

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Funkce komplexu exocyst v regulaci dynamiky průduchů
Function of Exocyst Complex in the Regulation of Stomata Dynamics

Bc. Matěj Röder

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Viktor Žárský, CSc.

Konzultanti: Mgr. Juraj Sekereš, RNDr. Michal Hála, Ph.D.

Praha, 2016

Tato diplomová práce byla vypracována v letech 2013 – 2016 na Katedře experimentální biologie rostlin Univerzity Karlovy v Praze pod vedením doc. RNDr. Viktora Žárského, CSc.

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

V Praze, 30. 4. 2016

Podpis

Poděkování:

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Viktoru Žárskému, CSc. za vedení při práci a svým konzultantům Mgr. Juraji Sekerešovi a RNDr. Michalu Hálovi, Ph.D. za cenné rady. Také bych rád poděkoval Mgr. Ivanu Kulichovi, Ph.D. za veškerou poskytnutou pomoc.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory z projektu GAUK č. 1244214

OBSAH

1	Seznam zkratk	6
2	Abstrakt	7
3	Abstract	8
4	Úvod	9
5	Cíle práce	9
6	Přehled literatury	10
6.1	Průduchy	10
6.1.1	Turgor	10
6.1.2	Co ovlivňuje turgor	13
6.1.3	Dynamika cytoplazmatické membrány	14
6.1.4	Dynamika vakuoly a tonoplastu	17
6.2	Regulace průduchů	19
6.2.1	Abiotické faktory	19
6.2.2	Vliv hormonů	19
6.2.3	Vývoj průduchů	20
6.2.4	Ontogenické učení na ABA	21
6.3	Komplex exocyst	22
6.3.1	Role komplexu exocyst v rostlinných buňkách	24
6.3.2	Podjednotka exocystu EXO70	25
6.3.3	Dosud poznaný vliv komplexu exocyst na dynamiku svěracích buněk	27
7	Materiál a metody	29
7.1	Materiál	29
7.1.1	Seznam použitých chemikálií	29
7.1.2	Seznam použitých programů	29
7.1.3	Rostlinný materiál	30
7.2	Metody	30
7.2.1	Kultivace rostlin	30
7.2.2	Křížení <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
7.2.3	Izolace genomové DNA	31
7.2.4	Genotypovací PCR	32
7.2.5	Měření listové plochy	33
7.2.6	Měření počtu trichomů na listu	34
7.2.7	Měření neporušenosti kutikuly	34
7.2.8	Vysoušecí experiment	34

7.2.9	Příprava otiskových preparátů epidermis.....	35
7.2.10	Výpočet průduchové hustoty	35
7.2.11	Výpočet velikosti průduchů	35
7.2.12	Barvení ROS v listech.....	35
7.2.13	Pozorování dynamiky průduchů otevíraných světlem	37
7.2.14	Pozorování RFP-EXO70B1 a GFP-RIN4 při pohybech průduchů	37
8	Výsledky	39
8.1	Velikost listové plochy.....	39
8.2	Počet trichomů na listu.....	40
8.3	Neporušenost kutikuly	41
8.4	Vysoušecí experiment.....	41
8.5	Hustota průduchů	42
8.6	Velikost průduchů.....	43
8.7	Výskyt reaktivních forem kyslíku (ROS)	45
8.7.1	Celolistové zbarvení.....	45
8.7.2	Buněčná lokalizace ROS.....	47
8.7.3	Indukce tvorby ROS pomocí SHAM a KCN.....	48
8.8	Dynamika průduchů otevíraných světlem.....	49
8.9	Lokalizace EXO70B1 a RIN4 ve svěřacích buňkách	49
9	Diskuze	51
9.1	Rychlost vysoušení	51
9.2	Průduchový vzor	54
9.3	Synergismus mutací <i>exo70B1</i> a <i>sid2</i>	55
9.4	Dynamika průduchů.....	56
9.5	Kolokalizace EXO70B1 a RIN4 ve svěřacích buňkách.....	57
10	Souhrn.....	58
11	Seznam použité literatury.....	59

1 SEZNAM ZKRATEK

ABA	– kyselina abscisová
ANOVA	– Analysis of Variance
DAB	– 3,3'-diaminobenzidin
EDTA	– etylendiamintetraoctová kyselina
FAR	– fotosynteticky aktivní záření
FM1-43	– N-(3-Trietylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamin)Styryl)pyridinium dibromid
FRAP	– Fluorescence Recovery After Photobleaching
HEPES	– 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonová kyselina
HSD	– Honest Significant Difference
MES	– 2-(N-morfolino)etansulfonová kyselina
NASC	– The Nottingham Arabidopsis Stock Centre
Pe	– turgorový tlak v epidermálních buňkách
Pg	– turgorový tlak ve svěracích buňkách
ROS	– reaktivní formy kyslíku
SDS	– laurylsíran sodný
SHAM	– salicylhydroxamová kyselina
VAEM/TIRF	– Variable-Angle Epifluorescence Microscopy/Total Internal Reflection Fluorescence

2 ABSTRAKT

Průduchy jsou struktury v pokožce rostliny, které plochou své průduchové štěrbinou regulují propojení vnějšího a vnitřního prostoru rostliny. Na vývoji průduchového vzoru se podílí velké množství vnitřních a vnějších signálů.

Během průduchových pohybů prodělávají svěrací buňky značnou změnu svého objemu a povrchu. Protože roztažitelnost biologických membrán je výrazně omezena, tak tato změna plochy musí být kompenzována pohybem membránového materiálu v buňce. Většina tohoto pohybu se děje mezi endozomálními kompartmenty a cytoplazmatickou membránou.

Komplex exocyst je proteinový komplex zajišťující správné cílení sekretorických váčků do jejich místa určení na plazmatické membráně. Funkce tohoto komplexu je nezbytná pro mnoho buněčných procesů vyžadujících přesné zacílení sekrece.

Mutace v genu *Exo70B1* způsobuje odlišný vývoj průduchového vzoru, kdy u mutanta *exo70B1* se velikost průduchů liší v závislosti na kultivačních podmínkách mnohem více než u nemutantních rostlin. Protein EXO70B1 se také přímo podílí na dynamice průduchů, kdy mutant *exo70B1* má zpomalené otevírání průduchů na světle. Toto přímé zapojení je možno pozorovat i na proteinu EXO70B1 značeném fluorescenční sondou, který během průduchových pohybů mění svou lokalizaci. Žádný z těchto fenotypových projevů není způsoben akumulací kyseliny salicylové, protože dvojití mutanti *exo70B1/sid2* se v těchto podmínkách chovali shodně s mutantem *exo70B1*.

Proteiny EXO70E1 ani EXO70E2 nemají nezaměnitelnou funkci ani při vývoji průduchů, ani při průduchových pohybech, neboť mutanti *exo70E1*, *exo70E2* a ani jejich dvojitý mutant nevykazovali žádný mutantní fenotyp ve spojitosti s průduchy.

Při kultivaci za nestandardních podmínek *sid2* mutant vykazuje nestandardní růst na vysokém osvětlení, kdy jeho vzrůst je omezen v důsledku zvýšené tvorby ROS v buňkách.

Klíčová slova: komplex exocyst, svěrací buňky, průduchový vzor, průduchová dynamika, kyselina salicylová, *Arabidopsis thaliana*

3 ABSTRACT

Stomata are structures in plant epidermis which regulate contact between inner and outer environment of the plant by mediating their stomatal aperture. Many inner and outer signals contribute to the ontogenesis of the stomatal pattern.

Guard cells undergo significant change of volume and surface during stomatal movement. This change of surface must be compensated by intracellular trafficking of membrane material because biological membrane has limited elasticity. Most of this trafficking takes place between plasma membrane and endosomal compartments.

Complex exocyst is protein complex that ensures proper targeting of secretory vesicles to their destination on the plasma membrane. Function of this complex is essential for many cellular processes that require precise targeting of secretion.

Mutation in gene *Exo70B1* causes different development of the stomatal pattern. Plants with mutated *Exo70B1* differ in stomatal size depending on the cultivation conditions more than wild type plant. Protein EXO70B1 is also directly involved in stomatal dynamics because mutants *exo70B1* have retarded stomatal opening in response to light. This direct connection can be observed on the fluorescently labeled protein EXOB1 which significantly changes its localization during stomatal movements. None of these observed phenotypes is caused by accumulation of salicylic acid, as the double mutant *exo70B1/sid2* behaves identically as single mutant *exo70B1*.

Proteins EXO70E1 and EXO70E2 have distinctive function neither during stomatal development nor during stomatal dynamics. Mutants *exo70E1*, *exo70E2* and their double mutant have no observable change in stomatal phenotype.

Mutant *sid2* has shown dwarfed grow under the high light conditions. This is caused by elevated generation of ROS in cells.

Keywords: Exocyst complex, guard cells, stomatal pattern, stomatal dynamics, salicylic acid, *Arabidopsis thaliana*

4 ÚVOD

Průduchy jsou mikroskopické póry oddělující vnitřní prostor rostliny od okolí. Díky přesně regulovanému otevírání a zavírání průduchů je rostlina schopna regulovat příjem CO₂ a výdej H₂O, což je proces nezbytný pro přežití rostliny na souši. Na svěrací buňky působí mnoho vnějších a vnitřních signálů. Mezi tyto signály patří fytohormony, světlo, koncentrace plynů uvnitř i vně rostliny, ale i přítomnost patogenů. Svěrací buňky jsou schopny díky složité síti receptorů a kanálů na tyto signály odpovědět snížením nebo zvýšením turgoru, což díky jedinečné struktuře buněčné stěny vede k otevření nebo zavření průduchu.

Při těchto pohybech se mění povrch svěrací buňky až o 40 %. Cytoplazmatická membrána kvůli své omezené roztažnosti musí na tuto změnu reagovat přesně regulovanou endocytózou a exocytózou, při kterých je pohybováno velkým množstvím nejen membránových lipidů, ale také velkým množstvím membránových proteinů, z nichž některé se váží na interaktory exocyst komplexu.

Exocyst je proteinový komplex sloužící k zacílení a poutání sekretorických váčků putujících z endozomálních kompartmentů na plazmatickou membránu. Tento komplex je nezbytný pro veškerou polarizovanou exocytózu.

Podjednotka EXO70 se vyskytuje na cílové membráně a slouží jako cíl pro zbytek komplexu nacházejícím se na sekretorickém váčku. EXO70 je nejvíce zmnoženou podjednotkou komplexu exocyst v rostlinách a bylo ukázáno, že různé podjednotky mohou mít v buňce různé funkce.

5 CÍLE PRÁCE

- vytvořit různé kultivační podmínky vhodné pro pozorování případné změny fenotypu vlivem těchto podmínek
- analyzovat změnu průduchového vzoru a dynamiky svěracích buněk mutantů *exo70B1*, *exo70E1* a *exo70E2* a jejich dvojitého mutantu
- zjistit, jakým podílem se na případné změně podílí akumulace kyseliny salicylové, a to pomocí zakřížení mutantních linií, které prokáží změněný fenotyp, s mutanty *sid2* a *npr1*, které mají poruchu v syntetizující a signální dráze kyseliny salicylové
- připravit křížením rostliny, které by umožnily sledovat chování fluorescenčně značených bílkovin EXO70B1 a RIN4 při zavírání a otevírání průduchů

6 PŘEHLED LITERATURY

6.1 Průduchy

Průduchy jsou struktury v epidermis rostlin. Skládají se z průduchové štěrbin, kterou lemují pár svěřacích buněk, což jsou specializované epidermální buňky. V těsném kontaktu se svěřacími buňkami se nacházejí buňky podpůrné.

Funkcí průduchů je zprostředkovávat a regulovat kontakt apoplastického prostoru rostliny a okolní atmosféry. Tímto jsou schopny ovlivňovat látkovou výměnu plynů, zejména příjem CO_2 a výdej H_2O . To jsou procesy kritické pro fotosyntézu a transpiraci, které jsou nezbytné pro přežití rostliny. Pro životaschopnost rostliny je nutné, aby průduchy dokázaly vnímat velké množství signálů pocházejících nejen z rostliny, ale i z jejího okolí, a aby na tyto signály byly schopné vhodně zareagovat otevřením nebo zavřením průduchové štěrbin. Pro tuto svou schopnost integrovat velké množství signálů do jednotné odpovědi jsou průduchy, zejména svěřací buňky, v centru pozornosti mnoha vědeckých týmů již celá desetiletí (Schroeder et al., 2001). Navíc svěřací buňky nikdy neobsahují plazmodezmy, a tak veškerý přenos signálů a látek mezi průduchem a okolím musí probíhat přes plazmatickou membránu (Wille a Lucas, 1984).

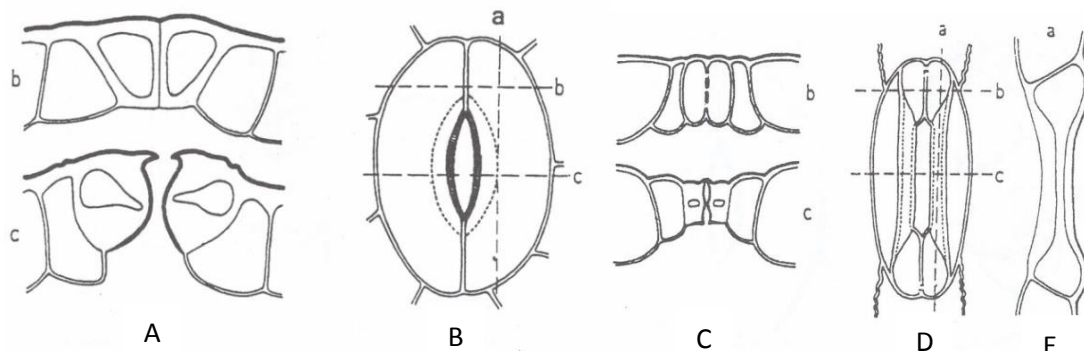
Otevírání a zavírání průduchové štěrbin je způsobováno změnou tvaru svěřacích buněk, která je zapříčiněna změnou turgoru uvnitř buněk a je umožněna specifickou stavbou buněčných struktur, zejména buněčné stěny a cytoskeletu. Na průduchových pohybech se však významně podílejí i cytoplazmatická membrána, vakuola, tonoplast a endosomální systém svěřacích buněk (Galatis a Apostolakos, 2004; Roelfsema a Hedrich, 2005; Pandey et al., 2007; Tanaka et al., 2007; Gao et al., 2009; Eisinger et al., 2012).

6.1.1 Turgor

Vodní potenciál je rozdíl mezi potenciální energií vodného roztoku na daném místě a potenciální energií čisté vody za stejných podmínek. Tento potenciál vyjadřuje tendenci vody k pohybu z jednoho místa na jiné, kdy voda má tendenci proudit z míst o vyšším potenciálu do míst s nižším (zápornějším) potenciálem. Hlavní složky vodního potenciálu na buněčné úrovni jsou osmotický a tlakový potenciál. Osmotický potenciál je tvořen rozpuštěnými látkami a obecně platí, že čím více rozpuštěných látek, tím negativnější je osmotický potenciál. Pokud bychom měli prostor ohraničený ideálně

elastickou semipermeabilní membránou (nekonečně roztažitelnou a nekladoucí žádný odpor k roztažení), mohli bychom zanedbat tlakovou složku vodního potenciálu. Kdyby uvnitř této membrány byl vodní potenciál nižší než v jejím okolí, docházelo by k toku vody dovnitř této membrány a ke zvětšování jejího vnitřního prostoru, dokud by nedošlo k vyrovnání osmotických potenciálů v důsledku naředění roztoku. Plazmatická membrána však ideálně roztažitelná není a v případě rostlinných buněk navíc tomuto roztažení brání i buněčná stěna a tlak vyvíjený okolními buňkami. Tyto mechanické bariéry se podílejí na tvorbě tlakového potenciálu, který působí proti osmotickému potenciálu, a tedy zvyšuje vodní potenciál buňky. Tlak, kterým takto působí cytoplazmatická membrána na buněčnou stěnu, se nazývá turgor a je důležitý jak pro rigiditu rostlinného těla, tak pro funkci a růst všech rostlinných buněk, včetně buněk svěřacích (Turner a Jones, 1980). Svěrací buňky mají fyziologický rozsah turgoru vyšší než jakékoliv jiné rostlinné buňky. Ten se může pohybovat v rozmezí 1 až 5 MPa (Franks et al., 1998; Franks et al., 2001). Udržení tak vysokého turgoru je možné pouze díky tomu, že svěrací buňky nejsou spojeny s okolím pomocí plazmodezmat a nedochází tedy k přenosu tlaků s okolními buňkami (Wille a Lucas, 1984).

Otevřenost průduchové štěrbině však nezávisí pouze na turgoru svěřacích buněk (P_g), ale i na turgoru okolních podpůrných epidermálních buněk (P_e). Obecně platí, že snížení P_g vůči P_e vede k uzavírání průduchové štěrbině a naopak zvýšení poměru P_g a P_e vede k jejímu otevírání. Pokud se však bude konstantě zvyšovat P_g i P_e povede to k uzavření štěrbině a naopak při stejném snížení P_g i P_e dojde k jejímu otevření, z čehož se dá vyvodit, že turgor podpůrných buněk je z mechanického hlediska důležitější než turgor buněk svěřacích (Glinka 1971; Edwards et al., 1976; Franks et al., 1998). I přes tuto mechanickou převahu podpůrných buněk pouze relativně málo rostlinných druhů (zejména trávy, u kterých se vyvinula odlišná anatomie průduchu – viz obr. 1) pracuje s turgorem podpůrných buněk a většina druhů ovlivňuje při procesu otevírání a zavírání průduchů pouze turgor svěřacích buněk (Raschke a Fellows, 1971; Shackel, 1987; Nonami et al., 1990).



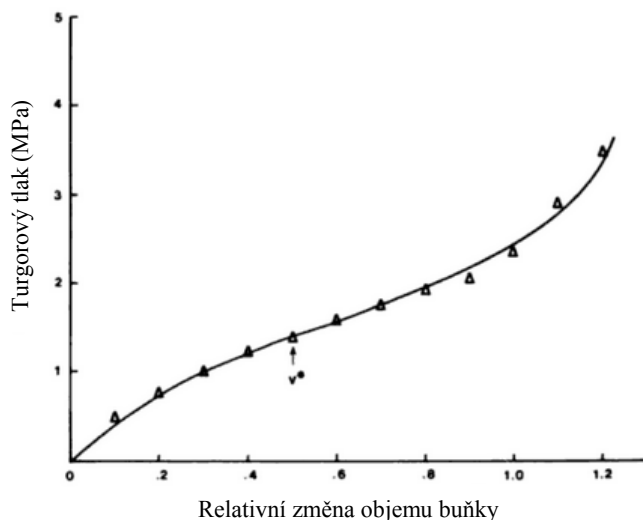
Obrázek 1: Stavba průduchu typ Amaryllis a Graminae

A – příčný řez průduchem typu Amaryllis v rovinách **b** a **c** vyznačených na **B**; **B** – pohled shora na průduch typu Amaryllis; **C** – příčný řez průduchem typu Graminae v rovinách **b** a **c** vyznačených na **D**; **D** – pohled shora na průduch typu Graminae; **E** - příčný řez průduchem typu Graminae v rovině **a** vyznačené na **D**

Převzato z Votrubová (1997), upraveno

Existují poměrně přesné modely závislosti objemu svěřacích buněk na turgoru buňky. Model nejlépe vystihující skutečnost považuje svěřací buňku za tenkostěnný objekt naplněný kapalinou. Navíc je v tomto modelu nezbytný přesný popis paprscitě uspořádaných celulóznic vláken, která jsou ve svěřacích buňkách uložena nerovnoměrně. Jejich největší koncentrace je na straně směřující dovnitř svěřací štěrbině a naopak nejnižší koncentrace je na vnější straně průduchu (Willie a Lucas, 1984).

Z přímých pozorování stomatálních pohybů doplněných o data z matematického modelu popsaného výše je zřejmé, že křivka závislosti objemu svěřací buňky na jejím turgoru má sigmoidní průběh se dvěma rozpoznatelnými fázemi (obr. 2). První fáze probíhá při nízkém tlaku a dochází k izotropnímu roztažení, kdy buněčná stěna se napíná rovnoměrně v tangenciálním i podélném směru. V druhé fázi, která probíhá za vyšších tlaků, se buňka roztahuje anizotropně, takřka výhradně v podélném směru, protože prstencovitě uspořádaná zesilující celulózová vlákna již dosáhla limitu své pružnosti. Zejména v této fázi dochází k otevření a uzavření průduchu (Sharpe et al., 1987).



Obrázek 2: Křivka závislosti objemu svěrací buňky na jejím turgoru
 v^* - bod ve kterém se dochází k přechodu z izotropního na anizotropní roztahování buňky
 Převzato z Sharpe et al. (1987), upraveno

6.1.2 Co ovlivňuje turgor

Při regulované změně turgoru hrají největší roli kationty K^+ a doprovodné anionty jako Cl^- a malát. Ve *Vicia faba* (Bob obecný) se turgor svěracích buněk při zavírání mění až o 300 mOsm za 30 minut. To je transportní kapacita iontů převyšující kapacitu jakékoliv jiné buňky v rostlinném těle (shrnutí v Blatt, 2000).

Hlavní kanály odpovědné za příjem K^+ iontů ve svěracích buňkách *Arabidopsis thaliana* jsou KAT1 (Nakamura et al., 1995), KAT2 (Pilot et al., 2001), AKT1 a AKT2/3 (Szyroki et al., 2001). Tyto kanály jsou navzájem částečně redundantní, neboť rostlina postrádající funkční kanál KAT1 nemá ovlivněnu stomatální dynamiku (Szyroki et al., 2001). Hlavní kanál podílející se na výtoky K^+ iontů ze svěrací buňky je GORK, což je homolog proteinu SKOR, který se vyskytuje pouze ve svěracích buňkách (Hosy et al., 2003).

Stejně důležité jako kanály na cytoplazmatické membráně jsou i kanály na tonoplastu, neboť vakuola zabírá až 90 % buňky, a tak většina osmoticky aktivních solutů musí kvůli zachování homeostázy zákonitě projít i tonoplastem (MacRobbie, 1995; MacRobbie, 1999). Tento transport zajišťuje rodina TPK kanálů (Gobert et al., 2007).

Významnou úlohu v ovlivňování turgoru však nehrají pouze ionty, ale i další osmoticky aktivní látky zejména cukry a produkty hydrolýzy škrobu, a to hlavně při večerní části denního cyklu (Talbot a Zeiger, 1993; Talbot a Zeiger, 1997). Při otevírání a zavírání průduchové štěrbině mění svěrací buňky svůj objem až o 300 % (Blatt et al., 1999) a povrch až o 40 % (Raschke, 1979). Tato změna povrchu se však samozřejmě neděje pouze na úrovni buněčné stěny, ale je třeba, aby došlo

k odpovídajícímu zmenšení nebo zvětšení povrchu cytoplazmatické membrány a k reorganizaci cytoskeletu a jiných vnitřních struktur, které se na tomto procesu podílejí (Galatis a Apostolakos, 2004; Roelfsema a Hedrich 2005; Tanaka et al., 2007). Změna povrchu plazmatické membrány nemůže být přičítána pouze elasticitě a reorganizaci již přítomného materiálu jako u buněčné stěny (Rui a Anderson, 2016), ale musí zde docházet i k přísunu nebo odběru membránového materiálu, neboť roztažnost plazmatických membrán je pouze 3 % (Wolfe a Steponkus 1983; Wolfe et al., 1986).

6.1.3 Dynamika cytoplazmatické membrány

Existují dvě nevylučující se hypotézy, které vysvětlují osud přebytečného a chybějícího materiálu na cytoplazmatické membráně u svěracích buněk zavírajících se, respektive otevírajících se průduchů.

