

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Je vývoj průduchů na listech huseníčku výsledkem komunikace
epidermis s mezofylem nebo s kutikulou?**

Bakalářská práce

Ondřej Hroníček

Školitelka: Ing. Marie Hronková, Ph.D

České Budějovice 2019

Hroníček, O., 2019: Je vývoj průduchů na listech huseníčku výsledkem komunikace epidermis s mezofylem nebo s kutikulou? [Is stomatal development in the leaves of *Arabidopsis thaliana* the result of epidermis communication with mesophyll or cuticle? Bc. Thesis, in Czech.] – 44 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Environmental growth conditions like light intensity can play very important role in the leaf development. It is well known that stomatal density and/or stomatal index can be affected by the light intensity and quality. In this thesis relationship between epicuticular wax composition and stomatal development was investigated in *Arabidopsis thaliana* plants. Mutants in genes controlling cuticle and stomata development were used.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; cuticle; EPF factors; KCS genes; stomatal development

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsou vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 16. 04. 2019

Podpis:

Poděkování

Zde bych rád poděkoval doktorce Marii Hronkové za skvělou spolupráci a spoustu nových zkušeností a poznatků, které jsem stihnul načerpat. Děkuji spolupracovníkům z ÚMBR a Katedry experimentální biologie rostlin PřF, především Jitce Neuwirthové za analýzy a laskavé poskytnutí výsledků analýz epikutikulárních vosků, dále Ivě Mozgové za cenné rady a zkušenosti při výběru linií pro genotypování a metod testování, Ladislavu Markovi za provedení isotopové analýzy uhlíku, jejíž výsledky zde byly použity a Daně Wiesnerové a Marii Šimkové za laskavou pomoc a podporu v laboratoři.

Obsah

1	Úvod	1
2	Teoretická část	3
2.1	Průduchy.....	3
2.1.1	Obecné informace	3
2.1.2	Řízení otevírání průduchů.....	4
2.1.3	Evoluce vývoje průduchů	5
2.1.4	Molekulární základ vývoje průduchů	5
2.1.5	Vliv vnějších podmínek na vývoj průduchů	7
2.2	Vnitřní koncentrace CO ₂ v listu	9
2.3	Kutikula.....	10
2.3.1	Obecné informace o kutikule	10
2.3.2	Vztah kutikuly a průduchů.....	11
2.4	Cíle práce.....	11
3	Materiál a metody.....	12
3.1	Podmínky pěstování a rostlinný materiál	12
3.2	Stanovení počtu průduchů a průduchového indexu	12
3.3	Měření relativní míry exprese metodou qPCR.....	13
3.3.1	Izolace RNA	13
3.3.2	DNázování	15
3.3.3	Reverzní transkripce	15
3.3.4	qPCR.....	16
3.4	Analýza vosků	18
3.5	Detekce množství ¹³ C v rostlinném materiálu.....	18
3.6	Výběr linií s homozygotní mutací v genu <i>HIC</i>	18
3.6.1	Použité databáze	18
3.6.2	Genotypizace mutantů	19

4	Výsledky.....	22
4.1	Vliv světla na vývoj průduchů a množství epikutikulárních vosků	22
4.1.1	Počet průduchů a průduchový index závisí na mutaci i světle	22
4.1.2	Počet průduchů u <i>epfl,2</i> mutantů	24
4.1.3	Analýza exprese genů	25
4.1.4	Analýza vosků	27
4.1.5	Výsledky izotopové analýzy	28
4.2	Výběr linií s homozygotní mutací v genu <i>HIC</i>	29
4.2.1	Linie SM	29
4.2.2	Linie SAIL	30
4.2.3	Linie SALK	31
4.3	Analýza <i>hic</i> mutantů za atmosférických podmínek	31
4.3.1	Počet průduchů ve srovnání s wt rostlinou	31
4.3.2	Analýza vosků	32
4.3.3	Izotopová analýza	33
5	Diskuze	35
5.1	Vliv světla na vývoj průduchů a kutikuly	35
5.2	Vliv počtu průduchů na izotopovou diskriminaci uhlíku ($\delta^{13}\text{C}$).....	37
5.3	Charakteristika fenotypu <i>hic</i> mutantů	38
6	Závěr.....	39
7	Zdroje	39
8	Seznam obrázků.....	44

1 Úvod

Průduchy jsou drobné mikroskopické póry v pokožce listů, ale i ostatních nadzemních orgánů rostliny tvořené dvěma svěřacími buňkami, které pór obklopují, zajišťují výměnu plynů s okolím. V závislosti na vnějších podmínkách prostředí jsou na světle více či méně otevřené a umožňují tak příjem CO₂ pro fotosyntézu. Skrze otevřený průduch se do okolního prostředí transpirací uvolňuje vodní pára, což je pro rostlinu výhodné z hlediska potřeby chlazení listu a udržování jeho optimální teploty. Při odpařování vody z povrchu listu se totiž spotřebovává energie ve formě skupenského tepla, může to však znamenat neúměrnou ztrátu vody na úkor vyššího příjmu CO₂. Díky vybavení svěřacími buňkami, které regulují propustnost průduchu, může rostlina regulovat příjem CO₂ a výdej vodní páry podle aktuálních potřeb rostliny a podle aktuální situace v okolí. Z dlouhodobého hlediska mohou být transpirace a příjem CO₂ řízeny i změnou počtu a velikosti průduchů. Obecně se předpokládá, že mladé (vyvíjející se) listy dostávají informaci o potřebě vytvořit příslušný počet průduchů v epidermis vyvíjejících se listů na základě informace například o intenzitě světla a množství CO₂ ze starších (dospělých) listů (Lake et al., 2001). Hustota průduchů (počet průduchů na ploše listu) je taktéž druhově specifická vlastnost, například suchomilné rostliny jsou obecně na průduchy chudší.

V bezprostředním kontaktu s okolím je i kutikula. Tato vosková vrstva pokrývá list, účinně brání výparu vody mimo průduchy, nepropouští nežádoucí látky dovnitř listu k mezofylu a představuje ochrannou vrstvu vůči UV záření a ochranu rostliny před nepříznivými abiotickými a biotickými faktory. Tvořena je komplexem látek složených z nerozpustného polymeru kutinu a vícero chemicky různorodých skupin rozpustných lipidů, souhrnně označených jako vosky. Lze ji členit na dvě vrstvy, vnitřní intrakutikulární s převahou kutinu a vnější epikutikulární tvořenou převážně vosky. Společně s průduchy a cévním systémem vznikly jako adaptace rostlin v průběhu jejich přechodu na souš před více než 400 miliony let.

