

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta
Experimentální biologie rostlin

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a molekulární biologie rostlin



Bc. Jana Modráčková

**Studium funkce genů *EXO70H7* a *EXO70H8* ve vývoji
Arabidopsis thaliana.**

Function study of *EXO70H7* and *EXO70H8* genes in *Arabidopsis thaliana* development.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitelka: Mgr. Zdeňka Kubátová

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze, 7.8.2020

.....

Poděkování:

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Zdeňce Kubátové za trpělivé vedení, bezmeznou ochotu a pozitivní přístup. Dále velký dík patří profesoru Viktorovi Žárskému a docentce Fatimě Cvrčkové za připomínky, náměty a důležité znalosti, bez kterých by tato práce nedošla zdárnému konci. Všem členům naší laboratoře děkuji za nesmírnou ochotu mi vždy pomoci a poradit s čímkoliv a též děkuji laborantce Martě Čadyové za umožnění hladkého průběhu práce v laboratoři. V neposlední řadě patří velký dík mé rodině a přátelům za jejich nekonečnou podporu.

ABSTRAKT

Komplex exocyst je osmi-proteinový komplex známý též jako Sec6/8 a jeho kompozice je evolučně vysoce konzervovaná napříč organismy. Tento komplex se účastní váčkového transportu jakožto součást poutacího mechanismu na specifické místo plazmatické membrány. V genomu *Arabidopsis thaliana* se jeho podjednotka EXO70 vyskytuje ve 23 kopiích tohoto genu. V práci byly studované paralogy *EXO70H7* a *EXO70H8*, u kterých podle dosud dostupných informací vzniklo podezření na důležitost ve vývoji kořene. U rostlin mutantních v těchto genech se během práce nepodařilo identifikovat žádný výrazný fenotypový projev. Pomocí experimentů za stresových podmínek byly testovány další projevy mutací v těchto genech. Většina těchto experimentů neidentifikovala žádné odchylky. Pouze při klíčení semen za stresových podmínek bylo zjištěno, že dochází k signifikantně horšímu klíčení mutantních semen *exo70H7* na médiích obsahujících sorbitol, což poukazuje na horší obranu proti osmotickému stresu. Signifikantní zhoršení v klíčení semen *exo70H8* na médiu s nadbytkem NaCl naznačuje větší náchylnost k nadbytečnému příjmu iontů sodíku. Analýza buněčné lokalizace pomocí vytvořených konstruktů s GFP přinesla poznání lokalizace těchto proteinů. EXO70H7 se lokalizuje v cytoplazmě a v jádře s negativně kontrastním jádérkem a lokalizace EXO70H8 byla nalezena v cytoplazmě s negativními tělísky bez signálu. Získaná data vytvářejí nové pole pro další výzkum, který upřesní roli těchto podjednotek.

Klíčová slova:

exocytóza, komplex exocyst, geny *EXO70*, endodermis, *Arabidopsis thaliana*

ABSTRACT

Complex Exocyst consists of eight proteins and it is known as a Sec6/8. Its composition is evolutionarily highly conserved amongst all the species. This complex is involved in vesicle trafficking as a part of attaching mechanism to a specific place on the plasma membrane. EXO70 subunit has been found in 23 copies in *Arabidopsis thaliana* genome. In this study we have been examine paralogues EXO70H7 and EXO70H8. There have been suggestions that these genes are important in development of roots according to the previous studies. We have not been able to identify any significant phenotype within the mutant plants in these genes. There has been studied other mutant appearance during the stress experiments. Most of these experiments did not identify any divergence. Only experiments with germination during stress conditions revealed significantly worse germination of *exo70H7* mutant seeds on the medium containing sorbitol. This suggests that mutant seeds have a worse protection against osmotic stress. Significantly worse germination of *exo70H8* seeds on the medium with excess NaCl indicates that these seeds incriminate to higher absorption of sodium ions. Analysis of the cell localization of GFP constructs brought knowledge of appearance EXO70H7 and EXO70H8 proteins. EXO70H7 locates in the cytoplasm and in the cell nucleus with the negatively contrasting nucleolus. EXO70H8 has been found in the cytoplasm with the negatively contrasting bodies without signal. Gained information are creating new field for further research, which will specify the role of these subunits.

Key words:

exocytosis, exocyst complex, genes *EXO70*, endodermis, *Arabidopsis thaliana*

Obsah

1 Úvod a cíle práce.....	1
2 Literární přehled.....	2
2.1 Vývoj kořene v přítomnosti stresových faktorů.....	2
2.1.1 Ochranné vrstvy kořene podle Nawrath et al., 2013	2
2.1.2 Zóny kořene podle Takatsuka and Umeda, 2014 a Verbelen et al., 2006.....	3
2.2 Vliv vybraných stresových faktorů na vývoj kořene	4
2.2.1 Vliv solného stresu na vývoj kořene	4
2.2.2 Vliv nadbytku či nedostatku železa v půdě na vývoj kořene	6
2.3 Úloha komplexu exocyst v kořeni při stresových podmínkách	7
2.3.1 Komplex exocyst.....	7
2.3.2 Proteiny EXO70 v obraně proti stresům	8
2.3.3 Podjednotka EXO70H7.....	9
2.3.4 Podjednotka EXO70H8.....	10
3 Materiály a metodika	11
3.1 Rostlinný materiál a podmínky kultivace	11
3.2 In vitro <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
3.2.1 Složení médií.....	11
3.3 Podmínky stresové kultivace <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
3.3.1 Složení médií pro stresovou kultivaci:.....	12
3.4 Bakteriální kultury a podmínky jejich kultivace.....	12
3.4.1 Složení médií.....	13
3.5 Genotypování	13
3.5.1 Izolace genomické DNA	13
3.5.2 Genotypování	13
3.5.3 Agarová elektroforéza.....	14
3.6 Křížení rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
3.7 Klonování.....	15
3.7.1 Polymerázová řetězová reakce.....	15
3.7.2 Purifikace fragmentů z DNA gelu.....	15
3.7.3 5' TOPO klonování.....	16
3.7.4 Izolace plazmidové DNA z bakterií.....	16
3.7.5 Kontrolní restrikce DNA.....	16
3.7.6 GateWay LR reakce	16
3.7.7 Transformace bakterií pomocí elektroporace.....	17
3.7.8 Sekvence.....	17
3.8 Transformace rostlin	17
3.8.1 Stabilní transformace <i>Arabidopsis thaliana</i>	17

3.8.2	Tranzientní transformace listů <i>Nicotiana benthamiana</i>	18
3.9	Mikroskopická pozorování.....	18
3.10	Izolace proteinů.....	19
3.11	Western blot.....	19
4	Výsledky	20
4.1	Popis rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> s mutací v genech <i>EXO70H7</i> a <i>EXO70H8</i>	20
4.2	Buněčná lokalizace GFP konstruktů proteinů <i>EXO70H7</i> a <i>EXO70H8</i>	20
4.2.1	Konstrukt 35s::GFP: <i>EXO70H7</i> v listech <i>Nicotiana benthamiana</i>	20
4.2.2	Konstrukt 35s::GFP: <i>EXO70H8</i> v listech <i>Nicotiana benthamiana</i>	21
4.2.3	Konstrukt 35s::GFP: <i>EXO70H7</i> a <i>EXO70H7prom</i> ::GFP: <i>EXO70H7</i> v rostlinách <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
4.2.4	Analýza obsahu volného a vázaného GFP v rostlinách <i>Arabidopsis thaliana</i> obsahujících konstrukty 35s::GFP: <i>EXO70H7</i> a <i>EXO70H7prom</i> ::GFP: <i>EXO70H7</i> pomocí metody Western Blot	25
4.2.5	Konstrukt 35s::GFP: <i>EXO70H8</i> a <i>EXO70H8prom</i> ::GFP: <i>EXO70H8</i> v rostlinách <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
4.3	Vliv stresorů na vývoj rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> a jejích mutantů v genech <i>EXO70H7</i> a <i>EXO70H8</i>	29
4.3.1	Klíčení semen mutantních rostlin <i>exo70H7</i> na médiích obsahujících soli.....	29
4.3.2	Klíčení semen mutantních rostlin <i>exo70H8</i> na médiích obsahujících soli.....	32
4.3.3	Přenesení 5denních semenáčků mutantních rostlin <i>exo70H7</i> a <i>exo70H8</i> na médium obsahující sůl.....	35
4.3.4	Kultivace mutantních rostlin <i>exo70H7</i> a <i>exo70H8</i> v tekutém médiu.....	35
4.3.5	Kultivace mutantních rostlin <i>exo70H7</i> a <i>exo70H8</i> na médiu s vyšším obsahem železa..	35
4.3.6	Kultivace mutantních rostlin <i>exo70H7</i> a <i>exo70H8</i> na médiu s nižším obsahem železa ..	35
5	Diskuze.....	36
5.1	Podjednotky <i>EXO70H7</i> a <i>EXO70H8</i> ve vývoji kořene.....	36
5.2	Expres proteinu <i>EXO70H7</i> a ověření jeho buněčné lokalizace	36
5.3	Expres proteinu <i>EXO70H8</i>	37
5.4	Podjednotky <i>EXO70H7</i> a <i>EXO70H8</i> ve vývoji kořene při stresových podmínkách.....	38
5.4.1	Klíčení mutantních semen na médiích obsahujících soli	39
6	Závěr	40
7	Seznam použitých zkratk.....	41
8	Seznam použité literatury.....	42

1 ÚVOD

Kořen je prvním orgánem rostlin, který cítí nerovnováhu živin v půdě a nadbytek různých toxických látek. Jelikož je rostlina přisedlým organismem, není schopna odpovědět na tyto nebezpečné podmínky útekem jako například živočichové. Kořen si tak během evoluce musel vyvinout obranu proti příjmu nadbytečných látek ze svého okolí, a to jak mechanickou obranu pomocí různých nepropustných bariér, tak i aktivní, kdy za pomoci svého růstu uniká do míst s nižším stresem. Zkoumání těchto mechanismů je důležitým krokem pro vylepšení zemědělské produkce. V dnešním světě je velké množství zemědělských půd vystaveno nadměrnému zasolení, výskytu těžkých kovů, nedostatku minerálních látek a v neposlední řadě nadměrnému suchu. Poznání obranných mechanismů kořene tak může pomoci se šlechtěním odolnějších odrůd plodin či jiné prospěšné úpravě zeminy, která by mohla snížit toxický vliv těchto stresů.

Při obraně proti stresům je pro rostlinu nepostradatelný transport materiálu v buňce na plazmatickou membránu. V tomto procesu hraje nezastupitelnou roli komplex exocyst, který se skládá z mnoha podjednotek, mj. paralogů *EXO70*. Tyto proteiny byly již v předchozích publikacích spojovány s obranou rostlin před různými stresy, a tak pro tuto diplomovou práci byly vybrány geny *EXO70H7* a *EXO70H8*. Jejich exprese ukazuje na možnou funkci těchto proteinů v tvorbě mechanických obranných struktur v kořeni a tato práce se pokusila tento předpoklad potvrdit či vyvrátit.

CÍLE PRÁCE

- Analýza fenotypu mutace v genech *EXO70H7* a *EXO70H8*.
- Vytvoření rostliny s dvojitou mutací *exo70H7-exo70H8*.
- Vytvoření konstruktů s GFP pro studium lokalizace proteinů *EXO70H7* a *EXO70H8*.
- Pozorování kořenů rostlin s mutacemi v genech *EXO70H7* a *EXO70H8* a rostlin divokého typu za různých stresových podmínek a najít případné odchylky.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

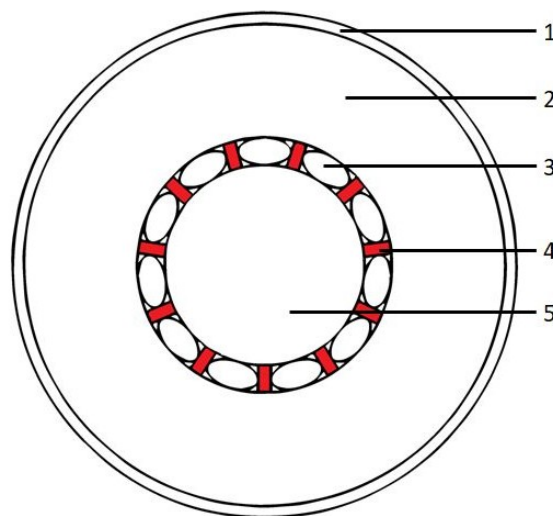
2.1 Vývoj kořene v přítomnosti stresových faktorů

Rostliny jsou sesilní organismy neustále vystavované působení vnějších faktorů, kterým nejsou schopny uniknout svým fyzickým přemístěním jako živočichové. Musely tedy evolučně vyvinout jiné mechanismy, jakými se mohou přizpůsobovat okolním podmínkám a nepříznivým vlivům různorodých stresových faktorů (Bradshaw and Hardwick, 1989; Esmon et al., 2004; Weiner, 2004). Nedostatek živin v půdě nebo naopak nadbytek různých látek (mnohdy až toxické koncentrace) zasahuje na prvním místě kořeny a ty se musí aktuálnímu složení půdy přizpůsobit. Mezi typická přizpůsobení patří např. zvýšení růstu kořenů pro lepší získávání živin, přirozená tvorba difuzních bariér zamezujících příjmu toxických látek, změny hladiny fytohormonů a změny v expresi genů právě v reakci na změny okolí (Bradshaw and Hardwick, 1989; Julkowska et al., 2017; Naseer et al., 2012; Pacifici et al., 2015).

2.1.1 Ochranné vrstvy kořene podle Nawrath et al., 2013

Difuzní bariéra primárního kořene modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (dále jen *Arabidopsis*) je tvořena několika vrstvami, které se skládají z různých typů buněk. Epidermis vytváří vnější ochrannou vrstvou buněk (zvaná též rhizodermis). Primární kůra (tzv. kortex) vytváří zónu buněk mezi epidermis a endodermis, která ochraňuje střední válec kořene, jež obsahuje vodivá pletiva. Periderm (též druhotná kůra) u starších kořenů, které již prošly sekundárním tloustnutím, nahrazuje epidermis a endodermis. U většiny rostlin se pod epidermis nachází vrstva buněk zvaná exodermis. V této vrstvě dochází k značné suberinizaci a lignifikaci, která vytváří impregnující strukturu podobnou Caspariho proužku (viz dále). Ale jak popsal Wilson a Peterson (1983), u rostliny *Arabidopsis* se exodermis nenachází.

Na kořenové čepičce se vyskytuje vrstva krátce žijících, avšak neustále se vytvářejících nových buněk, které se z kořenové špičky postupně odlupují, jak se kořen rostliny prodírá substrátem, a ochraňují tak apikální meristém. Kořenová čepička navíc produkuje vrstvu slizu, který ochraňuje nejen ji, ale i za ní rostoucí epidermální buňky. V kořenové epidermis *Arabidopsis* se střídají krátké oblasti obsahující běžné epidermální buňky s oblastmi buněk kořenových vlásků, tzv. trichoblasty (Dolan et al., 1994). Vznik kořenových vlásků je rychlý proces přeměny buněk meristému, kdy nově vzniklé kořenové vlásky okamžitě začínají plnit svou úlohu příjmu živin. Jelikož je epidermis



Obrázek. 1: Schéma horizontálního průřezu kořelem. (1) kořenová epidermis (rhizodermis). (2) primární kůra (kortex). (3) buňka endodermis. (4) Caspariho proužek. (5) střední válec.

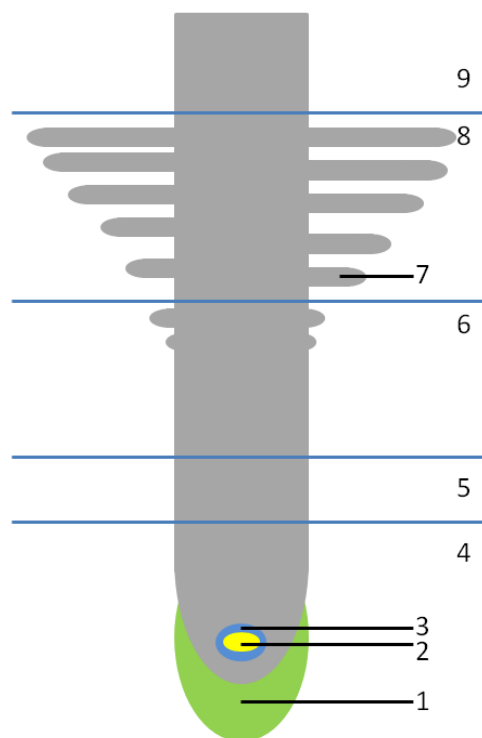
hlavním místem příjmu solutů z půdy, tak není možné, aby byla potažena ochrannou nepropustnou vrstvou či měla silně hydrofobní modifikace buněčné stěny jako má například stonek (Wilson and Peterson, 1983), a proto je endodermis plně propustná nejen pro chtěné živiny, ale i pro škodlivé látky. Teprve až na úrovni buněčné vrstvy endodermis je dosaženo rovnováhy mezi příjmem živin z okolní půdy, ochranou před patogeny či příjmem toxických iontů a látek. Zde dochází k utěsnění extracelulárního prostředí buněčné stěny mezi buňkami pomocí Caspariho proužku, který byl pojmenován po svém objeviteli, německém botanikovi Robertu Caspary (Caspary R., 1865). Caspariho proužek vzniká depozicí ligninu a suberinu na transversální straně buněčné stěny endodermálních. Navíc plazmatická membrána buněk těsně ulpívá na Caspariho proužku a potlačuje tak laterální difuzi proteinů v rámci plazmatické membrány (Karahara and Shibaoka, 1992). Obdobně slouží proteinový komplex tzv. tight junction u živočichů, který také utěsňuje mezibuněčný prostor a zabraňuje tak úniku solutů a vody mezi buňkami (Esau, 1960). To vše vytváří bariéru, která uzavírá extracelulární prostor buněčných stěn (tzv. apoplast) a zamezuje volnému proudění vody a solutů z primární kůry kořene do středního válce. Veškerá voda se soluty je tak nucena projít transportem skrze plazmatickou membránu a dochází tedy k selektivitě díky prostupu do cytoplazmy buněk (symplastu) (viz obr. 1).

2.1.2 Zóny kořene podle Takatsuka and Umeda, 2014 a Verbelen et al., 2006

U kořene *Arabidopsis* můžeme odlišit pět zřetelných zón od kořenové špičky až po hypokotyl: zóna meristematická, přechodová zóna, elongační zóna, zóna kořenového vlášení a zóna plně diferencovaných pletiv (viz obr. 2). V každé zóně mají buňky svou specifickou aktivitu a anatomii.

Kořen má neukončený růst a tato jeho vlastnost začíná v apikálním meristému, jenž je zónou aktivního buněčného dělení. Jak již bylo zmíněno výše, tento meristém je ochraňován kořenovou čepičkou. Multipotentní kmenové buňky tohoto meristému jsou malé a bohaté na cytoplazmu a obklopují klidové centrum (seskupení téměř se nedělících buněk produkujících fytohormony), které udržuje jejich nediferencovaný stav. Společně tak tyto multipotentní buňky a buňky klidového centra vytvářejí niku kmenových buněk, které asymetrickým dělením produkují dceřiné buňky. Ty se akumulují v podélném směru a dále se dělí.

U *Arabidopsis* se nad meristematickou zónou vyskytuje zóna přechodná, kde dochází k pomalému



Obrázek 2: Schéma kořene. (1) Kořenová čepička. (2) Klidové centrum. (3) Kmenové buňky. [4] Zóna meristematická. [5] Zóna přechodová. [6] Elongační zóna. (7) Kořenový vlásek. (8) Zóna kořenového vlášení. [9] Zóna plně diferencovaných pletiv.

růstu buněk jak do délky, tak i do šířky. Je tak přechodem od dělení buněk k jejich dlouživému růstu. Zde jsou jádra umístěna ve středu buněk (podobně jako v meristématické zóně), buňky mají malé vakuoly a jejich tvar je přibližně izodiametrický.

Jak již název napovídá v elongační zóně kořene buňky procházejí velmi rychlým prodlužováním a to bez nárůstu do šířky. Tvar buněk v této zóně je tím pádem značně protáhlý. Také se zde formuje velká centrální vakuola, která vytěsňuje jádro k plazmatické membráně. V této zóně dochází i k tvorbě kořenových vlásků.

V zóně kořenového vlášení se postupně zpomaluje prodlužování buněk a buňky tak dosahují své dospělé délky. Název je odvozen od velmi aktivního růstu špiček kořenových vlásků a jejich hojného výskytu.

Zbytek kořene je tvořen již buňkami v plně diferencovaných trvalých pletivech. A právě zde dochází k zakládání a růstu postranních kořenů, jež vznikají z pericyklu.

2.2 Vliv vybraných stresových faktorů na vývoj kořene

2.2.1 Vliv solného stresu na vývoj kořene

Sůl je jedním z častých stresorů potkávající rostliny, ať už se jedná o přírodní výskyt či umělé zasolení způsobené antropogenní činností. Rozkladem matečních hornin dochází k uvolňování solí do půdy. Nejintenzivněji takto vzniká dobře rozpustný chlorid sodný (dále jen sůl). Další příčinou akumulace solí v půdě je jejich ukládání z oceánské vody díky větru a dešti. Nejzávažnější zdroj je nepřírozené zasolování půdy stále se rozšiřujícím moderním zemědělstvím. Sůl se koncentruje v kořenové zóně půdy a vytváří tak intenzivní stres na vývoj kořene rostlin a jakožto jeden z nejvíce devastujících abiotických stresů významně snižuje produkci rostlin (Galvan-Ampudia et al., 2013; Munns and Tester, 2008). Sůl se tak stává jednou z významných stresových podmínek prostředí, které mají velký dopad na zemědělství a je nezbytné se této problematice více věnovat. Vysoký obsah solí v půdě typicky narušuje růst a vývoj rostlin snížením vodního potenciálu a tím zhoršením příjmu vody a živin z půdy. Sůl působí i stres iontový, kdy dochází ke zvýšené akumulaci iontů až na toxickou úroveň. Některé rostliny si během evoluce vyvinuly obranné mechanismy a staly se tak tolerantní na zasolení (tzv. halofyty). Ovšem to neplatí pro modelový organismus *Arabidopsis* použitý v této práci, který je rostlinou silně senzitivní na nadbytek solí v půdě (tzv. glykofyt) (Munns, 2002; Munns and Tester, 2008; Zolla et al., 2010).