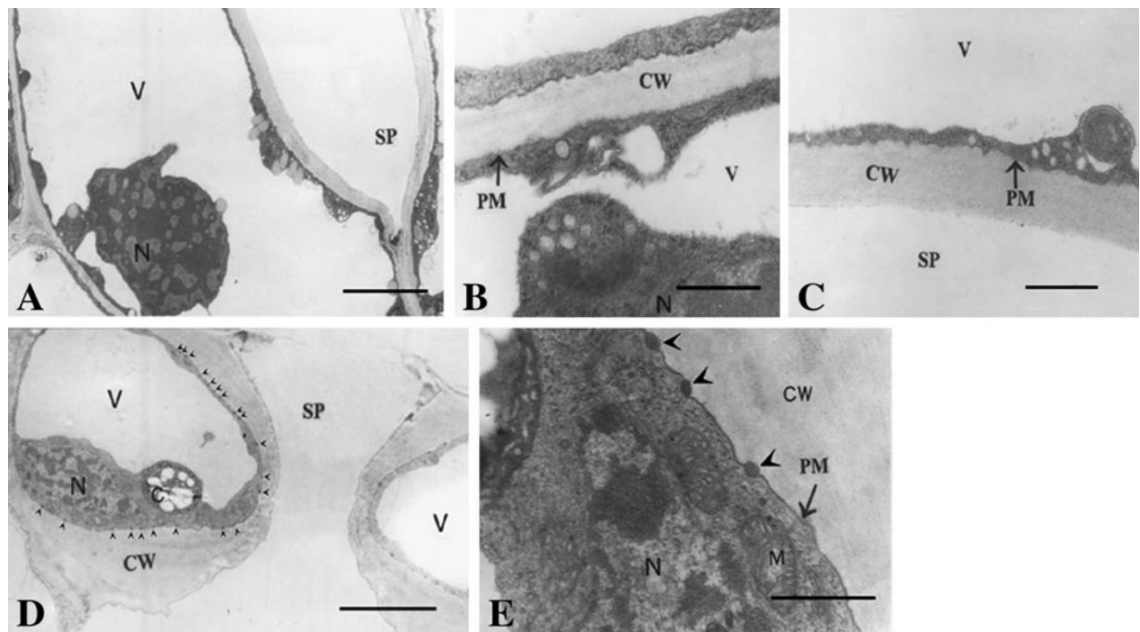
První hypotéza předpokládá vznik vychlípenin na plazmatické membráně, které jsou drženy proti vysokému turgoru pomocí rigidního proteinového lešení (Gordon-Kamm a Steponkus, 1984), kdežto druhá teorie předpokládá velké množství endocytických a exocytických událostí, které membránový materiál odvádějí dovnitř buňky ve formě malých váčků (Saxton a Breidenbach, 1988).

První pozorování cytoplazmatických membrán svěracích buněk *in vivo* bylo prováděno na protoplastech, u kterých nepřítomnost buněčné stěny usnadňuje vizualizaci membrán a umožňuje použití metody terčíkového zámku pro pozorování změny povrchu plazmatické membrány. Předpokládalo se, že i když je u protoplastů turgor nulový (neexistuje zde buněčná stěna, na kterou by cytoplazmatická membrána mohla vyvíjet tlak), tak vnímání vnitřního pnutí v cytoplazmatické membráně zůstane zachováno a stejně tak budou zachovány i mechanismy expanze, respektive smrštění cytoplazmatické membrány (Diekmann et al., 1993). Přestože se tyto předpoklady nakonec ukázaly jako mylné, neboť buněčná stěna je nedílnou součástí mechanismu fungování dynamiky cytoplazmatické membrány svěracích buněk (Li et al., 2010), přinesly pokusy na protoplastech některá významná zjištění. Ukázaly, že dochází k internalizaci membrán ve formě váčků do cytoplazmatického prostoru, a že tyto váčky spolu uvnitř buněk nefúzí a nefúzí ani s jinými buněčnými kompartmenty, ale tvoří v konfokálním mikroskopu rozlišitelný endosomální pás ve vzdálenosti 1 μm od cytoplazmatické membrány (Diekmann et al., 1993; Kubitschek et al., 2000). Také bylo ukázáno, že endocytovaná membrána nemá náhodné složení, ale dochází zde

k cílenému vycytávání některých membránových proteinů, například draselných kanálů KAT1 (Hurst et al., 2004; Sutter et al., 2007).

S rozvojem konfokální a superresoluční mikroskopie se začalo upouštět od pokusů s protoplasty a přešlo se na pokusy, které byly prováděny na sloupnuté epidermis anebo na celých listových řezech. Tyto pokusy dokázaly lépe vystihnout vzájemné ovlivnění funkce buněčné stěny, cytoplazmatické membrány, endosomálních kompartmentů, tonoplastu a vakuoly na dynamice svěřacích buněk (Gao et al., 2005; Tanaka et al., 2007; Li et al., 2010).

Li et al. (2010) na řezech z elektronového mikroskopu ukázali, že u intaktních svěřacích buněk plně otevřených průduchů jsou tonoplast i cytoplazmatická membrána hladké bez jakýchkoliv viditelných záhybů ve všech pozorovaných oblastech buňky (viz obr. 3).



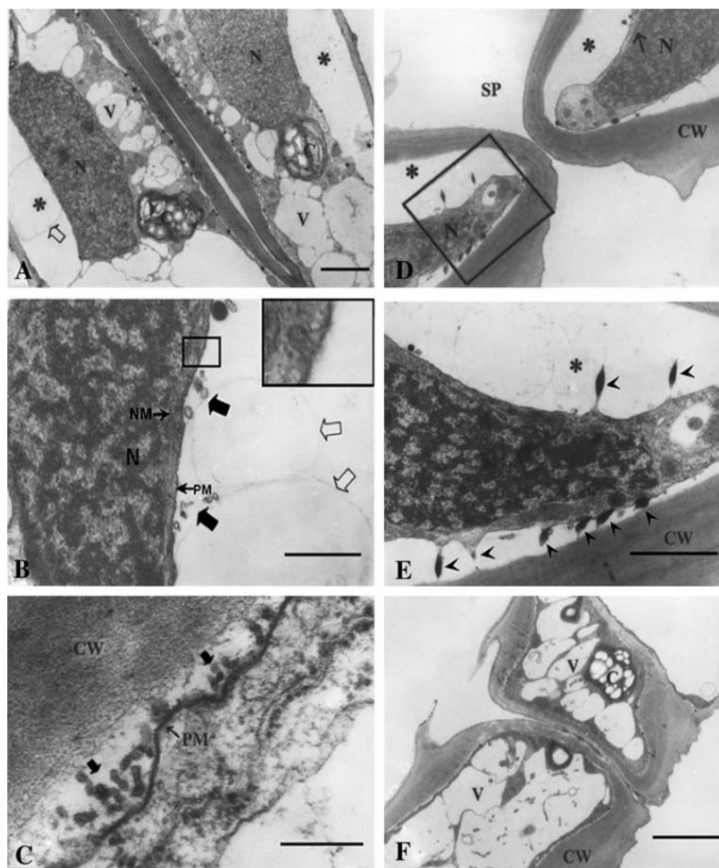
Obrázek 3: Obrázek průřezu svěřací buňky otevřeného průduchu z TEM. (A) Podélný průřez. Úsečka = 3 μm . (B) Podélný průřez na zadní straně. Šipka ukazuje plazmatickou membránu. Úsečka = 0,5 μm . (C) Podélný průřez na straně průduchové štěrbin. Šipka ukazuje plazmatickou membránu. Úsečka = 0,5 μm . (D) Příčný průřez. Úsečka = 4 μm . (E) Příčný průřez na vnitřní straně. Šipka ukazuje plazmatickou membránu. Úsečka = 0,1 μm .

V – vakuola; N – jádro; SP – průduchová štěrbin; CW – buněčná stěna; PM – cytoplazmatická membrána; M – mitochondrie

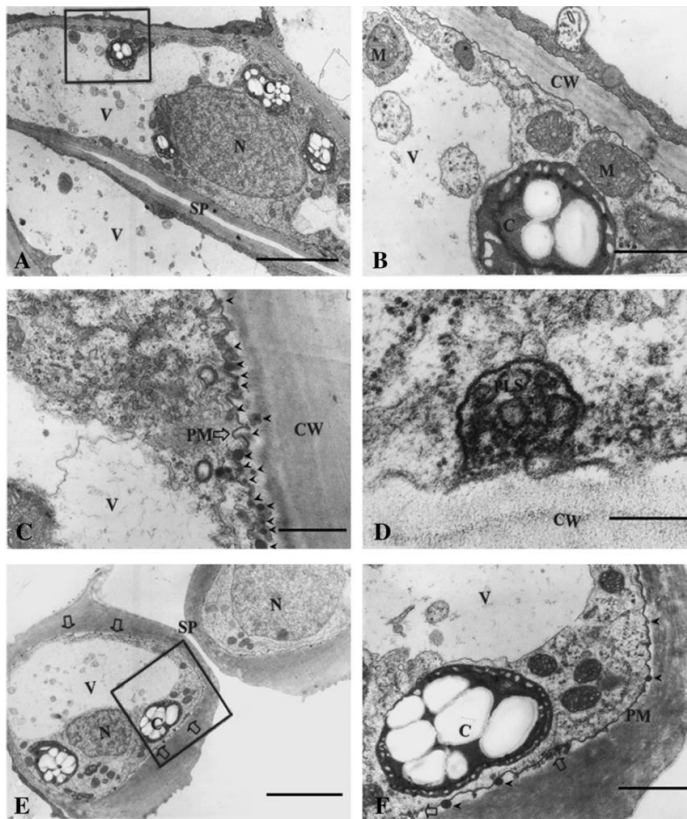
Převzato z Li et al. (2010)

Svěrací buňky, které byly zavřeny za pomoci ABA nebo zvýšené koncentrace CO₂, což je rychlý proces trvající 30 minut až 1 hodinu, vykazovaly velký počet exocytických i endocytických váčků, cytoplazmatická membrána byla na zadní straně plazmolýzovaná a na vnitřní straně (směřující do průduchové štěrbině), kde se plazmolýza neobjevila a cytoplazmatická membrána byla stále pevně spojena s buněčnou stěnou, byla silně zvrásněná. Stejně tak tonoplast byl silně zvrásněný a vakuola se v řezech jevila fragmentovaná (viz obr. 4).

Naproti tomu svěrací buňky průduchů zavřených denním rytmem, což je proces velmi pomalý, trvající několik hodin, měly cytoplazmatickou membránu silně zvrásněnou a místy se objevovaly invaginace směřující do cytoplazmy. Exocytické váčky se zde vyskytovaly mnohem méně a měly organizovanější strukturu. Vakuola těchto svěracích buněk byla nefragmentovaná, avšak s viditelnými invaginacemi tonoplastu (viz obr. 5).



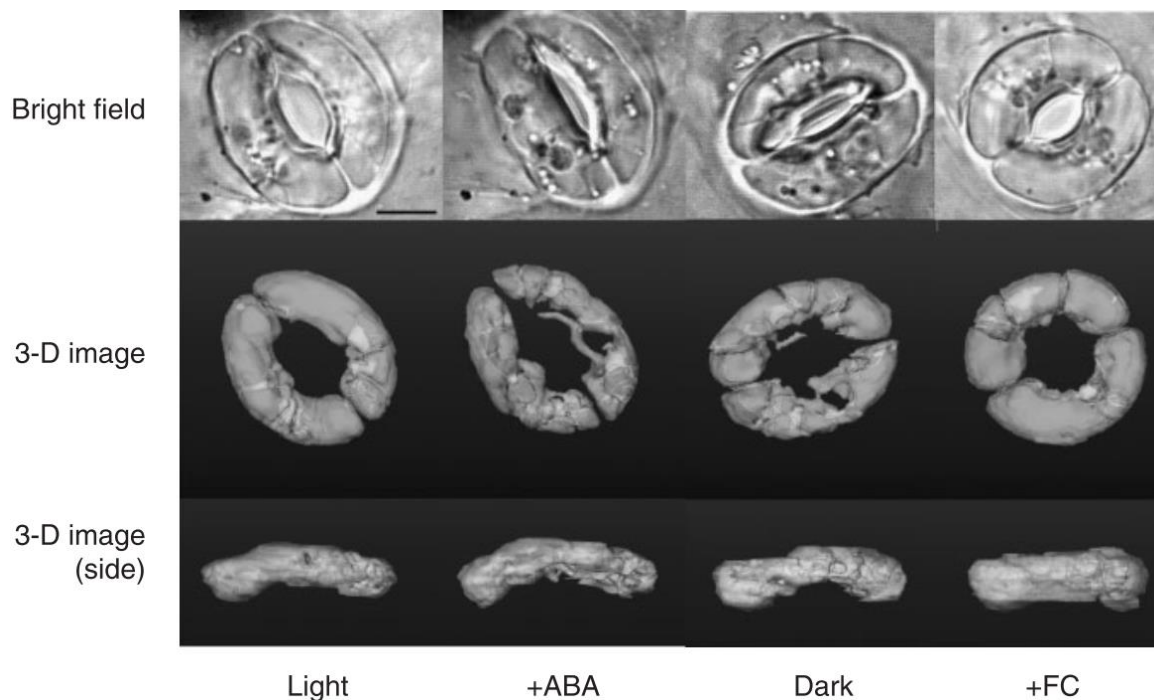
Obrázek 4: Průřez svěrací buňky průduchu uzavřeného zvýšenou koncentrací CO₂ z TEM.
 (A) Podélný průřez. Úsečka = 2 μm
 (B) Zvětšený rámeček obrázku A. Podélný průřez ukazující silně plazmolýzovanou oblast. Velké prázdné šipky ukazují velké váčky a velké plné šipky ukazují malé váčky vně CM. V pravém horním rohu je zvětšená zarámovaná oblast ukazující endocytózu. Úsečka = 0,25 μm
 (C) Podélný průřez na vnitřní straně ukazující velké množství váčků exocytických struktur. Úsečka = 0,05 μm
 (D) Příčný průřez. Úsečka = 2 μm
 (E) Zvětšený rámeček z obrázku D. Příčný průřez. Úsečka = 0,15 μm
 (F) Příčný průřez v centrální části, kde plazmolýza neprobíhá. Úsečka = 2 μm
 V – vakuola; N – jádro; SP – průduchová štěrbin; CW – buněčná stěna; PM – cytoplazmatická membrána; PLS – plazmalemazom; M – mitochondrie; * – plazmolýzovaná oblast
 Převzato z Li et al. (2010)



Obrázek 5: Průřez svěrací buňky průduchu uzavřeného denním rytmem z TEM. (A) Podélný průřez. Úsečka = 2 µm (B) Zvětšený rámeček obrázku A. Podélný průřez. Úsečka = 0,15 µm (C) Podélný průřez na ventrální straně. Šipka ukazuje plazmatickou membránu. Úsečka = 0,5 µm (D) Velmi zvětšený podélný řez na zadní straně ukazující plazmalemazom. Úsečka = 0,05 µm (E) Příčný průřez. Šipky ukazují shluky exocytických struktur mimo CM. Úsečka = 2 µm (F) Zvětšený rámec z obrázku E. Příčný průřez. Šipka ukazuje shluk exocytických struktur mimo CM. Úsečka = 0,25 µm
 V – vakuola; N – jádro; SP – průduchová štěrбина; CW – buněčná stěna; PM – cytoplazmatická membrána; PLS – plazmalemazom; M – mitochondrie
 Převzato z Li et al. (2010)

6.1.4 Dynamika vakuoly a tonoplastu

Není překvapivé, že vakuola, vzhledem k tomu, že může zabírat až 90 % objemu plně vyvinuté svěrací buňky, hraje důležitou úlohu pro dynamiku průduchů. Její mechanická a signalizační funkce byly popsány již dávno (shrnuto v Blatt, 2000), ale jakou úlohu při stomatálních pohybech hraje tonoplast se podařilo odkrýt až relativně nedávno. Gao et al. (2005) pozoroval v rovinných řezech vysokou fragmentaci vakuoly, vznik tonoplastových invaginací a tvorbu trans-vakuolárních membrán. Při opětovném otevření průduchu a zvětšení objemu svěrací buňky došlo k vymizení těchto struktur. Při pokusu s řízeným rozkládáním fluorescein diacetátu, který selektivně barví vakuoly (tzv. fotobleaching), však vyšlo najevo, že i když se v rovinném řezu vakuola svěrací buňky zavřeného průduchu jeví jako rozdělená na několik menších, tak tyto jsou spolu stále spojeny v jeden nerozdělený prostor. To bylo potvrzeno při vytvoření 3D struktury (viz obr. 6) vakuoly svěracích buněk otevřených i zavřených průduchů (Kutsuna a Hasezawa, 2005). Vakuoly při zavření průduchu zmenší svůj objem o 40 %, avšak jejich povrch se zvětší až o 20 % (Tanaka et al., 2007). Ve svěracích buňkách zavřených průduchů sice byly pozorovány i vakuolám podobné váčky, které nebyly spojeny s vakuolárním komplexem, avšak tyto mizely ihned po zahájení otevírání průduchu (Gao et al., 2009).



Obrázek 6: 3D rekonstrukce vakuol svěracích buněk. Úsečka = 5 μm
Převzato z Tanaka et al. (2007)

Tanaka et al. (2007) při porovnání 3D modelu svěracích buněk otevřeného a zavřeného průduchu také ukázal, že tonoplast se zvětší o zhruba stejný povrch, o jaký se zmenší cytoplazmatická membrána, kdežto povrch membrán obsažených v endozomálních kompartmentech se nijak výrazně nezmění a zůstane přibližně 45 % veškerého membránového materiálu obsaženého v buňce. Vzhledem k tomu, že bylo mnohokrát dokázáno, že cytoplazmatická membrána svěracích buněk se při stomatálních pohybech nikdy nemísí s tonoplastem (Diekmann et al., 1993; Kubitschek et al., 2000; Gao et al., 2005; Tanaka et al., 2007) a že endoplazmatické retikulum prochází velkou strukturální změnou (Kubitschek et al., 2000; Higaki et al., 2012), dá se předpokládat, že tonoplast je sice místo, kde je přebytečný membránový materiál v sevřených svěracích buňkách uložen, ale že tento materiál pochází z endozomálních kompartmentů, které zase přijímají přebytečný membránový materiál z cytoplazmatické membrány. Tomu by nasvědčoval i fakt, že rostlina mutantní ve funkci proteinu SYP22, což je SNARE protein nacházející se na membráně pozdního endozomu a tonoplastu (Uemura et al., 2002; Rojo et al., 2003; Carter et al., 2004) má výrazně sníženou rychlost otevírání průduchů (Gao et al., 2005).

6.2 Regulace průduchů

Jak již bylo řečeno, rostlina pomocí průduchů reguluje kontakt svého mezibuněčného prostoru s okolím a z tohoto důvodu musí svěřací buňka odpovídat na mnoho vnějších i vnitřních stresových podnětů, aby zachovala životaschopnost rostliny v neustále se měnících podmínkách.

6.2.1 Abiotické faktory

Při stresu suchem dochází k uzavření průduchů, avšak buňka není uzavřena tím, že ji samotnou vnější podmínky vysuší, ale přijímá signály z jiných částí rostliny, hlavně kyseliny abscisovou, zejména z vysoušejících se kořenů, které ji přimějí snížit svůj turgor a tím se zavřít (Chaves et al., 2002). Stres teplem, za předpokladu že má rostlina dost vody vede naopak k otevření průduchů a umožnění výraznější transpirace, která rostlinu ochladí a předejde se tak poškození fotosyntetického aparátu. Pokud dojde ke kombinaci stresu horka a sucha, tak rostlina v extrémních případech otevře průduchy a obětuje vodu ve snaze ochránit se před přehřátím (Reynolds-Henne et al., 2010). V přítomnosti vysoké koncentrace CO₂ dochází k přivírání průduchů a naopak v nízkých koncentracích CO₂ dochází k jejich otevírání (Hashimoto et al., 2006). Intenzita a spektrum dopadajícího světla mají také vliv na otevřenost průduchů. Zde hrají roli zejména modré světlo, které způsobuje hyperpolarizaci plazmatické membrány a následný vtok iontů (Eckert a Kardenhoff, 2000). Toto modré světlo je vnímáno kryptochromy a fototropiny (Kang et al., 2009). Vliv na otevřenost průduchů má i fotosynteticky aktivní záření, díky kterému se v chloroplastech svěřacích buněk tvoří osmoticky aktivní látky (Talbot a Zeiger, 1993).

6.2.2 Vliv hormonů

6.2.2.1 Kyselina abscisová (ABA)

Kyselina abscisová se produkuje zejména v dehydratovaných kořenech, a ABA se následně xylémem rozvádí do celé rostliny. Ve svěřacích buňkách spouští několik fyziologických procesů, jako například zvýšení cytosolického pH (Irving et al., 1992), vtok Ca²⁺ iontů (Pei et al., 2000), produkci reaktivních forem kyslíku (Pei et al., 2000) a syntézu oxidu dusnatého (Bright et al., 2006). Tyto procesy vedou v konečném důsledku k otevření iontových kanálů a odtoku K⁺, Cl⁻ a malátových iontů mimo svěřací buňky, čímž se sníží turgor a dojde k uzavření průduchu (Li et al., 2006).

6.2.2.2 Auxin

Nízká koncentrace auxinu působí pozitivně na otevírání průduchů, neboť vede k aktivaci H^+ ATPáz na cytoplazmatické membráně, což vede k hyperpolarizaci membrány a příjmu K^+ kationtů. Vysoká koncentrace auxinu naopak vede k uzavírání průduchů, neboť vede k aktivaci výstupních K^+ kanálů. Navíc bylo prokázáno, že nízké koncentrace auxinu působí antagonisticky na zavření průduchu způsobeného přítomností ABA (Acharya a Assmann, 2009).

6.2.2.3 Cytokininy

Zvýšená hladina cytokininů vede k otevírání průduchů a snižuje citlivost svěřacích buněk k ABA, neboť cytokininy snižují množství H_2O_2 a NO ve svěřacích buňkách. Vysoušecí stres vede k snížení hladiny cytokininů v rostlině (Acharya a Assmann, 2009).

6.2.2.4 Jasmonáty

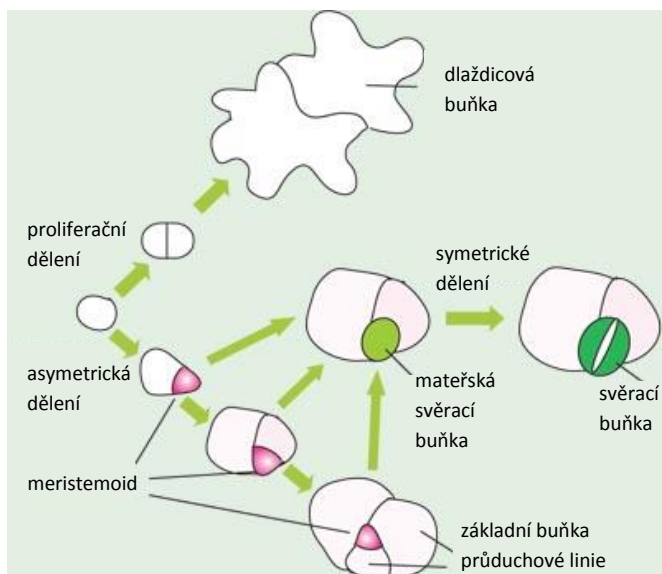
Zvýšená hladina metyljasmonátu vede k uzavírání průduchů (Irving et al., 1997). Toto zavírání má mnoho podobných znaků jako zavírání pomocí ABA, neboť také vede k zvýšení cytosolického pH, tvorbě kyslíkových radikálů (ROS) v chloroplastech a vtoku Ca^{2+} iontů do cytoplasmy (Suhita et al., 2004; Islam et al., 2010). Působení jasmonátů je však obtížné rozlišit od působení ABA, neboť přítomnost jednoho hormonu ve svěřací buňce vede k endogenní produkci druhého hormonu (Hossain et al., 2011).

6.2.2.5 Kyselina salicylová

Přítomnost kyseliny salicylové ve svěřací buňce vede k produkci superoxidových radikálů O_2^- , jejichž přítomnost vede k uzavření průduchu. Toto uzavírání je inhibováno přítomností superoxid dismutázy i v přítomnosti salicylhydroxamové kyseliny (Mori et al., 2001).