Spojením mezi vývojem průduchů a vývojem kutikuly se zabývalo několik málo prací britských autorů v letech 2002-2003. Gen *HIC* (KCS13), jeden člen rodiny KCS, která u *Arabidopsis* čítá 21 členů, kóduje enzym 3-ketoacyl Co-A syntázu pro tvorbu kutikuly a zároveň patrně reguluje počet průduchů na listu v závislosti na koncentraci CO₂ (Gray et al., 2002). *hic* mutanti neomezují počet průduchů při vysoké koncentraci CO₂ jako wild-type rostliny. Nabízí se tak otázka provázání mechanismů tvorby kutikuly, zakládání průduchů v

epidermis, komunikace mezi vrstvami listu: mezofylem, epidermis a kutikulou. Souvisí spolu zakládání průduchů a výsledná podoba epidermis a tvorba a výsledná tloušťka a struktura kutikuly a jak? Předávají si pletiva listu informace o vnějším i vnitřním prostředí, což by napomáhalo efektivnímu přizpůsobování rostliny k podmínkám prostředí, v nichž rostlina roste?

2 Teoretická část

2.1 Průduchy

2.1.1 Obecné informace

Rostlinné průduchy na listu i dalších nadzemních orgánech rostlin tvoří specializované svěrací buňky, u dvouděložných rostlin většinou eliptického (ledvinovitého) tvaru velké řádově setiny milimetru, které vznikly jako evoluční uzpůsobení při přechodu rostlin na souš. Bývají doprovázeny podpurnými buňkami a dohromady tvoří průduchový komplex.

Začalo být nezbytně nutné regulovat množství unikající vody, pro rostlinu není přijatelné, aby se voda vypařovala volně celým povrchem listu, čemuž ostatně i brání kutikula. Zároveň se tak povrch listu uzavřel před přístupem vzduchu, který do rostliny také proudí z většiny přes průduchy, kutikulární transpirace je podstatně nižší než stomatální (Kerstiens et al., 1996).

Pokud by tento pór zůstával neměnný, rostlina by nemohla pružně reagovat na aktuální výkyvy počasí, vodní páry by unikaly buď málo, nebo příliš. Za tmy, kdy neprobíhá fotosyntéza, rostlina nepotřebuje žádný CO_2 jako substrát pro fotosyntézu, proto je zbytečné, aby byly průduchy otevřeny, uzavřením průduchů se zamezí i výparu vody. Naopak za světla se průduchy otevřou, aby rostlina mohla fotosyntetizovat na maximum, navíc výpar vody chladí listy. Na druhou stranu za přílišného vedra a sucha, kdy již rostlina nemůže ztrácet tolik vody, zvláště když jí není v půdě dostatek, přivře průduchy. Tím se také sníží rychlost fotosyntézy, která je stejně pro přehřívání listů méně efektivní. Udává se, že u C_3 rostlin je na každou jednu molekulu CO_2 zafixovanou do cukru ztraceno kolem 500 molekul H_2O , u C_4 rostlin je to kolem 250 a u CAM rostlin je to ve výsledku kolem 50 molekul vody. Tento poměr vychází z transpiračního indexu (Taiz and Zeiger, c2006 pp 66–69). Propustnost (otevřenost) průduchu reguluje turgor svěracích buněk průduchu, díky němuž se mění jejich tvar a tím i velikost štěrbin mezi nimi ihned po obdržení signálu. Reakce je velmi rychlá, trvá pouze řádově minuty (Kriedemann et al., 1972).

U mechů jsou průduchy přítomné jen na tobolce, tzn. na sporofytu, u vyšších rostlin chybí některým hlevíkům, všem játrovkám a primitivním mechům na bázi fylogenetického stromu (Edwards et al., 2000). Důležitou součástí svěracích buněk jsou celulózové mikrofibrily, které najdeme v každé rostlinné buňce, kde mají za úkol udržovat tvar. Vnitřní

část buněčné stěny svěřacích buněk, která sousedí s pórem je oproti buněčné stěně v ostatních částech buněk až pětkrát silnější, vytváří pevnou lištu (Taiz and Zeiger, c2006). Zajímavý je zvýšený počet chloroplastů ve svěřací buňce ve srovnání s epidermálními buňkami, které chloroplasty nemají. Výhodné to může být z mnoha důvodů, svěřací buňky reagují mimo jiné i na světlo, tudíž fotosyntetický aparát může sloužit jako zdroj signálu, reakce jsou také zdrojem osmoticky aktivních látek (Zeiger et al., 2002).

2.1.2 Řízení otevírání průduchů

Vnější podmínky, jako například intenzita a kvalita světla, teplota a obsah vody v listu, vnitrobuněčná koncentrace CO₂, jsou vnímány svěřacími buňkami, signály jsou integrovány a výsledkem jejich integrace je odpovídající otevření štěrbin průduchu. Mechanika otevírání průduchů je založena především na transportu draselných iontů přes membránu a změnách jejich koncentrace ve svěřacích buňkách průduchů. Protonová pumpa vyčerpá H⁺ z prostoru svěřacích buněk, čímž se vytvoří negativní náboj. Následné reakce na membráně aktivují nábojem řízené draselné kanály, které začnou propouštět draselné kationty dovnitř svěřací buňky. Současně svěřací buňka začne přijímat chloridové ionty či začne produkovat malát. Osmotický potenciál uvnitř buňky klesá, snižuje se vodní potenciál, buňka nasává vodu, začne zvětšovat objem. Slabší buněčná stěna na vnější straně svěřacích buněk se vyklene, což zvětšuje štěrbinu póru a průduch se otevírá (Ward and Schroeder, 1994).