Solný stres má dvě složky: osmotickou (zvýšené množství iontů v půdě vytahuje vodu ven z kořene) a iontovou (nadbytek iontů vně rostliny a po jejich příjmu i uvnitř může být pro rostlinu toxický). Osmotický stres okamžitě zpomaluje růst buněk kořenové špičky a též i mladých listů rostliny, zároveň v odpovědi na něj dochází k uzavření průduchů. Proti iontovému stresu se rostliny brání tím, že zamezují příjmu nadbytku sodných iontů a to aktivním pumpováním těchto iontů ven z buněk kořene. Většina sodných iontů, které vstoupí do buňky na vnější straně kořene je aktivně pumpováno ven Na^+/H^+ antiportérem na plazmatické membráně. Ionty, které i přesto zůstanou v kořeni, jsou z cytoplazmy sekretovány do vakuol nebo transportovány do stonků a listů, kde nadále dochází k jejich kompartmentalizaci a tím snížení jejich toxicity v cytoplazmě (Munns and

Tester, 2008). Základními odpověďmi rostliny na zasolení půdy jsou tedy regulace osmotické rovnováhy (mj. akumulace cukrů v cytoplazmě) a transport iontů ať už do vakuol či starých listů (Munns and Tester, 2008), ale také přizpůsobení architektury kořenového systému hraje důležitou roli.

Kořenový systém se mění po vystavení rostliny solnému stresu a mj. dochází k inhibici gravitropického růstu kořene redukcí gravitační odpovědi. Předpokládalo se, že k narušení gravitropismu dochází kvůli rychlé degradaci amyloplastů v kořenové čepičce *Arabidopsis*. Což by podporovala hypotéza, kterou vyslovil Sack (1991) o usedání škrobových zrn v kořenové čepičce, jež slouží jako přijímače gravitačního signálu kořene. Ovšem bylo zjištěno, že příčinou rychlé degradace škrobů v kořenové čepičce při vystavení solnému stresu je nejspíš snaha o udržení osmotické stability a tím zachování dostatečného množství vody v buňkách kořenové čepičky (Sun et al., 2008).

Částečně potlačený gravitropismus v zasoleném prostředí byl popsán i jako nový druh tropismu tzv. halotropismus. Kořeny tak rostou mimo osu gravitace a vyhýbají se tím místu s vysokou koncentrací soli. Směr tohoto růstu je dán redistribucí auxinu v kořenové špičce, která je brzkou odpovědí na nerovnováhu sodných iontů v půdě. Z toho vyplývá, že se jedná o reakci na iontový stres a ne na osmotický (Galvan-Ampudia et al., 2013). Tato rychlá odpověď zahrnuje signální dráhu nazývanou „salt overly sensitive“ popsanou na takto pojmenované mutantní rostlině (Sun et al., 2008).

Navíc je růst primárního kořene ovlivněn ještě redukcí počtu buněk kořenového meristému za solného stresu. Sůl zvyšuje akumulaci oxidu dusnatého, důležité signální molekuly, v kořenové špičce a tím zde redukuje množství rostlinného hormonu auxinu. Auxin hraje důležitou roli v architektuře kořenového systému regulací dělení buněk, jejich růstu a diferenciaci. A právě i snížení množství auxinu v kořenové špičce kvůli solnému stresu je jednou z příčin vzniku krátkých primárních kořenů (Liu et al., 2015). Skrze auxin dochází i k dalšímu působení soli, kdy se během silného solného stresu akumuluje v epidermis kořene v jeho elongační zóně, což může způsobovat redukcí buněčného dělení a buněčné elongace. Následkem tak dochází k zastavení růstu primárního kořene (Wang et al., 2009).

Solný stres má výrazný vliv na vývoj kořenových vlásků, jelikož jsou velmi citlivé k inhibici nadbytkem iontů. Sůl působí na anatomickou strukturu kořene a výrazně tak snižuje hustotu kořenových vlásků. Jednou z těchto anatomických změn je snížení počtu buněk (trichoblastů), z kterých se vyvíjejí kořenové vlásky. Vzniká tím systematická odpověď, která minimalizuje poškození rostliny nadcházejícím stresem. V tomto případě se redukuje absorpční plocha a díky tomu se snižuje příjem nadbytečných sodných iontů (Wang et al., 2008).

Nadměrné zasolení půdy má vliv i na chování postranních kořenů, které se výrazně odlišuje podle intenzity tohoto stresu. Při mírném solném stresu (konkrétně jeho iontové části) dochází k morfogenní odpovědi zvýšeným růstem postranních kořenů, jejich větvením a zvýšením jejich počtu. U zasažených rostlin se vyskytuje více aktivních primordií postranních kořenů kvůli solí vyvolané akumulaci auxinu. Nahromaděním auxinu totiž nemůže dojít k zamrznutí primordií ve stavu před vývojem samotných postranních kořenů. Do této regulace je zapojena i ethylenová signální dráha

s kyselinou abscisovou (Zolla et al., 2010). Naopak při silném solném stresu dochází k redukci počtu postranních kořenů, protože vysoká salinita snižuje zakládání postranních kořenů a jejich samotnou organogenezi. Takové zakrnění vývoje postranních kořenů je způsobeno nejspíše redistribucí auxinu. Zajímavé je, že u již existujících postranních kořenů stimuluje auxin při vysokém solném stresu naopak jejich prodlužování. Předpokládá se, že podle úrovně síly solného stresu jsou aktivovány odlišné signální dráhy (Wang et al., 2009).

Ve shrnutí: kořen, jakožto první rostlinný orgán, který pocítí vysokou salinitu půdy, vykazuje výraznou vývojovou odpověď v podobě změny architektury kořenového systému. Solný stres narušuje gravitropní směr růstu hlavního kořene (Galvan-Ampudia et al., 2013; Sun et al., 2008) a jeho celkový růst je zpomalen (Liu et al., 2015; Wang et al., 2009). Dochází k negativní regulaci formace kořenových vlásků, vzniká tak kratší a méně husté kořenové vlášení (Wang et al., 2008). V neposlední řadě výsledný vliv na vývoj postranních kořenů určuje míra koncentrace soli: nízká úroveň soli stimuluje tvorbu a růst postranních kořenů, kdežto vysoká inhibuje jejich tvorbu a to oboje v závislosti na auxinu (Wang et al., 2009; Zolla et al., 2010).

2.2.2 Vliv nadbytku či nedostatku železa v půdě na vývoj kořene

Železo je esenciální látkou pro rostliny, nezbytnou pro základní procesy jako je fotosyntéza, respirace, metabolismus dusíku. Železo se v půdě vyskytuje ve dvou oxidativních stavech Fe^{3+} a Fe^{2+} , kdy je pro ně rozdílná míra absorpce a toxicity (oboje vyšší pro Fe^{2+}) (Becana et al., 1998; Brumbarova et al., 2015; Fageria et al., 2008). Nadbytek železa se vyskytuje v kyselé půdě s nedostatkem kyslíku (Becker and Asch, 2005). Naopak nedostatek železa je v zásaditých a aerobních půdách (Eroglu et al., 2016).

Nadbytek železa blokuje růst primárního kořene zpomalením dělení buněk a jejich růstu (Li et al., 2015a, 2012). Navíc inhibuje zakládání laterálních kořenů v nově narostlých kořenech, a tak jsou tyto kořeny ochráněny od toxicity nadbytku železa (Li et al., 2015b; Reyt et al., 2015). Ale u již existujících proximálních kořenů nemá železo významný vliv na formaci dalších postranních kořenů, a tak zde dochází k zachování kořenů nezbytných pro příjem živin (Heil and Baldwin, 2002). Více toxická forma železa Fe^{2+} se vykytuje v nižší části půdy, kde je nižší pH a méně kyslíku (Ratering and Schnell, 2000). Právě výše zmíněná úprava kořenového systému snižuje nadbytečný příjem železa v nižších vrstvách půdy a zamezuje tak jeho toxicitě, ale zároveň nedochází k extrémnímu zamezení příjmu dalších živin z horních vrstev půdy (Heil and Baldwin, 2002). Podobně jako u soli, i zde dochází tak k narušení gravitropismu a růstu kořene směrem pryč od stresu nadbytkem železa. Vystavení kořenové špičky železu je nezbytným spouštěčem této reakce (Li et al., 2015b; Zou et al., 2012).

Při nedostatku železa v půdě se rostliny snaží naopak zvětšit povrch plochy kořenového systému pro jeho příjem. Nižší množství železa spouští formaci zárodků kořenových vlásků na místech, kde se trichoblasty normálně nevyskytují. Tento proces hraje důležitou roli v příjmu železa zvýšením absorpční plochy kořene (Li et al., 2016; Schmidt et al., 2000). Dochází také

k prodloužení délky primárního kořene a zvýšení počtu laterálních kořenů při mírném stresu nedostatkem železa, ale při silném strádání z nedostatku železa naopak počet postranních kořenů ubývá (Gruber et al., 2013).

2.3 Úloha komplexu exocyst v kořeni při stresových podmínkách

2.3.1 Komplex exocyst

Exocytóza je posledním krokem v sekretorické dráze buňky, kdy dochází k transportu lipidů, proteinů a složek buněčných stěn z Golgiho aparátu a dalších buněčných organel na plazmatickou membránu a do apoplastu. Právě při exocytóze dochází k fúzi váčku s plazmatickou membránou a uvolnění přenášeného nákladu. V rostlinách je tak jedním z hlavních mechanismů buněčné morfogeneze (Battey et al., 1999). Komplex exocyst, osmi-proteinový komplex známý též jako Sec6/8, se účastní lokalizace váčků na specifické místo plazmatické membrány a usnadňuje tak počátek exocytózy (Novick et al., 1980). Komplex exocyst byl jako první identifikován v kvasinkách (Novick et al., 1980) a následně i u savců (Kee et al., 1997). V krytosemenných rostlinách bylo nalezeno všech osm podjednotek jako u kvasinek a savců, a to Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 a Exo84. Tyto podjednotky se vyskytují v rostlinách v mnoha kopiích, kdy u *Arabidopsis* podjednotky SEC6, SEC8 a SEC10 mají pouze jednu kopii, SEC3, SEC5 a SEC15 dvě kopie, EXO84 tři a EXO70 má 23 kopií (Cvrckova et al., 2012; Elias, 2003; Hála et al., 2008). Avšak kompozice komplexu exocyst je evolučně vysoce konzervovaná napříč organismy (Koumandou et al., 2007).

Exocytóza je nedílnou součástí tvorby buněčné stěny a díky možnosti její polarizace může udávat i tvar směru růstu buňky. A to právě díky vyšší frekvenci dokování váčků do jedné domény na plazmatické membráně, kde je požadován růst. Takto směřovaná exocytóza se nazývá polarizovaná a má význam např. při růstu pylové láčky, kořenových vlásků (tzv. apikální růst) a během cytokineze pro tvorbu buněčné desky (Cole et al., 2005; Synek et al., 2006; Wen et al., 2005; Žárský et al., 2009). Komplex exocyst se v buňkách nachází v místech aktivní exocytózy a zvětšování membrány, kde zprostředkovává navázání (tethering) sekretovaných váčků na plazmatickou membránu. Následnou fúzi membrán pak zprostředkovávají proteiny SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor).

Ze studií na kvasinkách bylo zjištěno, že podjednotka EXO70 je nepostradatelná pro exocytózu a komplex exocyst je reugulován skrze tuto podjednotku pomocí malých GTPáz z rodiny Rho (He et al., 2007; Wu and Guo, 2015; Wu et al., 2009). Většina podjednotek komplexu exocyst je v kvasinkách navázána na váček a interaguje s podjednotkami SEC3 a EXO70, které se lokalizují na plazmatické membráně. Jejich spojením je váček tzv. dokován k plazmatické membráně a následnou fúzi váčku provádí SNARE proteiny a dokončí tak splynutí s membránou (He et al., 2007).

Jak již bylo zmíněno výše podjednotka EXO70 se v genomech suchozemských rostlin vyskytuje obvykle v mnoha kopiích, např. v genomu *Arabidopsis* se nachází 23 kopií, u mechu *Physcomitrella patens* 13 a u rýže (*Oryza sativa*) až 47 (Cvrckova et al., 2012). Vystává tedy

otázka, jestli jsou tyto kopie mezi sebou funkčně zastupitelné, či mají rozdílné funkce. U některých podjednotek již bylo zjištěno, že plně zastupitelné nejsou a jejich funkce je tedy alespoň z části unikátní. Např. mutace *exo70A1* vykazuje polotrasličí vzrůst, poruchu polárního růstu a další fenotypové projevy, které naznačují, že bez proteinu EXO70A1 je viabilita rostliny výrazně zhoršená (Synek et al., 2006). Bylo také zjištěno, že podjednotka EXO70H4 je nezbytná pro depozici kalózy v trichomu *Arabidopsis* a není možné tuto její funkci komplementovat jiným paralogem EXO70 (Kulich et al., 2015). Tato práce si klade za cíl objevit případnou unikátní roli EXO70H7 a EXO70H8 ve vývoji rostliny *Arabidopsis*.

2.3.2 Proteiny EXO70 v obraně proti stresům

Váčkový transport hraje důležitou roli v regulaci rostlinné odpovědi na různé biotické a abiotické stresy. Je důležitý pro transport materiálu mezi buněčnými kompartmenty a depozici či recyklaci proteinů na plazmatické membráně. Exocytóza má tedy v tomto procesu nezastupitelné místo (Mazel et al., 2004). Jak již bylo zmíněno výše, pro lokalizaci tohoto transportu jsou nezbytné proteiny EXO70. Ovšem jejich role ve fyziologii stresu ještě není plně objasněna a jsou známy teprve jen některé jejich reakce na stresy v rostlinách.

U rostliny *Arabidopsis* byl prokázán všeobecný trend ve zvýšení exprese genů EXO70 při patogenní nákaze, abiotickém stresu a ošetření fytohormony, čímž se potvrzuje jejich předpokládaná důležitá role v obraně proti těmto procesům (Chong et al., 2010). Podle genetické studie Julkowska et al., 2016, je s tolerancí zasolení u *Arabidopsis* asociovaný gen EXO70A2. Při stresové odpovědi na zasolení jsou důležité i podjednotky EXO70B1 a EXO70B2. Tyto dva proteiny jsou cílem pro U-box E3 ligázy PUB18/PUB19 a PUB22/PUB23 (Seo et al., 2016). Zmíněné ligázy jsou negativní regulátory stresové odpovědi na zasolení a to regulací otevírání a zavírání průduchů skrze kyselinu abscisovou (Cho et al., 2008). Jelikož dané ligázy ubikvitinují podjednotky EXO70B1 a EXO70B2, stávají se tak tyto proteiny pozitivním regulátorem zavírání průduchů (Seo et al., 2016). Role EXO70B1 v regulaci průduchů byla potvrzena i při odpovědi na osvětlení. Jeho inhibicí dochází k potlačení nadměrného otevírání průduchů pomocí Rho-type GTPázy 2. A tak je EXO70B1 důležitá v obraně před nadbytečnými ztrátami vody z rostliny skrze průduchy (Hong et al., 2016). V odpovědi na environmentální stresy bývá často zapojen i autofagický transport do vakuol. U rostlin s mutací v genu EXO70B1 dochází k redukci autofagie a po ošetření kyselinou salicylovou u nich došlo k hypersenzitivní odpovědi, která je častou reakcí na biotický stres (Kulich et al., 2013).

Bylo zjištěno, že EXO70D1 v tabáku (*Nicotiana benthamiana*) se účastní odpovědi na zasolení. Při overexpressi genu tohoto proteinu dochází k vyšší toleranci solného stresu a zvýšené akumulaci reaktivních forem kyslíku („reactive oxygen species“ dále jen ROS) oproti rostlinám divokého typu. Tvorba ROS je jednou z hlavních odpovědí rostlin na abiotický stres. Při solném stresu je vytváří především NADPH oxidáza, jež se nachází na plazmatické membráně, a tak se předpokládá, že EXO70D1 je zahrnuta do tvorby ROS touto oxidázou (Trinh et al., 2019).

Při stresu těžkými kovy dochází též k produkci ROS a i zde dochází k regulaci genů EXO70 a tím alternaci produkce ROS. Během transkriptomální analýzy rýže (*Oryza sativa*) bylo zjištěno, že

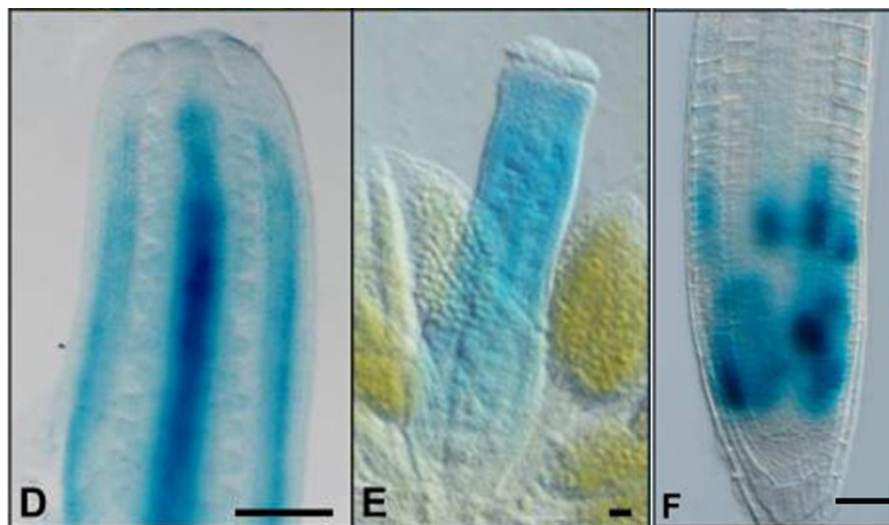
nadbytek mědi alteroval mj. úroveň genů zahrnutých ve váčkovém transportu a to především geny *EXO70* (Lin et al., 2013). Studie byly provedeny i u hortenzie (*Hydrangea villosa*), kde dochází ke zvýšení exprese některých genů *EXO70* při teplotním stresu i suchu a podobně je tak tomu i u *EXO70* genů pšenice (Zhao et al., 2019).

Z dosavadních výsledků se ukazuje nezastupitelná role proteinů *EXO70* v obraně proti abiotickým stresům a je nezbytné tomuto tématu věnovat další úsilí ve studiu. A právě proto se tato diplomová práce věnuje studiu *EXO70H7* a *EXO70H8* ve vývoji kořene za stresových podmínek.

2.3.3 Podjednotka *EXO70H7*

Gen podjednotky exocystu *EXO70H7* se nachází u *Arabidopsis* na pátém chromozomu a obsahuje jeden intron (The *Arabidopsis* Information Resource. Locus: *AT5G59730*). Podle online aplikace BioGRID vytváří fyzickou interakci s proteiny TRS120 (podjednotka TRAPP1) a CLUB, který je předpokládaným faktorem tetheringového proteinu TRAPP1 (BioGRID3.5.187. *Arabidopsis thaliana* (Columbia) *EXO70H7*).

V publikaci Li et al. (2010) byl potvrzen výskyt proteinu *EXO70H7* v různých pletivech *Arabidopsis* pomocí metody polymerázové řetězové reakce v čase (dále jen RT-PCR). Protein byl detekován v laterální kořenové čepičce, epidermis, primární kůře, endodermis a středovém válci kořenového meristému. Dále byl nalezen v cévních svazcích dospělých kořenů a v plodolistu květu. Vytvořením transgenní linie *EXO70H7*promotor::*GUS* a následnou expresí glukuronidázy byla pozorována exprese v meristemické zóně kořene, což naznačuje zapojení *H7* do regulace buněčného cyklu (viz obr. 3). Dále v cévních svazcích těsně nad zónou kořenového vlášení. Signál byl pozorován i v gynéceu, přesněji laterálních svazcích gynécea ve stádiu 9, a silnější signál pak ve stádiu 11 v celém gynéceu (viz obr. 3). Tento signál vymizel po otevření květního pupene (Li et al., 2010).



Obrázek 3: Expresa *EXO70H7*promotor::*GUS* v *Arabidopsis*. (D) *GUS* exprese v cévních svazcích gynécea ve stádiu 9 a (E) ve většině buněk gynécea ve stádiu 11. (F) Expresa byla pozorována v meristemické zóně kořenové špičky. Měřítka v D, E a F = 50 μ m. Převzato a upraveno z Li et al., 2010.

Co se týká buněčné lokalizace, bylo zatím provedeno pouze pozorování konstruktů EXO70H4promotor::GFP:EXO70H7, kde promotor EXO70H4 umožnil expresi a pozorování v trichomu stabilně transformované rostliny *Arabidopsis*. Signál tohoto konstruktů byl lokalizován v jádře a cytoplazmě trichomové buňky, viz obr. 4 (Kulich et al., 2018). Vystává ovšem otázka, nakolik je toto pozorování pod promotorem EXO70H4 relevantní a přenesitelné na další pletiva.

Salt Overly Sensitive1 (SOS1) protein vytváří plasma membránový Na^+/H^+ -antiportér, nezbytný pro odpověď na zasolení. U mutantních rostlin *sos1-1* dochází při solném stresu k smrti kořenů. A právě u tohoto mutantu při zasolení byla provedena kvantitativní RT-PCR, která prokázala přítomnost mj. i EXO70H7 proteinu, což naznačuje aktivaci nezbytné sekretorické dráhy v buňkách kořene mutantní rostliny *sos1-1* při solném stresu (Oh et al., 2010).

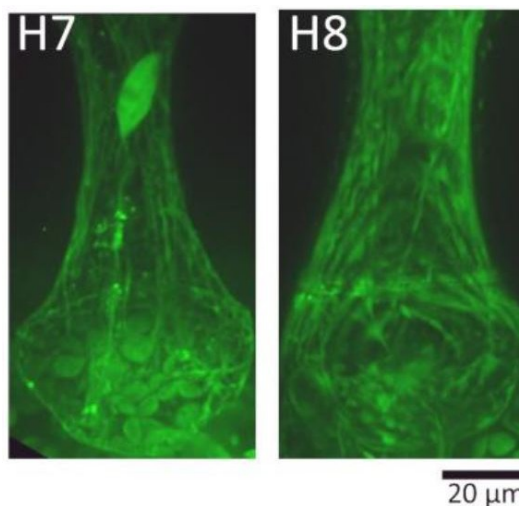
2.3.4 Podjednotka EXO70H8

Gen podjednotky exocystu EXO70H8 se nachází u *Arabidopsis* na druhém chromozomu a neobsahuje žádný intron (The Arabidopsis Information Resource. Locus: AT2G28650). Podle aplikace GENEVESTIGATOR® se gen *EXO70H8* celkově exprimuje výrazně méně než gen *EXO70H7*. Toto tvrzení v kořenu potvrzují i data z online aplikace eFP Browser, podle které se EXO70H8 exprimuje lehce více než EXO70H7 pouze v endodermis kořene (eFP Browser. Root Compare At5g59730, At2g28650).