6.2.3 Vývoj průduchů

Vznik průduchů se děje v důsledku řady kontrolovaných dělení epidermálních buněk, charakteristických sérií asymetrických dělení, která je zakončena jedním dělením symetrickým (viz obr. 7). Molekulární podstata regulace procesu vedoucího až ke vzniku páru svěřacích buněk je zkoumána již dlouhou dobu a je poměrně dobře známa (shrnuto v Simmons a Bergmann, 2016). Stále však není dostatečně známo, jakým podílem se jednotlivé mechanismy účastní regulace vzniku průduchového vzoru.

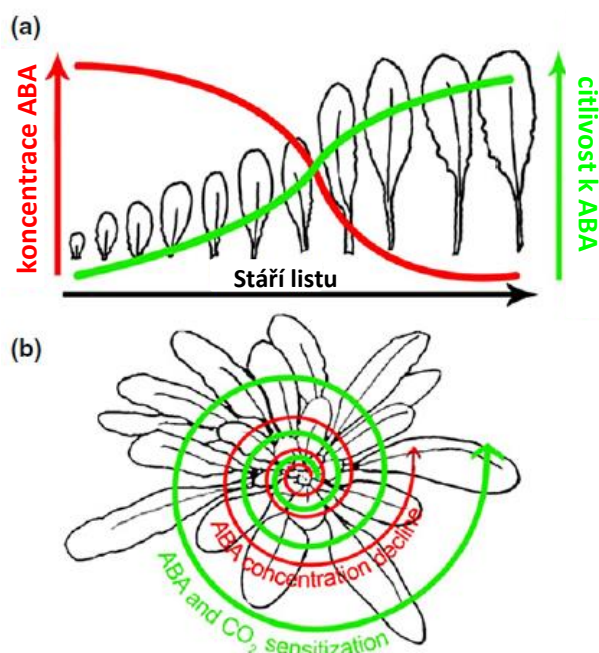


Obrázek 7: Vývoj svěracích buněk převzato z Torii et al. (2006), upraveno

Je dokázáno, že kritickou úlohu pro průduchový vzor mají signály přicházející k mladým listům z listů starších. Co je podstatou tohoto signálu je však stále nejasné, ale předpokládá se, že by se mohlo jednat o kyselinu abscisovou a o obsah isotopu ^{13}C v asimilátech přicházejících do listu (Lake a Woodward, 2008; Sekiya a Yano, 2008; Šantrůček et al., 2014). Mezi externí stimuly, které ovlivňují vývoj průduchů, patří množství a spektrální složení světla (Salisbury, 1928; Casson et al., 2009). Nutno však poznamenat, že se nejedná o světlo dopadající na vznikající listy, ale na listy starší (Schoch et al., 1980; Thomas et al., 2004). Dalším důležitým činitelem řídícím stomatální hustotu je externí koncentrace CO_2 , kdy zvýšená koncentrace vede ke snížení průduchové hustoty (Woodward a Kelly, 1995). Stejně jako u světla bylo ukázáno, že není rozhodující koncentrace CO_2 v okolí vznikajících listů, ale koncentrace v okolí listů starších (Lake et al., 2001). Mezi další známé faktory ovlivňující stomatální vzor patří vlhkost (Bakker, 1991), teplota (Fraser et al., 2009), dostatek fosforu (Sekiya a Yano, 2008) a dusíku (Yan et al., 2012). Výsledky Šantrůčka et al. (2014) naznačují, že hlavním faktorem, který má vliv na výslednou stomatální hustotu, je koncentrace CO_2 v mezibuněčném prostředí rostliny a většina faktorů zmíněných výše pouze upravuje tuto koncentraci.

6.2.4 Ontogenické učení na ABA

Jak již bylo popsáno výše, kyselina abscisová je rostlinný hormon, který hraje významnou úlohu v regulaci otevřenosti průduchů a také v tvorbě průduchového vzoru. V posledních letech se však ukázalo, že hraje i nezastupitelnou úlohu v naučení mladých svěracích buněk reagovat na podněty v okolí (Pantin et al., 2013).



Obrázek 8: Vývoj listu a vliv koncentrace ABA na citlivost svěřacích buněk
Převzato z Chater et al. (2013), upraveno

Již dlouhou dobu bylo známo, že nově vznikající listy mají vysokou hladinu ABA, a přesto jejich průduchy jsou zcela otevřené (Jordan et al., 1975). Svěřací buňky těchto průduchů jsou necitlivé na ABA, ačkoliv epidermální buňky, ze kterých se mohou tvořit svěrací buňky, na ABA citlivé jsou, což umožňuje kyselině abscisové ovlivňovat průduchový vzor (Tanaka et al., 2013). Svěřací buňky se stávají citlivými k ABA až v okamžiku, kdy hladina kyseliny abscisové v rostoucím listu výrazně poklesne (viz obr. 8). Tento pokles také vyvolává zvýšenou citlivost svěracích buněk vůči jiným podnětům z okolního prostředí, jako je například koncentrace CO₂ a intenzita a spektrální složení světla (Pantin et al., 2013).

6.3 Komplex exocyst

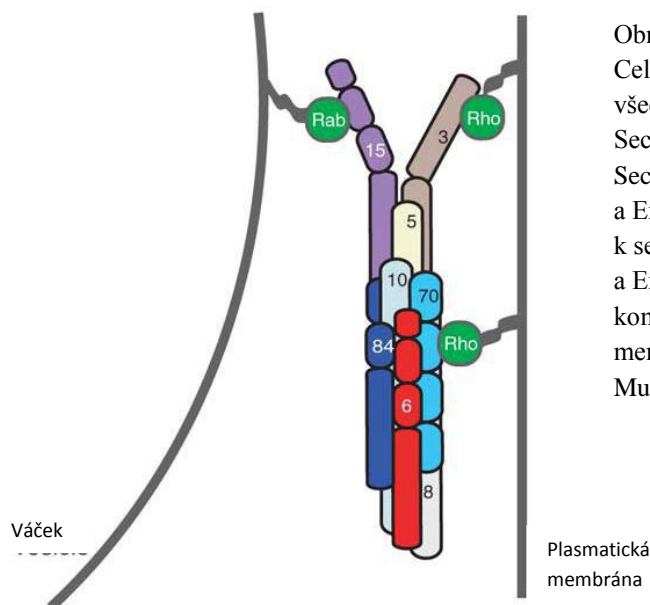
Váčkový transport je vysoce regulovaný proces. Samotné správné spojení sekretorického váčku s cílovou membránou je úlohou proteinů rodiny SNARE. Před tímto procesem je však třeba zajistit uchycení sekretorického váčku na cílovém místě velmi blízko membrány pomocí poutacích komplexů. Těchto poutacích komplexů bylo zatím v eukaryotických buňkách objeveno několik, každý zprostředkovává transport mezi jinými kompartmenty. Mezi objevené poutací komplexy patří například COG, Ds11p, GARP, HOPS, TRAPP a exocyst (Whyte a Munro, 2002; Lynch-Day et al., 2010). Z výše uvedených je pravděpodobně nejlépe prostudován exocyst. Jedná se o evolučně velmi konzervovaný bílkovinný komplex, který lze najít v takřka všech

eukaryotických organismech a jeho úlohou je zajišťování správného zacílení sekretorických váčků na plazmatickou membránu (Munson a Novick, 2006).

Exocyst byl jako první popsán u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* při analýze *sec* mutantů, které mají poruchu v sekretorické dráze. Ukázalo se, že šest těchto mutantů (*Sec3p*, *Sec5p*, *Sec6p*, *Sec8p*, *Sec10p* a *Sec15p*) je mutantních v proteinech, které společně s nově objeveným proteinem *Exo70* tvoří heterooligomerní komplex nazvaný exocyst (TerBush et al., 1996). Rok po tomto objevu byla při analýze savčího komplexu exocyst objevena i poslední jednotka komplexu *Exo84* (Kee et al., 1997). S odstupem byly objeveny homology všech podjednotek komplexu i u rostlin (Cvrčková et al., 2001, Eliáš et al., 2003). A dále Hála et al. (2008) dokázali existenci celého komplexu exocyst u *Arabidopsis thaliana* a u *Nicotiana tabacum*.

Boyd et al. (2004) ve své práci na kvasinkovém komplexu pomocí imunoelektronové mikroskopie a FRAP ukázali, že šest z osmi podjednotek komplexu exocyst přichází na místo exocytózy společně se sekretorickým váčkem. Jedinými výjimkami jsou *Sec3* a *Exo70*, které jsou asociovány s plazmatickou membránou. Pomocí těchto výsledků a analýzy interakcí mezi jednotlivými podjednotkami byl vypracován model (obr. 9), který předpokládá, že jádro komplexu exocyst tvoří proteiny *Sec6*, *Sec8* a *Sec10*, zatímco *Sec5*, *Sec15*, *Exo84* jsou na okraji komplexu, kde zprostředkovávají vazbu k membráně váčku a jiným regulačním proteinům, jako jsou např. RAB GTPázy. *Exo70* a *Sec3* jsou za pomoci lipid vazebních domén navázány na fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát v plazmatické membráně, kde fungují jako kotva pro zbytek komplexu (Pleskot et al., 2015). Tyto dvě podjednotky jsou regulovány za pomoci Rho GTPáz (Munson a Novick, 2006). K samotnému poutání sekretorického váčku k plazmatické membráně dochází prostřednictvím sestavení celého komplexu dohromady (Munson a Novick, 2006; Cvrčková et al., 2012).

Rostliny mají, na rozdíl od kvasinek, některé podjednotky komplexu exocyst ve svých genomech zmnoženy. Například genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje po dvou kopiích *SEC3*, *SEC5*, *SEC10*, *SEC15*, tři kopie *EXO84* a 23 kopií *EXO70* a jedinými nezmnoženými podjednotkami u *A. thaliana* jsou *SEC6* a *SEC8* (Eliáš et al., 2003; Cvrčková et al., 2012; Vukasinovic et al., 2014).



Obrázek 9: Model komplexu exocyst
 Celý komplex exocyst vznikne při spojení všech svých osmi podjednotek dohromady. Sec5 (žlutá), Sec6 (červená), Sec8 (bílá), Sec10 (světle modrá), Sec 15 (fialová) a Exo84 (tmavě modrá) jsou vázány k sekretorickému váčku, kdežto Sec3 (hnědá) a Exo70 (tyrkysová) jsou před dokončením komplexu přítomné na plasmatické membráně.
 Munson a Novick (2006), upraveno

6.3.1 Role komplexu exocyst v rostlinných buňkách

Polarizovaná exocytóza je klíčová pro funkci a růst mnoha rostlinných buněk a není proto překvapením, že první dokázanou funkcí komplexu exocyst u rostlin bylo umožnění růstu pylové láčky, která vyžaduje vysokou organizovanost polarizované sekrece. Toto bylo dokázáno u rostlin *Arabidopsis thaliana*, které byly mutantní v genu SEC8, kdy pylová láčka těchto mutantů ztratila schopnost apikálního růstu (Cole et al., 2005). Další fenotypový projev poškození exocystu byl pozorován u rostlin kukuřice (*Zea mays*) defektní v genu Rth1 (Roothairless1), což je homolog genu SEC3. Fenotypový projev této mutace spočívá v absenci kořenových vlásků, ačkoliv dochází k jejich správné diferenciaci, což naznačuje problém s polarizovaným růstem, ne nepodobným tomu, který se vyskytuje u pylové láčky mutantu sec8 rostlin *Arabidopsis thaliana* (Wen et al., 2005). Také u mutantů sec5, sec6 a sec15a rostliny *Arabidopsis thaliana* byl objeven defekt klíčení pylové láčky podobný tomu, jež se objevuje u mutantů sec8 (Synek et al., 2006). Záhy byly objeveny další projevy mutace podjednotek komplexu exocyst. U rostlin sec8, které byly komplementovány genem SEC8 řízeným pylově specifickým promotorem LAT52, což odstranilo pylovou sterilitu, ale zachovalo mutantní fenotypový projev sporofytu, bylo objeveno, že Sec8 se účastní cytokineze a mutant v tomto proteinu vykazuje narušený růst hypokotylu (Synek et al., 2006). Sec8 se také účastní tvorby pektinové vrstvy v buněčné stěně vulkanických buněk na povrchu semen *Arabidopsis*. Stejněho procesu se účastní i Exo70A1 (Kulich

et al., 2010). Mutant v genu EXO84b vykazuje silné narušení cytokineze, které vede k trpasličímu vzrůstu a tvarově narušeným listům a epidermálními buňkám. Podobný, avšak ne tak silný fenotypový projev má i mutant *exo70A1*. Obě tyto mutantní rostliny vykazují zvýšený počet exocytických váček v cytoplazmě (Fendrych et al., 2010). Komplex exocyst je důležitý také pro recyklaci PIN proteinů, jež se podílejí na tvorbě auxinového gradientu. Bylo ukázáno, že PIN1 a PIN2 u mutantů *exo70A1* a *sec8* mají signifikantně zpomalené přemísťování na plazmatickou membránu po ošetření Brefeldinem A, což je laktonový derivát, který inhibuje COPI transport (Drdová et al., 2013). Dále bylo pomocí fluorescentně značených proteinů *Exo70A1*, *Sec6*, *Sec8*, *Sec15b* a *Exo84b* dokázáno, že komplex exocyst se účastní tvorby buněčné přepážky při dělení buněk (Fendrych et al., 2010). Při vizualizaci podjednotek *SEC6*, *SEC8*, *EXO70A1* a *EXO84b* komplexu exocyst pomocí metody VAEM/TIRF se ukázala vysoká dynamika komplexu. Podjednotky kolokalizují za vzniku rozlišitelných bodů v sekretoricky aktivních oblastech plazmatické membrány. Takto vzniklý komplex se odpojoval od membrány s poločasem deset sekund. Tyto tečky jsou nezávislé na cytoskeletu a nepřekrývají se s markery endocytózy. Exocyst často kolokalizoval se sekretorickými váčky značenými *VAMP721-GFP*, avšak nacházel se i v místech bez váček. Mutant *exo70A1* měl výrazně redukován výskyt komplexu exocyst na plazmatické membráně a ve spojitosti s tím i výrazně zpomalenou exocytózu. Tyto výsledky ukazují na to, že komplex exocyst neustále rotuje mezi cytoplazmou a plazmatickou membránou a tím zajišťuje odvod sekretorických váček na plazmatickou membránu (Fendrych et al., 2013).

6.3.2 Podjednotka exocystu EXO70

Podjednotky *EXO70* a *SEC3* u kvasinek jsou obě součástí membránové domény komplexu exocyst, avšak práce Zhang et al. (2013) ukázala, že *SEC3* u *Arabidopsis* má stejnou dynamiku jako ostatní podjednotky komplexu a naznačuje, že se nejedná o membránově vázaný protein, což by z podjednotky *EXO70* činilo jedinou podjednotku vázanou na cílovou membránu, a tedy klíčovou část komplexu exocyst. Co podporuje toto tvrzení o klíčové části je i fakt, že u suchozemských rostlin došlo k jejich množení, které nelze pozorovat u žádné jiné skupiny organismů. U *Vitis vinifera* se nachází 15 homologů, u *Arabidopsis* se nachází 23 homologů *EXO70*, což je více než všech homologů všech zbývajících podjednotek komplexu exocyst dohromady, a u *Oriza sativa* se nachází dokonce 47 homologů *EXO70* (Cvrčková et al., 2012).

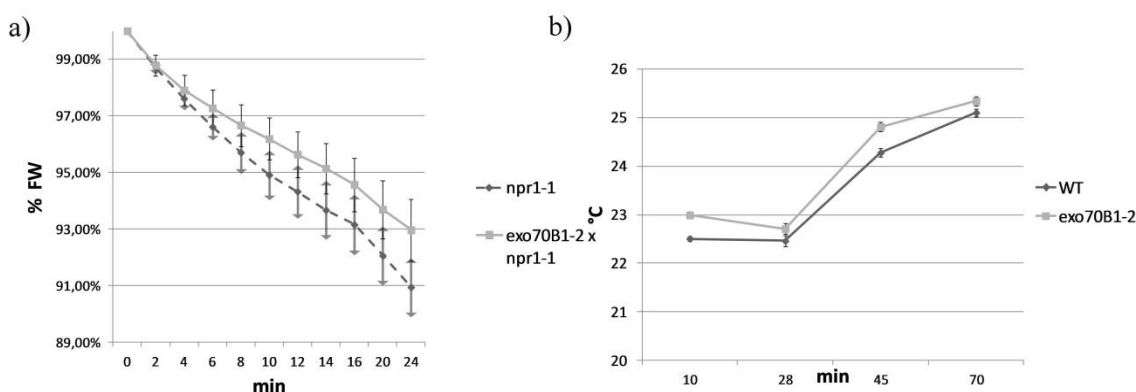
Navíc podjednotka EXO70 interaguje s Rho GTPázami, což umožňuje její přesnou regulaci (Robinson et al., 1999; He et al., 2007). Určitou dobu nebylo jasné, zda funkce těchto homologů byly redundantní nebo došlo ke specializaci jednotlivých homologů. Dnes se však objevuje čím dál více důkazů, které ukazují, že různé homology EXO70 mohou zastávat různé funkce v buňce (Žarský et al., 2009; Kulich et al., 2013, 2015). Nejčastěji se vyskytující paralog EXO70 u *Arabidopsis* je paralog EXO70A1, který se vyskytuje ve všech pletivech s výjimkou samčího gametofytu a jeho defekt vede, jak již bylo popsáno výše, k narušení cytokineze, trpasličímu fenotypu, takřka úplné sterilitě a jiným poruchám naznačujícím poruchu polarizovaného růstu, čímž se svou funkcí nejvíce blíží kvasinkové EXO70 (Synek et al., 2006). Mutant *exo70B1* má růstový fenotyp normální, avšak trpí poruchou hromadění antokyanů ve vakuole a vykazuje poruchu v autofagické dráze, jenž vede v pozdější fázi růstu k objevení se nekrotických lézí na listech, které jsou způsobeny hypersenzitivní reakcí, vyvolané akumulací kyseliny salicylové v mutantu *exo70B1* (Kulich et al., 2013). Toto zdůvodnění však bylo zpochybněno, neboť se ukázalo, že dvojitý mutant *exo70B1/sid2*, který není schopen akumulovat kyselinu salicylovou (Wildermuth et al., 2001), trpí nekrotickými lézemi stejně jako mutant *exo70B1* a pouze dvojitý mutant *exo70B1/pad4* měl fenotyp zcela bez nekrotických lézí. Tento článek také ukázal, že nekrotické léze souvisejí s vysokou hladinou proteinu TIR-NBS2 (NS2), která se v mutantu *exo70B1* akumuluje, avšak v dvojitém mutantu *exo70B1/pad4* nikoliv. Dvojitý mutant *exo70B1/ns2* nekrotické léze nevykazoval (Zhao et al., 2015). Mutanty *exo70B2* a *exo70H1* také neprojevují defekt v růstu, avšak mají narušenu ochranu proti patogenům, kdy jsou náchylnější k infekci způsobené *Pseudomonas syringae* a při penetraci stěny způsobené *Blumeria graminis* je vytvořená ochranná papila velmi narušená (Pečenková et al., 2011). Bylo také ukázáno, že přeexprimovaná podjednotka EXO70E2 má schopnost tvořit dvoumembránové struktury, a to jak u rostlin, tak u živočichů (Ding et al., 2014). S tímto jevem pravděpodobně souvisí i schopnost EXO70 zakřivovat membrány, která byla ukázána u živočišných buněk, a to nezávisle na zbytku komplexu exocyst (Zhao et al., 2013). Podjednotka EXO70H4 se ukázala jako klíčová pro depozici kalózy a vytvoření kroužku Ortmannové v trichomech, jakožto i jejich sekundární tloustnutí v přítomnosti UV-B záření (Kulich et al., 2015).

6.3.3 Dosud poznáný vliv komplexu exocyst na dynamiku svěracích buněk

Prvním náznakem, že komplex exocyst má vliv na stomatální dynamiku bylo objevení, že mutant *exo70B1* má zpomalenou ztrátu vody při vysoušecích experimentech, což se projevilo v nižším úbytku váhy oddělených listů a ve vyšší teplotě rozet pod vysokým ozářením (obr. 10). Toto bylo provedeno na mutantu *exo70B1* a na dvojitém mutantu *exo70B1/npr1*. Protein NPR1 je receptor salicylové kyseliny spouštějící obranu rostliny proti patogenům (Wu et al., 2012) a zároveň částečně zachraňuje mutantní rostliny *exo70B1* před vznikem nekrotických lézí (Kulich et al., 2013). Tato data byla získána při přípravě článku Kulich et al. (2013), avšak nebyla nakonec v článku použita.

Další indicií, která ukazovala na funkci komplexu exocyst na dynamiku svěracích buněk je interakce a částečná kolokalizace proteinu EXO70B1 s proteinem RIN4 (Sabol et al., nepublikováno). Protein RIN4 je zapojen do obrany proti patogenům (Mackey et al., 2002; Kim et al., 2005), je také důležitý interaktor s protonovými pumpami AHA1 a AHA2 (Liu et al., 2009), z níž zejména AHA1, také známá jako OST2 (open stomata 2), hraje klíčovou úlohu při stomatální dynamice (Merlot et al., 2007; Wang et al., 2014).

V letošním roce také vyšel článek Hong et al. (2016), který ukazuje, že Exo70B1 je důležitým interaktorem RIC7 (ROP-interactive Cdc42- and Rac- interactive binding motif-containing protein 7), který je negativním regulátorem otevírání průduchů vyvolaném světlem (Jeon et al., 2008) a také negativním regulátorem zavírání průduchů vyvolaném kyselinou abscisovou (Hong et al., 2016).



Obrázek 10: Evapotranspirace z *exo70B1* mutantních rostlin: a) kvantifikovaná jako úbytek hmotnosti oddělených listů; b) teplota rosety pod ozářením 400 W/m² (po dobu prvních 30 minut) a 800 W/m² (po 30 minutách). Pokus proveden na *npr1* mutantním pozadí, které částečně blokuje vznik nekrotických lézí mutantu *exo70B1*

FW (foliar weight) – váha listu
Kulich et al., nepublikovaná data

Bylo ukázáno, že mutantní rostlina *exo70B1* má zpomalené otevírání průduchů za světla a naopak rostlina ve které je EXO70B1 přeexprimován má otevírání za světla zrychlené. Tím byl publikován první důkaz, že komplex exocyst má přímý vliv na průduchovou dynamiku (Hong et al., 2016).

7 MATERIÁL A METODY

7.1 Materiál

7.1.1 Seznam použitých chemikálií

2-(N-morfolino)etansulfonová kyselina (MES)	Sigma-Aldrich, USA
3,3'-diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, USA
4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonová kyselina (HEPES)	Sigma-Aldrich, USA
etanol	Lach-Ner, ČR
etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
glycerol	Lachema, ČR
hydrogenfosforečnan sodný ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	Chemapol, ČR
chlorid draselný (KCl)	Chemapol, ČR
chlorid sodný (NaCl)	Chemapol, ČR
chlorid vápenatý (CaCl_2)	Chemapol, ČR
chloroform	Lach-Ner, ČR
izopropanol	Lach-Ner, ČR
kyanid draselný (KCN)	Lachema, ČR
kyselina abscisová	Sigma-Aldrich, USA
kyselina octová	Lach-Ner, ČR
laurylsíran sodný (SDS)	Lach-Ner, ČR
N-(3-Trietylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamin)Styryl)pyridinium dibromid (FM1-43)	Thermo Fisher Scientific, USA
polyoxyetylen sorbitan monolaurát (Tween 20)	Sigma-Aldrich, USA
salicylhydroxamová kyselina (SHAM)	Sigma-Aldrich, USA
tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich, USA
toluidinová modř (tolonium chlorid)	Carl Roth, Německo

7.1.2 Seznam použitých programů

Fiji	open source
Microsoft Excel s pluginem Real Statistics	Microsoft, USA
GeneSnap	SynGene, UK

7.1.3 Rostlinný materiál

V této práci bylo pracováno s rostlinou *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia 0 a jejími mutanty, které jsou uvedeny v tabulce 1. Z těchto mutantů byly křížením vytvořeny dvojité mutanty. Dvojitý mutant *exo70B1/npr1* a *exo70B1/sid2* byl vytvořen Mgr. Ivanem Kulichem, Ph.D. a dvojitý mutant *exo70E1/exo70E2* byl vytvořen Mgr. Hanou Soukupovou, Ph.D.