Jedním ze signálů, který otevírá průduchy, je světlo. Reakce průduchů je tak výsledkem působení světla různých vlnových délek. Modré světlo aktivuje protonové pumpy, což umožní vstup draselným iontům (Shimazaki et al., 2007). Na modré světlo reagují i vyzolované svěřací buňky, což ukazuje, že všechny signály a mechanismy pro reakce na modré světlo jsou uvnitř svěřací buňky (Zeiger and Hepler, 1977). Jako senzor pro modré světlo působí zeaxanthin, to bylo dokázáno pomocí mutanta, který toto barvivo neprodukoval, tudíž jeho průduchy nereagovaly na modré světlo (Frechijia et al., 1999). Červená složka světelného spektra posiluje fotosyntézu v mezofylu a ve svěřacích buňkách a snižuje koncentraci CO₂ v cytoplasmě, což může indukovat změnu stavu průduchu (Shimazaki et al., 2007). Aby došlo k reakci na červené světlo, jeho intenzita musí být vyšší než u světla modrého, a i doba trvání ozáření musí být řádově delší. Paprsek červeného světla přesně cílený na svěřací buňku nezpůsobí reakci, signál tedy musí přicházet z okolí. Jednou z teorií je, že rychlejší fotosyntéza v okolním mezofylu působí snížení koncentrace CO₂ ve svěřací buňce (Roelfsema et al., 2002). Každopádně ale vlivem červeného světla dochází v průduchu k akumulaci draselných iontů a cukrů (Hsiao et al., 1973; Talbott and Zeiger, 1998).

Dalším hráčem v regulaci otevření průduchů je kyselina abscisová. Její zvýšená koncentrace zavírá průduchy, což koresponduje s jejími inhibičními funkcemi. Svěrací buňky pro ni mají extra i intracelulární receptory. Navázání aktivuje kanály pro vápenaté ionty v cytoplasmatické membráně, které zastaví přístup draselných iontů z okolí, zato stimulují přechod draselných, vápenatých, ale i chloridových iontů z vakuol. Dále vápenaté ionty způsobí otevření výtokových kanálů pro chloridové ionty, které začnou opouštět buňku, což způsobí depolarizaci membrány. Kaskáda pokračuje aktivací draselných kanálů, díky kterým K⁺ začnou opouštět svěrací buňku. Pro zkrácení jsem neuváděl některé mediátory, přes které mohou ionty působit. ABA se jako stresový hormon syntetizuje v rostlině v reakci na snížený obsah vody v půdě a zavírá průduchy dříve, než dojde k vadnutí rostlin v důsledku snížení vodního potenciálu rostliny (Desikan, 2003).

2.1.3 Evoluce vývoje průduchů

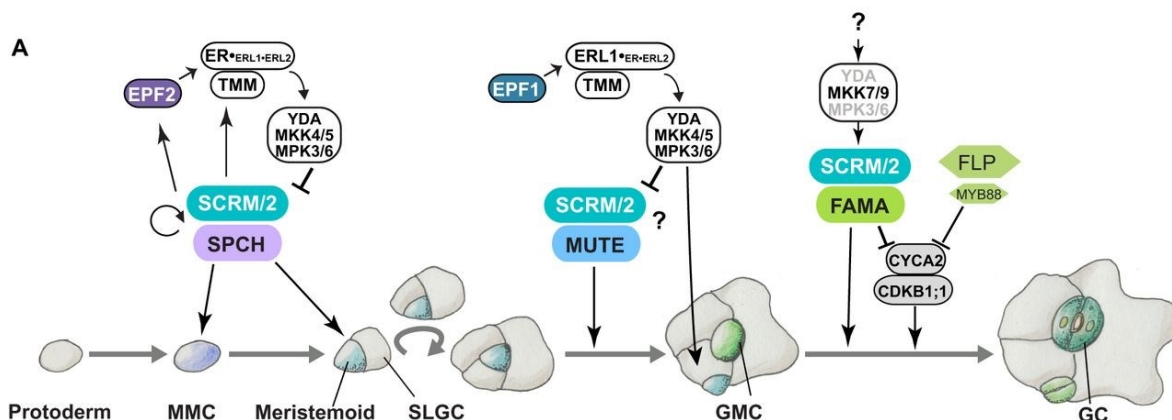
Podle fosilních nálezů průduchy vznikly pouze jednou v době zhruba před 450 miliony let s tím, jak rostliny začaly přecházet na souš. Vzhledem ke stavu atmosféry, kdy bylo ve vzduchu více CO₂ než dnes, bylo zapotřebí výrazně méně paropropustných pórů. Průduchový index postupně stoupal s ubýváním oxidu uhličitého v atmosféře. První útvary pro výměnu vzduchu na listu vznikly patrně před 450 miliony let na původních *Charophytes*, předchůdcích dnešních bezcévnatých rostlin, mechů a hlevíků. Pravá stomata řízená bHLH a EPF faktory se vyvinula před 430 miliony let u kapradin. Nasvědčuje tomu fakt, že průduchy moderních vraneček také reagují na ABA (Ruszala et al., 2011). (Moderní) játrovky nemají průduchy, ale pouhé pokožkové póry, které se od průduchů liší stavbou i morfologií (Vatén and Bergmann, 2012). Dnešní mechy mají průduchy výhradně na sporangiích sporofytu a o jejich funkčnosti se vedou spory, u mechů a hlevíků jde často o pseudostomata nebo dochází k druhotné ztrátě průduchů (Merced and Renzaglia, 2017; Vatén and Bergmann, 2012).

2.1.4 Molekulární základ vývoje průduchů

Svěrací buňky jsou specializované epidermální buňky. Z protodermu se vyvine nejdříve meristemoidní mateřská buňka (meristemoid mother cell, MMC). Tato buňka je schopná se asymetricky rozdělit na meristemoid (M), který si ponechává vlastnosti kmenové buňky, a na stomatal-lineage ground cell (SLGC). Meristemoid se dále asymetricky dělí a dává vzniknout dalším SLGC. Po několika cyklech ztratí vlastnosti kmenové buňky a specializuje se v mateřskou svěrací buňku (GMC), která se symetricky rozdělí na dvě svěrací buňky (GC), obklopující pór.

Přechod do dalšího stádia vývoje buňky řídí signály z okolních buněk, které tak mohou ovlivňovat, jestli se z dané mateřské buňky stane funkční průduch. Ústřední roli zde hrají transkripční faktory *SPEECHLESS* (*SPCH*), *MUTE* a *FAMA*. Jedná se o transkripční faktory typu bHLH (basic-helix-loop-helix). Tyto proteiny dimerizují se *SCREAM* (*SCRM*, dříve označované jako *ICE1*) a se *SCRM2*, což jsou také bHLH transkripční faktory. Vývoj průduchu tak můžeme rozdělit do tří fází. Celý tento proces je znázorněn na Obr. 1, včetně významných faktorů, které se ho účastní.