Výskyt proteinu EXO70H8 v různých pletivech *Arabidopsis* byl potvrzen pomocí metody RT-PCR. Protein byl nalezen v endodermis kořene v zóně kořenového vlášení a zóně plně diferencovaných pletiv. Vytvořením transgenní linie EXO70H8promotor::GUS a následné exprese glukuronidázy byla pozorována exprese pouze v cévních svazcích těsně nad zónou kořenového vlášení (Li et al., 2010).

Konstrukt EXO70H4promotor::GFP:EXO70H8 byl lokalizován na plazmatické membráně trichomu v divokém typu rostliny *Arabidopsis*. Signál byl silně akumulován v polarizovaných doménách běžně bohatých na kyselinu fosfatidovou. Lokalizace byla nalezena i v rámci buněčné stěny, kdy se předpokládá, že signál přichází z plazmatické membrány a je fyzicky zachycen mezi buněčnou stěnou a plazmatickou membránou (Kubátová et al., 2019). Stejný konstrukt byl pozorován ještě jednou v trichomu *exo70H4* *Arabidopsis*, kde se zdá být signál v cytoplazmě a oproti EXO70H7 není v jádře, viz obr. 4 (Kulich et al., 2018).

Stejně jako předtím u EXO70H7, i zde vystává otázka, nakolik je toto pozorování relevantní k lokalizaci proteinu EXO70H8 v jiných pletivech, jelikož v tomto případě byl protein exprimován pod přirozeným promotorem EXO70H4.



Obrázek 4: Lokalizace (vlevo) EXO70H4::GFP:EXO70H7 a (vpravo) EXO70H4::GFP:EXO70H8 v trichomu *exo70H4* *Arabidopsis*. (Vlevo) výrazná lokalizace konstruktů s EXO70H7 v jádře a v cytoplazmě. (Vpravo) lokalizace konstruktů s EXO70H8 v cytoplazmě. Převzato a upraveno z Kulich et al., 2018.

3 MATERIÁLY A METODIKA

3.1 Rostlinný materiál a podmínky kultivace

Pro výzkum byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* (dále jen *Arabidopsis*), a to linie Columbia-0, *exo70H7-1* (Salk_072673), *exo70H7-2* (Gabi_058608), *exo70H8-1* (Salk_014867), *exo70H8-2* (Sail_1174_C02), a rostliny *Nicotiana benthamiana*. Semena *Arabidopsis* byla vernalizována v malém množství vody po dobu 2-4 dnů v lednici (4°C). Poté byla vyseta do rašelinových pelet (Jiffy) a přenesena do kultivační místnosti s konstantními podmínkami 25° C a 16h fotoperiodou. Obdobně byly pěstovány i rostliny *Nicotiana benthamiana*, pouze neprocházely chladovou vernalizací. Rostliny byly zalévány dle potřeby vodovodní vodou.

3.2 In vitro *Arabidopsis thaliana*

Semena byla povrchově sterilizována v 1,5 ml roztoku 20% bělicího prostředku SAVO s 5 µl detergentu Silwett L-77. V tomto roztoku byla semena ponechána 15 minut za lehkého třepání. Ve sterilním prostředí flow-boxu byla následně čtyřikrát promyta sterilní vodou a vložena do lednice (4 °C) na dobu 3-4 dnů pro vernalizaci. Poté byla semena vyseta opět ve sterilním prostředí flow-boxu na agarová média s polovičním obsahem mixu bazálních solí Murashige a Skoog (dále jen MS), která byla případně upravena pro jednotlivé stresové pokusy (viz podmínky stresové kultivace). Tyto misky byly umístěny v kultivačních místnostech s konstantními podmínkami 25° C a 16h fotoperiodou ve svislé poloze.

3.2.1 Složení médií

Základní ½ MS médium s 1 % agarózy: 2,2 g MS mixu (Duchefa), 10 g sacharózy (Lach-Ner) a 10 g agarózy (Duchefa) bylo do 1 l doplněno ionizovanou vodou.

½MS médium s 1,6 % agarózy pro pozorování kořenů: 2,2 g MS mixu (Duchefa), 10 g sacharózy (Lach-Ner) a 16 g agarózy (Duchefa) bylo do 1 l doplněno ionizovanou vodou.

3.3 Podmínky stresové kultivace *Arabidopsis thaliana*

Rostliny či již samotná semena byla vystavována různým stresovým podmínkám a to zvýšené koncentraci solí (NaCl a KCl), cukru (sorbitolu), železa při sterilní kultivaci na pevných či tekutých agarových médiích.

Stresové pokusy in vitro probíhaly za podmínek popsaných výše. Pouze misky v některých případech byly nejen ve svislé, ale i v horizontální poloze a v případě tekutých médií se misky neustále lehce třepaly. Při zjišťování klíčivosti semen za stresových podmínek byla použita média o koncentracích 160 mM a 200 mM NaCl, KCl a sorbitolu. Dále byl pozorován vývoj rostlin na médiích s vyšší koncentrací železa (100 µM) a též i média s nižším obsahem železa a to pouze 10 % oproti běžnému ½MS médiu. Při jednom z pokusů byly rostliny kultivovány na klasickém ½MS médiu po dobu 6 dní a až následně přeneseny na 160mM NaCl médium za sterilních podmínek

(použití pinzet sterilizovaných plamenem a práce ve flowboxu). U všech těchto experimentů bylo důležité, aby semena mutantních a příslušných rostlin divokého genotypů byla stejně stará, aby tak nedocházelo k rozdílnosti klíčení a růstu na základě různého stáří semen.

Rostliny na miskách byly po dané době růstu a klíčení dokumentovány pomocí skeneru či binokulární lupy. Pro statistické určení signifikance byly využity online softwary: Chi-Square kalkulačka (<https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/default2.aspx> a <http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>) a pro test korekce multiplicity False Discovery Rate kalkulačka (<https://tools.carbocation.com/FDR>).

3.3.1 Složení médií pro stresovou kultivaci:

160mM NaCl médium: do základního ½MS média bylo přidáno 9,2 g NaCl (Lach-Ner).

200mM NaCl médium: do základního ½MS média bylo přidáno 11,6 g NaCl (Lach-Ner).

160mM KCl médium: do základního ½MS média bylo přidáno 12 g KCl (Chemapol).

200mM KCl médium: do základního ½MS média bylo přidáno 15 g KCl (Chemapol).

160mM sorbitolové médium: do základního ½MS média bylo přidáno 29 g sorbitolu.

200mM sorbitolové médium: do základního ½ MS média bylo přidáno 36,4 g sorbitolu.

100µM železnaté médium: do základního ½MS média bylo přidáno 28 mg FeSO₄ · 7H₂O (Duchefa) a 30 mg EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctova, Lachema).

½MS médiu s nízkým obsahem železa (10 % oproti standardu): médium bylo vytvořeno jako základní ½MS médium pouze složky FeSO₄·7H₂O bylo dáno 2,78 mg/l.

½MS tekuté médium: 2,2 g MS mixu (Duchefa), 10 g sacharózy (Lach-Ner) a 1 g agarózy (Duchefa) bylo do 1 l doplněno ionizovanou vodou.

Všechna média byla sterilizována klávováním při 121 °C, 0,21 MPa po dobu 15 min v autoklávu Systec DB-23.

3.4 Bakteriální kultury a podmínky jejich kultivace

Pro množení plazmidů byly použity kompetentní buňky bakterií *Escherichia coli* (kmen DH5α, dále jen E. coli) a *Agrobacterium tumefaciens* (kmen GV3101, dále jen Agrobacterium). Bakterie byly kultivovány na médiích LB, MPB či MPA za podmínek danému kmeni vyhovujících.

3.4.1 Složení médií

LB médium: 23 g LB základního bujónu (Sigma) bylo do 1 l doplněno ionizovanou vodou a pH bylo upraveno na 7,5.

MPB: 25 g živného bujónu č. 2 (Biolife) bylo do 1 l doplněno ionizovanou vodou a pH bylo upraveno na 7,5.

MPA médium: 23 g živného agaru č. 2 (Biolife), 10 g NaCl bylo do 1 l doplněno ionizovanou vodou a pH bylo upraveno na 7,5.

Všechna média byla sterilizována klávováním při 121 °C, 0,21 MPa po dobu 15 min v autoklávu Systec DB-23.

3.5 Genotypování

3.5.1 Izolace genomické DNA

Genomická DNA byla izolována z listů *Arabidopsis*, z kterých byl odebrán kus o průměru cca 0,5 cm do mikrozkušavky, kde byl následně rozmělněn homogenizační tyčinkou. Do mikrozkušavky bylo přidáno 400 µl extračního pufru (200mM Tris-HCl, pH 7,5, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0,5% SDS) a 300 µl chloroformu (Lach-Ner). Tato směs byla umístěna na vortexu po dobu 5 minut a následně centrifugována 3 minuty při 16 000x g. Do nové mikrozkušavky bylo přeneseno 300 µl supernatantu a přidáno 300 µl izopropanolu (Lach-Ner). Následně prošla tato směs 10min srážením DNA na ledu, a pak byla centrifugována 5 minut při 16 000x g. Tekutina byla odstraněna z mikrozkušavek a zkumavky byly pár minut ponechány otevřené pro dosušení. Následně byl sediment DNA rozpuštěn v 50 µl Tris/EDTA pufru.

3.5.2 Genotypování

Vyizolovaná genomická DNA byla použita pro přípravu PCR reakce (viz kap. klonování) s Dream Taq polymerázou a primery popsány níže.

Univerzální primery:

Salk Lbb1.3: 5' -ATTTTGCCGATTTTCGGAAC- 3'

Sail Lb3: 5' - CATCTGAATTTTCATAACCAATCTCG- 3'

Gabi Lb 08409: 5' - ATATTGACCATCATACTCATTGC- 3'

Pro *exo70H7-1* (Salk_072673):

Salk_072673 LP: 5' -AATCGATTGTTGATGAGACGC- 3'

Salk_072673 RP: 5' -CCTGAGCCTCTAGACCCAAAG- 3'

Pro *exo70H7-2* (Gabi_058608):

Gabi_058G08 LP: 5' -TCAAAGCCAAGGATTTTTTCAG- 3'

Gabi_058G08 RP: 5' -ATCTTGAGATCATCCATTGCG- 3'

Pro *exo70H8-1* (Salk_014867):

Salk_014867 LP: 5' -TAACGGTGGAGGTTGAATCAG- 3'

Salk_014867 RP: 5' -TATCTATTCCATTGCATGGGC- 3'

Pro *exo70H8-2* (Sail_1174_C02):

Sail_1174_C02 LP: 5' -TCACCAAATGGATTTCGTTTTTC- 3'

Sail_1174_C02 RP: 5' -GCGTCTTCGATAGTGTGTTC- 3'

3.5.3 Agarová elektroforéza

K vizualizaci DNA fragmentů byla využita agarová elektroforéza. Pro přípravu elektroforetického gelu byla rozpuštěna agaróza (Serva) pro cílovou 1% koncentraci v TBE pufru (10mM Tris, 20mM kyselina boritá, 1mM EDTA, pH 8,0). Po povaření (1 – 2 minuty) v mikrovlnné troubě, kdy došlo k plnému rozpuštění agarózy, bylo přidáno interkalační barvivo GelRed (Biotium, ředěné 1:10 000 v ionizované vodě) ve finální 0,1% koncentraci. Roztok se nechal ztuhnout ve vaničce s hřebeny, kam se po zatuhnutí a přenesení gelu do elektroforetické nádržky s Tris-borát-EDTA pufrem napipetovalo 10 µl izolované DNA smíchané s Loading Dye (New England Biolabs) v poměru 1:6. Vždy bylo do první jamky napipetováno 2 µl GeneRuler DNA Ladder Mix (Termo Fisher Scientific) jako měřítko testovaných fragmentů DNA. Elektroforéza byla nastavena na 90 V. Gel byl vizualizován a vyhodnocen za pomoci digitálního systému G:BOX (Syngene) a programu GeneSnap (Syngene).

3.6 Křížení rostlin *Arabidopsis thaliana*

Pro vytvoření dvojité mutantní rostliny *exo70H7-exo70H8* křížením byly použity kvetoucí rostliny linií *exo70H7-1* a *exo70H8-2* o stáří přibližně 4 týdnů. Došlo k odstranění všech již rozkvetlých či odkvetlých květů a pupat nevhodných ke křížení u jedné z rostlin. U ponechaných cca 5 pupat vhodných pro křížení byly odstraněny kališní a korunní lístky a tyčinky, jen neopylená blizna byla ponechána. Na tuto bliznu se nanášel pyl ze zralých tyčinek rostliny druhé linie. U opylené rostliny byly zabaleny vrcholky do potravinářské folie kvůli ochraně opylené blizny a zachování ideální vlhkosti.

Rostlina byla nadále kultivována při klasických podmínkách a po zaschnutí šešulí byla sklizena semena. Z těch byla vypěstována první heterozygotní generace a následně z ní druhá generace (segregující). Druhá generace byla genotypována, díky čemuž se podařilo vybrat rostliny homozygotní v obou mutacích z rodičovských genotypů.

3.7 Klonování

Pro oba geny (EXO70H7 a EXO70H8) byly naklonovány vždy dva konstrukty s N-terminálním zeleně fluorescenčním proteinem (GFP) a to jeden s konstitutivním virovým promotorem 35s a jeden s přirozeným promotorem. Pro zaklonování přirozených promotorů do vstupních vektorů pomocí 5'TOPO klonování byly navrženy vlastní primery (viz níže). Zbytek konstruktů byl složen GateWay LR reakcí pomocí vstupních vektorů dostupných z laboratorních sbírek. Správnost vzniklých konstruktů byla ověřena kontrolní restrikcí a sekvenací.

Primery na klonování přirozených promotorů genů *EXO70H7* a *EXO70H8*:

H7 prom forward: 5' -TATCATTTTATGAAATCGCTTTGAGACTAGAGAGCTTAG- 3'

H7 prom reverse: 5' -TTTTGTGGTTTGCTCTGTTTTTATTTTTTGGTACC- 3'

H8 prom forward: 5' -TTAGTATTTTTGCTCGACAAAAAATTCGTATG- 3'

H8 prom reverse: 5' -TTTTGTGGTTGGTGATTTTTTTATGTGTACA- 3'

3.7.1 Polymerázová řetězová reakce

Pro polymerázovou řetězovou reakci (dále jen PCR) při genotypování byla použita DNA polymeráza DreamTaq (Thermo Fisher). Do celkového objemu 20 μ l reakční směsi bylo dáno 0,04 μ l DreamTaq polymerázy (5U/ μ l), 2 μ l 10x DreamTaq pufru, 0,25 μ l dNTP (2'-deoxynukleosid 5'-trifosfáty), 0,2 μ l 100 μ M levého primeru a stejně tak pravého primeru (pro sekvenci primerů viz kap. genotypování). Vše bylo doplněno ionizovanou vodou do objemu 19 μ l (tj. 16,31 μ l) a nakonec byl přidán 1 μ l templátové DNA. Reakce běžela v teplotním programu: 94 °C 2 minuty, 94 °C 30 sekund, 58 °C 1 minuta, 72 °C 1 minuta, kdy krok 2-4 byl opakován 25x a zakončeno to bylo 72 °C na 10 minut.

Pro PCR s primery přirozených promotorů genů EXO70H7 a EXO70H8 byla opět použita DNA polymeráza DreamTaq (Thermo Fisher). Do celkového objemu 50 μ l reakční směsi bylo dáno 0,1 μ l DreamTaq polymerázy (5U/ μ l), 5 μ l 10x DreamTaq pufru, 0,625 μ l dNTP, 0,5 μ l 100 μ M levého primeru a stejně tak pravého primeru (pro sekvenci primerů viz výše), 2 μ l templátové DNA (zde genomová DNA rostliny divokého typu) a vše bylo doplněno ionizovanou vodou do objemu 50 μ l (tj. 41,27 μ l). Reakce běžela v teplotním programu: 94 °C 2 minuty, 94 °C 30 sekund, 60 °C 1 minuta, 72 °C 1 minuta, kdy krok 2-4 byl opakován 32x a zakončeno to bylo 72 °C na 10 minut.

PCR byla vždy prováděna ve 200 μ l mikrozkušavkách a připravována na ledu pro udržení nízkých teplot. Pro samotnou reakci byly použity přístroje TGradient (Biometra) či TRIO PCR Thermocycler (TProfessional). Získaný DNA produkt byl následně separován pomocí agarové gelové elektroforézy.

3.7.2 Purifikace fragmentů z DNA gelu

Z výše zmíněného agarového gelu byl purifikován fragment DNA o požadované velikosti získaný pomocí PCR. Tento fragment byl z gelu vyříznut sterilním skalpelem za osvit UV lampou v temné místnosti. Tento kus gelu byl přenesen do 2ml mikrozkušavky. Z fragmentu gelu byla vyizolována DNA pomocí Monarch® DNA Gel Extraction Kitu (New England BioLabs) a tím

vznikl finální produkt 10 µl eluátu. Celková koncentrace DNA v eluátu byla měřena pomocí Nanodropu (Thermo Fisher Scientific).

3.7.3 5' TOPO klonování

Získaný purifikovaný produkt DNA z PCR přirozených promotorů byl použit do reakce 5' TOPO klonování (kit od firmy Thermo Fisher Scientific). Do celkového objemu 6,5 µl reakce byly dány 4 µl zmíněného PCR produktu, 1 µl Salt solution, 1 µl 5-TOPO p-ENTER vektoru a 0,5 µl 10x Tris/EDTA pufru. Vše bylo mírně promícháno a 30 minut inkubováno při pokojové teplotě. Následně byly 2 µl tohoto produktu přidány ke kompetentním bakteriím TOP10 E. coli TOPO-5 a vše bylo promícháno a inkubováno po dobu 30 minut na ledě. Reakce byla zastavena teplotním šokem 42 °C po 30 sekund a následně umístěna zpět na led. Bylo přidáno 250 µl S.O.C média o pokojové teplotě a směs byla inkubována 60 minut ve 37 °C za stálého třepání. Po této době byly bakterie rovnoměrně naneseny na Petriho misky s MPA médiem obsahujícím antibiotikum kanamycin (koncentrace 50 µl/ml) a inkubovány přes noc ve 37 °C.

3.7.4 Izolace plazmidové DNA z bakterií

Byla vybrána jedna kolonie transformovaných buněk E. coli z Petriho misky a přenesena za sterilních podmínek párátkem do zkumavky s 2 ml LB či MPB média a příslušnými antibiotiky (koncentrace pro Gentamycin 10 µg/ml, pro Ampicillin 100 µg/ml, pro Kanamycin a pro Spectinomycin 50 µg/ml). Vzniklé inokulum bylo kultivováno za stálého třepání přes noc (8 – 16 hodin) za teploty 37 °C. Po kultivaci byla tato kultura centrifugována při 16 000x g po dobu 1 minuty.

Samotná izolace plazmidové DNA byla provedena GeneJET Plasmid Isolation Kitem (Thermo Fisher Scientific) dle oficiálního protokolu a tím vznikl finální produkt 100 µl eluátu.

3.7.5 Kontrolní restrikce DNA

Objem 3 µl vyizolované DNA byly smíchány s 0,1 µl vhodného restrikčního enzymu vybraného podle sekvence DNA, 2 µl příslušného pufru a 15 µl ionizované vody. Tato směs byla promíchána a inkubována 1 hodinu při teplotě vyhovující restrikčnímu enzymu. Pro analýzu byla využita gelová elektroforéza.

3.7.6 GateWay LR reakce

Pro LR reakci (použit kit od firmy Thermo Fisher Scientific) byly smíchány následující reagenty: 0,5 µl vstupního vektoru virovým 35s promotorem (pEN L4-2-R1), 1,5 µl vstupního vektoru s GFP (pEN L1-F-L2), 1 µl destinačního vektoru (pB7m34GW) a 1 µl LR klonázy II. Tento premix byl vyroben dvakrát a do jednoho bylo přidáno 1 µl inzerční DNA EXO70H7 ve vstupním vektoru (pDONOR P2R-P3) s 1 µl ionizované vody, do druhého stejného premixu bylo přidáno 0,5 µl inzerční DNA EXO70H8 ve vstupním vektoru (pDONOR P2R-P3) s 1,5 µl ionizované vody. Tyto dva mixy byly kultivovány při 25 °C po dobu 24 hodin. Následně pro zastavení reakce byl do směsi přidán 1 µl proteinázy K a směs byla umístěna do 37 °C na 10 minut.

Pro dvě samostatné LR reakce přirozených promotorů genů EXO70H7 a EXO70H8 byly použity konstrukty vytvořené 5' TOPO klonovací reakcí jakožto vstupní vektor. V případě EXO70H7 byly pro LR reakci použity následující reagenty: 1,25 µl vstupního vektoru s přirozeným promotorem EXO70H7, 0,75 µl vstupního vektoru s GFP (pEN L1-F-L2), 1 µl destinačního vektoru (pB7m34GW), 1 µl LR klonázy II a 1 µl inzerční DNA EXO70H7 ve vstupním vektoru (pDONOR P2R-P3). U EXO70H8 bylo použito 0,5 µl vstupního vektoru s přirozeným promotorem EXO70H8, 0,75 µl vstupního vektoru s GFP (pEN L1-F-L2), 1,25 µl destinačního vektoru (pB7m34GW), 1 µl LR klonázy II, 0,5 µl inzerční DNA EXO70H8 ve vstupním vektoru (pDONOR P2R-P3) a 1 µl ionizované vody. Tyto dva mixy byly kultivovány při 25 °C po dobu 24 hodin. Následně pro zastavení reakce byl do směsi přidán 1 µl proteinázy K a směs byla umístěna do 37 °C na 10 minut.

3.7.7 Transformace bakterií pomocí elektroporace

Do 50 µl kompetentních buněk (*E. coli* či *Agrobacterium*) bylo přidáno 0,2 – 1,5 µl požadované DNA. Tato směs byla přenesena do vychlazené sterilní elektroporační kyvety a vše bylo nutno provádět na ledu pro zvýšení efektivity. Za využití elektroporačního přístroje Eporator (Eppendorf) byla vnesena DNA do kompetentních buněk elektrickým pulzem 2500 V pro *E. coli* a 1800 V pro *Agrobacterium*. Následně ve sterilním prostředí flow boxu byly bakterie přeneseny do 600 µl sterilního média LB či MPB a míchány po dobu 1 hodiny při 37 °C u *E. coli* nebo 2 hodiny při 28 °C *Agrobacterium*. Po této době byly bakterie rovnoměrně nanášeny na Petriho misky s médiem MPA a příslušnými antibiotiky a takto kultivovány přes noc ve 37 °C u *E. coli* či 48 hodin ve 28 °C u *Agrobacterium*.