	Ekotyp	Zdroj	Název linie	Mutantní v genu	Typ mutace
Col0 WT	Columbia 0	NASC		bez mutace	
<i>exo70B1</i>	Columbia 0	NASC	GABI_156G02	AT5G58430	inzertní
<i>exo70E1</i>	Columbia 0	NASC	SALK_084145	AT3G29400	inzertní
<i>exo70E2</i>	Columbia 0	NASC	GABI_072F12	AT5G61010	inzertní
<i>npr1</i>	Columbia	Saskia van Wees (Utrecht University)		AT1G64280	bodová
<i>ost1</i>	Columbia 0	NASC	GABI_516B05	AT4G33950	inzertní
<i>sid2</i>	Columbia 0	NASC	SALK_042603	AT1G74710	inzertní

Tabulka 1: Rostlinný materiál, se kterým bylo pracováno
NASC - The Nottingham Arabidopsis Stock Centre

7.2 Metody

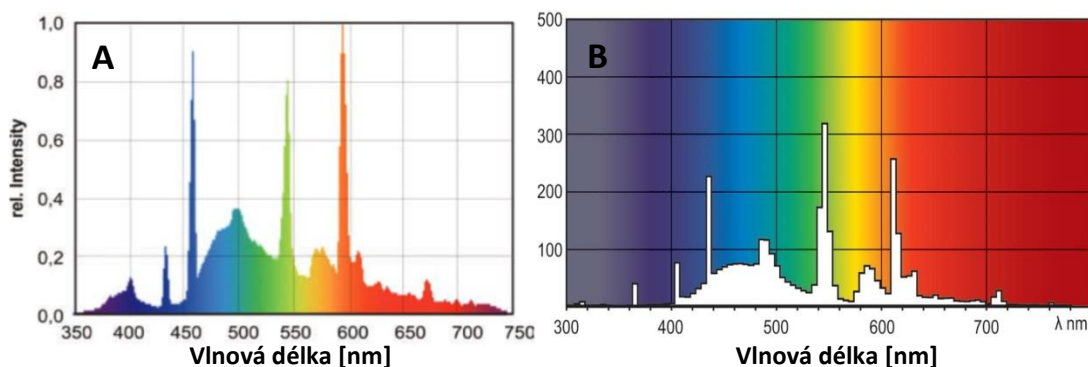
7.2.1 Kultivace rostlin

Semena rostlin *Arabidopsis thaliana* byla vyseta na rašelinové pelety Jiffy, které byly předtím nechány několik minut nabobtnat ve vodě z vodovodního řádu. Následně byly tyto pelety se semeny ponechány kvůli vernalizaci semen 3 dny ve tmě v chladové místnosti při 4 °C. Poté mohly být rostliny kultivovány ve 3 různých podmínkách:

1) Horní police kultivační místnosti S22 – osvětlení zde bylo obstaráváno zářivkami Philips HO 90 De Luxe se světelným spektrem (obr. 11) a FAR (fotosynteticky aktivní zařízení) bylo 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Teplota se zde pohybovala mezi 22 – 23 °C, rychlost větru byla mezi 0,05 – 0,1 m/s a relativní vlhkost vzduchu činila 50 – 70 %.

2) Dolní police kultivační místnosti S22 – osvětlení zde obstarávaly zářivky Narva BIO Vital se světelným spektrem (obr. 11) a FAR zde byl 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Teplota se pohybovala mezi 21 – 23 °C, rychlost větru byla pod přístrojem detekovatelnou hranicí 0,05 m/s a relativní vlhkost vzduchu činila 45 – 70 %.

3) Klimabox Adaptis A1000 – osvětleno zářivkami Narva BIO vital se světelným spektrem (obr. 11) a FAR zde činilo 330 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Teplota se zde pohybovala mezi 22 – 23 °C, rychlost větru byla mezi 0,1 – 0,2 m/s a relativní vlhkost vzduchu činila 40 – 80 %. Všechna 3 kultivační místa měla denní režim 16 hodin světla a 8 hodin tmy.



Obrázek 11: Světelné spektrum zářivek
 A – zářivka Narva BIO Vital; B zářivka Philips HO 90 De Luxe
 převzato z narva.cz a philips.com, upraveno

7.2.2 Křížení *Arabidopsis thaliana*

Pro křížení byly použity rostliny staré 5-6 týdnů, u kterých již bylo vyvinuto několik šešulí a květů. Mateřské rostlině byly odstraněny všechny šešule, otevřené květy a příliš malá poupata, takže jí zůstalo několik velkých pupat, v nichž se budou nacházet pestíky vhodné k opylení. Z těchto pupat byly ostrou hodinářskou pinzetou odstraněny kališní a korunní lístky a tyčinky, takže na květu zůstal pouze pestík s neopylenou bliznou. Tato blizna byla opylena za pomoci zralé tyčinky odebrané z otcovské rostliny a obalena pruhem potravinové fólie svázané shora tak, aby se zabránilo vyschnutí, ale aby zároveň nebyl omezen vývoj budoucí šešule. Rostliny byly poté vráceny na své původní kultivační místo. Po vyvinutí šešule byl odstraněn fóliový kryt. Po vyschnutí šešulí byla semena sklizena a byla z nich vypěstována první heterozygotní generace, která byla kontrolně genotypována. Z rostlin, které byly opravdu heterozygotní, byla získána semena, z nichž byla vypěstována druhá generace, z které byly po genotypování vybráni jedinci homozygotně mutantní v obou genech. Z těchto jedinců byla získána semena pro třetí generaci, která již sestává pouze z dvojitých mutantů.

7.2.3 Izolace genomové DNA

Z rostliny byl odstříhnut malý lístek a přenesen do mikrozkušavky, kde byl pomocí homogenizační tyčinky rozmělněn. Bylo přidáno 400 μ l extrakčního pufru (200 mM Tris-HCl; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA, 0,5% SDS; pH 7,5) a 400 μ l chloroformu. Tato směs byla 1 min třepána na třepačce a 3 minuty centrifugována při 16000 g. 300 μ l horní fáze bylo přeneseno do nové mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 300 μ l ledového izopropanolu. Mikrozkušavka byla několikrát otočena, aby došlo k promíchání. Suspenze byla následně centrifugována 5 min při 16000xg. Supernatant byl odstraněn a zkušavka byla ponechána 10 minut při pokojové teplotě, aby se odpařil zbytek

isopropanolu. Peleta byla následně rozpuštěna ve 100 µl TE pufru (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0).

7.2.4 Genotypovací PCR

Ke genotypování inzertních mutantů byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR), která byla prováděna na cyklerech TProfessional TRIO, TPersonal a nebo TGradient (všechny Biometra). Reakce probíhala v mikrozkušnicích o objemu 200 µl. Pro reakci byla používána polymeráza DreamTaq (Fermentas). Reakce probíhala v objemu 20 µl a obsahovala 2 µl 10x DreamTaq pufru, 0,04 µl DreamTaq DNA polymerázy, 0,25 µl dNTPs mix 2,5 mM každý, 0,2 µl pravého a 0,2 µl levého primeru a 1 µl genomové DNA izolované z listů rostlin *Arabidopsis*. Doplněno demineralizovanou vodou do objemu 20 µl. Program cyklu: počáteční denaturace 96 °C 2 min, denaturace 96 °C 30 s, nasedání 55 – 63 °C (podle T_m primerů) 1 min, elongace 72 °C 1 min/kBp, závěrečné prodlužování 72 °C 10 min. Kroky denaturace až elongace byly opakovány 30x.

Pro reakce byly použity tyto primery:

exo70B1

LP: CGTGGCAGGAGTTAGAAGATG
RP: TTGTCTGCGTTTTCCCTATG
GABI o8474: ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT

exo70E1

LP: TTGCTGCTGAACTTCCATG
RP: TTGAGCTTGAACATTCGTCG
SALK Lbb1.3: ATTTTGCCGATTCGGAAC

exo70E2

LP: GGGATTTCTCTTCCTCTCTGTTA
RP: ACAGAATGGTTGATCATACTCGC
GABI o8474: ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT

ost1

LP: ACTCCTGAAATGAGTTGCTGGAAGAAA
RP: ACAGAGTTCAAGATCACGAGCCTTCC
GABI o8474: ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT

sid2

LP: ACCCTAATTTGGATTTGGTGC

RP: AGCTCTAGGCCTAGTTGCAGC

SALK Lbb1.3: ATTTTGCCGATTTTCGGAAC

Primery RP a LP byly použity pro detekci nemutantní formy genu, kdežto primer RP a GABI popř. SALK LB byly použity pro detekci mutantů.

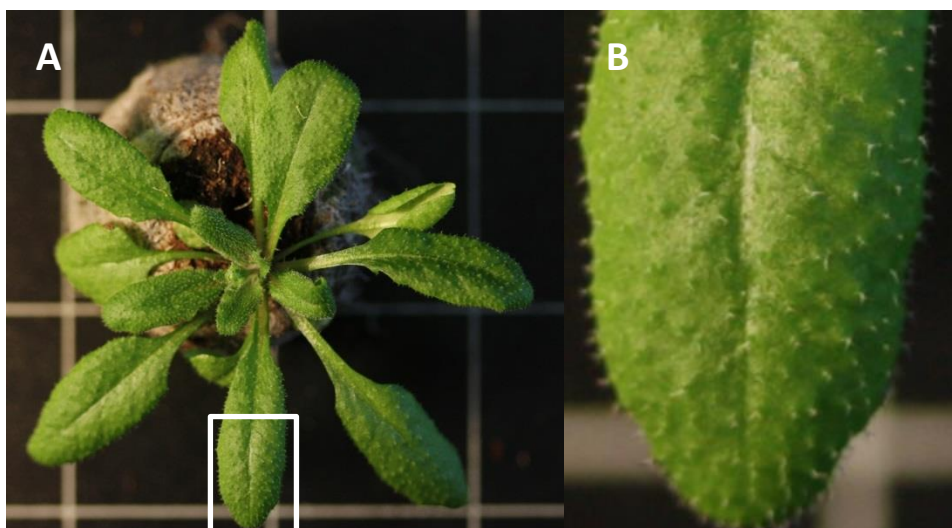
Pro vizualizaci fragmentů DNA byla následně použita gelová elektroforéza. Do 1x TBE pufru (10 mM Tris; 20 mM kyselina boritá; 1 mM EDTA, pH 8,0) byla přidána agaróza tak, aby její koncentrace dosáhla 1%. Směs byla povařena tak dlouho, dokud nedošlo k dokonalému rozpuštění agarózy. Následně bylo přidáno interkalační barvivo GelRed (Biotinum), které bylo ředěno 1:10000. Roztok se následně nalil do připravených vaniček s hřebenem, kde se nechal ztuhnout. Hřeben se vyjmul a gel byl přenesen do elektroforetické vaničky naplněné 1x TBE puftrem. Vzorky DNA byly smíchány s 6x Loading Dye (Fermentas) v poměru 1:5 a nanесeny do jamek v gelu. Elektrolýza probíhala při 90 V u malých gelů a při 120 V u gelů větších. Pro vizualizaci a vyfotografování výsledků byl použit přístroj G:BOX s programem GeneSnap (oba SynGene).

7.2.5 Měření listové plochy

Rostliny staré 4 týdny kultivované na všech 3 stanovištích byly vyfoceny na fotoaparát Canon EOS 450D, objektiv Canon EF 35mm. Obrázky byly zpracovány v programu FiJi a listová plocha byla změřena za pomoci bodové testovací mřížky (obr. 12). Získaná data byla zpracována v programu Microsoft Excel s doplňkem Real Statistics a pro vyhodnocení statistické signifikance výsledku byla použita metoda ANOVA.



Obrázek 12: Foto rostliny s vyznačenou mřížkou, s označenými body, které byly započítány do výpočtu listové plochy



Obrázek 13: Příklad fotografie použité pro měření počtu trichomů
A – foto celé rostliny shora; **B** – detail listu vyznačený na **A** s viditelnými jednotlivými trichomy

7.2.6 Měření počtu trichomů na listu

Rostliny staré 4 týdny kultivované na horní pozici kultivační místnosti byly vyfoceny shora na fotoaparát Canon EOS 450D, objektiv Canon EF 35mm. Na takto získaných fotografiích byly následně pomocí programu FiJi spočítány všechny trichomy na listech, které se nacházely v rovině ostrosti (obr. 12). Data takto získaná byla následně zpracována v programu Microsoft Excel s doplňkem Real Statistics a pro vyhodnocení statistické signifikance výsledku byla použita metoda ANOVA.

7.2.7 Měření neporušenosti kutikuly

Pro měření neporušenosti kutikuly byla upravena metoda použitá v práci Tanaka et al. (2004).

Z rostlin starých 4 týdny bylo odštířeno několik listů (starých i mladých), které byly ponořeny na 2, 5 nebo 10 minut do 0,05% roztoku toluidinové modři ve vodě. Tyto listy byly následně opláchnuty v demineralizované vodě a vyfoceny fotoaparátem Olympus C5050Z připojeném na binokulární lupu s nastaveným pětinasobným zvětšením.

7.2.8 Vysoušecí experiment

Z rostlin kultivovaných na horním patře v kultivační místnosti starých 4 týdny bylo odebráno 5 listů (3. – 7. nejstarší pravé listy), které byly okamžitě zváženy na analytických vahách. Rány po odštířnutí byly zakryty voskem, aby jimi nedocházelo k úbytku vody a tyto listy s voskem byly opět ihned zváženy, neboť bylo třeba znát

přesnou hmotnost vosku. Listy poté byly ponechány na listu papíru na rozptýleném denním světle. Tyto listy byly váženy vždy 10, 20, 30, 45 a 60 minut po ustřížení.

Rostliny použité v tomto měření byly kultivovány na horní polici kultivační místnosti S22. Vyhodnocení dat bylo provedeno v programu Microsoft Excel s doplňkem Real Statistics a pro vyhodnocení statistické signifikance výsledku byla použita metoda ANOVA.

7.2.9 Příprava otiskových preparátů epidermis

Z rostlin kultivovaných na dolní polici kultivační místnosti a v klimaboxu starých 4 týdny byly odebrány 4 listy (3. – 6. nejstarší list) a na jejich povrch byl nanesen bezbarvý rychleschnoucí lak na nehty (Simple Beauty 00). Po zaschnutí byla vrstva laku opatrně sloupnuta z listu a přenesena na podložní sklíčko.

7.2.10 Výpočet průduchové hustoty

Předem připravené otiskové preparáty epidermis a preparáty listů obarvených DAB byly pozorovány na mikroskopu Nikon Eclipse Mikroskop 90i s kamerou Andor Clara. Hustota průduchů byla počítána ze získaných obrázků z mikroskopu s pomocí stereologického hodnotícího rámečku (unbiased counting frame) v programu FiJi. Získaná data byla zpracována v programu MS Excel s doplňkem Real Statistics. Pro vyhodnocení statistické signifikance výsledku byla použita metoda ANOVA.

7.2.11 Výpočet velikosti průduchů

K výpočtu velikosti průduchů byly použity snímky otiskových preparátů epidermis a snímky získané při pozorování dynamiky svěracích buněk (viz níže). V programu FiJi byla změřena výška svěracích buněk tak, jak je naznačeno na obrázku 13. Získaná data byla zpracována v programu MS Excel s doplňkem Real Statistics. Pro vyhodnocení statistické signifikance výsledku byla použita metoda ANOVA.

7.2.12 Barvení ROS v listech

ROS bylo barveno podle upravené metody z Daudi a O'Brien (2012). Před samotným barvením byly vzorky kultivovány a ošetřovány:

7.2.12.1 Pro přirozený výskyt ROS v listech rostlin

Z rostlin kultivovaných na všech 3 místech starých 4 týdny byly odebrány 3 listy (4. – 6. nejstarší) a s nimi bylo dále postupováno podle obarvovacího protokolu (viz níže).

7.2.12.2 Pro výskyt ROS indukovaným vysokým ozářením

Z rostlin starých 4 týdny kultivovaných na horní polici kultivační místnosti byly odebrány 4 listy (4. – 7. nejstarší). Tyto listy byly přeneseny do Petriho misek naplněných vodou. Polovina misek byla následně umístěna na přímé slunce (FAR ~ $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) a druhá polovina byla umístěna do tmy. Zde byly ponechány shodně 30 min. Dále bylo postupováno podle obarvovacího protokolu (viz níže).

7.2.12.3 Indukce ROS pomocí SHAM a KCN

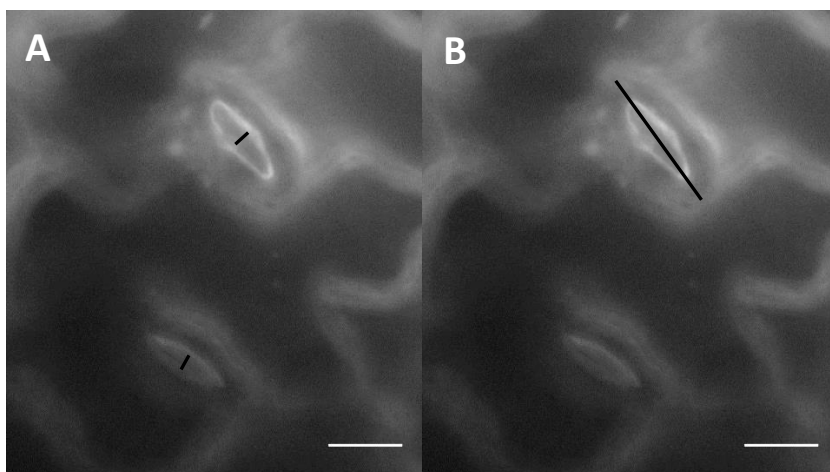
Z rostlin starých 4 týdny kultivovaných na horní polici kultivační místnosti byly odebrány 4 listy (4. – 7. nejstarší). Tyto listy byly přeneseny do Petriho misek naplněných HEPES pufrem (15 mM HEPES; 0,2 mM CaCl_2 ; pH 7). Třetina těchto misek navíc obsahovala 5 mM KCN a druhá třetina 15 mM SHAM. Vzorky byly následně umístěny do vývěvy, kde byl pufr pomocí mírného vakua infiltrován do listů. Dále byly misky se vzorky umístěny na 1 hodinu do kultivační místnosti, kdy jedna polovina byla pod osvětlením FAR $100 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ a druhá byla pod osvětlením FAR $750 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Dále bylo postupováno podle obarvovacího protokolu (viz níže).

7.2.12.4 Obarvovací protokol

Listy se umístí do DAB barvicího roztoku (1 mg/ml DAB; 0,05% Tween 20; 10 mM Na_2HPO_4) tak, aby byly zcela ponořené. Jedna sada vzorků určená jako kontrola byla umístěna do DAB barvicího roztoku neobsahujícího DAB. Od tohoto okamžiku jsou vzorky chráněny před světlem, neboť DAB se vlivem světla rozkládá. Vzorky se umístí do vývěvy a je na ně 5 minut aplikováno mírné vakuum kvůli infiltraci DAB roztoku do listů. Dále jsou na 4 hodiny umístěny na laboratorní třepačku nastavenou na 60 otáček za minutu. Potom je DAB barvicí roztok nahrazen odbarvovacím roztokem (3 díly etanolu, 1 díl kyseliny octové a 1 díl glycerolu) a vzorky jsou umístěny na 20 minut do horké lázně o teplotě 95°C . Od tohoto kroku již není třeba chránit vzorky před světlem. Po vyjmutí z horké lázně byl starý odbarvovací roztok vyměněn za nový, ve kterém bylo možno vzorky uchovávat delší dobu v lednici.

7.2.12.5 Mikroskopické pozorování vzorků

Vzorky byly pozorovány na mikroskopu Nikon Eclipse Mikroskop 90i s kamerou Andor Clara a byly vyhotoveny obrázky pokrývající celou plochu listu pod objektivem 10x zvětšujícím.



Obrázek 14: Ukázka epidermis rostliny Col9 s 2 průduchy na počátku měření. A - Černá čára ukazuje typické měření šířky průduchových štěrbin; B- Černá čára ukazuje typické měření výšky průduchu; Měřítka = 10 μ m

7.2.13 Pozorování dynamiky průduchů otevíraných světlem

4 týdny staré rostliny kultivované na horní polici v kultivační místnosti byly ponechány 3 hodiny ve tmě. Poté z nich byl odebrán 4. nejstarší list, který byl na 5 minut ponořen do obarvovacího pufru (5 μ g/ml FM1-43; 10 mM MES; 5 mM KCl; 50 μ l CaCl₂; pH 6,15). Po obarvení byl list opláchnut a vložen mezi mikroskopovací skla v neutrálním MES pufru (10 mM MES; 5 mM KCl; 50 μ l CaCl₂; pH 6,15). Periodicky po 15 minutách bylo vždy pořízeno několik snímků v mikroskopu Nikon Eclipse Mikroskop 90i s kamerou Andor Clara. Mezi snímáním byl preparát umístěn na světlo. Ze získaných obrázků byly v programu FiJi změřeny šířky průduchových štěrbin, kde byla vždy měřena vzdálenost v nejširším místě mezi silně fluoreskujícími kutikulárními řasami svěracích buněk (obr. 13). Získaná data byla zpracována v programu MS Excel s doplňkem Real Statistics. Pro vyhodnocení statistické signifikance výsledku byla použita metoda ANOVA.

7.2.14 Pozorování RFP-EXO70B1 a GFP-RIN4 při pohybech průduchů

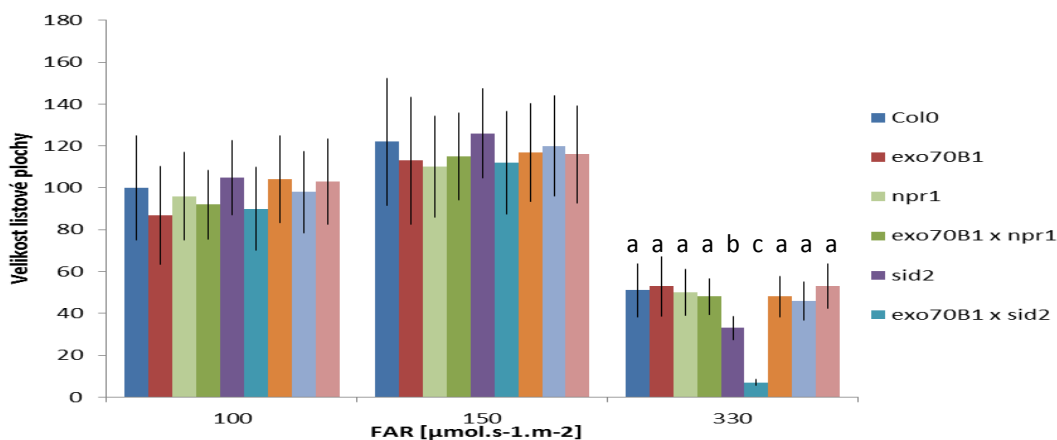
Transformované rostliny s vloženými geny UBQ::RFP:EXO70B1 a UBQ::GFP:RIN4 (transformované Mgr. Peterem Sabolem) staré 5 týdnů, kultivované na dolní polici v kultivační místnosti byly umístěny na světlo a po minimálně 1 hodině byly z jejich listů vystřihovány vzorky, které byly umístěny na mikroskopovací skla do MES pufru (10 mM MES; 5 mM KCl; 50 μ l CaCl₂; pH 6,15). U jedné sady vzorků byla do MES pufru přidána ABA (výsledná koncentrace 10 μ M), u druhé byl přidán peptid flg22 do výsledné koncentrace 5 μ M. U třetí sady vzorků byl použit čistý MES pufr.