První fáze iniciace probíhá za přítomnosti faktoru *SPCH* a reguluje dělení MMC. *SPCH* dimer indukuje tvorbu faktorů *EPF2* a *TMM*, *EPF2* soutěží se *STOMAGENEM* (*EPFL9*), pozitivním epidermálním faktorem o pozici na receptorovém komplexu tvořeném *ERECTA* a *TMM*, přes MAP kinázovou kaskádu reguluje funkci dimeru *SPCH/SCRM*, vzniká tak zpětnovazebná regulační smyčka. Druhou fází, přechod meristemoidu v *GMC*, reguluje dimer s faktorem *MUTE*. Jeho syntézu řídí epidermální faktor *EPF1*, jež o pozici na receptorovém komplexu soutěží opět se *STOMAGENEM*. A nakonec třetí fáze, diferenciace konečné svěrací buňky z mateřské svěrací buňky (*GMC*) je řízena bHLH transkripčním faktorem *FAMA* (Han and Torii, 2016).



Obr. 1 – Schéma vývoje průduchů od protodermálních ke svěracím buňkám. Převzato z Han and Torii, 2016.

Epidermální faktory *EPF1* i *2*, které zasahují do regulace diferenciace průduchů, fungují na principu aktivace MAP kinázové dráhy, která ve finále brání syntéze bHLH transkripčních faktorů *SPCH*, *MUTE* a *FAMA*, jež vedou k diferenciaci průduchu. Další zajímavou regulaci představuje přímá vazba *SPCH* na promotor genu *MUTE*. Tyto dráhy jsou dále řízeny mnoha signály z více stran, některým se v průběhu textu ještě budu věnovat (Han and Torii, 2016).

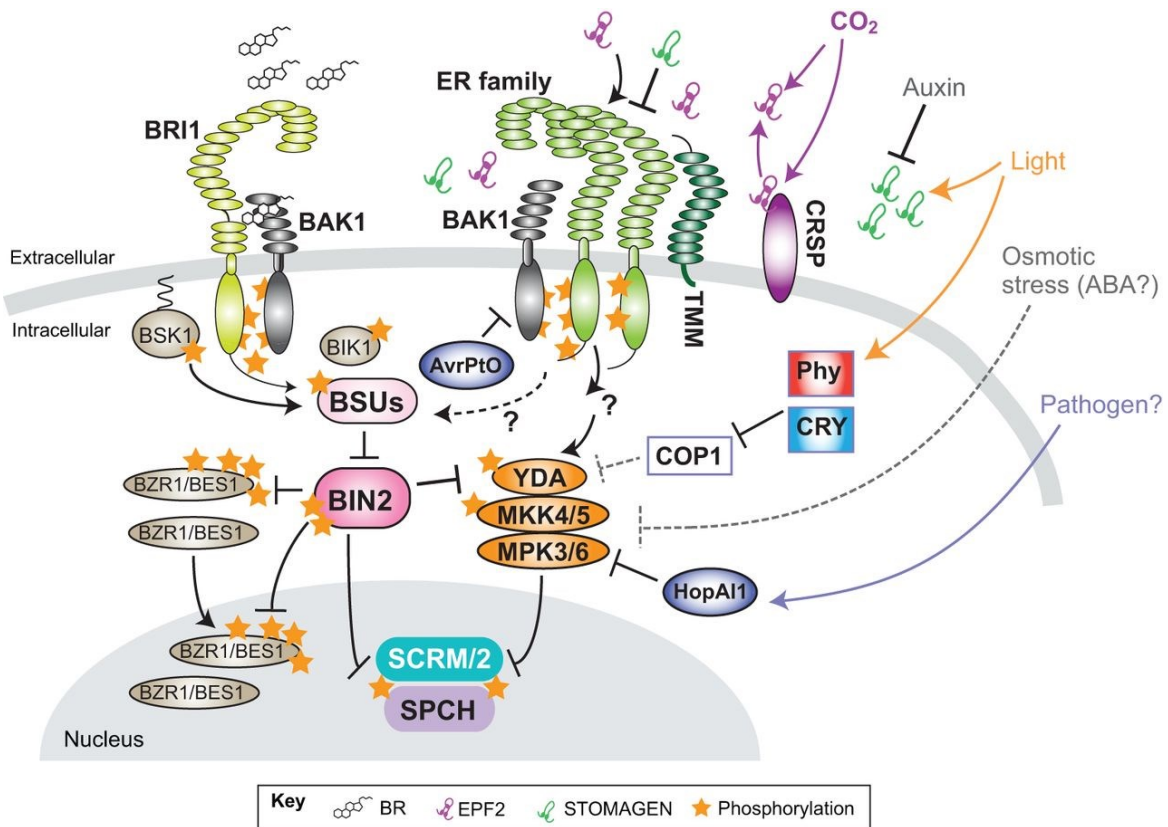
U *Arabidopsis* byly detekovány signální epidermální faktory STOMAGEN (EPFL9) – pozitivní a EPF1 a 2, které jsou negativní, a řada dalších členů komplexní rodiny epidermálních faktorů (např. EPFL6), které regulují tvorbu průduchů. Například faktor EPF2 je syntetizován vyvíjejícími se buňkami průduchů, konkrétně v MMC (Hara et al., 2009), zato STOMAGEN je patrně syntetizován v mezofylu (Sugano et al, 2010). Jejich receptorem je komplex proteinů na membráně tvořených mimo jiné TMM (TOO MANY MOUTH protein, receptor-like serine/threonine-protein bez kinázové aktivity) a ERECTA (LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase), případně dalšími ERECTA-like proteiny (Shpak, 2013).

2.1.5 Vliv vnějších podmínek na vývoj průduchů

Také vznik průduchů, jejich počet a velikost je řízena vnějšími podmínkami. Ve vztahu k průduchům rostliny nejvíce reagují na koncentraci CO₂ a úroveň světla, dále reagují na vlhkost, teplotu a brassinosteroidy. Tyto vnější i vnitřní faktory aktivují či inhibují různé molekulární signální dráhy, které jsou popsány výše (Pillitteri and Dong, 2013). Na Obr. 2 je schéma, které znázorňuje různé faktory působící na vývoj průduchů a také známé cesty, přes které působí.