3.7.8 Sekvence

Sekvence byla použita pro potvrzení správnosti sekvence vzniklých konstruktů. Samotnou sekvenaci prováděla externí firma Eurofins Genomics. Odeslaný vzorek obsahoval 5 µl sekvenované templátové DNA o koncentraci 80 ng/µl s 5 µl požadovaného primeru o koncentraci 5 pMol/µl.

Primery pro sekvenaci konstruktů 35s::GFP:EXO70H7, 35s::GFP:EXO70H8, H7promotor::GFP:EXO70H7 a H8promotor::GFP:EXO70H8:

GFP_seq_forward: 5' -CCACAACGTCTATATCATGG- 3'

GFP_seq_reverse: 5' -ACGCCGTAGGTCAG- 3'

M13_seq_forward: 5' -GTAAAACGACGGCCAGT- 3'

M13_seq_reverse: 5' -AACAGCTATGACCAT- 3'

3.8 Transformace rostlin

3.8.1 Stabilní transformace *Arabidopsis thaliana*

Pro transformaci *Arabidopsis* bylo nutno připravit požadovaný transformovaný kmen *Agrobacteria* pomocí elektroporace popsané výše a ten byl den předem sterilně přenesen do 50 ml

tekutého LB či MPB média. Toto bakteriální inokulum bylo kultivováno při 28 °C za stálého míchání 1-2 dny.

Vzniklá bakteriální kultura byla centrifugována 15 minut při 3700x g za 4 °C. Supernatant byl vylit a sediment resuspendován v 50 ml roztoku 5% sacharózy s 25 µl Silwetu a 50 µl acetosyringonu (Fluka). U rostlin určených pro transformaci bylo týden předem ostříháno první květenství, aby se založila nová a hustší. U těchto druhých květenství byly těsně před transformací ostříhány již založené šesule a otevřené květy. Poupata takto připravených rostlin byla namočena do suspenze na cca 5 vteřin a následně byly celé nadzemní části zabaleny do igelitového pytle, pro udržení ideální vlhkosti a umístěny do tmy přes noc. Druhý den byl pytel odstraněn a rostliny byly nadále kultivovány při klasických podmínkách. Po vyschnutí šesulí byla sklizena semena a po vernalizaci následně hromadně vyseta do hlíny. Zhruba po týdnu byly narostlé semenáčky pravidelně postřikovány roztokem herbicidu BASTA (Fluka) o koncentraci 250 ng/l. Netransformované nerezistentní rostliny byly herbicidem zahubeny a tímto se vyselektovaly správně natransformované přeživší rostliny s požadovaným konstruktem.

3.8.2 Tranzientní transformace listů *Nicotiana benthamiana*

Pro transformaci *Nicotiana benthamiana* bylo nutno připravit požadovaný transformovaný kmen *Agrobacterium* pomocí elektroporace a ten byl den předem sterilně přenesen do 2 ml tekutého LB či MPB média. Toto bakteriální inokulum bylo kultivováno při 28 °C za stálého míchání 1-2 dny. Bylo nezbytné připravit takového inokulum i pro kmen *Agrobacterium* transformovaného supresorem posttranslačního silencingu p19.

Vzniklá bakteriální kultura byla centrifugována 2 minuty při 8000x g. Supernatant byl vylit a sediment promyt 1 ml infiltračního média (50 mM MES pH 5,5, 2mM Na₃PO₄, 0,5% glukóza a 100 µM acetosyringon), opět stočen a resuspendován v 1 ml infiltračního média. Bakteriální suspenze byla naředěna na optickou denzitu 0,03 u požadovaných konstruktů a 0,05 u konstruktu p19. Tímto byla připravená směsná suspenze požadovaného konstruktů a konstruktů p19, která byla nabrána do injekční stříkačky bez jehly a spodní stranou listu byla vtlačena do mezibuněčného prostoru listu.

3.9 Mikroskopická pozorování

Mikroskopická pozorování byla prováděna na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880 s objektivem C-Apochromat 40×/1,2 W Korr FCS M27. Excitace GFP byla vyvolána laserem o vlnové délce 488 nm a emise zachycena v rozmezí 508-540 nm. Pro ověření signálu byl využíván lambda sken, kdy pro GFP byla maximální emise při 512 nm a naopak rozpoznaná autofluorescence měla maximum emise mezi 650 až 721 nm. Pro značení plazmatické membrány byla využita fluorescenční barva FM4-64 o koncentraci 16 pM. V tomto roztoku byly rostliny ponořeny 5-10 minut za nepřístupnosti světla, následně přeneseny do ionizované vody a ihned pozorovány. Tato barva byla excitována laserem o vlnové délce 561 nm a emise byla detekována v rozmezí 580-650 nm. Pro úpravu získaných fotek byl použit software FiJi.

3.10 Izolace proteinů

Pro izolaci proteinů byly použity tři listy dospělé rostliny *Arabidopsis*, které byly umístěny do třecí misky spolu s 200 μ l sklářského písku a 1 ml lyzačního pufru (150mM NaCl, 0,1% TRITON X, 50mM TRIS pH 8) s inhibitory proteáz v poměru 13:1. Po rozdrcení listů na homogenní směs, byla směs přelita do 2ml mikrozkušavky a třecí miska byla vypláchnuta dalším 1 ml lyzačního pufru s inhibitory proteáz, což bylo opět slito do stejné mikrozkušavky. Následně bylo vše stočeno ve vychlazené centrifuze (4 °C) na 800x g 5 minut. Supernatant byl přenesen do nové 2ml mikrozkušavky a z něj bylo odebráno 50 μ l do 1,5ml mikrozkušavky jakožto vzorek celkové buněčné frakce. 2ml mikrozkušavka se zbytkem supernatantu byla dále stočena ve vychlazené centrifuze (4 °C) na 4000x g 10 minut. Supernatant byl opět přenesen do nové 2ml mikrozkušavky a z něj bylo odebráno 50 μ l do 1,5ml mikrozkušavky jakožto vzorek cytoplazmatické frakce. Pelet byl rozpuštěn v 50 μ l fyziologického roztoku (PBS) v 1,5ml mikrozkušavce a vznikl tím vzorek jaderné frakce. Do všech třech 1,5ml mikrozkušavek bylo přidáno 10 μ l dodecylsírany sodného (SDS) a zkušavky pak byly umístěny na již vyhřátý bloček na 95-100 °C na 10 minut. Takto připravené vzorky byly skladovány v -20 °C po krátkou dobu, při delším skladování byla nutná teplota -80 °C.

3.11 Western blot

Ze vzorků jednotlivých buněčných frakcí s SDS (viz kap. Izolace proteinů) bylo nanášeno 25 μ l do 12,5% akrylamidového rozdělovacího gelu (2,08 ml 30% Acrylamide-Bis, 1,25 ml TRIS pH 8,8, 6 μ l Temed, 1,67 ml ionizované vody a jako poslední bylo přidáno 33 μ l 10% APS) se zaostřovacím gelem (0,325 ml 30% Acrylamide-Bis, 0,625 ml TRIS pH 6,8, 2,5 μ l Temed, 1,525 ml ionizované vody a jako poslední bylo přidáno 12,5 μ l 10% APS). Jako standard molekulové hmotnosti proteinů bylo použito 2,5 μ l PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Elektroforéza běžela při napětí 300 V po dobu 1,5 až 2 hodin. Z gelu byly proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu pomocí blotovacího přístroje, který byl nastaven na napětí 1,5mA na 1 cm² plochy sendviče po dobu 1,5 hodiny. Membrána byla poté přenesena do 5% mléka v PBS s 0,5% Tweenem (Sigma-Aldrich) a nechána přes noc na třepačce při 4 °C.

Druhý den byla membrána vyndána z mléka a 5 minut promývána v PBS. Membrána byla těsně zatavena do igelitového pytlíku obsahujícího 10 ml 3% mléka s primární protilátkou anti-GFP (Rabbit ANTI-GFP antisera.com) v poměru 1:30 000 a točena na třepačce cca 75 minut při pokojové teplotě. Následně byla membrána 3x propláchnuta po dobu 5 minut v PBS s 0,5% Tweenem (Sigma-Aldrich). Pro aplikaci sekundární protilátky byla membrána přemístěna do vaničky s 15 ml 5% mléka se sekundární protilátkou (ANTI-RABBIT IgG Progema) v poměru 1:15 000 a inkubována 50 minut při pokojové teplotě. Membrána byla opět propláchnuta 3x po dobu 5 minut v PBS s 0,5% Tweenem (Sigma-Aldrich). Pro vizualizaci proteinů na membráně byl použit chemiluminescenční Cytiva Life Sciences™ Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent kit (Fisher scientific) po dobu 10 minut. Následně byla membrána vyvolána na film v klasickém postupu vývojka – voda – ustalovač. Expozice filmu byla 15 minut.

4 VÝSLEDKY

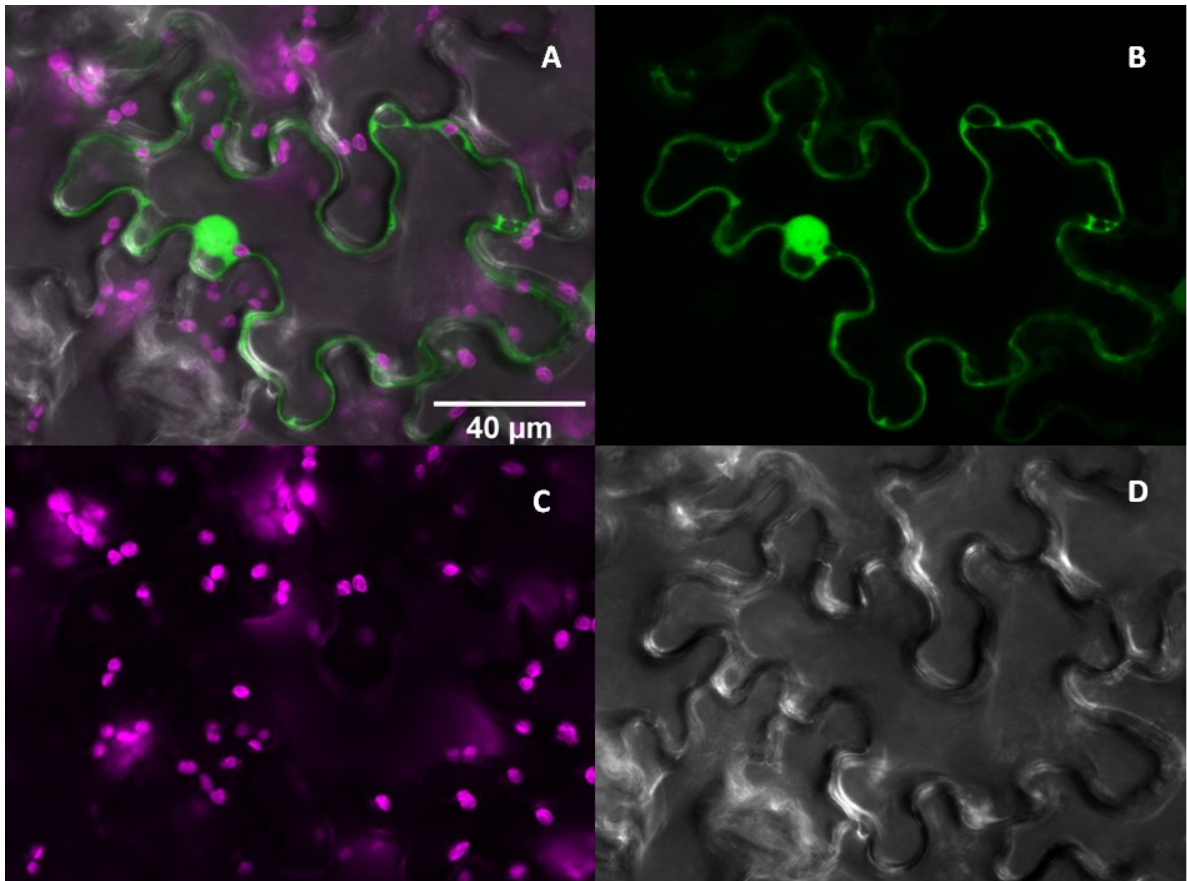
4.1 Popis rostlin *Arabidopsis thaliana* s mutací v genech *EXO70H7* a *EXO70H8*

U mutantních rostlin *exo70H7*, *exo70H8* a to ani u dvojitého mutantu *exo70H7-exo70H8* nebyl v průběhu diplomové práce nalezen žádný fenotypový projev. Mutantní rostliny vypadaly jak na pouhý pohled okem, tak i při zvětšení binolupou či mikroskopem (zvětšení až 600x) totožně jako rostliny divokého typu, a to i při růstu za různých stresových podmínek (viz kap. 4.3).

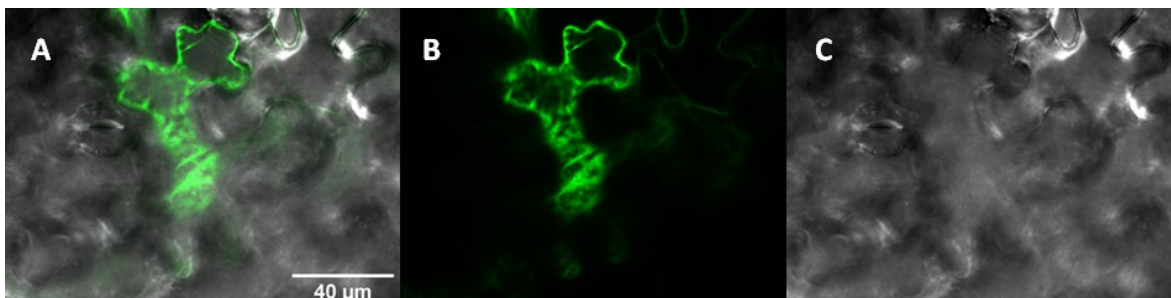
4.2 Buněčná lokalizace GFP konstruktů proteinů *EXO70H7* a *EXO70H8*

4.2.1 Konstrukt 35s::GFP:EXO70H7 v listech *Nicotiana benthamiana*

Pro pozorování buněčné lokalizace byl použit nejprve systém transienční transformace listů *Nicotiana benthamiana* s využitím konstruktů EXO70H7 s N-terminálním GFP pod konstitutivním virovým promotorem 35s. Protein byl lokalizován v jádře s kontrastním jádřerkem a cytoplazmě, kde byly viditelné kontrastní buněčné kompartmenty bez signálu. Mezi dvěma buňkami byla patrná i střední lamela bez signálu. Viz obr. 5 a 6.



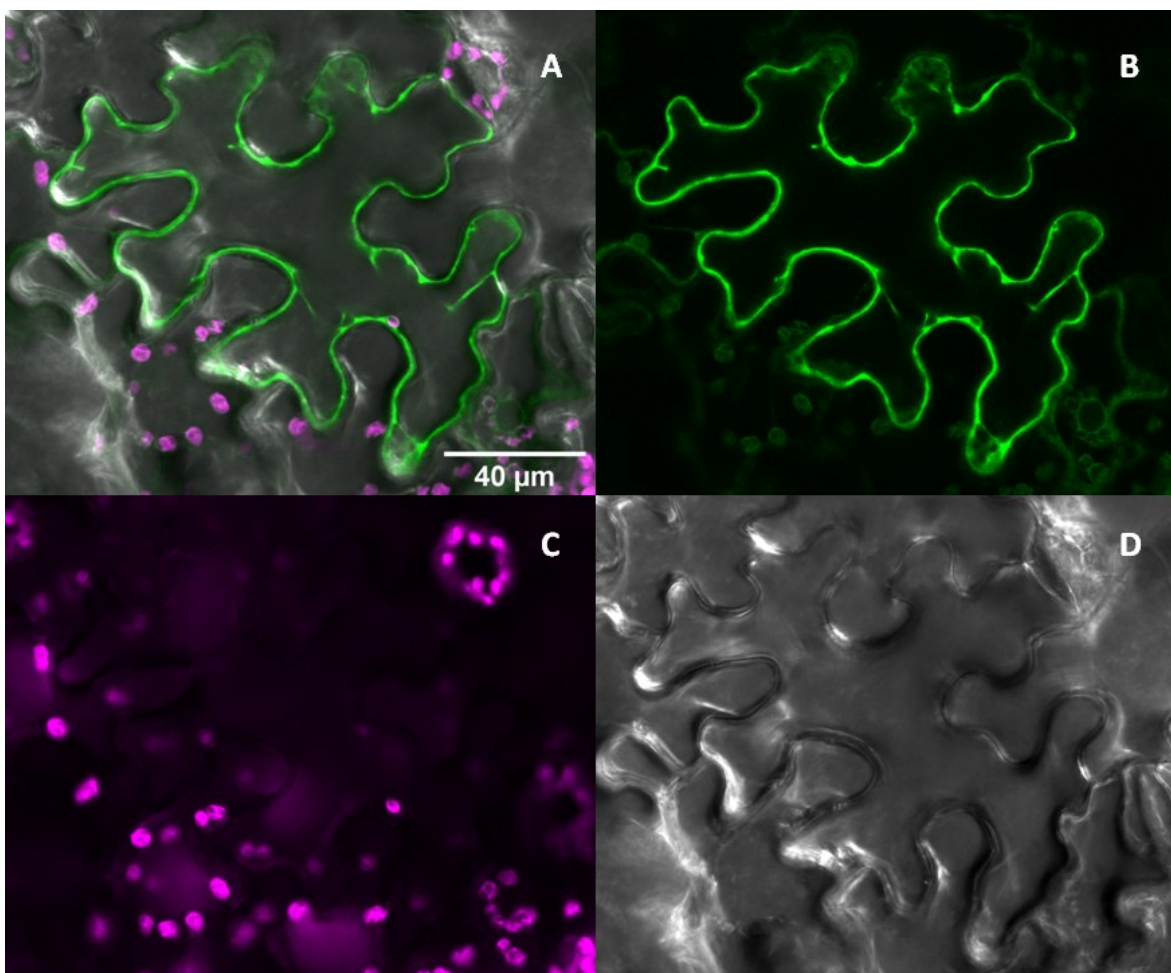
Obrázek 5: Lokalizace 35s::GFP:EXO70H7 v listu *Nicotiana benthamiana*. GFP signál je vidět v jádrech s kontrastním jádřerkem bez signálu a v kortikální cytoplazmě epidermálních buněk. Proložení všech kanálů (A), samostatný GFP kanál – zelená (B), kanál přirozené fluorescence plastidů – magentová (C) a viditelné spektrum – šedá (D).



Obrázek 6: Kortikální lokalizace 35s::GFP:EXO70H7 v listu *Nicotiana benthamiana*. GFP signál je vidět v cytoplazmě epidermální buňky s kontrastními buněčnými kompartmenty bez signálu. Proložení kanálu GFP a viditelného spektra (A), samostatný GFP kanál - zelená (B) a viditelné spektrum - šedá (C).

4.2.2 Konstrukt 35s::GFP:EXO70H8 v listech *Nicotiana benthamiana*

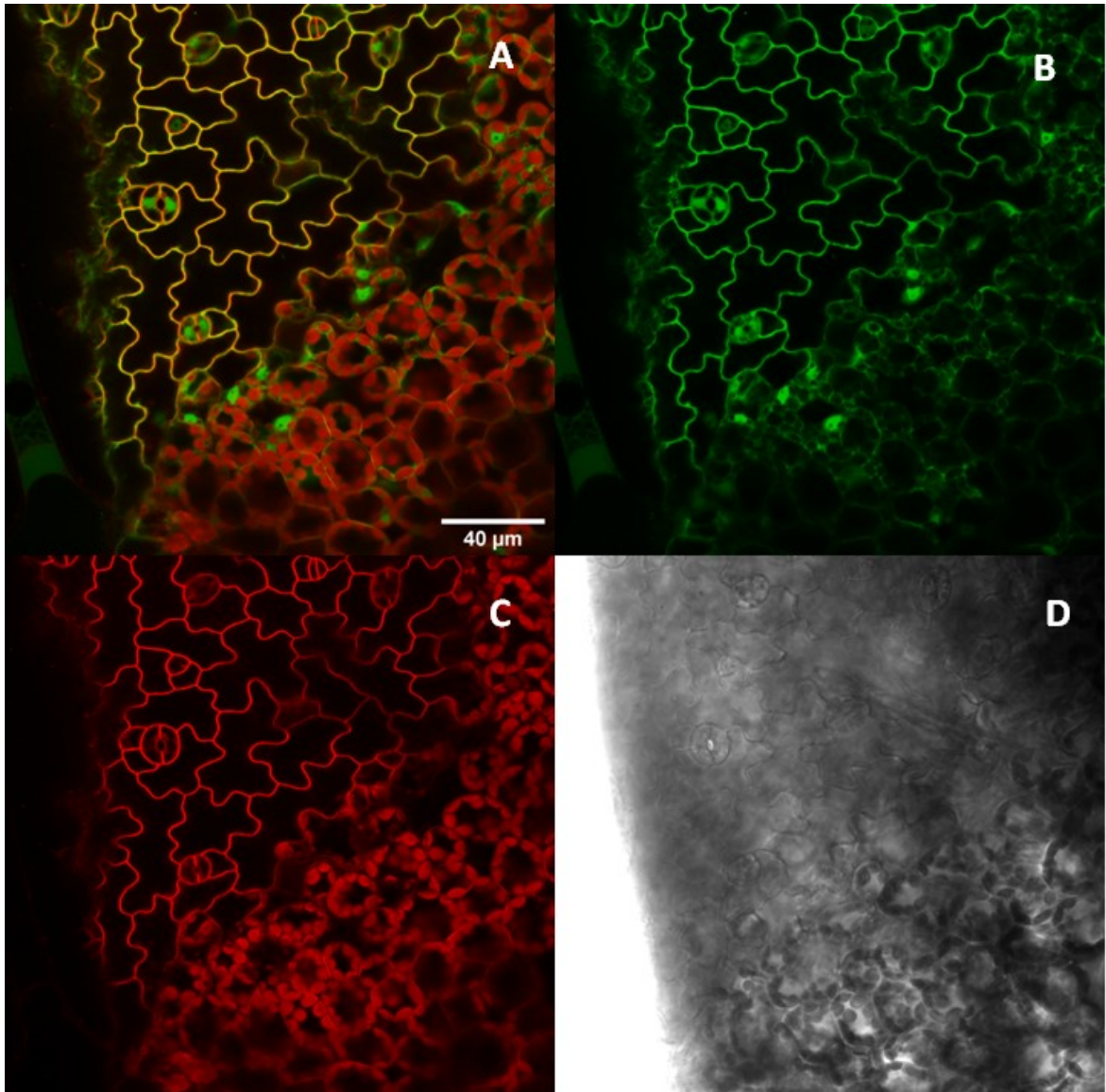
Výše zmíněná transienční transformace listů *Nicotiana benthamiana* byla využita i pro konstrukt EXO70H8 s N-terminálním GFP pod konstitutivním virovým promotorem 35s. Signál byl všeobecně slabší než u EXO70H7 konstruktů a vyskytoval se pouze v cytoplazmě. Opět byla mezi dvěma buňkami patrná střední lamela bez signálu. Viz obr. 7.