Tyto vzorky byly následně pozorovány v spinning disc konfokálním mikroskopu Yokogawa CSU-X s kamerou Zyla (oba Andor).

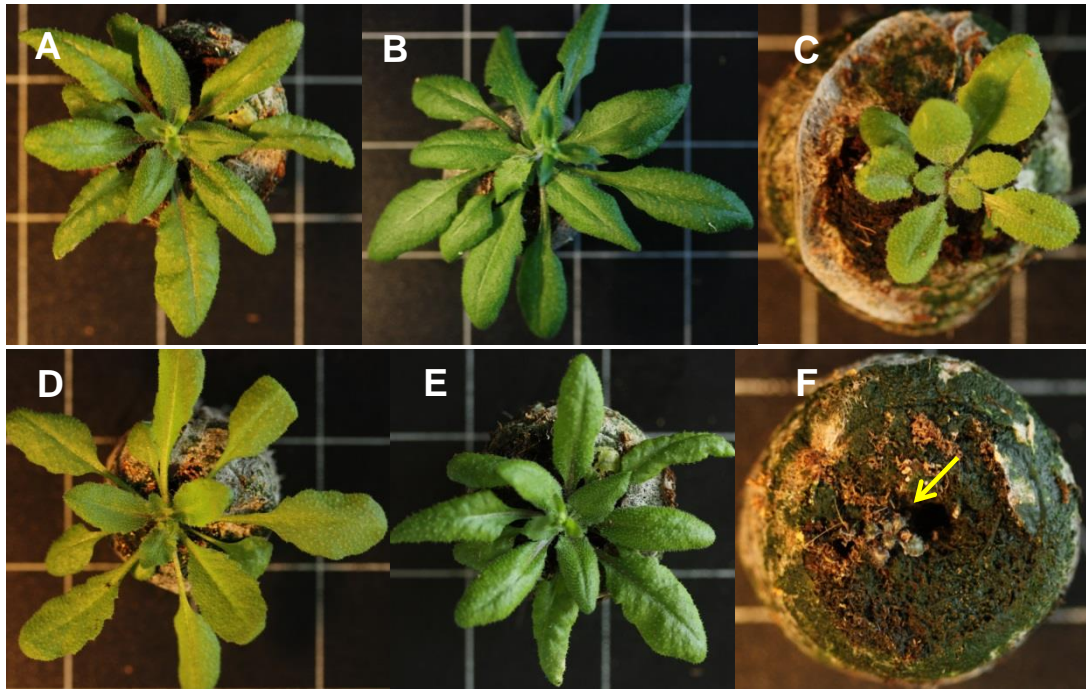
8 VÝSLEDKY

8.1 Velikost listové plochy

Rostliny pěstované na různých stanovištích vykazovaly rozdílnou listovou plochu (viz graf 1). Průměrná velikost listové plochy 14 nemutantních rostlin ekotypu Col0 kultivovaných na horní polici v kultivační místnosti ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR) byla $7,74 \text{ cm}^2$ (v grafu zastoupena 100 %). Největší rozdíl od této hodnoty vykazoval mutant *exo70B1*, u něhož průměrná velikost listové plochy činila $6,72 \text{ cm}^2$. Tento rozdíl ale nebyl statisticky signifikantní, stejně jako nebyl signifikantní rozdíl u žádné jiné mutanty pěstované na této lokalitě. Obecně největší velikosti listové plochy byly u rostlin pěstovaných na dolní pozici v kultivační místnosti ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR), kde 13 nemutantních rostlin ekotypu Col0 starých 4 týdny mělo listovou plochu o průměrné velikosti $9,44 \text{ cm}^2$ (122 % plochy Col0 pěstované pod $100 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR). Zde byly rozdíly mezi jednotlivými mutanty menší než na předchozí zmíněné pozici a opět žádný z mutantů ve velikosti své listové plochy nedosahoval statisticky významného rozdílu. Rostliny pěstované v klimaboxu ($330 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR) měly listovou plochu výrazně menší než rostliny na jiných stanovištích, kdy 10 rostlin ekotypu Col0 mělo v průměru listovou plochu velkou $3,44 \text{ cm}^2$. Zde se však již objevily signifikantní rozdíly mezi mutantem *sid2* a Col0, kdy 8 rostlin *sid2* mělo průměrnou velikost listové plochy $2,22 \text{ cm}^2$. Ještě většího rozdílu dosahoval dvojitý mutant *exo70B1/sid2*, který měl v těchto kultivačních podmínkách výrazně sníženou fitness. 5 rostlin, které přežily tyto podmínky, mělo listovou plochu velkou v průměru pouze $0,60 \text{ cm}^2$. Tyto rostliny nedokázaly vyprodukovat životaschopná semena. Rozdíl mezi mutantem *exo70B1/sid2* a nemutantní Col0 je zobrazen na obrázku 15.



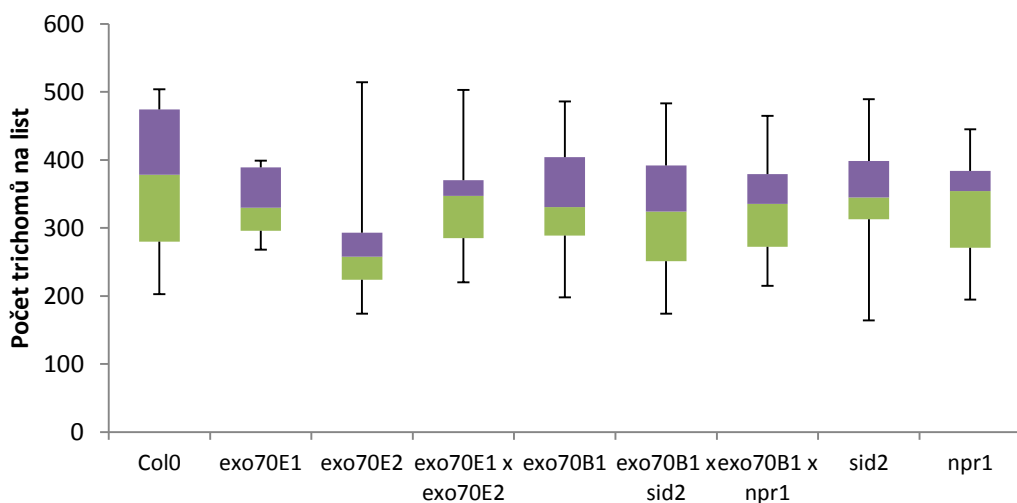
Graf 1: Sloupcový graf ukazující velikost listové plochy rostlin pěstovaných na 3 různých stanovištích. Hodnoty velikosti listové plochy jsou relativní k velikosti Col0 kultivované na horní polici v kultivační místnosti ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). Rozdílná písmena vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly zjištěné metodou ANOVA s HSD Tukey testem ($p < 0,05$)



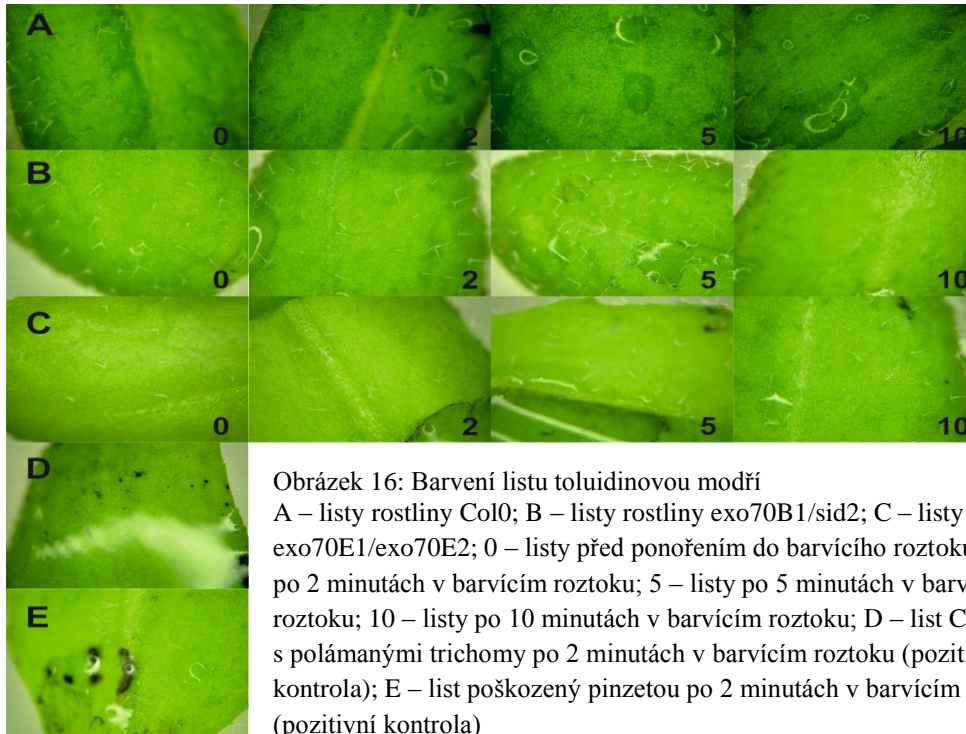
Obrázek 15: Fotografie 4 týdny starých rostlin rostoucích za různých podmínek
 A – rostlina Col0 kultivovaná na horní polici v kultivační místnosti; B – rostlina Col0 kultivovaná na dolní polici v kultivační místnosti; C – rostlina Col0 kultivovaná v klimaboxu; D – dvojitý mutant *exo70B1xid2* kultivovaný na horní polici v kultivační místnosti; E – dvojitý mutant *exo70B1xid2* kultivovaný na dolní polici v kultivační místnosti; F – dvojitý mutant *exo70B1xid2* kultivovaný v klimaboxu, žlutá šipka vyznačuje umístění rostliny

8.2 Počet trichomů na listu

Nemutantní rostlina ekotypu Col0 má v průměru 367,2 trichomů na list (hodnota získaná z devatenácti 4. - 7. nejstarších listů 7 rostlin). Největší odchylku od Col0 vykazuje mutant *exo70E2*, který má v průměru 298,1 trichomů na list (viz graf 2). Tato odchylka, stejně jako odchylka u ostatních mutantních rostlin, však není statisticky významná (počítáno pomocí ANOVA testu).



Graf 2: Krabicový graf ukazující počet trichomů na list



Obrázek 16: Barvení listu toluidinovou modří
 A – listy rostliny Col0; B – listy rostliny *exo70B1/sid2*; C – listy rostliny *exo70E1/exo70E2*; 0 – listy před ponořením do barvicího roztoku; 2 – listy po 2 minutách v barvicím roztoku; 5 – listy po 5 minutách v barvicím roztoku; 10 – listy po 10 minutách v barvicím roztoku; D – list Col0 s polámanými trichomy po 2 minutách v barvicím roztoku (pozitivní kontrola); E – list poškozený pinzetou po 2 minutách v barvicím roztoku (pozitivní kontrola)

8.3 Neporušenost kutikuly

Při testování neporušenosti kutikuly se neobjevily žádné rostliny, které by měly kutikulární vrstvu jakkoli poškozenou, a to ani po 10 minutách v odbarvovacím roztoku (obr. 16). Jediné viditelné zabarvení bylo v okolí místa, kde byl list oddělen od rostliny, a v místech jiného poškození, jako je například otláčení od pinzety nebo polámání trichomů.

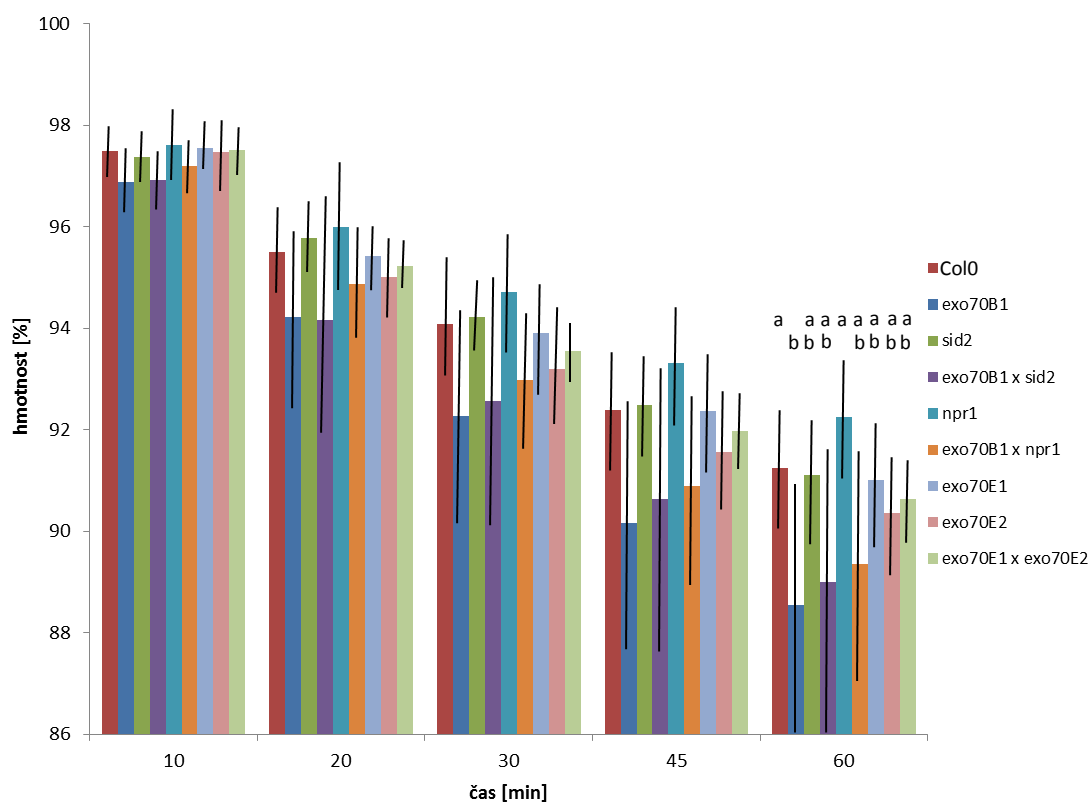
8.4 Vysoušecí experiment

Byly provedeny dva vysoušecí experimenty, kdy se pracovalo celkem s 11 rostlinami od každého mutanta. Při těchto experimentech se ukazovalo, že mutant *exo70B1* ztrácí rychleji vodu než jeho nemutantní forma Col0. Rostlina ekotyp Col0 v průměru ztratila za 60 minut experimentu 8,75 % své počáteční váhy, kdežto mutant *exo70B1* za stejnou dobu a stejných podmínek ztratil 11,46 % (viz graf 3). Tento rozdíl úbytku tedy představoval 2,71 % čerstvé hmotnosti rostliny. Obdobné hodnoty byly získány i pro všechny dvojité mutantní v *exo70B1* genu, kdy *exo70B1/npr1* měl úbytek větší o 2,91 % počáteční hmotnosti oproti mutantovi *npr1* a *exo70B1/sid2* měl úbytek větší o 2,10 % oproti *sid2* mutantovi. Při výpočtu statistické signifikance metodou ANOVA s HSD Tukey testem však vyšlo, že jediné signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi Col0 a *exo70B1* a *exo70B1* a *npr1*. Jiné rozdíly mezi rostlinami již nejsou statisticky

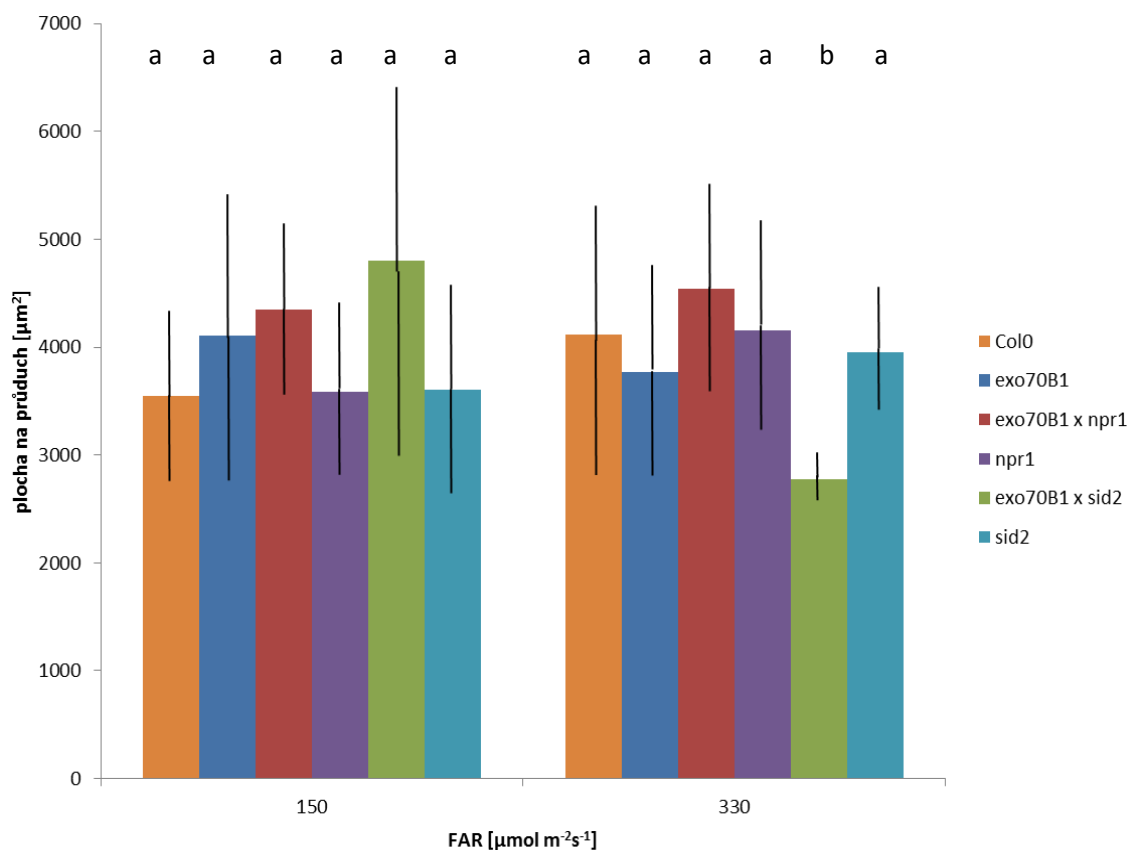
významné. Co však stojí za povšimnutí, je velká směrodatná odchylka u všech rostlin *exo70B1* mutantních, která se u jiných mutantů nevyskytuje.

8.5 Hustota průduchů

Pro měření hustoty průduchů bylo použito několik desítek snímků epidermis každého z mutantů, z čehož několik snímků znázorňovalo celý list. Průměrná hustota průduchů u nemutantní rostliny ekotyp Col0 kultivované na spodním patře kultivační místnosti je 1 průduch na $3544 \mu\text{m}^2$. Největší odchylku od této hustoty vykazoval mutant *exo70B1/sid2*, který měl průměrně 1 průduch na $4799 \mu\text{m}^2$. Při analýze statistické významnosti pomocí ANOVA však vyšlo najevo, že tato odchylka není významná (p bylo dokonce větší než 0,11). Rostliny Col0 rostoucí v klimaboxu měly průměrnou hustotu 1 průduch na $4119 \mu\text{m}^2$. Od této hodnoty se opět nejvíce odkláněla hustota dvojitého mutantu *exo70B1/sid2*, avšak na opačnou stranu než v předchozím případě. Mutant *exo70B1/sid2* měl průměrnou hustotu 1 průduch na $2775 \mu\text{m}^2$. Po provedení analýzy statistické signifikance pomocí ANOVA se ukázalo, že tento rozdíl je dokonce signifikantní na hladině pravděpodobnosti $p = 1,3e^{-12}$. Porovnání jednotlivých mutantů je zobrazeno na grafu 4.



Graf 3: Sloupcový graf ukazující závislost hmotnosti listů na čase po zahájení vysoušecího experimentu. Rozdílná písmena vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly zjištěné metodou ANOVA s HSD Tukey testem.

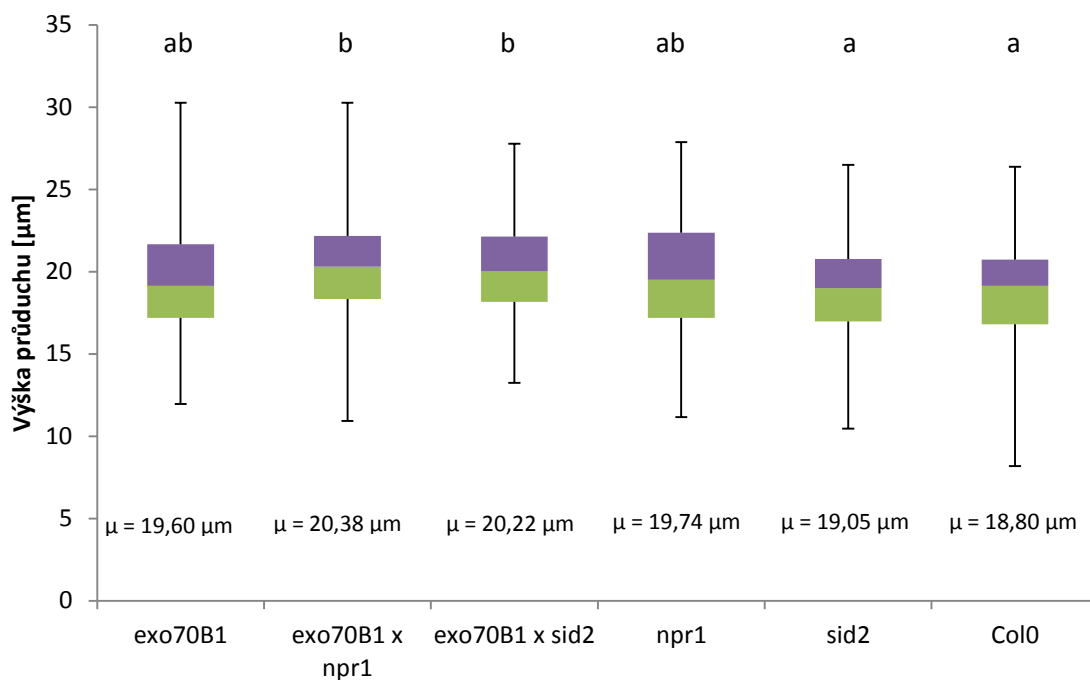


Graf 4: Sloupcový graf ukazující hustotu průduchů mutantů *Arabidopsis thaliana* v závislosti na kultivačních podmínkách
Rozdílná písmena vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly zjištěné metodou ANOVA s HSD Tukey testem ($p < 0,001$).

8.6 Velikost průduchů

Na analýzu velikosti svěracích buněk bylo použito několik desítek snímků epidermis z mutantních i nemutantních rostlin. Analyzováno bylo více než 500 průduchů z každé skupiny rostlin.

Rozptyl velikosti průduchů všech rostlin pěstovaných na dolním patře kultivační místnosti byl podobný (zobrazeno v grafu 5). Rostliny ekotyp Col0 pěstované na spodní polici měly průměrnou výšku průduchu 18,80 μm . Všechny mutantní rostliny měly průměrnou výšku průduchů vyšší. Podle analýzy ANOVA však jediné statisticky významné rozdíly vykazovaly mutanty *exo70B1/npr1* a *exo70B1/sid2*, které měly průměrnou výšku průduchu 20,38 μm u *exo70B1/npr1* a 20,22 μm u *exo70B1/sid2*. Nutno však podotknout, že tyto mutanty sice byly signifikantně odlišné od nemutantní Col0, ale již nebyly signifikantně odlišné od mutantů *npr1* a *exo70B1*, které nejsou významně odlišné od Col0.