2.1.5.1 Vliv světla na vývoj průduchů

Rostliny pěstované na světle tvoří více průduchů na plochu, mají totiž vyšší hustotu průduchů (SD), a také mají vyšší průduchový index (SI, podíl průduchů na celkovém počtu epidermálních buněk) (Schoch, et al., 1980). Rozdíl už ale můžeme vidět při ošetření krátkovlnným červeným světlem, které SI zvyšuje, zato dlouhovlnné červené světlo se chová naopak. V regulaci vývoje průduchů se tedy patrně uplatňuje fytochrom B (Casson et al., 2009). Působení modrého světla je zprostředkováno přes jeho receptor kryptochrom 1 a 2, efekt červeného světla přenáší fytochrom B a dlouhovlnné červené světlo působí na fytochrom A. Receptory pro červené a modré světlo inhibují faktor COP1, který pravděpodobně blokuje MAP kinázovou fosforylační dráhu přes enzym YDA, následně MKK4 a 5 a nakonec MPK3 a 6 až na úroveň SPCH a předpokládaný i zbývajících následných signálních faktorů MUTE a FAMA. Více světla tedy znamená méně MPK3/6, což zvyšuje množství transkripčního faktoru SPCH a možná i dalších dvou.



Obr. 2 – Schéma popisující externí i interní faktory, které ovlivňují tvorbu průduchů včetně drah, na které působí. Převzato z Han and Torri, 2016.

2.1.5.2 Vliv CO₂ na vývoj průduchů

Vzhledem k tomu, že jsou průduchy hlavním místem, kudy se CO₂ do listu dostává, chtělo by se říci, že všechny rostliny tedy budou reagovat na množství CO₂ v okolí. Zdá se však, že reakce na CO₂ je složitější, podle Woodwarda a Kellyové (1995) tak reaguje jen asi u 75 % druhů včetně *Arabidopsis*, a to tím způsobem, že se zvyšující se koncentrací CO₂ se snižuje počet průduchů.

Stěžejní roli v procesu vnímání koncentrace CO₂ zde patrně hrají geny pro β -carbonic-anhydrázu, a to *CA1* a *CA4* (Hu et al., 2010). Lze pozorovat výrazné zvýšení exprese genu *EPF2*, negativního epidermálního faktoru u kontrolních wild-type rostlin, při zvýšení koncentrace CO₂ spojené se snížením hustoty průduchů na listu. U mutantů v genech *CA1* a *CA4* tento efekt nebyl pozorován, naopak se hustota průduchů zvyšovala (Engineer et al., 2014).

Za pozornost stojí další gen s podobným chováním v závislosti na koncentraci CO₂, kterým je *HIC*. Mutanti v tomto genu nereagují na zvýšenou koncentraci CO₂ ve svém okolí

snížením, ale naopak zvýšením průduchového indexu. Tento gen kóduje enzym 3ketoacyl-CoA syntázu, jež se účastní syntézy dlouhých mastných kyselin pro kutikulární vosky (Gray et al., 2000). *HIC* se patrně exprimuje jen ve svěracích buňkách, není tedy příliš jasné, jak může řídit i množství vosků v kutikule a diferenciaci svěracích buněk. Může být ovlivněna buď propustnost svěracích buněk, či syntáza může fungovat jako signál. Dále bylo dokázáno, že mutanti i v jiných genech pro tvorbu kutikuly, tudíž rostliny s pozměněnou strukturou kutikuly, mají odlišný průduchový index (Zeiger and Stebbins, 1972).

2.1.5.3 Další faktory ovlivňující vývoj průduchů

Ví se, že faktory jako vlhkost, teplota či ABA mění průduchový index či stomatální densitu. Děje se tak pravděpodobně stále na úrovni regulace výše popsaných drah, vlhkost by měla indukovat MPK3/6, který inhibuje transkripční faktory potřebné pro diferenciaci průduchů. Stejně se dráha chová při působení chladu, kde byla navíc ještě zjištěna stimulace tvorby SCRM, který je třeba do duplexu k faktorům potřebným pro diferenciaci průduchů (Pillitteri and Dong, 2013). Do regulace vývoje průduchů je z hormonů zapojen auxin (Balcerowicz et al., 2014) jako negativní faktor ve vývoji. Zde se zmíním ještě o brassinosteroidech, inhibujících BIN2, který dále inhibuje SPCH přímo a nepřímo přes YDA i MKK4/5. Přítomnost brassinosteroidů tedy ovlivňuje množství průduchů na stejné dráze (Pillitteri and Dong, 2013), ale efekt je rozdílný na kotyledonu, kde SI snižuje, a na hypokotylu, kde SI zvyšuje (Gudesblat et al., 2012).

2.2 Vnitřní koncentrace CO₂ v listu

Musíme vzít do úvahy, že koncentrace CO₂ uvnitř listu se od koncentrace v atmosféře liší. Tato koncentrace je ovlivňována nejen vnější (atmosférickou) koncentrací CO₂ vně listu, ale také ostatními podmínkami vnějšího prostředí, například světlem a závlahou. Rostlina množství CO₂ aktivně reguluje pomocí otevírání a zavírání průduchů (Farquhar et al., 1989). K měření vnitřní koncentrace CO₂ v listu, která se nedá jednoduše změřit přímo, se využívá skutečnosti, že enzym RUBISCO (ribulózobisfosfát karboxyláza-oxygenáza) diskriminuje těžký izotop uhlíku ¹³C a přednostně zpracovává ¹²C. Mezi koncentrací CO₂ v listu a izotopovým signálem (poměrem ¹³C/¹²C vztaženým ke standardu – δ¹³C) je negativní korelace. Je-li CO₂ dostatek, je podíl ¹³C velmi malý, vyjádřený v záporných hodnotách ‰. Čím vyšší je poměr ¹³C/¹²C v sušině biomasy, tím nižší je koncentrace CO₂ v listovém mezofylu. Při rychlejší fotosyntéze nebo nedostatečném přísunu CO₂, kdy se nedostává tolik ¹²C, tudíž si RUBISCO nemůže tolik vybírat, se zvyšuje poměr ¹³C/¹²C. Nutno ale dodat, že

stejně výsledky dostaneme i u rostlin stresovaných suchem, u rostlin s přivřenými průduchy z jiných důvodů, než je sucho či u jedinců s méně průduchy (Farquhar et al., 1982; Šantrůček and Šantrůčková, 2018, pp. 53, 150-).