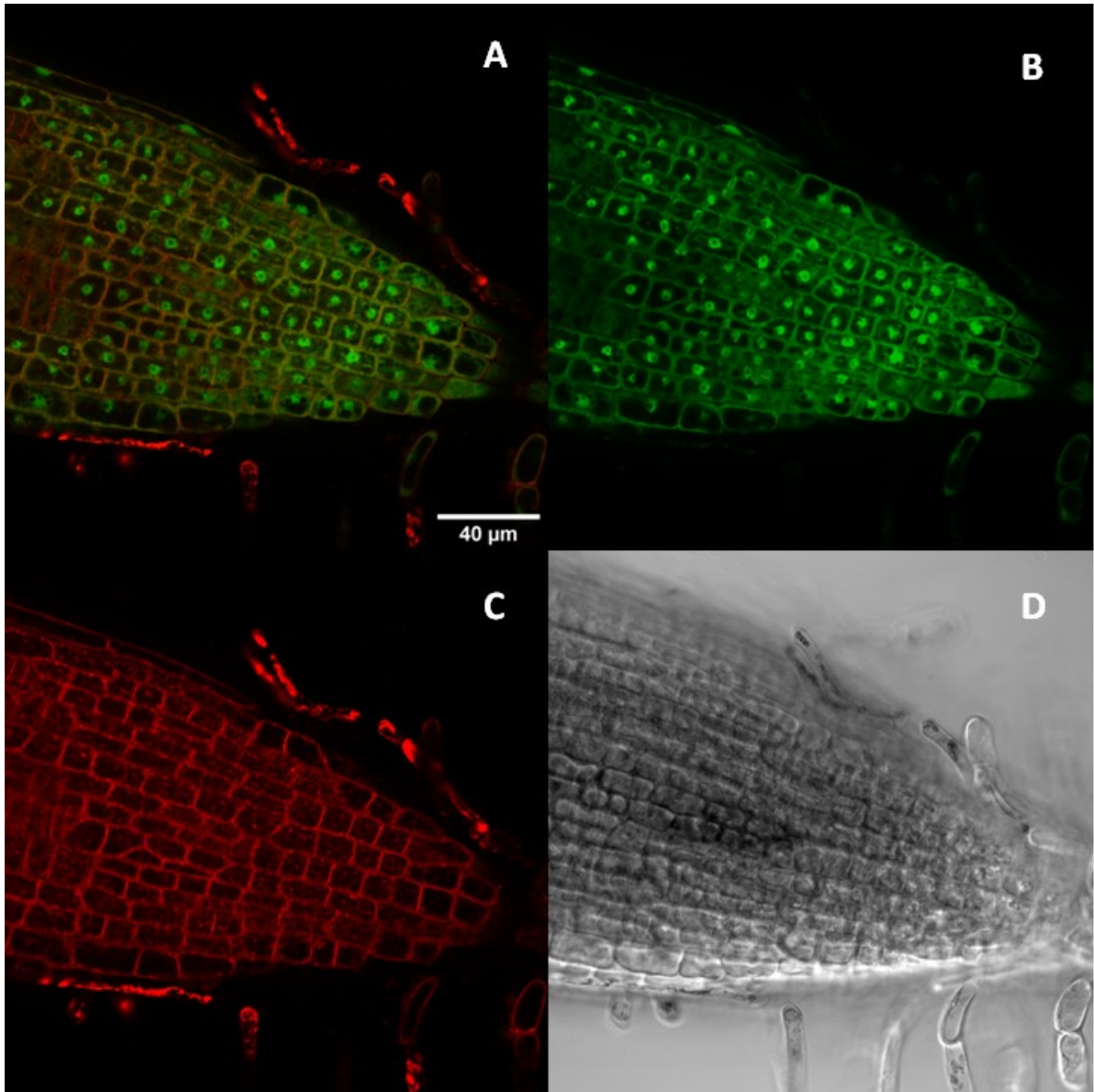
Obrázek 7: Lokalizace 35s::GFP:EXO70H8 v listu *Nicotiana benthamiana*. GFP signál je vidět v kortikální cytoplazmě epidermálních buněk. Proložení všech kanálů (A), samostatný GFP kanál – zelená (B), kanál přirozené fluorescence plastidů – magentová (C) a viditelné spektrum – šedá (D).

4.2.3 Konstrukt 35s::GFP:EXO70H7 a EXO70H7prom::GFP:EXO70H7 v rostlinách *Arabidopsis thaliana*

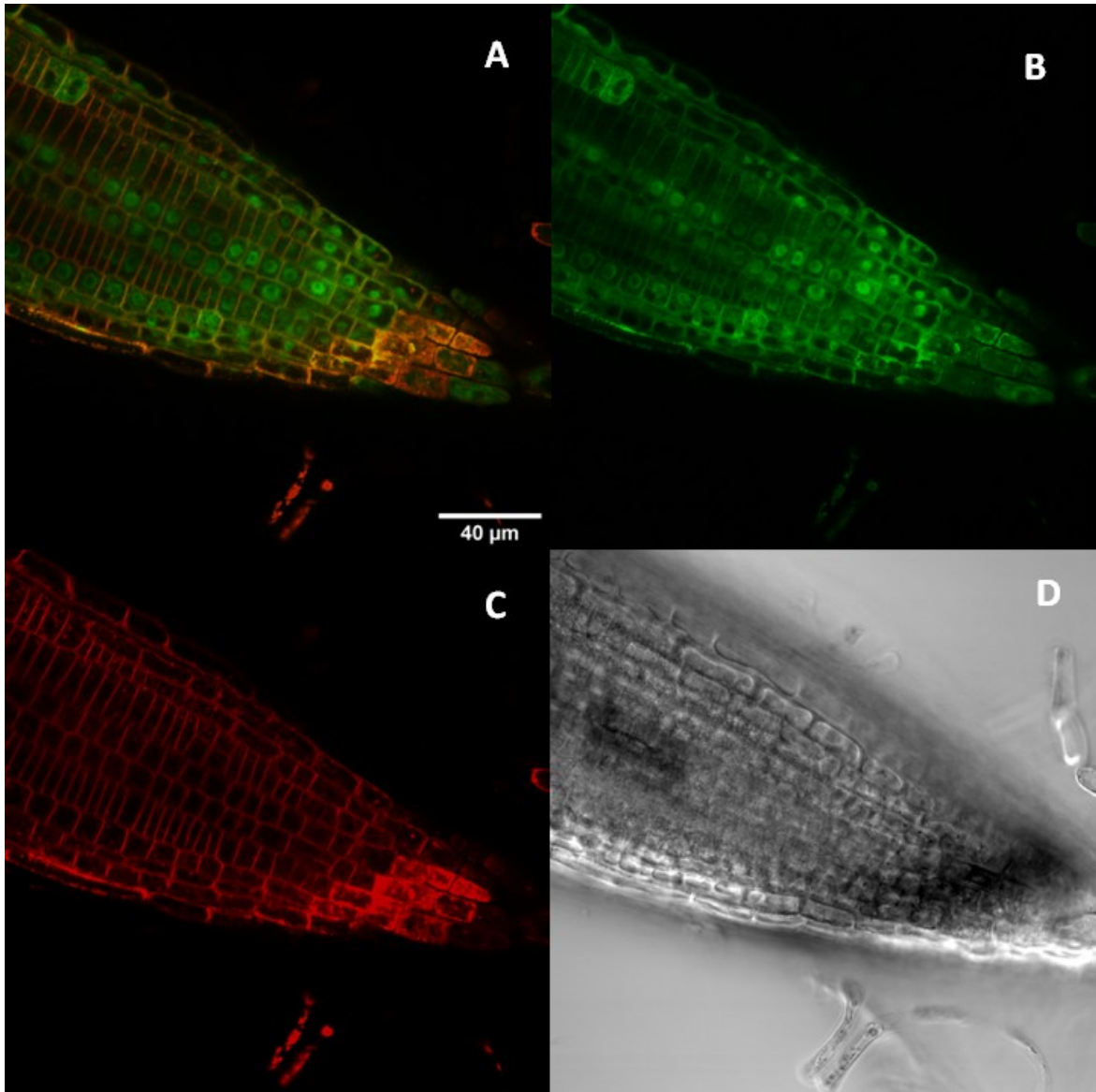
Buněčná a pletivová lokalizace proteinu EXO70H7 byla pozorována ve stabilně transformovaných rostlinách *Arabidopsis* s mutací v genu *EXO70H7*. Transformací vznikly dvě linie rostlin a to jedna s konstruktem EXO70H7 s N-terminálním GFP pod konstitutivním virovým promotorem 35s a druhá linie s tímtéž konstruktem pod přirozeným promotorem genu *EXO70H7*. Jak u konstitutivního tak i přirozeného promotoru byla potvrzena předchozí pozorování z listů tabáku (viz kap. 4.2.1). Signál GFP byl opět viditelný v jádrech s kontrastním jádérkem bez signálu. Též byl signál patrný v cytoplazmě. U konstitutivního promotoru 35s byl signál nalezen takřka ve všech částech rostliny, jmenovitě v epidermálních buňkách i buňkách průduchů listů a hypokotylu (obr. 8), po celé délce kořene byl signál v buňkách rhizodermis a primární kůry (obr. 9). V rostlinách transformovaných konstruktem s přirozeným promotorem byl signál GFP mnohem slabší a vyskytoval se pouze v oblasti kořenové špičky (obr. 10). U obou konstruktů byla vyvrácena lokalizace na plazmatické membráně díky pozorování s využitím barviva FM-64, která barví plazmatickou membránu. Signál tohoto barviva nekolokalizoval se signálem GFP.



Obrázek 8: Lokalizace 35s::GFP:EXO70H7 v listu mutantní rostliny *Arabidopsis exo70h7* s obarvenou plazmatickou membránou použitím FM-64. GFP signál je vidět v jádrech s negativním jádérkem a v kortikální cytoplazmě epidermálních a průduchových buněk. Proložení kanálu GFP a FM-64 (A), samostatný GFP kanál - zelená (B), FM-64 kanál (červená) s viditelnou plazmatickou membránou a chloroplasty mezofylových buněk, jejichž emisní vlnová délka se z velké části překrývá (C) a viditelné spektrum - šedá (D).



Obrázek 9: Lokalizace 35s::GFP:EXO70H7 v kořenné špičce mutantní rostliny *Arabidopsis exo70h7* s obarvenou plazmatickou membránou použitím FM-64. GFP signál je opět vidět v jádrech s negativním jádérkem a v cytoplazmě buněk. Proložení kanálu GFP a FM-64 (A), samostatný GFP kanál - zelená (B), FM-64 kanál (červená) s viditelnou plazmatickou membránou (C) a viditelné spektrum - šedá (D).

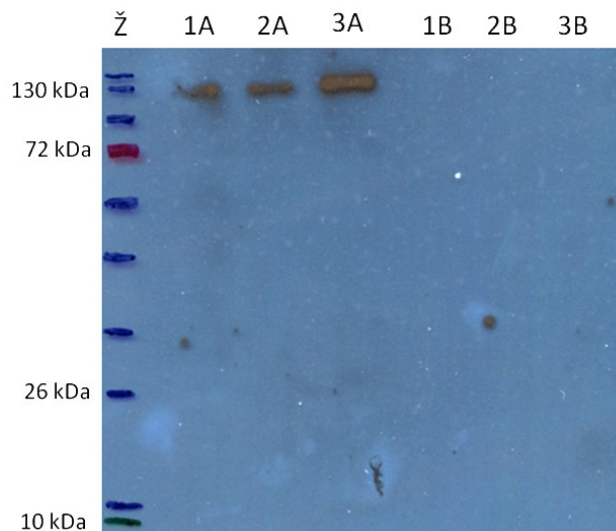


Obrázek 10: Lokalizace EXO70H7prom::GFP:EXO70H7 v kořenové špičce mutantní rostliny *Arabidopsis exo70h7* s obarvenou plazmatickou membránou použitím FM-64. Slabší signál GFP je i zde vidět v jádrech s negativním jádérkem a v cytoplazmě buněk. Proložení kanálu GFP a FM-64 (A), samostatný GFP kanál – zelená (B), FM-64 kanál (červená) s viditelnou plazmatickou membránou (C) a viditelné spektrum – šedá (D).

4.2.4 Analýza obsahu volného a vázaného GFP v rostlinách *Arabidopsis thaliana* obsahujících konstrukty 35s::GFP:EXO70H7 a EXO70H7prom::GFP:EXO70H7 pomocí metody Western Blot

Pro potvrzení, že výsledný GFP signál v kap. 4.2.3 je vázaný s proteinem našeho zájmu (EXO70H7) byla provedena analýza pomocí Western Blot. Na označené membráně bylo vidět, že v rostlinách stabilně transformovaných konstruktem 35s::GFP:EXO70H7 se nevyskytuje volné GFP (samostatné GFP má molekulovou velikost 27 kDa), nýbrž pouze GFP vázané. To jsme mohli

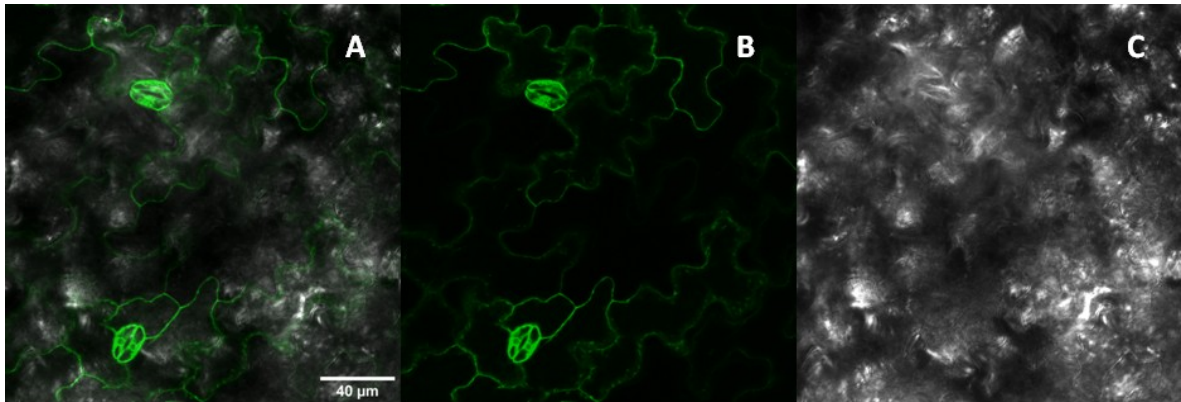
pozorovat jak v celkové buněčné frakci, tak i v obou oddělených frakcích: cytoplazmatické a jaderné. Tyto proteinové frakce byly izolovány z listů, proto u rostlin obsahujících konstrukt EXO70H7prom::GFP:EXO70H7 gel neprokázal ani volné ani vázané GFP, jelikož podle mikroskopického pozorování je tento konstrukt exprimován pouze v kořenové špičce. Viz obr. 11.



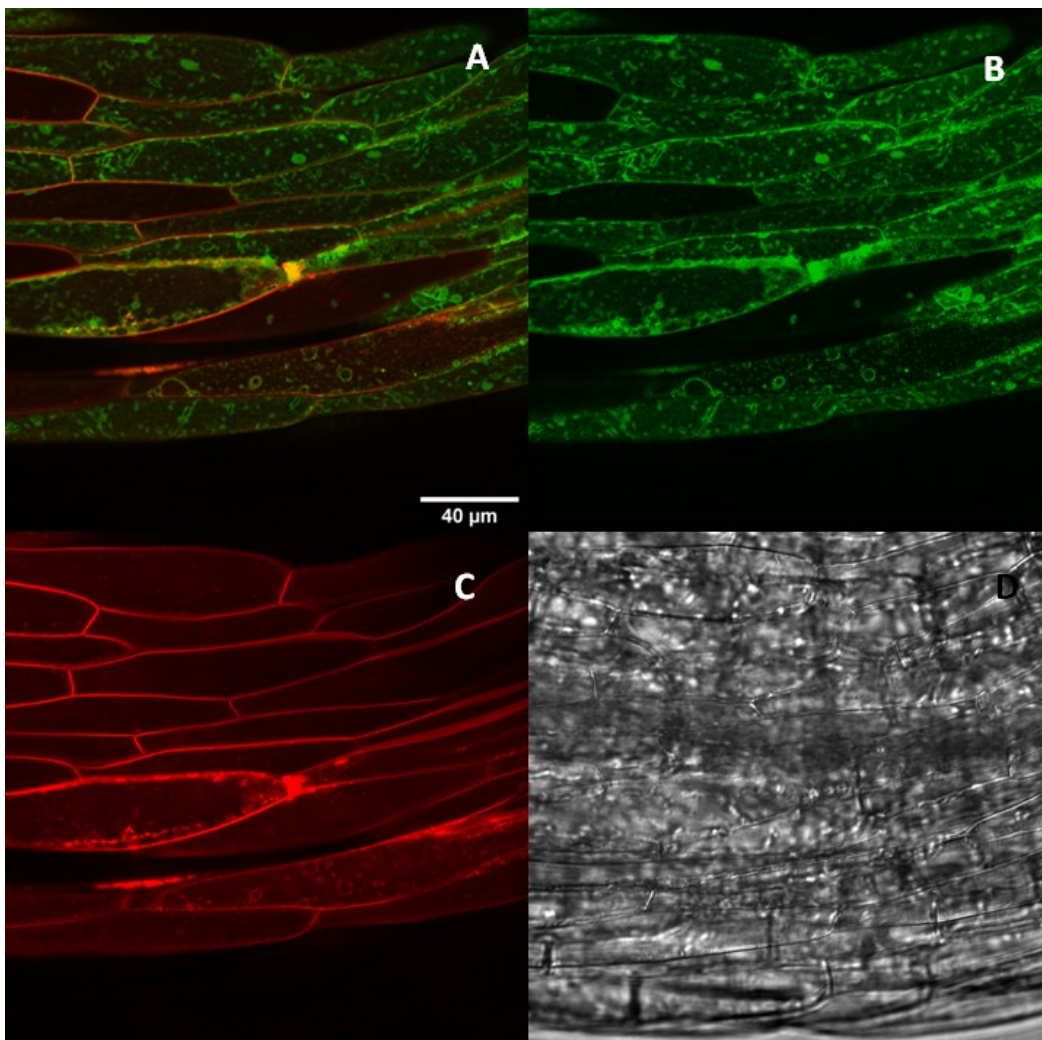
Obrázek 11: Analýza obsahu volného a vázaného GFP – Horizontální proteinová gelová elektroforéza. Na obrázku lze vidět přítomnost vázaného GFP v celkové buněčné frakci (1A), cytoplazmatické (2A) a pravděpodobně vyšší obsah v jaderné frakci (3A) z listů rostlin obsahujících konstrukt 35s::GFP:EXO70H7. Nepřítomnost jak vázaného tak i volného GFP je patrná jak v celkové buněčné frakci (1B), cytoplazmatické (2B) i v jaderné frakci (3B) z listů rostlin obsahujících konstrukt EXO70H7prom::GFP:EXO70H7. Ž, žebřík standardu molekulové hmotnosti.

4.2.5 Konstrukt 35s::GFP:EXO70H8 a EXO70H8prom::GFP:EXO70H8 v rostlinách *Arabidopsis thaliana*

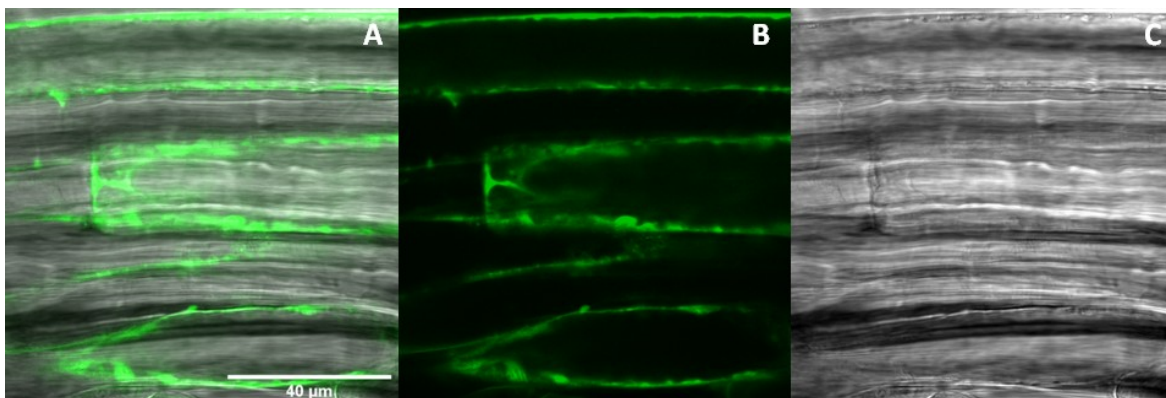
Buněčná a pletivová lokalizace proteinu EXO70H8 byla pozorována ve stabilně transformovaných rostlinách *Arabidopsis* s mutací v genu *EXO70H8*. Transformací vznikly dvě linie rostlin a to jedna s konstruktem EXO70H8 s N-terminálním GFP pod konstitutivním virovým promotorem 35s a druhá linie s tímtéž konstruktem pod přirozeným promotorem genu *EXO70H8*. Bohužel se nezdařilo najít svítící linii se signálem GFP pod přirozeným promotorem. Veškerá pozorování pro protein EXO70H8 jsou tedy pouze s konstitutivním promotorem 35s. Navíc i u konstitutivního promotoru byl signál GFP slabý. Signál byl nalezen v cytoplazmě buněk epidermis listů a hypokotylu (viz obr. 12 a 13), dále v cytoplazmě a v cytoplazmatických provazcích buněk primární kůry horní části kořene (viz obr. 14 a 15). Vždy byly v cytoplazmě patrná pohybující se negativní tělíska bez signálu (nejspíše nějaké buněčné organely). Potvrdilo se tímto tak pozorování z tranzientně transformovaných listů tabáku (viz kap. 4.2.2). Pro vyloučení signálu GFP na plazmatické membráně byla opět využita barvička FM-64.