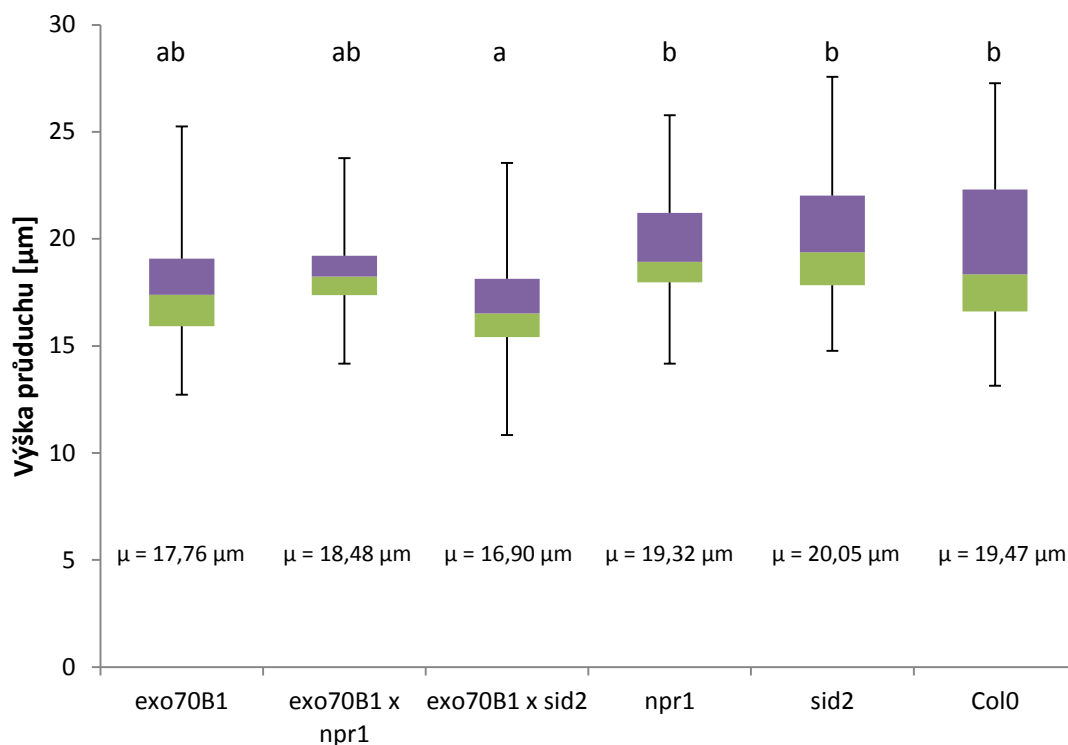
Graf 5: Krabicový graf ukazující výšku průduchů rostlin pěstovaných na dolní polici v kultivační místnosti

µ – průměrná výška průduchu; rozdílná písmena vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly zjištěné metodou ANOVA s HSD Tukey testem ($p < 0,05$).

Rozptyl velikosti průduchů rostlin kultivovaných v klimaboxu (graf 6) vykazuje na první pohled větší rozdíly mezi mutanty než rozptyl velikosti průduchů rostlin pěstovaných v kultivační místnosti (graf 5). Počet snímků epidermis rostlin pěstovaných v klimaboxu je však menší a byl zde tedy analyzován nižší počet průduchů (asi 150 z každé skupiny rostlin), a proto mají data nižší statistickou významnost.

Průměrná výška průduchu rostliny Col0 kultivované v klimaboxu je 19,47 µm. Jediný statisticky významný rozdíl od této hodnoty má dvojitý mutant *exo70B1/sid2*, jehož průměrná výška průduchu je 16,90 µm. Opět je však třeba podotknout, že rostliny *exo70B1* a *exo70B1/npr1* nejsou statisticky významně odlišné od mutantu *exo70B1/sid2* ani od nemutantní Col0.

Když se však porovnají data rostlin kultivovaných za různých podmínek mezi sebou, objeví se statisticky významný rozdíl mezi všemi rostlinami mutantními v genu *exo70B1* pěstovanými za různých podmínek. Tento rozdíl však nenacházíme u rostlin Col0 a mutantů *sid2* a *npr1* pěstovaných za různých podmínek (ANOVA s Tukey HSD testem, $p < 0,05$).



Graf 6: Krabicový graf ukazující výšku průduchů rostlin pěstovaných v klimaboxu
 μ – průměrná výška průduchu; rozdílná písmena vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly zjištěné metodou ANOVA s HSD Tukey testem ($p < 0,05$).

8.7 Výskyt reaktivních forem kyslíku (ROS)

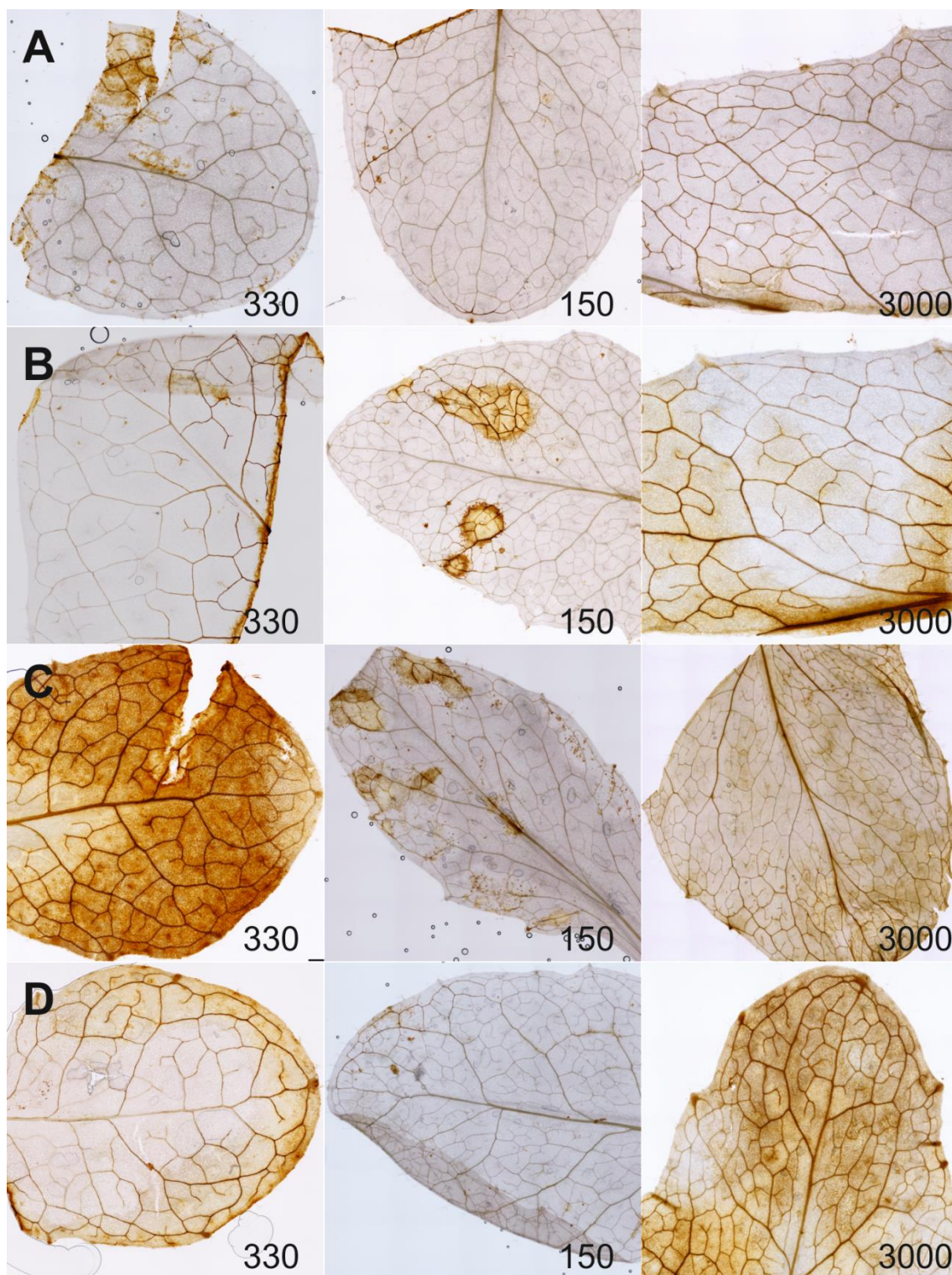
8.7.1 Celolistové zbarvení

Po obarvení ROS barvou diaminobenzidín (DAB) v listech rostlin, které rostly při nízkém osvětlení $150 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR v kultivační místnosti, nebyl vidět žádný intenzivní výskyt kyslíkových radikálů v ploše listu (obr. 17) s výjimkou některých listů *exo70B1* mutantních rostlin, kde byla zbarvena místa budoucích nekrotických lézí (tyto léze ještě na listech pouhým okem nebyly vidět).

Když se obarvily listy rostlin, které byly kultivovány v klimaboxu ($330 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR), tak listy rostlin *Col0*, *npr1*, *exo70B1* a *exo70B1/npr1* byly bez výrazného výskytu barvy, kdežto listy rostliny *sid2* vykazovaly nezpochybnitelně více zbarvení a v dvojitě mutantu *exo70B1/sid2* bylo zbarvení velmi výrazné (obr. 17).

Po obarvení ROS v listech, které rostly na $150 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR v kultivační místnosti, ale byly před samotným barvením vyloženy na 1 hodinu na polední slunce ($\sim 3000 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR), byl vidět zvýšený výskyt ROS u všech rostlin. Nejnižší výskyt ROS (na celolistových fotografiích takřka neznatelný) byl však u *Col0* a *npr1* mutantní rostliny, vyšší výskyt ROS byl v rostlinách *exo70B1* a *exo70B1/npr1*,

a nejvyšší výskyt ROS byl u *sid2* a *exo70B1*, kde u obou došlo ke zhruba stejnému zbarvení (obr. 17).

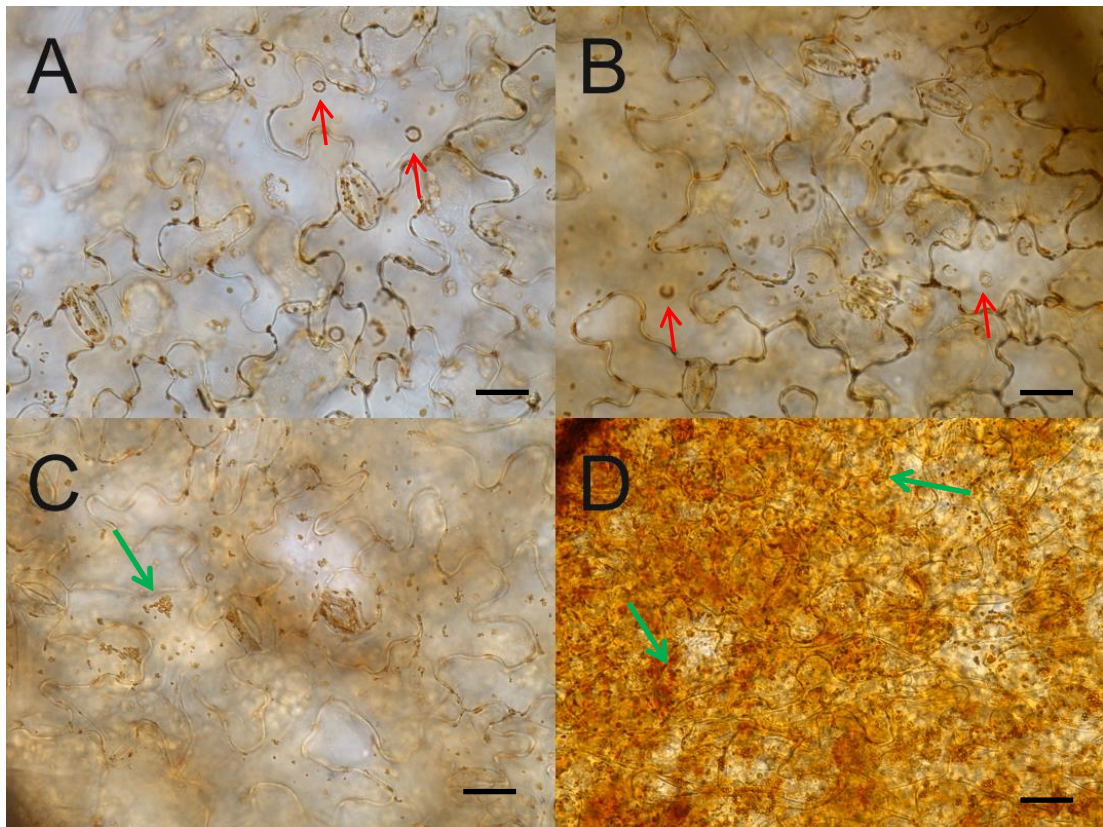


Obrázek 17: Výskyt ROS v listech

A – listy rostliny Col0; B – listy rostliny *exo70B1*; C – listy rostliny *exo70B1/sid2*; D – listy rostliny *sid2*;
 330 – přirozený výskyt ROS v rostlinách kultivovaných v klimaboxu (FAR $330 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$);
 150 – přirozený výskyt ROS v rostlinách kultivovaných na spodním patře kultivační místnosti S22 (FAR $150 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$); 3000 – ROS indukované v rostlinách ponecháním na 1 h na poledním slunci (FAR $\sim 3000 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)

8.7.2 Buněčná lokalizace ROS

Mikroskopický obraz buněk z listů 4 týdny starých rostlin kultivovaných v klimaboxu ukazuje buněčnou lokalizaci ROS. Ve všech buňkách epidermis, kde se podařilo ROS lokalizovat, převládaly ve formě pozůstatků po malých váčkovitých strukturách o velikosti kolem 1 μm . Při pozornějším zkoumání se ukázalo, že v rostlinách Col0 a dalších mutantech nemutantních v Exo70B1 (tedy Col0, npr1 i sid2) se dala nalézt agregace těchto váčkovitých struktur do větší prstencovité struktury připomínající autofagozomy (obr. 18). Tyto prstencovité struktury se však nepodařilo nalézt u rostlin mutantních v genu Exo70B1. V těchto rostlinách docházelo také k agregování ROS pozitivních váčků, avšak pouze do neuspořádaných shluků (obr. 18).



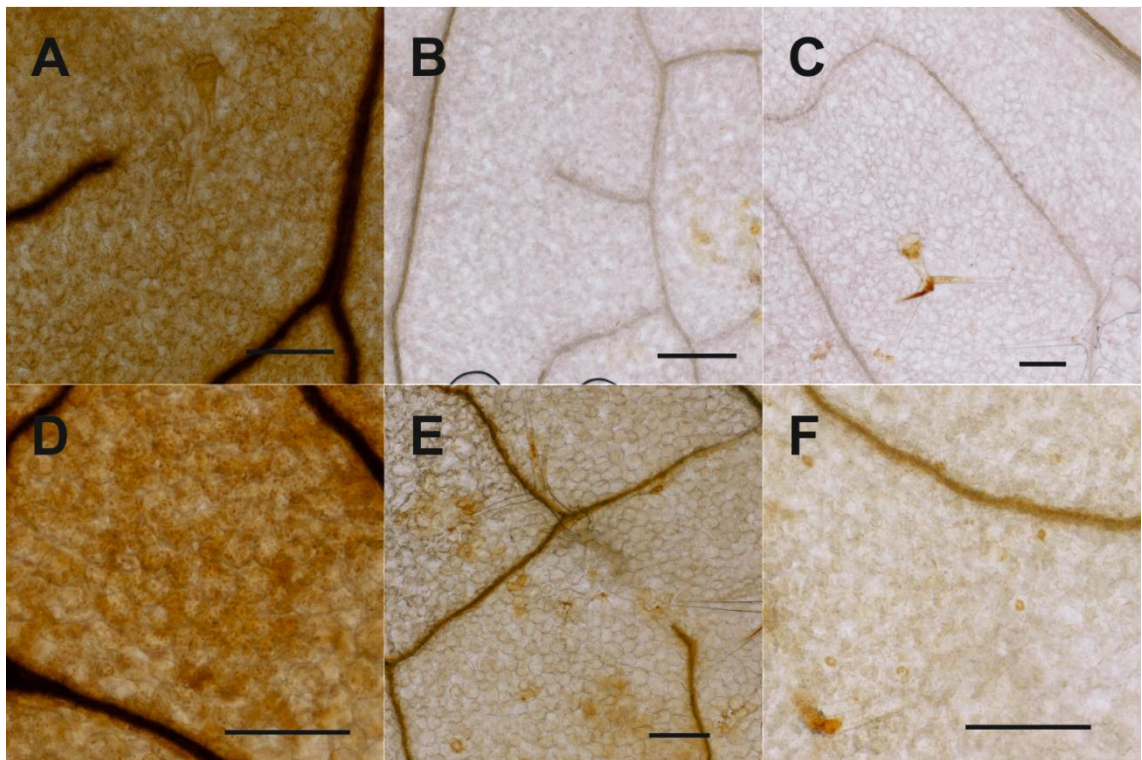
Obrázek 18: Buněčná lokalizace ROS rostlin pěstovaných v klimaboxu

A – rostlina Col0; B – rostlina *sid2*; C – rostlina *exo70B1*; D – rostlina *exo70B1/sid2*

červené šipky ukazují pozůstatky pravděpodobných autofagozómů; zelené šipky ukazují neorganizované shluky ROS pozitivních váčků; měřítko 20 μm

8.7.3 Indukce tvorby ROS pomocí SHAM a KCN

Listy všech rostlin kultivovaných na spodním patře kultivační místnosti po 1 hodině na $750 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR v SHAM pufru vykazovaly silnou přítomnost ROS. Intenzita zbarvení byla srovnatelně velmi silná ve všech rostlinách bez ohledu na jejich mutace (obr. 19). Naproti tomu, pokud se listy těchto rostlin daly na 1 hodinu na $750 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR pouze v čistém pufru, tak se rostliny *sid2* i *exo70B1/sid2* zabarvily znatelněji více nežli Col0 nebo kterýkoli jiný mutant (obr. 19). To souhlasilo s předchozím pozorováním, kdy byly vyloženy na polední slunce (stejně jako byla nižší intenzita světla, tak bylo v tomto pokuse výrazně nižší i zbarvení rostlin). V případě, že se listy těchto rostlin daly do pufru obsahujícího KCN a ponechaly se 1 hodinu na $750 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR, zbarvení Col0 a mutantů *npr1*, *exo70B1* a *exo70B1/npr1* bylo na stejné úrovni jako v pufru neobsahujícím KCN. U rostlin *sid2* a *exo70B1/sid2* došlo však k mírně vyššímu zbarvení listu nežli při použití pufru bez KCN (obr. 19).



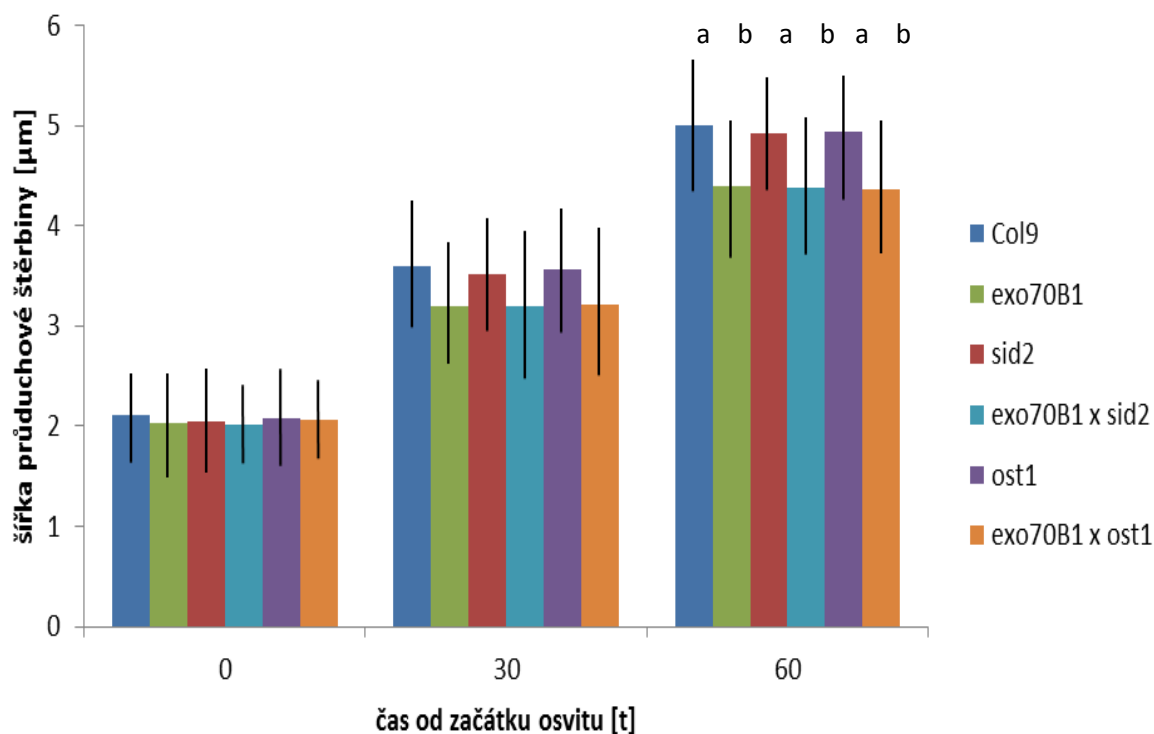
Obrázek 19: tvorba ROS při působení SHAM a KCN po 1 hodině v $750 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR
A – rostlina Col0 v 15mM SHAM; B – rostlina Col0 v 5mM KCN; C – rostlina Col0 v čistém pufru;
D – rostlina *exo70B1/sid2* v 15mM SHAM; E – rostlina *exo70B1/sid2* v 5mM KCN; F – rostlina
exo70B1/sid2 v čistém pufru; měřítko 100 μm

8.8 Dynamika průduchů otevíraných světlem

Průduchová štěrbina z listů nemutantní rostliny se za 1 hodinu otevřela v průměru z 2,1 μm na 5,0 μm . Podobnou statisticky nevýznamně odlišnou rychlostí se zvětšovaly i průduchové štěrbiny mutantů *sid2* a *ost1*. Průduchová štěrbina mutantních rostlin *exo70B1* se za 1 hodinu na světle otevřela z průměrné šířky 2,0 μm na 4,4 μm . Podobnou rychlostí se otevíraly průduchové štěrbiny i u dvojitých mutantů *exo70B1/sid2* a *exo70B1/ost1*. Při analýze statistické významnosti se tento rozdíl v rychlosti otevírání ukázal jako statisticky významný a data byla rozdělena do dvou jasně definovaných skupin (ANOVA s HSD Tukey testem; $p < 0,05$).

8.9 Lokalizace EXO70B1 a RIN4 ve svěřacích buňkách

Pro pozorování lokalizace proteinů RFP-EXO70B1 a GFP-RIN4 byly použity 5 týdnů staré rostliny s trvale vloženými geny UBQ::RFP:EXO70B1 a UBQ::GFP:RIN4. Tyto rostliny byly druhou generací po transformaci rostliny *Arabidopsis thaliana*. Pozorování bylo prováděno v spinning disk konfokálním mikroskopu.