2.3 Kutikula

2.3.1 Obecné informace o kutikule

Při vstupu rostlin na souš bylo potřeba zamezit ztrátám vody pouhým vypařováním z povrchu, patrně proto se u rostlin vyvinula kutikula, voskovitá vrstva téměř nepropustná pro vodu i plyny. Ale není to jediná funkce kutikuly, hraje důležitou roli ve fyziologii, vývoji rostliny a jejím vztahu k okolí (Yeats and Rose, 2013). Složena je z makromolekulární sítě kutinu, ve které jsou různé lipidy, zde nazývané vosky. Kutikulu lze rozdělit na dvě vrstvy na základě jejich složení. Níže položená „intrakutikulární vrstva“ je bohatá na kutin a polysacharidy, přímo navazuje na buněčnou stěnu pokožky (epidermis). Horní epikutikulární vrstva je bohatá na vosky při menším zastoupení sacharidů a na povrchu vytváří často charakteristické krystalické struktury z epikutikulárních vosků (Yeats and Rose, 2013).

Kutikulární vosky jsou nejčastěji deriváty dlouhých řetězců mastných kyselin čítající 20–34 uhlíků, které zahrnují vlastní mastné kyseliny, aldehydy, ketony, primární i sekundární alkoholy, alkany a estery vosků (Yeats and Rose, 2013). Biosyntéza bývá zahájena z 16 či 18uhlíkatých mastných kyselin v plastidech pokožkových buněk. Pomocí acyl-koenzym A syntázy jsou řetězce přeměněny na CoA thioestery, které jsou transportovány do endoplasmatického retikula (Pulsifer, et al., 2012). C16 acyl-koenzym A je substrátem pro komplex beta-ketoacyl-CoA syntázy, reduktázy, dehydratázy a reduktázy. V *Arabidopsis* se předpokládá 21 genů pro kódování β -ketoacyl-CoA syntázy (KCS), za nejdůležitější se považuje *CER6* (známý též jako *CUT1* či *KCS 6*), dále jsou přítomny další geny skupiny *CER*, dále *KCSI* či *PAS2* (Fiebig et al., 2000).

Kutin je složen z hydroxylovaných mastných kyselin s malým množstvím glycerolu, propanoidů a dikarboxylových kyselin (Kolattukudy, 2001). Syntéza opět začíná v plastidu v pokožkových buňkách a pokračuje v jejich endoplasmatickém retikulu, kde proběhne hydroxylace na několika místech a syntéza acyl-CoA prekurzoru (Li-Beisson et al., 2009).

Prekurzory vosků a kutinu jsou transportovány z endoplasmatického retikula přes cytoplasmatickou membránu a buněčnou stěnu. V přenosu hrají roli ABC přenašeče závislé na ATP (Pighin, 2004). Poslední krok syntézy kutinu je inkorporace hydroxyacyl monomerů.

O tomto procesu se ví málo, přítomný je gen *CD1*, což bylo detekováno na rajčeti (Girard et al., 2012). Syntéza vosků u *Arabidopsis* je podporována nedostatkem vody, chloridů a kyselinou abscisovou, syntéza kutinu reaguje jen na deficit vody (Kosma et al., 2009).

Bylo detekováno mnoho transkripčních faktorů, které se podílejí na tvorbě kutikuly (Yeats and Rose, 2013). *WIN1/SHN1* patří do rodiny tří genů, které se podílejí na syntéze kutinu, ale ne vosků (Shi et al., 2013). SHN faktor dále řídí expresi genů, které modifikují pektin, součást buněčné stěny. Patrně tak dochází ke vzájemné interakci syntézy kutinu a buněčné stěny (Shi et al., 2013). MYB96 závisí na koncentraci ABA a měl by řídit složení kutikuly podle sucha (Seo et al., 2009). *CFL1* inhibuje funkci HDG1, který patří do skupiny HD-ZIP IV, čímž inhibuje několik genů pro syntézu kutinu (Wu et al., 2011). Tato skupina faktorů dále reguluje diferenciaci mimo jiné i svěřacích buněk (Takada et al., 2013).

2.3.2 Vztah kutikuly a průduchů

Počet průduchů a složení kutikuly se navzájem ovlivňují, poprvé to bylo popsáno Zeigerem a Stebbinsem (1972). Vlivy některých faktorů na oba tyto děje jsem již nastínil v předchozím textu, jedná se například o *HIC*. Průduchový index je značně snížen u mutantů defektních v genech *CER1* a *CER6/CUT1*. *CER6* se na rozdíl od *HIC* exprimuje na celé ploše listu (Holroyd et al., 2002). Právě pro tyto vzájemné účinky se začalo spekulovat o propojenosti signálních drah v kutikule, pokožce a mezofylu a o existenci signálních molekul, které prostupují do různých částí rostliny (Bird and Gray, 2003).

2.4 Cíle práce

Za pomoci „průduchových“ a „kutikulárních“ mutantů, dále popsaných v kapitole Materiál a metody, analyzovat vzájemné vztahy mezi vývojem průduchů ve smyslu jejich počtu (SD) a podílu na celkovém počtu pokožkových buněk (SI) a vývojem kutikuly, respektive množstvím epikutikulárních vosků v závislosti na intenzitě světla. Zjistit, jak na tyto změny na transkripční úrovni reagují dva klíčové představitelé EPF faktorů (EPF2 a STOMAGEN). Pomocí analýzy izotopového poměru $\delta^{13}\text{C}$ nepřímo „změřit“ vnitřní koncentraci CO_2 v listech použitých genotypů. A nakonec, najít rostliny s homozygotní mutací v genu *HIC* (KCS13) pro další pokusy.

3 Materiál a metody

3.1 Podmínky pěstování a rostlinný materiál

Pokusné rostliny byly pěstovány dle jejich účelu. Rostliny *Arabidopsis* určené pro získání semen byly pěstovány v klimatizované skleníkové kóji orientované na východní stranu při teplotě 18 °C a buď pod přirozeným světlem, či pod LED pro generální osvětlování. Výsevy na Petriho miskách byly umístěny v kultivační místnosti klimatizované na 21 °C v policích osvětlených z boku pomocí zářivkových trubíc s časováním 16 hodin den/8 hodin noc. Pokusy prováděné ve standardizovaných podmínkách probíhaly v boxu Snijders Scientific (Nizozemsko). Jako vysoké světlo je označována hladina 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, jako nízké světlo je označována hladina 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ z T8 zářivek NARVA určených pro pěstování rostlin.