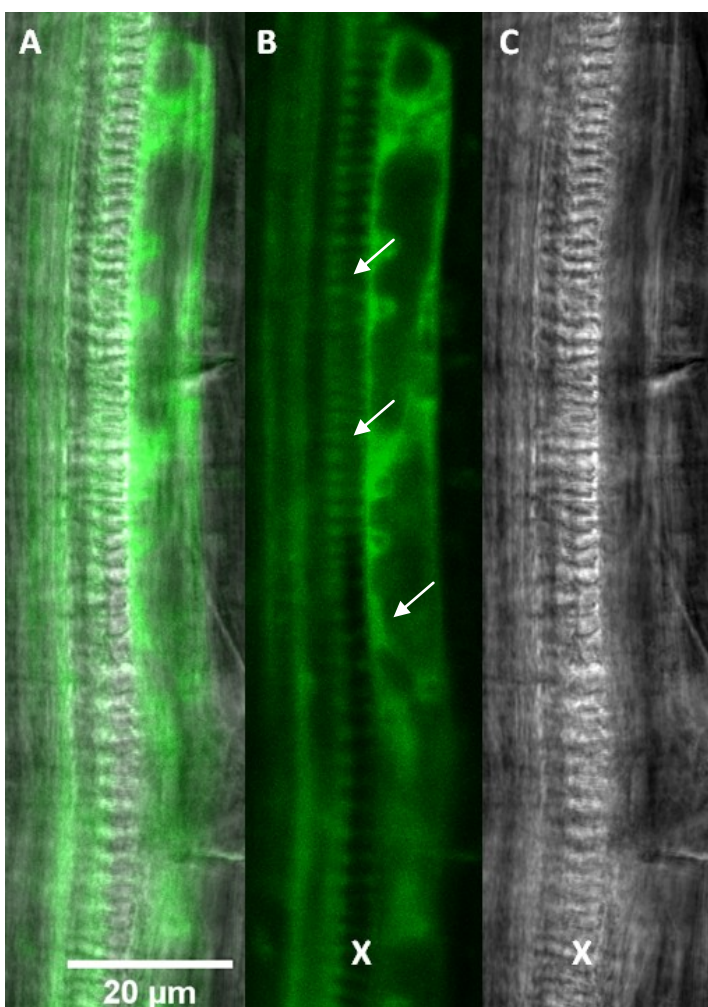
Obrázek 12: Lokalizace 35s::GFP:EXO70H8 v listu mutantní rostliny *Arabidopsis exo70h8*. GFP signál je vidět v kortikální cytoplazmě epidermálních a průduchových buněk. Proložení kanálu GFP a viditelného spektra (A), samostatný GFP kanál – zelený (B) a viditelné spektrum – šedý (C).



Obrázek 13: Lokalizace 35s::GFP:EXO70H8 v hypocotylu mutantní rostliny *Arabidopsis exo70h8* s obarvenou plazmatickou membránou použitím FM-64. GFP signál je vidět v kortikální cytoplazmě epidermálních buněk a zároveň jsou patrné buněčné kompartmenty bez signálu. Proložení kanálu GFP a FM-64 (A), samostatný GFP kanál – zelený (B), FM-64 kanál (červený) s viditelnou plazmatickou membránou (C) a viditelné spektrum – šedý (D).



Obrázek 14: Lokalizace 35s::GFP:EXO70H8 v kořenu mutantní rostliny *Arabidopsis exo70h8*. GFP signál je vidět v kortikální cytoplazmě a cytoplazmatických řetězcích buněk primární kůry kořene. Proložení kanálu GFP a viditelného spektra (A), samostatný GFP kanál – zelený (B) a viditelné spektrum – šedý (C).



Obrázek 15: Lokalizace 35s::GFP:EXO70H8 v kořenu mutantní rostliny *Arabidopsis exo70h8*. GFP signál je vidět v kortikální cytoplazmě a cytoplazmatických řetězcích buněk primární kůry kořene a zároveň jsou patrné buněčné kompartmenty bez signálu (některé z nich označené šipkou). Zároveň je vidět výrazná autofluorescence xylému (X). Proložení kanálu GFP a viditelného spektra (A), samostatný GFP kanál – zelený (B) a viditelné spektrum – šedý (C).

4.3 Vliv stresorů na vývoj rostlin *Arabidopsis thaliana* a jejích mutantů v genech *EXO70H7* a *EXO70H8*

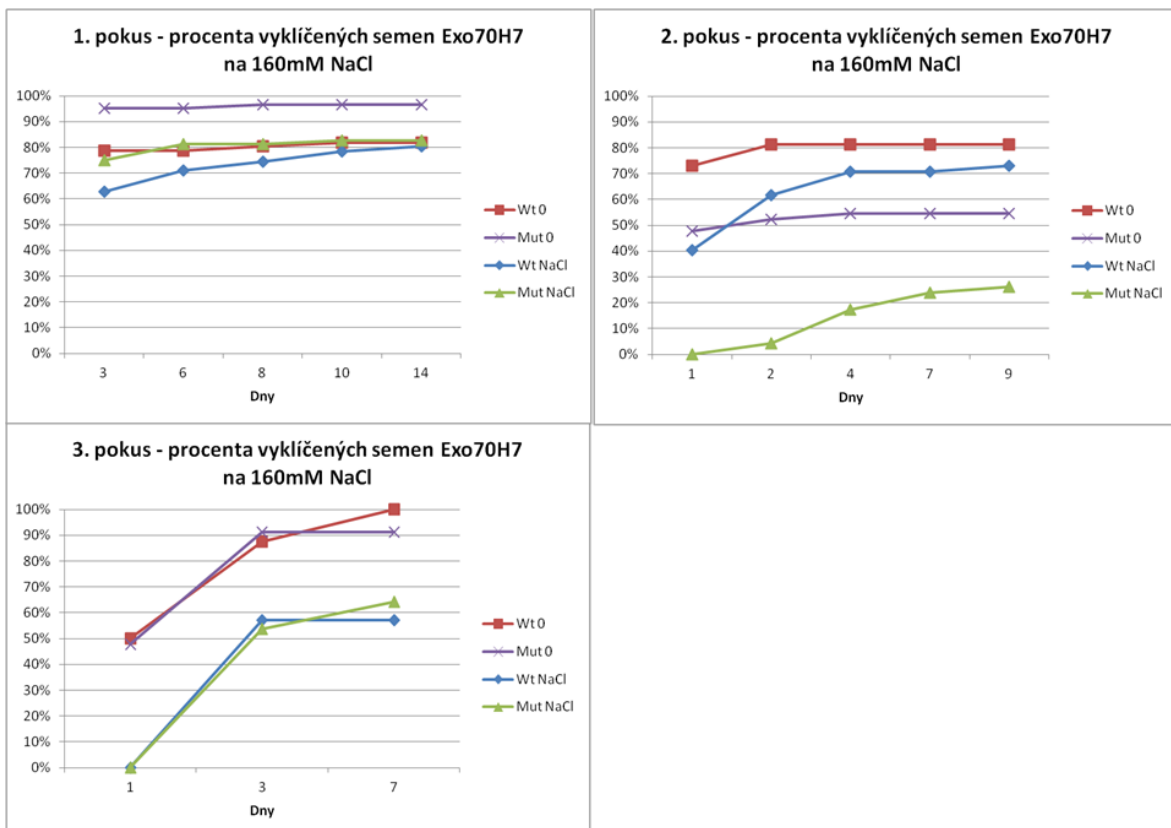
4.3.1 Klíčení semen mutantních rostlin *exo70H7* na médiích obsahujících soli

Semena mutantních rostlin *exo70H7* vykazovala vysokou variabilitu v klíčení jak mezi jednotlivými médii, tak i v opakováních pokusu a to i přes použití stejného stáří semen. Je tedy nutno vzít v potaz výraznou nestabilitu mutantních semen již při drobných fluktuacích podmínek, kterým nikdy nelze plně zabránit.

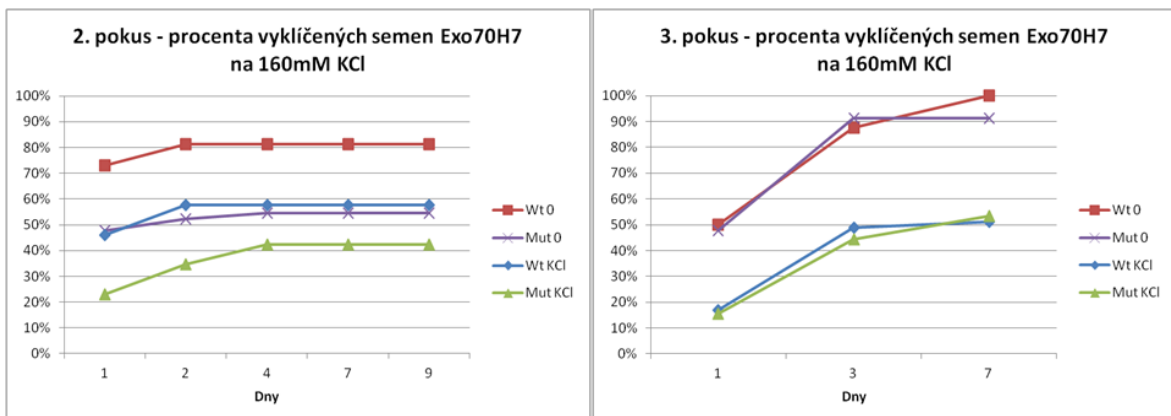
Chlorid sodný (NaCl) ve všech třech metodických opakováních zpomalil klíčení semen jak mutantních tak i rostlin divokého typu (viz obr. 16). Celkový finální objem vyklíčených semen po sedmi dnech na médiích s NaCl byl vždy nižší (viz obr. 19), s tím že podle statistických výpočtů rozdíl množství vyklíčených semen divokého typu na kontrolním ½MS médiu (dále jen kontrolní médium) oproti médiu s přidaným NaCl je signifikantní na úrovni 0,05. Rozdíl množství vyklíčených mutantních semen na kontrolním médiu a médiu s NaCl byl též signifikantní a to na vyšší úrovni 0,01. Co se týká porovnání vyklíčených semen divokého typu a mutanta na NaCl médiu, tak zde nebyl celkový rozdíl nijak patrný ani signifikantní (viz tab. 1).

I na chloridu draselném (KCl) v obou dvou metodických opakováních bylo zpomalené klíčení jak mutantních semen, tak i divokého typu (viz obr. 17). Po sedmi dnech klíčení na médiu s KCl byl celkový objem vyklíčených semen mnohem nižší než na kontrolních médiích (viz obr. 19). Rozdíl vyklíčených semen divokého typu po sedmi dnech mezi KCl a kontrolním médiem byl signifikantní na úrovni 0,01. Tentýž rozdíl u mutantních semen byl signifikantní na úrovni 0,05. Rozdíl množství vyklíčených semen divokého typu od mutantů na médiu s KCl nebyl moc znatelný a samozřejmě nebyl signifikantní (viz tab. 1x).

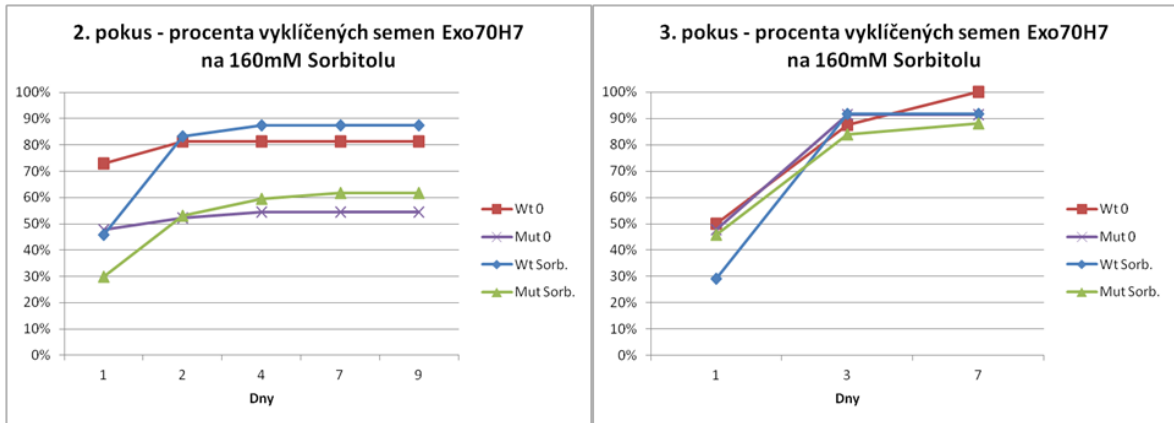
Na médiích s obsahem sorbitolu bylo klíčení pro jak divoký typ tak i mutanty ze začátku pomalejší oproti kontrolním médiím (viz obr. 18), ale celkový objem vyklíčených semen po 7 dnech byl srovnatelný (viz obr. 19). Rozdíl množství vyklíčených semen divokého typu na sorbitolovém médiu oproti kontrolnímu nebyl signifikantní. Stejně tak i u mutantních semen nebyl rozdíl potvrzen signifikantností. Ovšem porovnání klíčení semen divokého typu na sorbitolu oproti mutantním semenům též na sorbitolu je signifikantní na úrovni 0,01 a semena divokého typu zde tedy lépe klíčila (viz tab. 1).



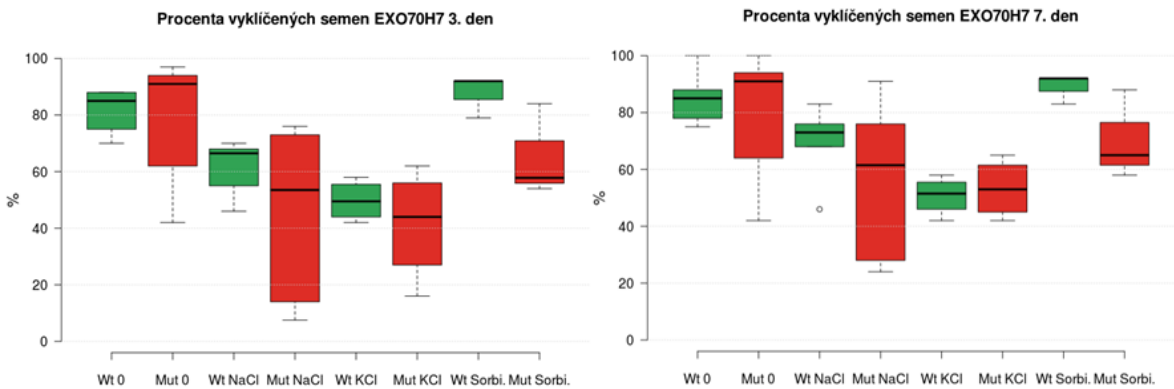
Obrázek 16: Grafy procent vyklíčených semen *Arabidopsis* mutantů (Mut) *exo70H7* a příslušných divokých typů (Wt) na kontrolních médiích (0) a médiích se 160mM NaCl v průběhu času ve třech metodických opakováních.



Obrázek 17: Grafy procent vyklíčených semen *Arabidopsis* mutantů (Mut) *exo70H7* a příslušných divokých typů (Wt) na kontrolních médiích (0) a médiích se 160mM KCl v průběhu času ve dvou metodických opakováních.



Obrázek 18: Grafy procent vyklíčených semen *Arabidopsis* mutantů (*Mut*) *exo70H7* a příslušných divokých typů (*Wt*) na kontrolních médiích (0) a médiích se 160mM sorbitolem (*Sorb.*) v průběhu času ve dvou metodických opakováních.



Obrázek 19: Graf procent vyklíčených semen *Arabidopsis* mutantů (*Mut*, červeně) *exo70H7* a příslušných divokých typů (*Wt*, zeleně) po třech dnech (vlevo) a po sedmi dnech (vpravo) kultivace na kontrolních médiích (0) a médiích se 160mM NaCl, 160mM KCl a 160mM sorbitolem (*Sorbi.*).

Tabulka 1: Signifikantnost získaných hodnot vyklíčených semen *Arabidopsis* mutantů (Mut) *exo70H7* a příslušných divokých typů (Wt) po sedmi dnech kultivace na médiích vypočítaných pomocí metody Chi-Square a ověřených metodou False Discovery Rate (FDR) pro korekci vícenásobného srovnávání. Ve spodní části tabulky jsou vypsané výsledné hodnoty Chi-Square výpočtů (p-hodnoty), kdy tmavě zeleně jsou označeny hodnoty nižší než 0,01, světle zeleně hodnoty nižší než 0,05 a červeně vyšší než 0,05 (tedy nesignifikantní). V horní části tabulky jsou za pomoci hvězdiček označeny výsledky FDR. (*) signifikantní podle 0,05, (**) signifikantní podle 0,01, (NS) nesignifikantní. Sorb., sorbitol.

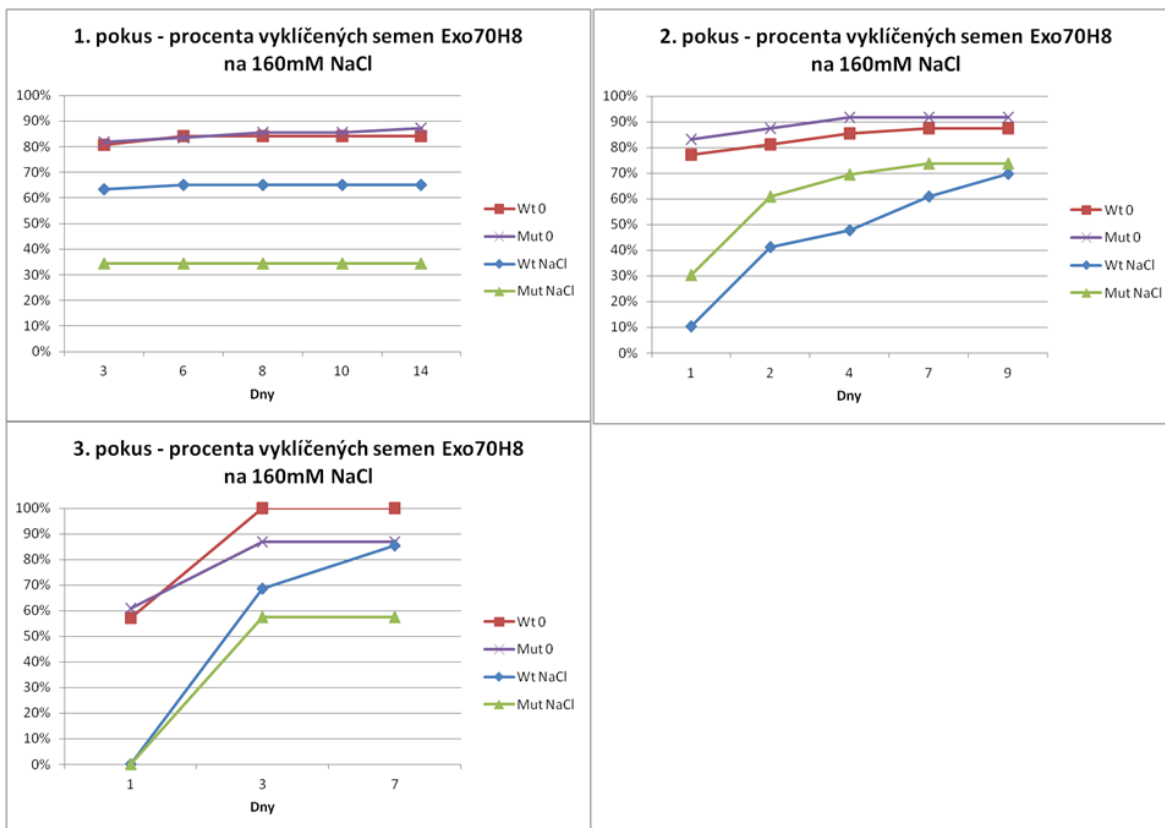
EXO70H7	Wt 0	Mut 0	Wt NaCl	Mut NaCl	Wt KCl	Mut KCl	Wt Sorb.	Mut Sorb.
Wt 0		NS	*	**	**	**	NS	**
Mut 0	.685349		*	**	**	*	NS	NS
Wt NaCl	.004286	.013438		NS	NS	*	**	NS
Mut NaCl	.000016	.000077	.098227		NS	NS	**	NS
Wt KCl	.000011	.000048	.036424	.450271		NS	**	NS
Mut KCl	<.00001	<.00001	.006521	.17263	.608523		**	*
Wt Sorb.	.755369	.150766	.000808	<.00001	<.00001	<.00001		*
Mut Sorb.	.044239	.096109	.683876	.089517	.034932	.008536	.006906	

4.3.2 Klíčení semen mutantních rostlin *exo70H8* na médiích obsahujících soli

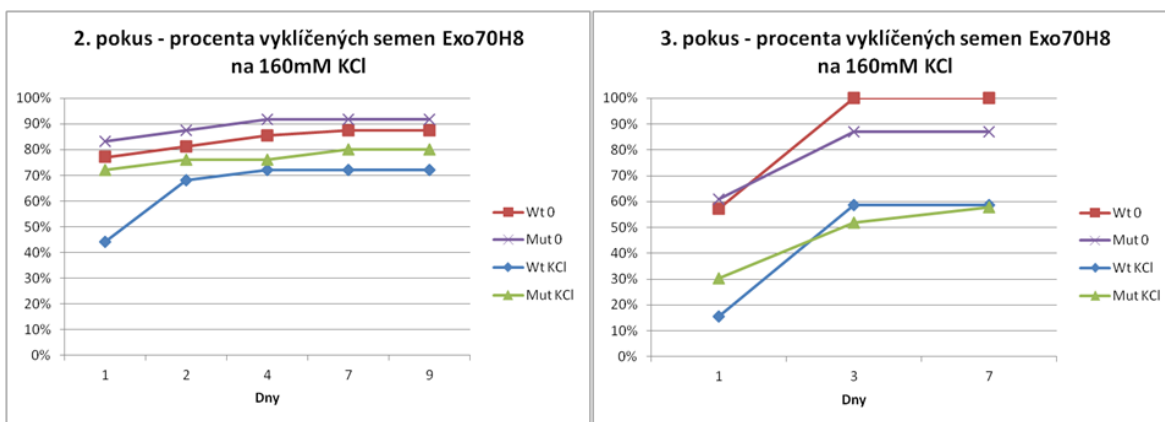
Při klíčení semen na médiích obsahujících NaCl semena jak divokého typu, tak i mutantů klíčila o poznání pomaleji (viz obr. 20) a celkový objem vyklíčených semen po sedmi dnech byl pro oba genotypy též menší (viz obr. 23). Signifikantnost rozdílu vyklíčených semen divokého typu na kontrolním médiu a médiu s NaCl je na úrovni 0,01. Stejně tak je tomu i u semen mutantních, i zde je signifikantnost na úrovni 0,01. Menší objem vyklíčených semen mutantu *exo70H8* na médiu s NaCl oproti vyklíčeným semenům divokého typu též na NaCl je signifikantní na úrovni 0,01 (viz tab. 2). Můžeme tedy tvrdit, že tento mutant výrazně hůře klíčí na NaCl médiu.