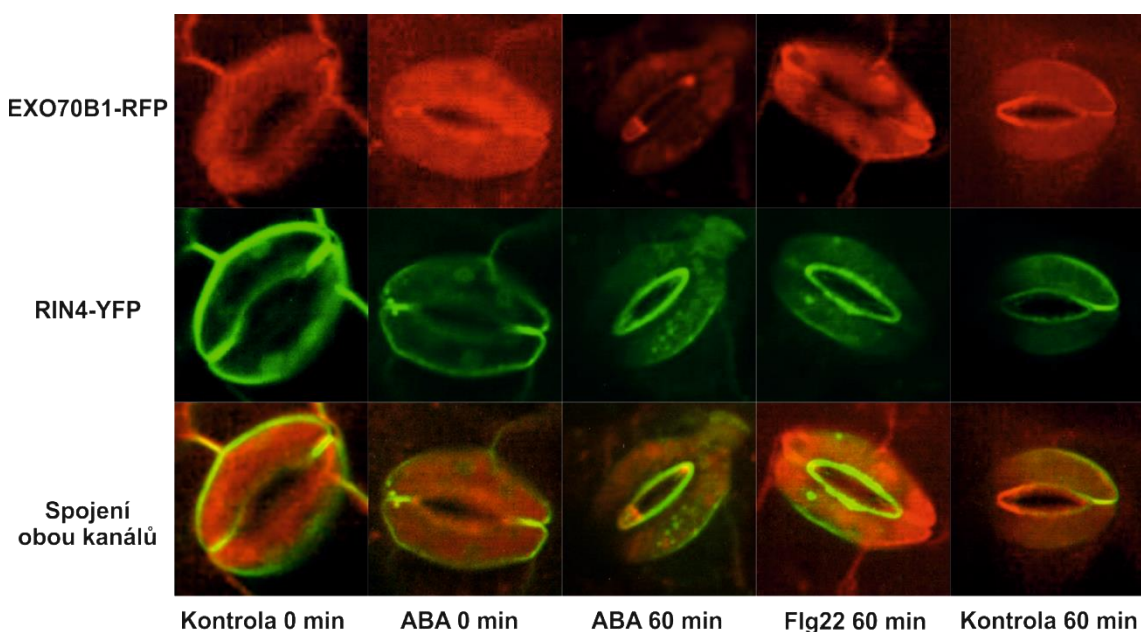


Graf 7: Šifka průduchové štěrbiny v závislosti na délce osvětlení
Rozdílná písmena vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly zjištěné metodou ANOVA s HSD Tukey testem ($p < 0,05$).

Na počátku pozorování byly průduchy otevřené. Signál RFP byl při pozorování slabý, ale lze říct, že lokalizace RFP-EXO70B1 byla v otevřeném průduchu na počátku měření rozložena rovnoměrně v cytoplazmě. Po 1 hodině v ABA pufru se zesílil RFP signál z jádra a signál v cytoplazmě byl uspořádanější s vyšší koncentrací na vnější straně průduchu. Stejný přesun signálu byl pozorovatelný i po 1 hodině působení peptidu flg22. Tento přesun a organizace signálu nebyl pozorován po 1 hodině v čistém kontrolním pufru, kde se naopak zdá, že se RFP-EXO70B1 nacházel více na cytoplazmatické membráně (obr. 20).

Protein GFP-RIN4 měl na počátku v otevřených průduších silnou plasmalemovou lokalizaci. Tato lokalizace velmi zeslábla po 1 hodině v ABA i flg22 a GFP signál se přesunul více do cytoplazmy. Po 1 hodině v kontrolním pufru zůstal signál GFP na cytoplazmatické membráně a nebyl vidět žádný přesun do cytoplazmy (obr. 20).

Na počátku před zavíráním průduchu GFP-RIN4 a RFP-EXO70B1 neměly takřka žádnou společnou lokalizaci. Po 1 hodině v ABA i flg22 se signál obou přesunul do stejné oblasti, avšak přesně určit, o jak silnou kolokalizaci jde, je z těchto dat velmi obtížné.



Obrázek 20: Lokalizace EXO70B1-RFP (UBQ::RFP:EXO70B1) a RIN4-GFP (UBQ::GFP:RIN4) ve svěracích buňkách *Arabidopsis thaliana*

9 DISKUZE

9.1 Rychlost vysoušení

Prvotní indicie před započítím veškerých prací ukazovaly, že mutant *exo70B1* by měl mít zpomalené vysušování. Toto zpomalení bylo připisováno zvýšené koncentraci kyseliny salicylové v mutantovi nebo jinému, doposud nepoznanému mechanismu působení EXO70B1 na dynamiku svěřacích buněk (Kulich et al., 2013 - nepublikovaná data). Jeden z cílů této práce bylo potvrdit nebo vyvrátit tuto domněnku. Z tohoto důvodu byl připraven dvojitý mutant *exo70B1/sid2*. Mutant *sid2* má defektní isochorismát syntázu 1, a není tedy schopen akumulovat kyselinu salicylovou (Wildermuth et al., 2001). Jako kontrola k těmto pokusům byl navíc vytvořen ještě dvojitý mutant *exo70B1/ost1*, který má poškozenou kinázu OST1 a není schopen zavírat průduchy v přítomnosti kyseliny abscisové, ačkoliv jinak je průduchová dynamika v přítomnosti světla, patogenů, CO₂, atd. zachována (Mustilli et al., 2002). Bylo třeba analyzovat fenotyp těchto mutantů, a tak byly do pokusů přidány ještě rostliny mutantní v genech *Exo70E1*, *Exo70E2* a jejich dvojitý mutant, neboť k místům, kde jsou tyto proteiny nejvíce exprimovány patří právě svěřací buňky (Yang et al., 2008).

Protože intenzita a spektrální složení světla jsou jedněmi z nejdůležitějších faktorů určujících průduchový vzor rostlin (Bergmann et al., 2004) a protože bylo ukázáno, že u mutantu *exo70B1* se nekrotické léze ukazují za vyššího osvětlení až v pozdější fázi vývoje (Kulich et al., nepublikovaná data), bylo přistoupeno ke kultivaci rostlin v několika různých kultivačních podmínkách.

Protože za kontrolu odparu vody z rostliny nejsou odpovědné pouze průduchy, ale i kutikula nebo trichomy, bylo nejprve analyzováno, zda nedochází u mutantů ke změně v těchto parametrech.

Co se kutikuly týče, má na ztrátu vody nejvyšší vliv její neporušenost, kdy pokud je kutikula neporušená, tak její tloušťka hraje na celkovém odparu z rostliny vliv pouze v desetinách procenta (Riederer a Schreiber, 2001). Z tohoto důvodu byl pro evaluaci kutikulární vrstvy u našich rostlin použit postup popsáný v Tanaka et al. (2004), což je metoda využívající hydrofilních vlastností barviva toluidinové modři, které má schopnost zabarvit povrch rostliny nechráněný hydrofobní vrstvou do 2 minut, kdežto povrch rostliny krytý hydrofobní kutikulou se nezabarví ani za pětinasobek času. Při těchto testech se nicméně ukázalo, že ani mutant *exo70B1*, ani žádný jiný z našich

testovaných mutantů nemá porušenu kutikulární vrstvu a tedy jakákoliv odchylka v odparu bude způsobena jiným jevem.

Dalším z testovaných parametrů byl počet trichomů na list. Hustota trichomů nebyla počítána, neboť trichomy vznikají ve velmi rané fázi vývoje listu a při růstu listu do plochy již nové nevznikají (Szymanski et al., 1998). Navíc u *Arabidopsis* je ztráta vody omezena trichomy jen při nejmladších listech, kdy jsou trichomy v porovnání k mladému lístku veliké a tvoří hustou síť. U dospělých listů jsou trichomy pravděpodobně již příliš daleko od sebe, aby tvořily efektivní bariéru pro cirkulující vzduch a zabránily tak jakékoliv ztrátě vody (Schreuder et al., 2002). Tomuto by nasvědčoval i fakt, že mladé svěrací buňky ve vyvíjejících se listech ještě nejsou schopny reagovat na podněty z okolí, ale potřebují čas, aby se tomu naučily (Pantin et al., 2013). Pro ověření této teorie by však bylo zapotřebí vytvořit matematický model, který by bral v úvahu tvar rozety a hustotu a velikost trichomů a jejich vliv na laminární a turbulentní proudění vzduchu okolo rostliny.

Žádný z našich testovaných mutantů nevykazoval žádnou změnu v hustotě trichomů a podle dat Mgr. Ivana Kulicha, Ph.D., který se zabývá kvalitativní stránkou trichomů u mutantů v genu *Exo70*, by u našich mutantů neměla být žádná signifikantní změna ovlivňující odpar vody, ani po stránce složení trichomu. Z tohoto vyšlo, že jakákoliv změna v odparu rostlin nemůže být způsobena ani rozdílnými trichomy.

Z výsledků mnou provedených vysoušecích experimentů vyšlo, že mutant *exo70B1* a všichni jeho dvojití mutanti mají mírně zvýšenou ztrátu vody. Toto je v přímém rozporu s daty, která byla naměřena při přípravě článku Kulich et al. (2013). Pokud se však podíváme podrobněji na naše získaná data a na jejich statistické vyhodnocení, tak zjistíme, že statisticky signifikantní rozdíl je pouze mezi rostlinami Col0 a *exo70B1* a *exo70B1* a *npr1* (metoda ANOVA s HSD Tukey testem, $p < 0,05$), což je poněkud zvláštní, neboť trend rychlejšího vysušování je viditelný u všech dvojitých mutantů, kdy jedna z mutací je *exo70B1*, ačkoliv tento trend je u těchto mutantů mírně zeslaben. To znamená, že buď mutace *npr1* a *sid2* oslabují fenotypový projev *exo70B1* (navrženo v Kulich et al., 2013) nebo zde, kvůli náhodě, leží průměr rychlosti mutantů *exo70B1* blíže ke vzdálenějšímu okraji přirozeného výskytu a naopak rostliny Col0 leží na druhé straně, což zesiluje statistickou signifikanci mezi těmito dvěma skupinami a ve skutečnosti by mohlo jít o pouhou náhodu. Pokud porovnááme 9 skupin a u každé skupiny je 5% šance falešně pozitivního výsledku, tak v konečném součtu to znamená, že šance alespoň jednoho falešně pozitivního výsledku je vyšší než 30%. Nicméně pro

to, že *exo70B1* mutant má mírně zrychlené vysychání za podmínek námi použitých hovoří i fakt, že pokud se všechny *exo70B1* mutantní rostliny (tedy i dvojití mutanti) dají do jedné skupiny a všechny *exo70B1* nemutantní rostliny do druhé, tak se statistická významnost rozdílu mezi skupinami významně posílí (párový t-test, $p < 0,001$).

Nicméně je otázkou, zdali námi pozorované rychlejší vysychání má jakýkoliv fyziologicky významný efekt. Ztráta vody vyšší o 2,71 % počáteční hmotnosti za 1 hodinu vysoušení je natolik marginální, že aby to způsobilo významnější pokles fitness, musela by být rostlina *exo70B1* umístěna do extrémních podmínek (Flexas a Medrano, 2002), kde by mnohem horší efekt na fitness měla její porucha v autofagické dráze a porucha akumulace antokyanů. Co dále stojí za pozornost u našich dat je to, že všechny *exo70B1* mutantní rostliny měly více než dvojnásobnou statistickou odchylku oproti rostlinám *exo70B1* nemutantním, což nasvědčuje tomu, že mutant *exo70B1* má výrazně vyšší variabilitu mezi jednotlivými rostlinami než Col0.

Námi změřenými daty však vyvstala otázka, proč se tyto data liší od dat naměřených před čtyřmi lety (obr. 10). Z těchto starších dat vyplývalo, že rostlina *exo70B1* naopak ztrácí vodu pomaleji, kdy ztráta vody rostlin Col0 činila 9 % za 24 minut, kdežto ztráta hmotnosti rostlin *exo70B1* byla pouze 7 %. Rostliny Col0 ale také tuto vodu ztrácejí mnohem rychleji (9 % za 24 minut u starých dat oproti 8,75 % za 60 minut u nových dat u Col0 rostlin).

Na tuto otázku by mohly odpovědět kultivační podmínky a podmínky, za kterých byl vysoušecí pokus vykonáván, neboť ty mohou pokus velmi ovlivnit (Yordanov et al., 2000). Rostliny sice rostly ve stejné kultivační místnosti pod stejným typem osvětlení, avšak rostliny použité pro měření v roce 2012 rostly na policích s nedetekovatelnou rychlostí větru (pod 0,05 m/s) a nové rostliny rostly za rychlosti větru až 0,1 m/s. Navíc je možné, že tyto rostliny měly jiný režim zalévání, ačkoliv toto se zpětně nedá nijak potvrdit. Také podmínky, za kterých byl prováděn pokus, se mírně lišily. Stará data byla měřena v místnosti, která měla okna směřující na východ a jih a pokus byl prováděn v dopoledních hodinách (zda v tu dobu svítilo slunce, už bohužel není známo). Nová data byla naměřena v místnosti s okny směřujícími na západ a pokus byl prováděn mezi 9. – 10. hodinou (bohužel opět není známo, jestli svítilo slunce). Dá se tedy předpokládat, že při našem měření svítilo na rostliny méně světla, které by mohlo interferovat se zavíráním průduchů.

Jako závěr k těmto datům bych tedy poznamenal, že se nedá obecně říci, že mutant *exo70B1* ztrácí rychleji nebo pomaleji vodu nežli nemutantní Col0, ale že je mutant mnohem více závislý na podmínkách, za kterých je kultivován. Tomuto by nasvědčovala i data z publikovaných článků, kdy Kulich et al. (2013) nachází takřka dvojnásobně zvýšenou koncentraci ABA v listech, avšak Hong et al. (2016) žádnou zvýšenou koncentraci ABA nedetekuje. Rostliny použité v Hong et al. (2016) však byly už od pohledu kultivovány v jiných podmínkách, byť rostly ve stejném režimu dne a v obdobných světelných intenzitách. Bohužel není zvykem v článcích zmiňovat rychlost větru, relativní vlhkost vzduchu a světelné spektrum nebo alespoň typ světla, které bylo použito, a proto lze jen velmi těžce porovnat kultivační podmínky mezi jednotlivými publikacemi. Stejně tak bylo pozorováno, že fenotyp nekrotických lézí v *exo70B1* je částečně zachraňován vyšší světelnou intenzitou (Kulich et al., 2013).

9.2 Průduchový vzor

Hustota průduchů rostoucích v kultivační místnosti na spodním patře byla mezi jednotlivými mutanty stejná (rsp. statisticky významně se neodlišovala jedna od druhé). Avšak odlišná byla hustota dvojitých mutantů *exo70B1/sid2* kultivovaných v klimaboxu, kteří měli mnohem vyšší hustotu průduchů. To není překvapivé, neboť při pokusu kultivovat rostliny za různých kultivačních podmínek se ukázalo, že tento mutant, pokud je kultivován v klimaboxu, tak vykazuje trpasličí vzrůst, kdy dosahuje v průměru pouze šestinového vzrůstu oproti Col0 kultivované za stejných podmínek. Mutant *sid2*, který je v klimaboxu asi o 25 % menší než Col0, však nevykazoval žádný statisticky signifikantní rozdíl v hustotě průduchů. To je pravděpodobně dáno velkou variabilitou v hustotě průduchů, která zde byla pozorována.

Co se však signifikantně lišilo mezi jednotlivými mutanty, byla měřená výška průduchů, kdy pokud rostliny rostly v kultivační místnosti na spodním patře, tak zde byla výška průduchů u rostlin mutovaných v genu *Exo70B1* větší než u rostlin v tomto genu nemutovaných a naopak, pokud rostliny rostly v klimaboxu, tak byla výška průduchů mutantů *exo70B1* menší než u rostlin Col0. Velmi zajímavé také je, že Col0 pěstované v na obou stanovištích nemají mezi sebou žádný statisticky významný rozdíl, kdežto rostliny *exo70B1* a jejich dvojité mutanti mezi sebou tento rozdíl statisticky signifikantní mají. Tyto data opět potvrzují teorii, že mutant *exo70B1* je extrémně citlivý na prostředí, ve kterém roste. Je tedy možné, že pokud se mutant *exo70B1*

neúčastní přímo tvorby průduchového vzoru, tak má v závislosti na prostředí posunutou bilanci uhlíku, která vede ke změně průduchového vzoru (Šantrůček et al., 2014).

9.3 Synergismus mutací *exo70B1* a *sid2*

Když se začalo s kultivací mutantů na různých stanovištích a měřila se jejich listová plocha, ukázalo se, že čtyřtýdenní rostliny, které rostly na obou stanovištích, mezi sebou v rámci stanoviště nemají žádný významný rozdíl. To však neplatilo u rostlin pěstovaných v klimaboxu, kde se projevil záhadný fenotyp u mutantu *sid2*, který dorůstal o 25 % menší listové plochy než nemutantní ekotyp Col0 a ještě silněji trpasličí vzrůst dvojitého mutantu *exo70B1/sid2*, který dosahoval vzrůstu menšího než 25 % Col0. Tyto rostliny vypadaly velmi vystresovaně a nebyly schopny produkovat životaschopná semena. V tomto klimaboxu však byly mírně stresovány všechny rostliny. Pravděpodobnou příčinou je porucha membrány, která umožňuje kontrolovat vlhkost vzduchu v klimaboxu, v jejímž důsledku je zde stejná vlhkost vzduchu jako v okolní místnosti. Pro kontrolu, zda je u těchto mutantů problémem vysoká ozáření, vysoká rychlost větru nebo nízká relativní vlhkost vzduchu bylo vyzkoušeno je vypěstovat ve skleničku pod světlem o intenzitě $750 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR. V těchto podmínkách měl mutant *exo70B1/sid2* opět problémy a dorůstal pouze malých velikostí. Tímto se nám podařilo zjistit, že problémem je tedy vysoká ozáření. Stres z vysoké ozáření vede k oxidativnímu stresu (Mittler, 2002). To se potvrdilo v okamžiku, kdy jsme listy rostlin pěstovaných v klimaboxu obarvili pomocí DAB pro detekci ROS. Bylo zde jasně vidět, že dvojitý mutant *exo70B1/sid2* je pod velkým oxidativním stresem. Pod oxidativním stresem se nacházel i mutant *sid2*, avšak ne pod tak vysokým (obr. 17). Pokud jsme následně indukovali tento stres vyložení listů na přímé polední slunce, tak se ukázalo, že *sid2* i dvojitý mutant *exo70B1/sid2* byly pod podobným množstvím stresu, který byl mnohem vyšší než u Col0. Tento výsledek naznačoval, že množství ROS vznikající pod vysokým ozářením je u obou *sid2* mutantů stejné, ale dvojitý mutant *exo70B1/sid2* má pravděpodobně problém s jejich zpracováním, což je ve své podstatě pro rostlinu srovnatelně velký problém, jako samostatná nadprodukce ROS (Apel a Hirt, 2004).

To se potvrdilo při pohledu na mikroskopické snímky rostlin pěstovaných v klimaboxu, obarvených DAB. Zde bylo jasně vidět, že ROS se vyskytují zejména v malých váčkovitých strukturách o velikosti kolem 1 μm . V případě Col0 a mutantu *sid2* však docházelo k agregaci těchto struktur do prstencovitých struktur podobných

autofagozómům, kdežto v mutantech *exo70B1* k jejich hromadění a spojování v hroznovité shluky (obr. 18). To by ukazovalo na to, že autofagická dráha, která je porušená v mutantech *exo70B1* je nutná pro zvládnání zvýšeného oxidativního stresu buňky. Důležitá role autofagie ve zvládnání oxidačních stresů je známa již delší dobu, a to zejména z živočišných buněk (Kiffin et al., 2006).

Na otázku, proč v *sid2* mutantech dochází k zvýšenému výskytu ROS po ozáření, byly na rostliny před barvením DAB aplikovány SHAM, což je inhibitor alternativní oxidázy a KCN, což je inhibitor dýchacího řetězce. Výsledky z tohoto barvení ukázaly, výrazný výskyt ROS ve všech rostlinách po aplikaci SHAM a vysokého ozáření. Aplikace KCN a vysokého ozáření zvýšila výskyt ROS pouze u mutantů *sid2* a *exo70B1/sid2*. Toto zvýšení bylo pouze mírné a bylo by třeba pokus zopakovat s vyšším ozářením, avšak zdá se, že mutant *sid2* má sníženou kapacitu alternativní oxidázy. Kapacita alternativní oxidázy je pravděpodobně snížena z toho důvodu, že salicylová kyselina je klíčovým induktorem tvorby proteinu AOX1 (Rhoads a McIntosh, 1992; Kapulnik, et al. 1992). Pro nízkou kapacitu alternativní oxidázy svědčí také fakt, že bylo již dříve pozorováno, že při inhibici alternativní oxidázy se většina ROS tvoří nikoliv v chloroplastech, ale v mitochondriích (Popov et al., 1997), což by odpovídalo našemu pozorování. Prezentované důkazy jsou nicméně nepřímé a pro podání přesvědčivého důkazu o snížení kapacity alternativní dráhy by bylo třeba použít měření respirace a příjmu kyslíku v přítomnosti KCN (Laties, 1982).

V každém případě však lze říci, že trpasličí fenotyp pozorovaný u dvojitého mutantu *exo70B1/sid2* s nejvyšší pravděpodobností souvisí se dvěma ne zcela příbuznými jevy, kdy mutant *sid2* se vyznačuje vyšší tvorbou ROS za zvýšeného osvětlení, pravděpodobně kvůli slabě exprimovanému AOX1, a mutant *exo70B1*, kvůli své poruše autofagie, není schopen se vypořádat s vysokým oxidativním stresem.

9.4 Dynamika průduchů

Při měření dynamiky průduchů otevíraných světlem se ukázalo, že všechny mutanty *exo70B1* pěstované pod mírným osvětlením mají zpomalené otevírání průduchů oproti Col0. Na toto zpomalení neměla vliv mutace *npr1*, *sid2* ani *ost1*. Tento výsledek naznačuje, že kyselina salicylová nemá vůbec žádný vliv na ovlivnění průduchové dynamiky u mutantů *exo70B1*. Bylo by však třeba zopakovat tyto pokusy a u pokusných rostlin vždy analyzovat množství fytohormonů, neboť je pravděpodobné, že v mnou měřených rostlinách nebyla kyselina salicylová akumulována, jinak by byl její vliv na

průduchovou dynamiku bezpochyby vidět (Poór et al., 2011). Mnou naměřené hodnoty se shodují s hodnotami publikovanými v Hong et al. (2016).

9.5 Kolokalizace EXO70B1 a RIN4 ve svěracích buňkách

Protein RFP-EXO70B1 se v otevřených průduších na počátku pozorování nacházel zejména v cytoplazmě se slabou cytoplazmatickou lokalizací, kdežto ve všech okolních epidermálních buňkách byla jeho lokalizace pouze membránová. Je otázka, zda je tato cytoplazmatická lokalizace přirozená nebo se zde RFP-EXO70 nachází v důsledku přeexprimování pod ubikvitinovým promotorem, neboť v Hong et al. (2016) při tranzientní expresi RFP-EXO70 ve *Vicia faba* byl signál cytoplazmatický pouze částečně a většina se vyskytovala na membráně.

Po zavření průduchu došlo k posunu červeného signálu EXO70-RFP do organizovanějších struktur uvnitř cytoplazmy a do jádra, což bylo zcela v souladu s daty z Hong et al. (2016).

GFP-RIN4 se v otevřených průduších nacházel takřka výhradně v cytoplazmatické membráně a v uzavřených průduších se signál silně internalizoval do struktur v cytoplazmě. Pohyb RIN4 ve svěracích buňkách během stomatálních pohybů ještě nebyl nikdy publikován, avšak vzhledem k tomu, že se jedná o interaktor AHA1 a AHA2 (Liu et al., 2009), tak jeho internalizace do cytoplazmy v průběhu zavírání není překvapující.

Pozorovat kolokalizaci RIN4 a EXO70B1 je z našich snímků obtížné a pro přesné určení, zda k ní dochází, bude třeba kvalitnějších snímků ve vyšším rozlišení.

10 SOUHRN

1. - Podařilo se nám ukázat, že i již dobře analyzovaný mutant rostliny *Arabidopsis thaliana* jako je *sid2*, pokud je kultivovaný za nestandardních podmínek, může vykázat neočekávaný a do této doby nepozorovaný trpasličí fenotyp při vysokém osvětlení způsobený zvýšenou tvorbou ROS.

Tato zvýšená tvorba ROS je pravděpodobně způsobena nižší kapacitou dráhy alternativní oxidázy v mitochondriích.

2. - Tento trpasličí fenotyp byl výrazně zesílen při zakřížení s mutací *exo70B1*, která způsobuje zpomalené odbourávání těchto ROS vlivem poruchy autofagické dráhy.