V práci bylo použito několik mutantních linií s defektními geny. Jako *att1* mutant je popisována rostlina s mutací v genu *ATT*, který produkuje cytochrom CYP86A2, který je nezbytný pro správnou syntézu kutinu. Tento mutant tak má nižší množství kutinu, kutikula je dále propustnější pro vodu (Xiao et al., 2004). Jako *cut1* je značen mutant s mutací v genu *CUTI*, který má vážné poruchy ve voskové vrstvě (Millar et al., 1999). *StRNAi* (Stomagen RNA interference) mutant má na posttranskripční úrovni blokovanou aktivitu STOMAGENU, díky čemuž má rostlina výrazně snížen počet průduchů (Sugano et al., 2010). Double mutant *epfl,2* má mutaci v negativně působících epidermálních faktorech, které regulují vznik průduchů, má jich tak zvýšené množství. Všechny tyto rostliny v rámci pokusů byly pěstované v hydroponii v Hoaglandově činidle 4x ředěném.

3.2 Stanovení počtu průduchů a průduchového indexu

Z mnohých metod, které umožňují vytvářet otisk povrchu listu tak precizně, aby bylo možné pod mikroskopem počítat buňky a průduchy, byla zvolena jedna z nejjednodušších, a to otisk do bezbarvého laku na nehty. Metoda neumožňuje vytvářet otisky na živém listu přímo na rostlině a je náročnější vytvořit otisk slabých listů, to je ale pro tyto pokusy irrelevantní.

Ve stanovený den bylo ze všech rostlin náhodně odebráno 5 listů pro každou skupinu a pro rubovou a lícovou stranu zvlášť. Listy následně byly zafixovány na papír pomocí oboustranné lepicí pásky (není vyžadováno v případě, kdy jsou listy dostatečně staré a pevné). Na povrch byl nanesen bezbarvý rychleschnoucí lak Rimmel London 60 Seconds, který se nechal několik minut zaschnout (dle mé zkušenosti 60 sekund z názvu nestačí, 3 minuty ale

byly dostatečné). Po zaschnutí byla na vrstvu laku nalepena obyčejná lepicí páska, na které po sloupnutí zůstal otisk. Páska byla nakonec nalepena na podložní mikroskopické sklo.

Snímky pro analýzu počtu průduchů byly pořízeny na mikroskopu BX61 (Olympus, Japonsko) s jednookou zrcadlovkou EOS 5100 (Canon, Japonsko) s rozlišením omezeným na 10 Mpx na trinokulární hlavici. Počítání bylo prováděno na výsledných fotografiích v programu FIJI (nástavba programu ImageJ, open source) a v aplikaci pro OS Android Colony Counter (Promega, Madison, Wisconsin). Hodnoty byly přepočítány na stomatální index (SI, poměr počtu průduchů a počtu buněk) a na stomatální densitu (počet průduchů na jednotku plochy). Výsledky byly dále zpracovány statisticky v programu Statistica v. 13.3 (TIBCO, Palo Alto, Kalifornie) metodou faktoriální ANOVY pro stanovení signifikance rozdílů mezi skupinami a Bartlettovo testem pro stanovení míry homogenity variance, která je požadována pro testy ANOVA. Grafy byly vytvořeny v programu SigmaPlot (Systat, San Jose, Kalifornie).

3.3 Měření relativní míry exprese metodou qPCR

3.3.1 Izolace RNA

Pro izolaci čisté RNA byla zvolena metoda organické extrakce a vazby RNA molekul na kolonku s křemelinovou membránou, která je schopná vázat RNA za přítomnosti chaotropního činidla. Použit byl kit NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel, Dürren, Německo).

Pro izolaci vzorků je třeba zajistit rychlou homogenizaci za nízké teploty, aby se RNA degradovala co nejméně. Listy z rostlin (maximálně 100 mg) byly hned po odebrání zmrazeny tekutým dusíkem v kryozkumavce či zabalené do alobalu. Následně byly vzorky homogenizovány v misce v tekutém dusíku, do kterého se přendaly listy. Co nejrychleji po rozmělnění byl prach přenesen do zkumavky s 350 μ l pufru RA1 s 3,5 μ l beta-merkaptoethanolu, což je irreverzibilní inhibitor RNáz, díky čemuž je lyzát stabilní.

Všechny centrifugační kroky byly prováděny při rychlosti 11000 g. Homogenizovaný roztok byl převeden do kolonky s fialovým víčkem, která odfiltruje pevné částice. Centrifuguje se 1 minutu, po použití může být kolonka vyhozena. Do sběrné zkumavky bylo přidáno 350 μ l 70% ethanolu a promícháno pipetou. Tato směs byla převedena na izolační kolonku s modrým víčkem a byla centrifugována 30 sekund. RNA (a trochu odpadní DNA) se naváže na povrch částic na membráně díky přítomnosti chaotropního činidla guanidium

thiokyanátu. V dalších pufrch je přítomný guanidin hydrochlorid pro udržení vazby a stabilizaci roztoků (reverzibilně denaturuje RNÁzy). Dále se kolonka stočila s 350 μ l MDB pufru po dobu 1 minuty pro odsolení.

První DNázování bylo provedeno přímo na kolonce pomocí s kitem dodávané DNÁzy. Lyofilizovanou DNÁzu je třeba rozpustit ve vodě a pro použití smíchat 10 μ l rekonstituované DNÁzy s 90 μ l dodaného reakčního pufru. Tato směs byla nakapána doprostřed filtru kolonky a při pokojové teplotě byl vzorek inkubován 15 minut. DNÁza byla inaktivována 200 μ l pufru RAW2, který byl přidán na kolonku a stočen 30 sekund. Následně bylo přidáno 600 μ l pufru RA3 a stočeno 30 sekund, následované přidáním 250 μ l RA3 pufru. V tomto stádiu je nutné vysušit membránu, proto se kolonka centrifuguje 2 minuty, sběrná zkumavka byla vyhozena a nahrazena v kitu dodávanou 1,5ml centrifugační zkumavkou prostou nukleáz. Na vysušenou membránu bylo přidáno 50 μ l vody zahřáté na 50 °C. Díky nepřítomnosti chaotropních činidel a vyšší teplotě (není vyžadována) se RNA uvolní a přejde do vodného roztoku.