Na médiích obsahujících KCl semena obou dvou druhů klíčila pomaleji než na kontrolním médiu (viz obr. 21) a celkový objem vyklíčených semen po sedmi dnech byl též menší (viz obr. 23). Rozdíl celkového objemu vyklíčených semen divokého typu na médiu s KCl byl signifikantní na úrovni 0,01. I rozdíl vyklíčených mutantních semen na kontrolním médiu a médiu s KCl byl signifikantní na úrovni 0,01. Mezi klíčením semen divokého typu a mutantů na KCl médiu rozdíl nebyl moc patrný a zároveň výpočty byly označeny za nesignifikantní (viz tab. 2).

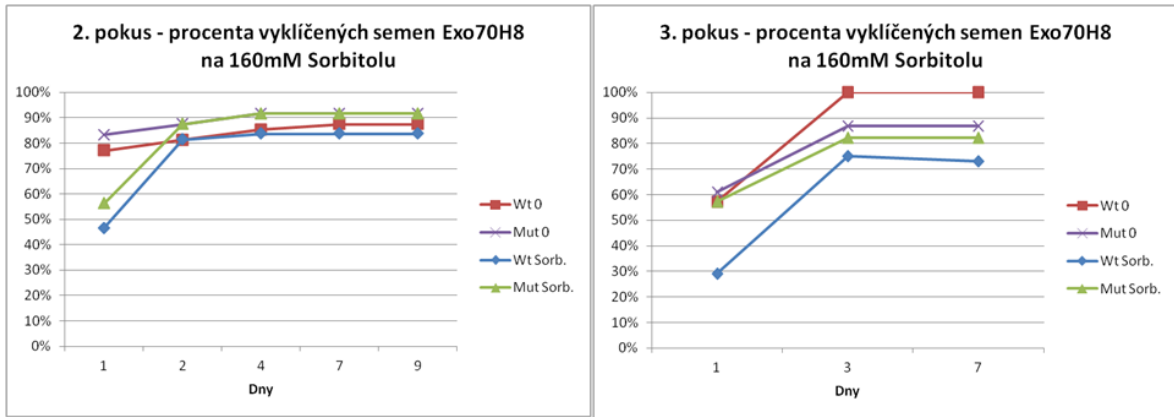
Sorbitolová média zpočátku zpomalila klíčení semen obou genotypů, (viz obr. 22), ale celkový objem vyklíčených semen po sedmi dnech jak na sorbitolu, tak i na kontrolním médiu byl srovnatelný (viz obr. 23). I podle testu signifikantnosti rozdíl vyklíčených semen divokého typu na médiích se sorbitolem a bez sorbitolu byl nesignifikantní (viz tab. 2).



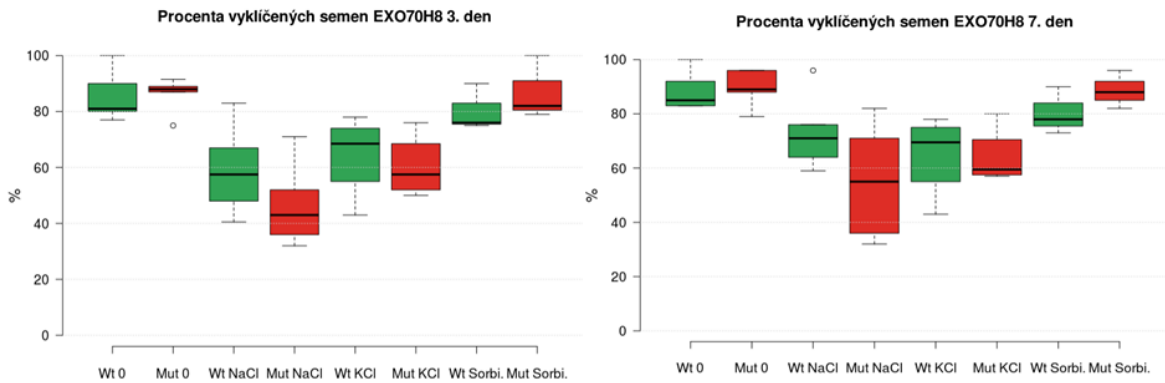
Obrázek 20: Grafy procent vyklíčených semen *Arabidopsis* mutantů (Mut) *exo70H8* a příslušných divokých typů (Wt) na kontrolních médiích (0) a médiích se 160mM NaCl v průběhu času ve třech metodických opakováních.



Obrázek 21: Grafy procent vyklíčených semen *Arabidopsis* mutantů (Mut) *exo70H8* a příslušných divokých typů (Wt) na kontrolních médiích (0) a médiích se 160mM KCl v průběhu času ve dvou metodických opakováních.



Obrázek 22: Grafy procent vyklíčených semen *Arabidopsis* mutantů (Mut) *exo70H8* a příslušných divokých typů (Wt) na kontrolních médiích (0) a médiích se 160mM sorbitolem (Sorb.) v průběhu času ve dvou metodických opakováních.



Obrázek 23: Graf procent vyklíčených semen *Arabidopsis* mutantů (Mut, červeně) *exo70H8* a příslušných divokých typů (Wt, zeleně) po třech dnech (vlevo) a po sedmi dnech (vpravo) kultivace na kontrolních médiích a médiích se 160mM NaCl, 160mM KCl a 160mM sorbitolem (Sorbi.).

Tabulka 2: Signifikantnost získaných hodnot vyklíčených semen *Arabidopsis* mutantů (Mut) *exo70H8* a příslušných divokých typů (Wt) po sedmi dnech kultivace na médiích vypočítaných pomocí metody Chi-Square a ověřených metodou False Discovery Rate (FDR) pro korekci vícenásobného srovnávání. Ve spodní části tabulky jsou vypsány výsledné hodnoty Chi-Square výpočtů (p-hodnoty), kdy tmavě zeleně jsou označeny hodnoty nižší než 0,01, světle zeleně hodnoty nižší než 0,05 a červeně vyšší než 0,05 (tedy nesignifikantní). V horní části tabulky jsou za pomoci hvězdiček označeny výsledky FDR. (*) signifikantní podle 0,05, (**) signifikantní podle 0,01, (NS) nesignifikantní. Sorb., sorbitol.

EXO70H8	Wt 0	Mut 0	Wt NaCl	Mut NaCl	Wt KCl	Mut KCl	Wt Sorb.	Mut Sorb.
Wt 0		NS	**	**	**	**	NS	NS
Mut 0	.981446		**	**	**	**	NS	NS
Wt NaCl	.000268	.000303		**	NS	NS	NS	**
Mut NaCl	< .00001	< .00001	.001743		NS	NS	**	**
Wt KCl	.000063	.000071	.346967	.139087		NS	NS	**
Mut KCl	.000077	.000087	.427932	.07988	.871599		NS	**
Wt Sorb.	.11559	.121095	.132455	.000138	.037904	.047333		NS
Mut Sorb.	.989362	.973295	.002443	< .00001	.000559	.00071	.164337	

4.3.3 Přenesení 5-ti denních semenáčků mutantních rostlin *exo70H7* a *exo70H8* na médium obsahující sůl

Rostliny *Arabidopsis*, které byly nejprve pěstovány na klasickém ½MS médiu a následně po 5 dnech sterilně přeneseny na média obsahující 160mM NaCl a pro kontrolu i na ½MS médium, nevykazovaly žádné prokazatelné trendy (porovnání přenesených mutantů oproti rostlinám divokého typu) a to ani po 14 dnech pozorování. Pouze bylo patrné, že sůl je pro rostliny toxická, ať jde o mutanty či divoké typy.

4.3.4 Kultivace mutantních rostlin *exo70H7* a *exo70H8* v tekutém médiu

U rostlin od semen pěstovaných v tekutém médiu po dobu pěti dní bylo podezření na odlišnou délku kořenů dvojitého mutantu *exo70H7-exo70H8*. Mnohočetným opakováním tohoto pokusu tato hypotéza nebyla potvrzena a bylo zjištěno, že stres vytvořený takovými podmínkami je tak vysoký, že naměřené hodnoty se chaoticky mění pro jednotlivé genotypy.

4.3.5 Kultivace mutantních rostlin *exo70H7* a *exo70H8* na médiu s vyšším obsahem železa

Rostliny byly pěstovány na médiích s obsahem 100mM železa. Bylo patrné, že takto vysoký obsah železa je pro rostliny velmi toxický, a tak rostliny mutantní i divokého typu nepřežily na takovýchto médiích dobře. Ovšem nebyl patrný žádný výrazný trend v porovnání mutantů vůči divokému typu rostlin.

4.3.6 Kultivace mutantních rostlin *exo70H7* a *exo70H8* na médiu s nižším obsahem železa

Při použití médií, která obsahovala pouze 10 % železa oproti běžnému ½MS médiu, nebyl znatelný žádný fenotypový projev ani jedněch z mutantních rostlin oproti rostlinám divokého typu pěstovaných na stejném médiu.

5 DISKUZE

5.1 Podjednotky EXO70H7 a EXO70H8 ve vývoji kořene

Při analýze fenotypů mutantních rostlin *exo70H7*, *exo70H8* a dvojitého mutantu *exo70H7-exo70H8* nebyl v této práci identifikován žádný pozorovatelný projev těchto mutací. Dalo by se tedy spekulovat, že některá z dalších podjednotek EXO70 dokáže plně nahradit funkci EXO70H7 a EXO70H8. Nedá se ani vyloučit, že se pouze nepodařilo najít podmínky, při kterých by došlo k fenotypovému projevu mutací.

5.2 Exprese proteinu EXO70H7 a ověřování jeho buněčné lokalizace

Pozorování buněčné lokalizace konstruktů EXO70H7 s N-terminálním GFP pod konstitutivním virovým promotorem 35s v listu *Nicotiana benthamiana* ukázalo, že je protein EXO70H7 lokalizován v jádře s kontrastním (negativním) jadérkem a v cytoplazmě. Lokalizace stejného konstruktů ve stabilně transformované rostlině *Arabidopsis* byla na buněčné úrovni pozorována také v jádře s kontrastním jadérkem a v cytoplazmě. K potvrzení těchto pozorování došlo i u transformantů *Arabidopsis* s konstruktů s přirozeným promotorem (EXO70H7prom::GFP:EXO70H7). Objevení signálu lokalizace tohoto proteinu v jádře a cytoplazmě naznačuje možné zapojení do transportu směrem z cytoplazmy do jádra či vice versa. Analýza výskytu volného GFP pomocí Western Blot potvrdila jaderný signál u konstruktů 35s::GFP:EXO70H7 v listech stabilních transformantů *Arabidopsis*. Došlo tak k vyvrácení možnosti, že by se jednalo pouze o výskyt volného GFP a tím bylo tedy potvrzeno, že pozorovaný signál, je navázán na sledovaný protein. U rostlin transformovaných konstruktů s přirozeným promotorem nebylo nalezeno ani volné GFP ani vázané GFP, protože tento konstrukt se exprimoval pouze v kořenové špičce a ne v listech (viz níže).

U obou konstruktů v *Arabidopsis* vzniklo podezření, že signál GFP mohl být lokalizován i na plazmatické membráně. Proto byly transformované rostliny pozorovány s obarvenou plazmatickou membránou pomocí barviva FM-64. Pozorování na konfokálním mikroskopu ukázalo, že EXO70H7 nekolokalizuje s barvivem FM-64 a tudíž se nelokalizuje na membránu, výskyt signálu je tedy v kortikální cytoplazmě těsně pod plazmatickou membránou. Protein EXO70H7 se tedy nejspíše neváže trvale na plazmatickou membránu, pokud vůbec, a možná se neúčastní sekrece do mimobuněčného prostoru či na plazmatické membrány. Nelze ovšem zanedbat možnost, že k vazbě toho proteinu na membránu nemuselo dojít, protože je na něj navázané GFP, které by mohlo zakrýt některou z potřebných domén EXO70H7 pro tvorbu konstruktů exocyst na membráně. Tato možnost by se dala ověřit vytvořením konstruktů obsahujícího GFP na C-konci a porovnání výsledků se současným konstruktů s GFP na N-konci.

Již dříve byl pozorován konstrukt EXO70H4prom::GFP:EXO70H7 v trichomových buňkách *exo70H4* *Arabidopsis* a i zde byl signál pozorován v jádře a cytoplazmě (Kulich et al., 2018). Pozorování konstruktů s promotorem 35s a s přirozeným promotorem EXO70H7 v buňkách kořenové špičky v této diplomové práci tedy korespondují s předchozími pozorováními v buňkách

trichomu. Výsledky mikroskopického pozorování v této práci ukázaly, že se EXO70H7 nejspíše lokalizuje na buněčné přepážce a účastní se tak dělení buněk. Při obarvení kořene barvivem FM-64 byl pozorován signál GFP kolokalizující s tímto barvivem nejspíše na nově vznikající buněčné přepážce u transformované rostliny *Arabidopsis* s konstruktem EXO70H7prom::GFP:EXO70H7. Navíc toto pozorování bylo v meristematické zóně kořene, kde probíhá velice aktivní dělení buněk. Ovšem opakování tohoto pozorování je nezbytné pro ověření těchto výsledků. V práci Li et al. (2010) naznačili taktéž možné zapojení EXO70H7 do regulace buněčného cyklu, jelikož pozorovali lokalizaci v meristematické zóně kořene transgenní linie EXO70H7promotor::GUS. Každopádně bližší pozorování buněčného cyklu jsou ještě nezbytná pro potvrzení této informace. V případě potvrzení této spekulace by protein EXO70H7 mohl hrát důležitou roli při tvorbě nové buněčné stěny vznikajících dceřiných buněk.

Z již publikované literatury víme, že lokalizace EXO70H7 v rámci celé rostliny *Arabidopsis* byla určena pomocí metody RT-PCR v laterální kořenové čepičce, epidermis, primární kůře, endodermis a středovém válci kořenového meristému, také v cévních svazcích dospělých kořenů a v plodolistu květu (Li et al., 2010). Ve stejné vědecké publikaci byla lokalizace tohoto proteinu hledána i pomocí transgenní linie EXO70H7prom::GUS. Exprese glukuronidázy pod přirozeným promotorem EXO70H7 byla nalezena v meristematické zóně kořene, v cévních svazcích těsně nad zónou kořenového vlášení a v gynéceu. V předkládané diplomové práci byla pozorována lokalizace EXO70H7 s N-terminálním GFP pod konstitutivním virovým promotorem 35s a pod přirozeným promotorem EXO70H7 v celé rostlině *Arabidopsis* pouze s vynecháním rozmnožovacích orgánů. Signál GFP pod promotorem 35s byl nalezen v epidermis listů a hypokotylu, v celém kořeni se signál vyskytoval v rhizodermis a primární kůře. Signál GFP s přirozeným promotorem byl nalezen pouze v kořenové špičce. Dochází tak tedy k rozepři s předchozím pozorováním lokalizace, až na výjimku meristému kořenové špičky, který se potvrdil ve všech případech. Je možné, že výsledky RT-PCR nekorespondovaly s mikroskopickým pozorováním signálu GFP pod přirozeným promotorem z důvodu možného silencingu tohoto konstruktů. Je také možné, že dochází k alternativnímu sestřihu mRNA pro tento protein a tím odštěpení sekvence GFP. Taktéž je možné, že se uměle vytvořený konstrukt inkorporoval do genomu v místech, kde chybí potřebné úseky DNA pro nasednutí transkripčních faktorů, jenž by mohly aktivovat expresi v těchto pletivech.

5.3 Exprese proteinu EXO70H8

Buněčná lokalizace konstruktů EXO70H8 s N-terminálním GFP pod konstitutivním virovým promotorem 35s v listu *Nicotiana benthamiana* (transientní transformace) byla detekována pouze v cytoplazmě. Signál stejného konstruktů ve stabilně transformované rostlině *Arabidopsis* byl slabý a vyskytoval se také v cytoplazmě s patrnými pohybuujícími se negativními tělísky bez signálu. Vznikl předpoklad, že by se signál tohoto konstruktů mohl vyskytovat i na plazmatické membráně, a proto byly transformované rostliny pozorovány s obarvenou plazmatickou membránou pomocí FM-64. Pozorování konfokálním mikroskopem ukázalo, že EXO70H8 nekolokalizuje s barvivem FM-64, a tudíž není lokalizován na plazmatické membráně. Již dříve byl pozorován konstrukt

EXO70H4prom::GFP:EXO70H8 v trichomových buňkách *Arabidopsis* divokého typu, kde byl signál nalezen na plazmatické membráně a v buněčné stěně (Kubátová et al., 2019). V trichomu pozorovaná plazmatická kolokalizace nebyla v této práci v jiných pletivech pozorována. Možnou příčinou může být použití přirozeného promotoru jiného genu ze skupiny EXO70 a tím změněná exprese, která v této práci nebyla pozorovaná s promotorem 35s ani s přirozeným promotorem.

Pletivová lokalizace EXO70H8 v celé rostlině *Arabidopsis* byla dříve nalezena pomocí metody RT-PCR v endodermis kořene v zóně kořenového vlášení a zóně plně diferencovaných pletiv. Ve stejné publikaci byla lokalizace tohoto proteinu hledána i pomocí transgenní linie EXO70H8prom::GUS. Exprese glukuronidázy pod přirozeným promotorem EXO70H8 byla nalezena pouze v cévních svazcích těsně nad zónou kořenového vlášení (Li et al., 2010). V této diplomové práci byla lokalizace konstruktů 35s::GFP:EXO70H8 hledána v celé rostlině *Arabidopsis* pouze s vynecháním rozmnožovacích orgánů. Signál GFP byl nalezen v buňkách epidermis listů i hypokotylu a v buňkách primární kůry kořene v zóně plně diferencovaných pletiv. Dalo by se říct, že část předchozího pozorování je tedy potvrzena i výsledky této práce s rozdílem exprese pod konstitutivním promotorem 35s. Právě tento promotor mohl zavinit pozorování signálu v listech a hypokotylu, kde u publikovaných dat nebyl zaznamenán. Co se týká rozdílu pozorování v primární kůře v této práci vůči pozorování v cévních svazcích a endodermis plně diferencovaného kořene, může se jednat o nesprávné vyhodnocení výsledků pozorování během této práce. Ovšem umístění signálu v dané kořenové zóně se shodovalo.

Je nezbytné zmínit rozdíl síly signálu konstruktů 35s::GFP:EXO70H7 a 35s::GFP:EXO70H8. Signál GFP navázaného na protein EXO70H7 byl mnohonásobně intenzivnější než signál GFP u proteinu EXO70H8, a to jak při transienční transformaci listů *Nicotiana benthamiana*, tak i při stabilní transformaci rostlin *Arabidopsis*. Toto pozorování potvrzuje data získaná aplikací GENEVESTIGATOR®, která ukazovala nižší hladinu exprese genu *EXO70H8* oproti *EXO70H7*.

5.4 Podjednotky EXO70H7 a EXO70H8 ve vývoji kořene při stresových podmínkách

Transport materiálů v buňce a na plazmatickou membránu je nepostradatelný pro rostlinu při obraně proti stresu. Jedním z těchto transportních procesů je právě exocytóza a její zacílení pomocí komplexu exocyst a konkrétně jeho podjednotky EXO70. Právě zvýšená exprese proteinů EXO70 při abiotickém stresu, nadbytku těžkých kovů, teplotním stresu a stresu suchem byla již dříve pozorována (Chong et al., 2010; Lin et al., 2013; Mazel et al., 2004; Zhao et al., 2019). Proto v této práci byly mutantní rostliny *exo70H7* a *exo70H8* podrobeny testům pěstování za různých stresových podmínek.

Výskyt proteinů EXO70H7 a EXO70H8 byl dřívějším výzkumem objeven mj. v endodermis kořenového meristému (eFP Browser. *Root Compare At5g59730, At2g28650*, Li et al., 2010), což naznačuje jeho možné zapojení v tvorbě endodermis a případně Caspariho proužku. Obě tyto struktury jsou nezbytné pro ochranu kořene před nadbytečným příjmem toxických látek z okolí. Dalším ukazatelem, že protein EXO70H7 hraje roli v obraně kořene před příjmem toxických látek,

byla dříve publikovaná data, ukazující, že by se protein EXO70H7 mohl účastnit regulace SOS1 proteinu (plasma membránový Na⁺/H⁺-antiportér), který je nezbytný pro odpověď kořene na zasolení (Oh et al., 2010). Pro otestování možné funkce proteinů EXO70H7 a EXO70H8 v obraně kořene proti toxickým látkám z okolí byly rostliny mutantů *exo70H7* a *exo70H8* a dvojitého mutantu *exo70H7-exo70H8* pěstovány na nadbytku soli a železa. Byly hledány případné fenotypové projevy zvýšené toxicity těchto látek na mutantní rostliny oproti rostlinám divokého typu. Tento předpoklad se nepotvrdil, jelikož mutantní rostliny vypadaly totožně s rostlinami divokého typu a žádný výrazný trend se neprojevil. Důvodem může být plná zastupitelnost jiným z genů rodiny EXO70, který mohl nahradit jejich předpokládanou funkci v obraně rostlin. Pravděpodobné vysvětlení může být i to, že se pouze nepodařilo objevit fenotypový projev mutace proteinů EXO70H7 a EXO70H8 a je tedy žádoucí hledat dál. Možná je funkce proteinů EXO70H7 a EXO70H8 podmíněna konkrétními podmínkami nebo stimuly, které nebyly v této práci testovány a fenotyp se tak nemohl objevit. Taktéž je možné, že mutace *exo70H7* a *exo70H8* narušuje až generativní fázi života *Arabidopsis*, která v této práci nebyla pozorována.