3. - Nepodařilo se nám určit jednoznačný vliv mutace *exo70B1* na odpar z listu rostliny, neboť se ukázalo, že fenotypový projev mutantu *exo70B1* je extrémně závislý na kultivačních podmínkách. Podařilo se nám však určit zpomalené otevírání průduchů vlivem světla u mutantu *exo70B1*. Stejný jev byl v tomto roce publikován (Hong et al., 2016).

4. - Nepodařilo se nám ukázat jakýkoliv fenotypový projev u mutantů *exo70E1*, *exo70E2* a ani jejich dvojitého mutantu. To nasvědčuje tomu, že ačkoliv se ve svěracích buňkách exprimují EXO70E1 i EXO70E2 silně, jejich funkce bude pravděpodobně redundantní s jinou EXO70.

5. - Provedli jsme vizualizaci proteinů RFP-EXO70 a GFP-RIN4 ve svěracích buňkách a určili jsme jejich lokalizaci v průběhu zavírání průduchu. Podle předběžných výsledků je možné, že zde dochází ke kolokalizaci.

11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Acharya BR, Assmann SM** (2009) Hormone interactions in stomatal function. *Plant molecular biology*, 69(4), 451-462
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399
- Bakker JC** (1991) Effects of humidity on stomatal density and its relation to leaf conductance. *Scientia Horticulturae*, 48(3), 205-212
- Bergmann DC, Lukowitz W, Somerville CR** (2004) Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science*, 304(5676), 1494-1497
- Blatt MR, Leyman B, Geelen D** (1999) Molecular events of vesicle trafficking and control by SNARE proteins in plants. *The New phytologist* 44, 388–418
- Blatt MR** (2000) Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annual review of cell and developmental biology*, 16(1), 221-241
- Boyd C, Hughes T, Pypaert M, Novick P** (2004) Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *Journal of Cell Biology* 167, 889-901
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ** (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal*, 45(1), 113-122
- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila E, Girke T, Raikhel N** (2004) The vegetative vacuole proteome of Arabidopsis thaliana reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* 16, 3285–3303
- Casson SA, Franklin KA, Gray JE, Grierson CS, Whitelam GC, Hetherington AM** (2009) Phytochrome B and PIF4 regulate stomatal development in response to light quantity. *Current Biology*, 19(3), 229-234
- Cole RA, Synek L, Žárský V, Fowler JE** (2005) SEC8, a subunit of the putative Arabidopsis exocyst complex, facilitates pollen germination and competitive pollen tube growth. *Plant Physiology* 138, 2005-2018
- Cvrckova F, Elias M, Hala M, Obermeyer G, Zarsky V** (2001) Small GTPases and conserved signalling pathways in plant cell morphogenesis: From exocytosis to the exocyst. *Cell Biology of Plant and Fungal Tip Growth* 328, 105-122
- Cvrčková F, Grunt M, Bezvoda R, Hála M, Kulich I, Rawat A, Žárský V** (2012) Evolution of the land plant exocyst complexes. *Frontiers in Plant Science* 3: article 159
- Daudi A, O'Brien JA** (2012) Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in Arabidopsis leaves. *Bio Protocol*, 2, e263
- Diekmann W, Hedrich R, Raschke K, Robinson DG** (1993) Osmocytosis and vacuolar fragmentation in guard cell protoplasts: their relevance to osmotically-induced volume changes in guard cells. *Journal of Experimental Botany* 44, 1569–1577
- Ding Y, Wang J, Lai JHC, Chan VHL, Wang X, Cai Y, Tan X, Bao Y, Xia J, Robinson DG, Jiang L** (2014) Exo70E2 is essential for exocyst subunit recruitment and EXPO formation in both plants and animals. *Molecular biology of the cell* 25(3), 412-426
- Drdová EJ, Synek L, Pečenková T, Hála M, Kulich I, Fowler JE, Murphy AS, Žárský V** (2013) The exocyst complex contributes to PIN auxin efflux carrier recycling and polar auxin transport in Arabidopsis. *Plant Journal* 73, 709-719

- Eckert M, Kaldenhoff R** (2000) Light-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants. *Journal of Experimental Botany*, 51(349), 1435-1442
- Edwards M, Meidner H, Sheriff DW** (1976) Direct measurement of turgor pressure potentials of guard cells: II. The mechanical advantage of subsidiary cells, the spannungphase, and the optimum leaf water deficit. *Journal of Experimental Botany* 27, 163–171
- Eisinger W, Ehrhardt D, Briggs W** (2012) Microtubules are essential for guard-cell function in *Vicia* and *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 5(3), 75-84
- Eliš M, Drdová E, Ziak D, Bavlnka B, Hála M, Cvrčková F, Soukupová H, Žárský V** (2003) The exocyst complex in plants. *Cell Biology International* 27, 199-201
- Fendrych M, Synek L, Pecenkova T, Toupalova H, Cole R, Drdova E, Nebesarova J, Sedinova M, Hala M, Fowler JE, Zarsky V** (2010) The Arabidopsis Exocyst Complex Is Involved in Cytokinesis and Cell Plate Maturation. *Plant Cell* 22, 3053-3065
- Fendrych M, Synek L, Pečenkova T, Drdová EJ, Sekereš J, de Rycke R, Nowack MK, Žárský V** (2013) Visualization of the exocyst complex dynamics at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology of the Cell* 24, 510-520
- Flexas J, Medrano H** (2002) Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of botany*, 89(2), 183-189
- Franks PJ, Cowan IR, Farquhar OD** (1998) A study of stomatal mechanics using the cell pressure probe. *Plant, Cell & Environment* 21, 94–100
- Franks PJ, Buckley TN, Shope JC, Mott KA** (2001) Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe. *Plant Physiology* 125, 1577–1584
- Fraser LH, Greenall A, Carlyle C, Turkington R, Friedman CR** (2009) Adaptive phenotypic plasticity of *Pseudoroegneria spicata*: response of stomatal density, leaf area and biomass to changes in water supply and increased temperature. *Annals of Botany*, 103(5), 769-775
- Galatis B, and Apostolakos P** (2004) The role of cytoskeleton in the morphogenesis and function of stomatal complexes. *New Phytologist* 161, 613–639
- Gao XQ, Li CG, Wei PC, Zhang XY, Chen J, Wang XC** (2005) The dynamic changes of tonoplasts in guard cells are important for stomatal movement in *Vicia faba*. *Plant Physiology* 139, 1207–1216
- Gao XQ, Wang XL, Ren F, Chen J, Wang, XC** (2009). Dynamics of vacuoles and actin filaments in guard cells and their roles in stomatal movement. *Plant, cell & environment*, 32(8), 1108-1116
- Glinka Z** (1971) The effect of epidermal cell water potential on stomatal response to illumination of leaf discs of *Vicia faba*. *Physiologia Plantarum* 24, 476–479
- Gobert A, Isayenkov S, Voelker C, Czempinski K, Maathuis FJM** (2007) The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 10726–10731
- Gordon-Kamm WJ, Steponkus PL** (1984) The influence of cold acclimation on the behavior of the plasma membrane following osmotic contraction of isolated protoplasts. *Protoplasma* 123,161– 173
- Hála M, Cole R, Synek L, Drdová E, Pečenkova T, Nordheim A, Lamkemeyer T, Madlung J, Hochholdinger F, Fowler JE, Zarsky V** (2008) An exocyst complex

- functions in plant cell growth in Arabidopsis and tobacco. *Plant Cell* 20, 1330-1345
- Hashimoto M, Negi J, Young J, Israelsson M, Schroeder JI, Iba K** (2006) Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nature cell biology*, 8(4), 391-397
- He B, Xi FG, Zhang J, TerBush D, Zhang XY, Guo W** (2007) Exo70p mediates the secretion of specific exocytic vesicles at early stages of the cell cycle for polarized cell growth. *Journal of Cell Biology* 176, 771-777
- Higaki T, Kutsuna N, Hosokawa Y, Akita K, Ebine K, Ueda T, Kondo N, Hasezawa S** (2012) Statistical organelle dissection of Arabidopsis guard cells using image database LIPS. *Scientific reports*, 2
- Hong D, Jeon BW, Kim SY, Hwang JU, Lee Y** (2016) The ROP2-RIC7 pathway negatively regulates light-induced stomatal opening by inhibiting exocyst subunit Exo70B1 in Arabidopsis. *New Phytologist*, 209(2), 624-635
- Hossain MA, Munemasa S, Uraji M, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y** (2011) Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 156(1), 430-438
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Poree F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very AA** (2003) The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100, 5549-5554
- Hurst AC, Meckel T, Tayefeh S, Thiel G, Homann U** (2004) Trafficking of the plant potassium inward rectifier KAT1 in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Journal* 37, 391-397
- Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osório ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C** (2002) How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of botany*, 89(7), 907-916
- Irving HR, Gehring CA, Parish RW** (1992) Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1790-1794
- Islam MM, Hossain MA, Jannat R, Munemasa S, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y** (2010) Cytosolic alkalization and cytosolic calcium oscillation in Arabidopsis guard cells response to ABA and MeJA. *Plant and Cell Physiology*, 51(10), 1721-1730
- Gehring CA, Irving HR, McConchie R, Parish RW** (1997) Jasmonates Induce Intracellular Alkalinization and Closure of *Paphiopedilum* Guard Cells. *Annals of Botany*, 80(4), 485-489
- Jeon BW, Hwang J-U, Hwang Y, Song W-Y, Fu Y, Gu Y, Bao F, Cho D, Kwak JM, Yang Z, Lee Y** (2008) The Arabidopsis small G protein ROP2 is activated by light in guard cells and inhibits light-induced stomatal opening. *Plant Cell* 20, 75-87
- Jordan WR, Brown KW, Thomas JC** (1975) Leaf age as a determinant in stomatal control of water loss from cotton during water stress. *Plant Physiology*, 56(5), 595-599
- Kang CY, Lian HL, Wang FF, Huang JR, Yang HQ** (2009) Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(9), 2624-2641
- Kapulnik Y, Yalpani N, Raskin I** (1992) Salicylic acid induces cyanide-resistant respiration in tobacco cell-suspension cultures. *Plant physiology*, 100(4), 1921-1926

- Kee Y, Yoo JS, Hazuka CD, Peterson KE, Hsu SC, Scheller RH** (1997) Subunit structure of the mammalian exocyst complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14438-14443
- Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM** (2006) Oxidative stress and autophagy. *Antioxidants & redox signaling*, 8(1-2), 152-162
- Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl JL, Mackey D** (2005) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell*, 121(5), 749-759
- Kubitscheck U, Homann U, Thiel G** (2000) Osmotically evoked shrinking of guard cell protoplasts causes vesicular retrieval of plasmamembrane into the cytoplasm. *Planta* 210, 423–431
- Kulich I, Cole R, Drdová E, Cvrčková F, Soukup A, Fowler J, Žárský V** (2010) *Arabidopsis* exocyst subunits SEC8 and EXO70A1 and exocyst interactor ROH1 are involved in the localized deposition of seed coat pectin. *New Phytologist* 188, 615-625
- Kulich I, Pečenková T, Sekereš J, Smetana O, Fendrych M, Foissner I, Höftberger M, Žárský V** (2013) *Arabidopsis* exocyst subcomplex containing subunit EXO70B1 is involved in the autophagy-related transport to the vacuole. *Traffic* 14, 1155-1165
- Kulich I, Vojtíková Z, Glanc M, Ortmannová J, Rasmann S, Žárský V** (2015) Cell wall maturation of *Arabidopsis* trichomes is dependent on exocyst subunit EXO70H4 and involves callose deposition. *Plant physiology*, 168(1), 120-131
- Kutsuna, N. and Hasezawa, S.** (2005) Morphometrical study of plant vacuolar dynamics in single cells using three-dimensional reconstruction from optical sections. *Microscopy Research and Technique* 68, 296–306
- Lake JA, Quick WP, Beerling DJ, Woodward FI** (2001) Plant development: signals from mature to new leaves. *Nature*, 411(6834), 154-154
- Lake JA, Woodward FI** (2008) Response of stomatal numbers to CO₂ and humidity: control by transpiration rate and abscisic acid. *New Phytologist*, 179(2), 397-404
- Laties GG** (1982) The cyanide-resistant, alternative path in higher plant respiration. *Annual Review of Plant Physiology*, 33(1), 519-555
- Li S, Assmann SM, Albert R** (2006) Predicting essential components of signal transduction networks: a dynamic model of guard cell abscisic acid signaling. *PLoS Biology*, 4(10), e312
- Li BB, Liu GF, Deng YY, Xie M, Feng ZG, Sun MZ, et al.** (2010) Excretion and folding of plasmalemma function to accommodate alterations in guard cell volume during stomatal closure in *Vicia faba* L. *Journal of Experimental Botany* 61, 3749-58
- Liu J, Elmore JM, Fuglsang AT, Palmgren MG, Staskawicz BJ, Coaker G** (2009) RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biol*, 7(6), e1000139
- Lynch-Day MA, Bhandari D, Menon S, Huang J, Cai HQ, Bartholomew CR, Brumell JH, Ferro-Novick S, Klionsky DJ** (2010) Trs85 directs a Ypt1 GEF, TRAPPIII, to the phagophore to promote autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 7811-7816
- Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL** (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, 108(6), 743-754
- MacRobbie EAC** (1995) ABA-induced ion efflux in stomatal guard cells multiple actions of ABA inside and outside the cell. *Plant Journal* 7, 565–76

- MacRobbie EAC** (1997) Signalling in guard cells and regulation of ion channel activity. *Journal of Experimental Botany* 48, 515–28
- Merlot S, Leonhardt N, Fenzi F, Valon C, Costa M, Piette L, Vavasseur A, Genty B, Boivin K, Müller A, Giraudat J, Leung J** (2007) Constitutive activation of a plasma membrane H⁺-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *The EMBO Journal*, 26(13), 3216-3226
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410
- Mori IC, Pinontoan R, Kawano T, Muto S** (2001) Involvement of superoxide generation in salicylic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant and Cell Physiology*, 42(12), 1383-1388
- Munson M, Novick P** (2006) The exocyst defrocked, a framework of rods revealed. *Nature Structural & Molecular Biology* 13, 577-581
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J** (2002) Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *The Plant Cell*, 14(12), 3089-3099
- Nakamura RL, McKendree WL, Hirsch RE, Sedbrook JC, Gaber RF, Sussman MR** (1995) Expression of an Arabidopsis potassium channel gene in guard cells. *Plant Physiology*, 109(2), 371-374
- Nonami H, Schulze E-D, Ziegler H** (1990) Mechanisms of stomatal movement in response to air humidity, irradiance and xylem water potential. *Planta* 183, 57–64
- Pandey S, Zhang W, and Assmann SM** (2007) Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters* 581, 2325–2336
- Pantin F, Renaud J, Barbier F, Vavasseur A, Le Thiec D, Rose C, Bariac T, Casson S, McLachlan DH, Hetherington AM, Muller B, Simonneau T** (2013) Developmental priming of stomatal sensitivity to abscisic acid by leaf microclimate. *Current Biology*, 23(18), 1805-1811
- Pečenková T, Hála M, Kulich I, Kocourková D, Drdová E, Fendrych M, Toupalová H, Žárský V** (2011) The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction. *Journal of Experimental Botany* 62, 2107-2116
- Pei, ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406(6797), 731-734
- Pilot G, Lacombe B, Gaymard K, Cherel I, Boucherez J, Thibaud JB, Sentenac H,** (2001) Guard cell inward K⁺ channel activity in Arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 3215–3221
- Pleskot R, Cwiklik L, Jungwirth P, Žárský V, Potocký M** (2015). Membrane targeting of the yeast exocyst complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Biomembranes*, 1848(7), 1481-1489
- Poór P, Gémes K, Horváth F, Szepesi A, Simon ML, Tari I** (2011) Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO₂ fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decreases harmful effects of subsequent salt stress. *Plant Biology*, 13(1), 105-114
- Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP, Starkov AA** (1997) Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS letters*, 415(1), 87-90

- Raschke K, Fellows MP** (1971) Stomatal movement in *Zea mays*, shuttle of potassium and chloride ions between guard cells and subsidiary cells. *Planta* 1110, 296–316
- Raschke K** (1979) in *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Physiology of Movements*, ed. Feinleib, H. W. A. M. E. (Springer, New York), Vol. 7, 383–441
- Reynolds-Henne CE, Langenegger A, Mani J, Schenk N, Zumsteg A, Feller U** (2010) Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1), 37-43
- Rhoads DM, McIntosh L** (1992) Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *The Plant Cell*, 4(9), 1131-1139
- Riederer M, Schreiber L** (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of experimental botany*, 52(363), 2023-2032
- Robinson NG, Guo L, Imai J, Toh-e A, Matsui Y, Tamanoi F** (1999) Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Molecular and Cellular Biology*, 19(5), 3580-3587
- Roelfsema MRG, and Hedrich R** (2005) In the light of stomatal opening: new insights into “the Watergate”. *The New phytologist* 167, 665–691
- Rajo E, Zouhar J, Kovaleva V, Hong S, Raikhel N** (2003) The AtC-VPS protein complex is localized to the tonoplast and the prevacuolar compartment in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell* 14, 361–369
- Rui Y, and Anderson TCh** (2016) "Functional Analysis of Cellulose and Xyloglucan in the Walls of Stomatal Guard Cells of *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 170.3, 1398-1419
- Salisbury EJ** (1928) On the causes and ecological significance of stomatal frequency, with special reference to the woodland flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 216, 1-65
- Saxton MJ, Breidenbach RW** (1988) Receptor-mediated endocytosis in plants is energetically feasible. *Plant Physiology* 86, 993–995
- Sekiya N, Yano K** (2008) Stomatal density of cowpea correlates with carbon isotope discrimination in different phosphorus, water and CO₂ environments. *New Phytologist*, 179(3), 799-807
- Shackel KA** (1987) Direct measurement of turgor and osmotic potential in individual epidermal cells. *Plant Physiology* 83, 719–722
- Sharpe PJH, Wu H, Spence RD** (1987) Stomatal mechanics. In E Zeiger, GD Farquhar, IR Cowan, eds, *Stomatal Function*. Stanford University Press, Stanford, CA, pp 91–114
- Schreuder, M. D., Brewer, C. A., & Heine, C.** (2001) Modelled influences of non-exchanging trichomes on leaf boundary layers and gas exchange. *Journal of theoretical biology*, 210(1), 23-32
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D** (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52, 627–658
- Schoch PG, Zinsou C, Sibi M** (1980) Dependence of the stomatal index on environmental factors during stomatal differentiation in leaves of *Vigna sinensis* L. 1. Effect of light intensity. *Journal of Experimental Botany*, 31(5), 1211-1216
- Simmons AR, Bergmann DC** (2016) Transcriptional control of cell fate in the stomatal lineage. *Current opinion in plant biology*, 29, 1-8
- Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A** (2004) Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate-and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology*, 134(4), 1536-1545

- Sutter JU, Campanoni P, Tyrrell M, Blatt MR** (2007) Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the Arabidopsis KAT1 K⁺ channel at the plasma membrane. *The Plant Cell* 18, 935–954
- Synek L, Schlager N, Eliáš M, Quentin M, Hauser MT, Žárský V** (2006) AtEXO70A1, a member of a family of putative exocyst subunits specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development. *Plant Journal* 48, 54-72
- Szymanski DB, Jilk RA, Pollock SM, Marks MD** (1998) Control of GL2 expression in Arabidopsis leaves and trichomes. *Development*, 125(7), 1161-1171
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K, Hedrich R** (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2917-2921
- Šantrůček J, Vráblová M, Šimková M, Hronková M, Drtinová M, Květoň J, Vrábl D, Kubásek J, Macková J, Wiesnerová D, Schreiber L, Neuwithová, J.** (2014) Stomatal and pavement cell density linked to leaf internal CO₂ concentration. *Annals of botany*, 114(2), 191-202
- Talbott LD, Zeiger E** (1993) Sugar and organic acid accumulation in guard cells of *Vicia faba* in response to red and blue light. *Plant Physiology* 102, 1163–1169
- Talbott LD, Zeiger E** (1996) Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation, *Plant physiol* 111, 1051-1057
- Tanaka T, Tanaka H, Machida C, Watanabe M, Machida Y** (2004) A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 37(1), 139-146
- Tanaka Y, Kutsuna N, Kanazawa Y, Kondo N, Hasezawa S, Sano T** (2007) Intra-vacuolar reserves of membranes during stomatal closure: the possible role of guard cell vacuoles estimated by 3-D reconstruction. *Plant and Cell Physiology* 48, 1159–1169
- Tanaka Y, Nose T, Jikumaru Y, Kamiya Y** (2013) ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in Arabidopsis leaves. *The Plant Journal*, 74(3), 448-457
- TerBush DR, Maurice T, Roth D, Novick P** (1996) The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Journal* 15, 6483-6494
- Thomas PW, Woodward FI, Quick WP** (2004) Systemic irradiance signalling in tobacco. *New phytologist*, 161(1), 193-198
- Turner NC, a Jones MM** (1980) Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation. *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress* (NC Turner and PJ Kramer, Editors), 87-103
- Uemura T, Yoshimura SH, Takeyasu K, Sato MH** (2002) Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes to Cells* 7, 743–753
- Vukašinović N, Cvrčková F, Eliáš M, Cole R, Fowler JE, Žárský V, Synek L** (2014) Dissecting a hidden gene duplication: the Arabidopsis thaliana SEC10 locus. *PLoS one*, 9(4), e94077
- Wang Y, Hills A, Blatt MR** (2014) Systems analysis of guard cell membrane transport for enhanced stomatal dynamics and water use efficiency. *Plant physiology*, 164(4), 1593-1599
- Wen TJ, Hochholdinger F, Sauer M, Bruce W, Schnable PS** (2005). The roothairless1 gene of maize encodes a homolog of sec3, which is involved in polar exocytosis. *Plant physiology*, 138(3), 1637-1643

- Whyte JRC, Munro S** (2002) Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *Journal of Cell Science* 115, 2627-2637
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562-565
- Wille A, Lucas W** (1984) Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. *Planta* 160, 129-42
- Woodward FI, Kelly CK** (1995) The influence of CO₂ concentration on stomatal density. *New Phytologist*, 131(3), 311-327
- Wolfe J, and Steponkus PL** (1983) Mechanical properties of the plasma membrane of isolated protoplasts. *Plant Physiology* 71, 276-285
- Wolfe J, Dowgert MF, Steponkus PL** (1986) Mechanical study of the deformation of the plasma membranes of protoplasts during osmotic expansions. *Journal of Membrane Biology* 93, 63-74
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C** (2012) The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell reports*, 1(6), 639-647
- Yan F, Sun Y, Song F, Liu F** (2012) Differential responses of stomatal morphology to partial root-zone drying and deficit irrigation in potato leaves under varied nitrogen rates. *Scientia Horticulturae*, 145, 76-83
- Yang Y, Costa A, Leonhardt N, Siegel RS, Schroeder JI** (2008) Isolation of a strong Arabidopsis guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods*, 4(1), 1
- Yordanov I, Velikova V, Tsonev T** (2000) Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38(2), 171-186
- Zarsky V, Cvrckova F, Potocky M, Hala M** (2009) Exocytosis and cell polarity in plants - exocyst and recycling domains. *New Phytologist* 183, 255-272
- Zhang Y, Immink R, Liu CM, Emons AM, Ketelaar T** (2013) The Arabidopsis exocyst subunit SEC3A is essential for embryo development and accumulates in transient puncta at the plasma membrane. *New Phytologist*, 199(1), 74-88
- Zhao Y, Liu J, Yang C, Capraro BR, Baumgart T, Bradley RP, Ramakrishnan N, Xu X, Radhakrishnan R, Svitkina T, Guo W** (2013) Exo70 generates membrane curvature for morphogenesis and cell migration. *Developmental cell*, 26(3), 266-278
- Zhao T, Rui L, Li J, Nishimura MT, Vogel JP, Liu N, Zhao Y, Dangl JL, Tang D** (2015) A truncated NLR protein, TIR-NBS2, is required for activated defense responses in the exo70B1 mutant. *PLoS Genet*, 11(1), e1004945