5.4.1 Klíčení mutantních semen na médiích obsahujících soli

U mutantních roslin jsme na základě dostupných dat z literatury předpokládali narušení buněčné stěny u mutantních semen, jelikož proteiny EXO70 se účastní její tvorby. Proto jsme očekávali, že se trend klíčení mutantních semen mohl lišit od semen divokého typu. Kdyby tomu tak bylo, mutantní semena by mohla lépe klíčit na kontrolních médiích, protože by měla lepší příjem vody, a naopak by hůře klíčila na médiích obsahujících soli, jelikož kvůli poruše buněčné stěny by byl zvýšen příjem jejich iontů. Ani jeden z těchto předpokladů však nebyl potvrzen pro mutantní semena *exo70H7*, u mutantních semen *exo70H8* byl potvrzen pouze předpoklad horšího klíčení na soli.

Rozdíl vyklíčených semen *exo70H7* oproti divokému typu na kontrolním médiu ani na 160mM NaCl a 160mM KCl médiu nebyl signifikantní. Ovšem porovnání klíčení na sorbitolu semen divokého typu oproti mutantním semenům *exo70H7* bylo signifikantní na úrovni 0,01 a semena divokého typu zde tedy lépe klíčila. Dalo by se tedy říct, že v případě mutace *exo70H7* je pro klíčení problematický osmotický stres způsobený v tomto případě nadbytkem sorbitolu. Druhou možností pro tento signifikantní rozdíl by mohlo být, že semena divokého typu jsou schopna lépe přijímat cukry z prostředí (v tomto případě sorbitol) a díky tomu rychleji klíčit. Zajímavým poznatkem bylo, že semena mutantních rostlin *exo70H7* vykazovala vysokou variabilitu v klíčení jak mezi jednotlivými médii, tak i v opakováních pokusu a to i přes stejnou šarži semen. Dalo by se tedy spekulovat nad výraznou nestabilitou mutantních semen již při drobných fluktuacích podmínek, a tím tedy jejich vyšší náchylnost k narušení klíčení oproti semenům divokého typu.

Rozdíl klíčení mutantních semen *exo70H8* oproti divokému typu na 160mM NaCl médiu byl signifikantní, mutantní semena klíčila výrazně hůře. V případě kontrolního média, 160mM KCl média a média se sorbitolem rozdíl klíčení mutantních semen oproti divokému typu nebyl signifikantní. Mutantní semena *exo70H8* jsou tedy citlivá na iontový stres způsobený nadbytkem NaCl, tedy přesněji nejspíše na nadbytek iontů sodíku. Toto zjištění naznačuje, že se protein EXO70H8 nějakým způsobem účastní obrany proti nadbytečnému příjmu iontů sodíku.

6 ZÁVĚR

Jedním z cílů této práce byla analýza fenotypu mutace v genech *EXO70H7*, *EXO70H8* a rostliny s dvojitou mutací *exo70H7-exo70H8*. Avšak ani u jedné z těchto mutací se v této práci nepodařilo identifikovat žádný fenotypový projev a je tak zapotřebí pátrat dále.

Buněčná lokalizace *in vivo* byla studována pomocí konstruktů daného proteinu s N-terminálním GFP pod konstitutivním virovým promotorem 35s či pod přirozeným promotorem pro daný gen. Nejprve byla zjištěna lokalizace *EXO70H7* pod 35s promotorem tranzientní transformací listu *Nicotiana Benthamiana* v jádře s kontrastním jádřekem a v cytoplazmě. Toto pozorování bylo potvrzeno i ve stabilně transformovaných rostlinách *Arabidopsis* jak s promotorem 35s tak i s přirozeným promotorem. Byla zjištěna i lokalizace na buněčné přepážce dělící se buňky, nicméně toto pozorování je nezbytné potvrdit v budoucím výzkumu. Ovšem kdyby tomu opravdu tak bylo, tak by protein *EXO70H7* mohl mít funkci v buněčném cyklu a vzniku nových buněk. Lokalizace *EXO70H7* v jádře byla navíc potvrzena pomocí analýzy Western Blot pro konstrukt s 35s promotorem. Pomocí barviva FM-64 byla vyvrácena případná lokalizace tohoto proteinu na plazmatickou membránu. Co se týká pletivové lokalizace, tak *EXO70H7* se vyskytuje v kořenové špičce pod přirozeným promotorem. V případě konstitutivního promotoru byl tento protein nalezen nejen v kořenové špičce, ale i po celé délce kořene v rhizodermis a primární kůře a v epidermis listů i hypokotylu.

Podobně i u *EXO70H8* byla lokalizace nejprve zjištěna v listech tabáku pod 35s promotorem, kde byl signál nalezen pouze v cytoplazmě. Signál byl potvrzen i ve stabilně transformované rostlině *Arabidopsis* s 35s promotorem. Nacházel se taktéž v cytoplazmě a byly patrné pohybuující se negativní tělíška (blíže neidentifikované buněčné kompartmenty). Pomocí barviva FM-64 byla vyvrácena případná lokalizace tohoto proteinu na plazmatickou membránu. V rostlině se protein *EXO70H8* vyskytoval pod konstitutivním promotorem v buňkách epidermis listů i hypokotylu a v buňkách primární kůry kořene v zóně plně diferencovaných pletiv. Nezdařilo se najít stabilně transformovanou linii rostlin s konstruktem GFP pod přirozeným promotorem toho genu, v které by byl viditelný signál GFP. Námětem na budoucí práci je tedy snaha o získání takovéto rostliny, v které by bylo možné sledovat expresi genu *EXO70H8* pod přirozeným promotorem.

Pozorování mutantních rostlin *exo70H7* a *exo70H8* a dvojitého mutantu *exo70H7-exo70H8* na médiích obsahujících nadbytek solí a železa či naopak nedostatek železa neukázalo žádné odchylky od rostlin divokého typu. Důvodem může být případná redundantnost genů z rodiny *EXO70* či prosté neobjevení fenotypu, protože nebylo dosaženo podmínek, které by ho vyvolaly. Vzniká tedy námět pro budoucí výzkum. Pouze v klíčení rostlin byly nalezeny některé rozdíly. Mutantní semena *exo70H7* klíčila signifikantně hůře na médiích obsahujících sorbitol než semena divokého typu. Zajímavým poznáním bylo, že semena *exo70H7* vykazovala vysokou variabilitu v klíčení jak mezi jednotlivými médii, tak i v opakováních pokusu a to i přes stejnou šarži semen. Signifikantní rozdíl byl pozorován v klíčení semen *exo70H8* oproti divokému typu na 160mM NaCl médiu, kdy mutantní semena klíčila výrazně hůře.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Agrobacterium	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>
DNA	„deoxyribonucleic acid“, deoxyribonukleová kyselina
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctova
GFP	„green fluorescent protein“, zelený fluorescenční protein
LB	„lysogeny broth“
MPA	masopeptonový agar
MPB	masopeptonový bujón
mRNA	„messenger RNA“
MS	mix bazálních solí Murashige a Skoog
NaCl	chlorid sodný
KCl	chlorid draselný
PBS	fyzilogický roztok
PCR	„polymerase chain reaction“, polymerázová řetězová reakce
RNA	„ribonucleic acid“, ribonukleová kyselina
ROS	„reactive oxygen species“, reaktivní formy kyslíku
RT-PCR	„real time polymerase chain reaction“ polymerázová řetězová reakce v čase
SDS	dodecylsírán sodný
SNARE	„soluble NSF attachment protein receptor“
TBE	Tris/Borate/EDTA
TRAPP	„transport protein particle“
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Batley, N.H., James, N.C., Greenland, A.J., and Brownlee, C. (1999). Exocytosis and Endocytosis. *Plant Cell* *11*, 643–659.

Becana, M., Moran, J.F., and Iturbe-Ormaetxe, I. (1998). Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant Soil* *201*, 137–147.

Becker, M., and Asch, F. (2005). Iron toxicity in rice—conditions and management concepts. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* *168*, 558–573.

Bradshaw, A.D., and Hardwick, K. (1989). Evolution and stress-genotypic and phenotypic components. *Biol. J. Linn. Soc.* *37*, 137–155.

Brumbarova, T., Bauer, P., and Ivanov, R. (2015). Molecular mechanisms governing Arabidopsis iron uptake. *Trends Plant Sci.* *20*, 124–133.

Caspary R. (1865). Bemerkungen über die Schutzscheide und die Bildung des Stammes und der Wurzel. *Jahrb Wiss. Bot* 101–124.

Cho, S.K., Ryu, M.Y., Song, C., Kwak, J.M., and Kim, W.T. (2008). Arabidopsis PUB22 and PUB23 Are Homologous U-Box E3 Ubiquitin Ligases That Play Combinatory Roles in Response to Drought Stress. *Plant Cell* *20*, 1899–1914.

Chong, Y.T., Gidda, S.K., Sanford, C., Parkinson, J., Mullen, R.T., and Goring, D.R. (2010). Characterization of the Arabidopsis thaliana exocyst complex gene families by phylogenetic, expression profiling, and subcellular localization studies. *New Phytol.* *185*, 401–419.

Cole, R.A., Synek, L., Zarsky, V., and Fowler, J.E. (2005). SEC8, a Subunit of the Putative Arabidopsis Exocyst Complex, Facilitates Pollen Germination and Competitive Pollen Tube Growth. *Plant Physiol.* *138*, 2005–2018.

Cvrckova, F., Grunt, M., Bezdova, R., Hala, M., Kulich, I., Rawat, A., and Zarsky, V. (2012). Evolution of the Land Plant Exocyst Complexes. *Front. Plant Sci.* *3*.

Dolan et al. (1994). The contribution of chimeras to the understanding of root meristem organization. *Linn. Soc* 195–208.

Elias, M. (2003). The exocyst complex in plants. *Cell Biol. Int.* *27*, 199–201.

Eroglu, S., Meier, B., Wirén, N. von, and Peiter, E. (2016). The Vacuolar Manganese Transporter MTP8 Determines Tolerance to Iron Deficiency-Induced Chlorosis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *170*, 1030–1045.

- Esau, K. (1960). Anatomy of Seed Plants. *Soil Sci.* 90, 149.
- Esmon, C.A., Pedmale, U.V., and Liscum, E. (2004). Plant tropisms: providing the power of movement to a sessile organism. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 665–674.
- Fageria, N.K., Santos, A.B., Filho, M.P.B., and Guimarães, C.M. (2008). Iron Toxicity in Lowland Rice. *J. Plant Nutr.* 31, 1676–1697.
- Galvan-Ampudia, C.S., Julkowska, M.M., Darwish, E., Gandullo, J., Korver, R.A., Brunoud, G., Haring, M.A., Munnik, T., Vernoux, T., and Testerink, C. (2013). Halotropism Is a Response of Plant Roots to Avoid a Saline Environment. *Curr. Biol.* 23, 2044–2050.
- Gruber, B.D., Giehl, R.F.H., Friedel, S., and Wirén, N. von (2013). Plasticity of the Arabidopsis Root System under Nutrient Deficiencies. *Plant Physiol.* 163, 161–179.
- Hála, M., Cole, R., Synek, L., Drdová, E., Pečenková, T., Nordheim, A., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Hochholdinger, F., Fowler, J.E., et al. (2008). An Exocyst Complex Functions in Plant Cell Growth in Arabidopsis and Tobacco. *Plant Cell* 20, 1330–1345.
- He, B., Xi, F., Zhang, J., TerBush, D., Zhang, X., and Guo, W. (2007). Exo70p mediates the secretion of specific exocytic vesicles at early stages of the cell cycle for polarized cell growth. *J. Cell Biol.* 176, 771–777.
- Heil, M., and Baldwin, I.T. (2002). Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends Plant Sci.* 7, 61–67.
- Hong, D., Jeon, B.W., Kim, S.Y., Hwang, J.-U., and Lee, Y. (2016). The ROP2-RIC7 pathway negatively regulates light-induced stomatal opening by inhibiting exocyst subunit Exo70B1 in Arabidopsis. *New Phytol.* 209, 624–635.
- Julkowska, M.M., Klei, K., Fokkens, L., Haring, M.A., Schranz, M.E., and Testerink, C. (2016). Natural variation in rosette size under salt stress conditions corresponds to developmental differences between Arabidopsis accessions and allelic variation in the LRR-KISS gene. *J. Exp. Bot.* 67, 2127–2138.
- Julkowska, M.M., Koevoets, I.T., Mol, S., Hoefsloot, H., Feron, R., Tester, M.A., Keurentjes, J.J.B., Korte, A., Haring, M.A., de Boer, G.-J., et al. (2017). Genetic Components of Root Architecture Remodeling in Response to Salt Stress[OPEN]. *Plant Cell* 29, 3198–3213.
- Karahara, I., and Shibaoka, H. (1992). Isolation of Casparian Strips from Pea Roots. *Plant Cell Physiol.* 33, 555–561.
- Kee, Y., Yoo, J.-S., Hazuka, C.D., Peterson, K.E., Hsu, S.-C., and Scheller, R.H. (1997). Subunit structure of the mammalian exocyst complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 14438–14443.

- Koumandou, V.L., Dacks, J.B., Coulson, R.M., and Field, M.C. (2007). Control systems for membrane fusion in the ancestral eukaryote; evolution of tethering complexes and SM proteins. *BMC Evol. Biol.* 7, 29.
- Kubátová, Z., Pejchar, P., Potocký, M., Sekereš, J., Žárský, V., and Kulich, I. (2019). Arabidopsis Trichome Contains Two Plasma Membrane Domains with Different Lipid Compositions Which Attract Distinct EXO70 Subunits. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Kulich, I., Pečenková, T., Sekereš, J., Smetana, O., Fendrych, M., Foissner, I., Höftberger, M., and Žárský, V. (2013). Arabidopsis Exocyst Subcomplex Containing Subunit EXO70B1 Is Involved in Autophagy-Related Transport to the Vacuole. *Traffic* 14, 1155–1165.
- Kulich, I., Vojtková, Z., Glanc, M., Ortmannová, J., Rasmann, S., and Žárský, V. (2015). Cell Wall Maturation of Arabidopsis Trichomes Is Dependent on Exocyst Subunit EXO70H4 and Involves Callose Deposition. *Plant Physiol.* 168, 120–131.
- Kulich, I., Vojtková, Z., Sabol, P., Ortmannová, J., Neděla, V., Tihlaříková, E., and Žárský, V. (2018). Exocyst Subunit EXO70H4 Has a Specific Role in Callose Synthase Secretion and Silica Accumulation. *Plant Physiol.* 176, 2040–2051.
- Li, G., Xu, W., Kronzucker, H.J., and Shi, W. (2015a). Ethylene is critical to the maintenance of primary root growth and Fe homeostasis under Fe stress in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 66, 2041–2054.
- Li, G., Song, H., Li, B., Kronzucker, H.J., and Shi, W. (2015b). Auxin Resistant1 and PIN-FORMED2 Protect Lateral Root Formation in Arabidopsis under Iron Stress. *Plant Physiol.* 169, 2608–2623.
- Li, G., Kronzucker, H.J., and Shi, W. (2016). The Response of the Root Apex in Plant Adaptation to Iron Heterogeneity in Soil. *Front. Plant Sci.* 7.
- Li, S., van Os, G.M.A., Ren, S., Yu, D., Ketelaar, T., Emons, A.M.C., and Liu, C.-M. (2010). Expression and Functional Analyses of EXO70 Genes in Arabidopsis Implicate Their Roles in Regulating Cell Type-Specific Exocytosis1[W][OA]. *Plant Physiol.* 154, 1819–1830.
- Li, X., Ma, H., Jia, P., Wang, J., Jia, L., Zhang, T., Yang, Y., Chen, H., and Wei, X. (2012). Responses of seedling growth and antioxidant activity to excess iron and copper in *Triticum aestivum* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 47–53.
- Lin, C.-Y., Trinh, N.N., Fu, S.-F., Hsiung, Y.-C., Chia, L.-C., Lin, C.-W., and Huang, H.-J. (2013). Comparison of early transcriptome responses to copper and cadmium in rice roots. *Plant Mol. Biol.* 81, 507–522.

- Liu, W., Li, R.-J., Han, T.-T., Cai, W., Fu, Z.-W., and Lu, Y.-T. (2015). Salt Stress Reduces Root Meristem Size by Nitric Oxide-Mediated Modulation of Auxin Accumulation and Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *168*, 343–356.
- Mazel, A., Leshem, Y., Tiwari, B.S., and Levine, A. (2004). Induction of Salt and Osmotic Stress Tolerance by Overexpression of an Intracellular Vesicle Trafficking Protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol.* *134*, 118–128.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* *25*, 239–250.
- Munns, R., and Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* *59*, 651–681.
- Naseer, S., Lee, Y., Lapierre, C., Franke, R., Nawrath, C., and Geldner, N. (2012). Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 10101–10106.
- Nawrath, C., Schreiber, L., Franke, R.B., Geldner, N., Reina-Pinto, J.J., and Kunst, L. (2013). Apoplastic Diffusion Barriers in Arabidopsis. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* *11*.
- Novick, P., Field, C., and Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* *21*, 205–215.
- Oh, D.-H., Lee, S.Y., Bressan, R.A., Yun, D.-J., and Bohnert, H.J. (2010). Intracellular consequences of SOS1 deficiency during salt stress. *J. Exp. Bot.* *61*, 1205–1213.
- Pacifici, E., Polverari, L., and Sabatini, S. (2015). Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. *J. Exp. Bot.* *66*, 1113–1121.
- Ratering, S., and Schnell, S. (2000). Localization of iron-reducing activity in paddy soil by profile studies. *Biogeochemistry* *48*, 341–365.
- Reyt, G., Boudouf, S., Boucherez, J., Gaymard, F., and Briat, J.-F. (2015). Iron- and Ferritin-Dependent Reactive Oxygen Species Distribution: Impact on Arabidopsis Root System Architecture. *Mol. Plant* *8*, 439–453.
- Sack, F.D. (1991). Plant Gravity Sensing. In *International Review of Cytology*, K.W. Jeon, and M. Friedlander, eds. (Academic Press), pp. 193–252.
- Schmidt, W., Tittel, J., and Schikora, A. (2000). Role of Hormones in the Induction of Iron Deficiency Responses in Arabidopsis Roots. *Plant Physiol.* *122*, 1109–1118.

- Seo, D.H., Ahn, M.Y., Park, K.Y., Kim, E.Y., and Kim, W.T. (2016). The N-Terminal UND Motif of the Arabidopsis U-Box E3 Ligase PUB18 Is Critical for the Negative Regulation of ABA-Mediated Stomatal Movement and Determines Its Ubiquitination Specificity for Exocyst Subunit Exo70B1. *Plant Cell* 28, 2952–2973.
- Sun, F., Zhang, W., Hu, H., Li, B., Wang, Y., Zhao, Y., Li, K., Liu, M., and Li, X. (2008). Salt Modulates Gravity Signaling Pathway to Regulate Growth Direction of Primary Roots in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 146, 178–188.
- Synek, L., Schlager, N., Eliáš, M., Quentin, M., Hauser, M.-T., and 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 J. Cell Mol. Biol.* 48, 54–72.
- Takatsuka, H., and Umeda, M. (2014). Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J. Exp. Bot.* 65, 2633–2643.
- Trinh, N.N., Le, H.T., and Nguyen, T.P. (2019). Overexpression of the dominant negative nbexo70d1 mutation confers tolerance to salt stress in transgenic tobacco. *Biol. Plant.*
- Verbelen, J.-P., De Cnodder, T., Le, J., Vissenberg, K., and Baluška, F. (2006). The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities. *Plant Signal. Behav.* 1, 296–304.
- Wang, Y., Zhang, W., Li, K., Sun, F., Han, C., Wang, Y., and Li, X. (2008). Salt-induced plasticity of root hair development is caused by ion disequilibrium in Arabidopsis thaliana. *J. Plant Res.* 121, 87–96.
- Wang, Y., Li, K., and Li, X. (2009). Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in Arabidopsis thaliana. *J. Plant Physiol.* 166, 1637–1645.
- Weiner, J. (2004). Allocation, plasticity and allometry in plants. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 6, 207–215.
- Wen, T.-J., Hochholdinger, F., Sauer, M., Bruce, W., and Schnable, P.S. (2005). The roothairless1 Gene of Maize Encodes a Homolog of sec3, Which Is Involved in Polar Exocytosis. *Plant Physiol.* 138, 1637–1643.
- Wilson, C.A., and Peterson, C.A. (1983). Chemical Composition of the Epidermal, Hypodermal, Endodermal and Intervening Cortical Cell Walls of Various Plant Roots. *Ann. Bot.* 51, 759–769.
- Wu, B., and Guo, W. (2015). The Exocyst at a Glance. *J. Cell Sci.* 128, 2957–2964.

Wu, H., Turner, C., Gardner, J., Temple, B., and Brennwald, P. (2009). The Exo70 Subunit of the Exocyst Is an Effector for Both Cdc42 and Rho3 Function in Polarized Exocytosis. *Mol. Biol. Cell* 21, 430–442.

Žárský, V., Cvrčková, F., Potocký, M., and Hála, M. (2009). Exocytosis and cell polarity in plants – exocyst and recycling domains. *New Phytol.* 183, 255–272.

Zhao, J., Zhang, X., Wan, W., Zhang, H., Liu, J., Li, M., Wang, H., Xiao, J., and Wang, X. (2019). Identification and Characterization of the EXO70 Gene Family in Polyploid Wheat and Related Species. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 60.

Zolla, G., Heimer, Y.M., and Barak, S. (2010). Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *J. Exp. Bot.* 61, 211–224.

Zou, N., Li, B., Dong, G., Kronzucker, H.J., and Shi, W. (2012). Ammonium-induced loss of root gravitropism is related to auxin distribution and TRH1 function, and is uncoupled from the inhibition of root elongation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 63, 3777–3788.

Internetové zdroje:

The Arabidopsis Information Resource. *Locus: AT5G59730* [online]. naposled modifikováno 30.11.2015 [citováno 29.7.2020]. Dostupné z <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=134665&type=locus>.

BioGRID3.5.187. *Arabidopsis thaliana (Columbia) EXO70H7* [online]. [citováno 29.7.2020]. Dostupné z <https://thebiogrid.org/21338/summary/arabidopsis-thaliana/exo70h7.html>.

The Arabidopsis Information Resource. *Locus: AT2G28650* [online]. naposled modifikováno 11.2.2013 [citováno 29.7.2020]. Dostupné z <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=35438&type=locus>.

eFP Browser. *Root Compare At5g59730, At2g28650* [online]. [citováno 29.7.2020]. Dostupné z http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Root&modeInput=Compare&primaryGene=At5g59730&secondaryGene=At2g28650&override=None&threshold=1.18&modeMask_low=None&modeMask_stddev=None.