Kvantita a čistota vyextrahované RNA byla testována spektrofotometricky na vlnových délkách 230 nm (odhalí zbytky chemikálií jako například guanidinu), 260 nm (stanoví koncentraci nukleových kyselin, nerozlišuje RNA a DNA) a 280 nm (stanoví množství zbytkových proteinů). Pouze vzorky, které vykazaly dostatečnou čistotu v poměru $A_{260/280}$, kde je požadován výsledek 1,8 či výše a v poměru $A_{260/230}$ 2 a více byly použity pro další postupy. Kvalita RNA a její celistvost byla testována pomocí elektroforézy v denaturačním pufru. Použit byl FA (formaldehyde-agarose) pufr 1x koncentrovaný ve složení 20 mM MOPS ve formě volné kyseliny, 5 mM acetátu sodného, 1 mM EDTA ve formě sodné soli (EDTA báze se jen velmi špatně rozpouští, je pak třeba použít více hydroxidu). Všechny chemikálie byly od výrobce Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri) v čistotě pro molekulární biologii. Pufr byl připraven nejdříve jako 10x zásobní roztok, jehož pH bylo upraveno hydroxidem sodným na hodnotu 7. FA pufr se používá na běh elektroforézy, tak i k přípravě agarózového gelu o koncentraci 1,2 % s obsahem barviva GelRed (Biotium, Fremont, Kalifornie), 1x koncentrovaného. 5 μ l vzorku bylo smícháno s denaturačním pufrům RNA Sample Loading Buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), předtím byly vzorky zahřáty na 50 °C. Elektroforéza běžela při napětí 4 V/cm (vzdálenosti elektrod) zhruba 90 minut. Pod UV světlem musel být vidět jeden či více pruhů nedegradované ribozomální RNA.

3.3.2 DNázování

Jeden krok pro degradaci DNA je součástí samotné izolace, ale v našem pokusu byl testován gen, který neobsahuje exony, tudíž nemohla být použita technika intron-splicing, která zabraňuje detekci kontaminační DNA, která nemá původ v reverzní transkripci. Byl použit kit TURBO DNA-free (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie). Kit obsahuje komerční modifikovanou DNázu, která má mít zvýšenou afinitu, což je v případě, kdy je třeba vzorek zbavit absolutně veškeré DNA, velmi žádoucí. Enzym není inaktivován běžnou metodou přidání EDTA a zahřátím na 75 °C, ale kit obsahuje roztok speciálních částic těžších než voda, které na sebe naváží nejen enzym, ale i dvojmocné soli z pufru, které by mohli interferovat s dalšími postupy. Vzorek RNA tak zůstává velmi čistý a reakcí téměř neovlivněný.

Maximálně 5 µg nukleových kyselin bylo rozředěno do 17 µl vody. V případě, kdy vzorek neobsahoval tolik nukleových kyselin, bylo odebráno 17 µl vzorku bez ohledu na množství. K tomu byly přidány 2 µl pufru a 1 µl enzymu. Po půlhodinové inkubaci v suchém bloku při 37 °C byly přidány 2 µl deaktivčního reagentu, který byl nejdříve důkladně promíchán. Za stálého míchání tak, aby byly inaktivační mikročástice stále v roztoku (mají mléčné zabarvení) byl vzorek po 5 minutách stočen po dobu 1 minuty při 13 000 g, inaktivační částice udělaly pevný pelet na dně. Nakonec bylo odebráno 20 µl vzorku tak, aby vzorek nebyl kontaminován inaktivátorem, který podle výrobce inhibuje reakce PCR. RNA byla skladována při teplotě -80 °C.

3.3.3 Reverzní transkripce

Reakce reverzní transkripce, která zajistí převedení sekvencí RNA do cDNA, která je vhodná pro další zpracování, byla provedena pomocí kitu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts). Jedná se o rekombinantní reverzní polymerázu z viru myší leukémie (MoMuLV, MMLV či jen MLV polymeráza) s redukovanou ribonukleázovou aktivitou, což je schopnost polymerázy likvidovat RNA-DNA duplexy. Syntéza probíhá při teplotě 37 °C, což je běžná teplota, při které funguje většina transkripčních enzymů, u moderních rekombinantních polymeráz je ale snaha, aby syntéza probíhala za vyšší teploty. Jednořetězcová RNA totiž tvoří smyčky a sekundární struktury, které mají tendenci bránit enzymu v činnosti. Vyšší teplota tyto smyčky drží rozvolněné. Jako primery lze u reverzní transkripce použít náhodné 6nukleotidové sekvence, tzv. random (náhodné) hexamery, které syntetizují kratší i delší náhodné úseky. Vzhledem k délce produktů, které vznikají v qPCR, to nevadí. Výhodou je, že se přepíše veškerá RNA ve vzorku. Další možností je použít primer obsahující alespoň 16x thymin, který nasedá na polyA

řetězec mRNA. Takhle v ideálním případě dostaneme přepsaný celý transkript (v praxi je to limitováno schopností polymerázy tvořit dlouhé řetězce), reakce je ale omezena jen na mRNA. Poslední možností je dělat syntézu s genově specifickým primerem, je možné použít třeba reverzní primer pro (q)PCR. V našich pokusech byla používána první možnost, random hexamery.

Kit je stavěn na až 2 μg RNA, které byly do reakce použity i u nás, pokud bylo toto množství dostupné, jinak bylo použito méně RNA. Reakce se skládala ze 2 μl 10 RT Buffer, 0,8 μl 100mM dNTP mixu, 2 μl 10x RT Random Primers, 4,2 μl vody a 1 μl Multiscribe Reverse Transcriptase. Z tohoto byl připraven master mix pro každý vzorek. 10 μl master mixu bylo přidáno k 10 μl vzorku, ve kterém byly až 2 μg RNA. Reakce měla teplotní kroky 10 minut 25 $^{\circ}\text{C}$ (pokojová teplota) pro nasedání primerů, dvě hodiny pro samotnou reakci a 85 $^{\circ}\text{C}$ pro irreverzibilní denaturaci polymerázy. Tento vzorek mohl být použit pro další kroky.

3.3.4 qPCR

K provádění vlastní kvantitativní PCR reakce se používají dva základní typy chemie. SYBR Green či vylepšený EVA Green jsou interkalační barviva, které mají schopnost se selektivně vázat na dvouvláknovou DNA, přičemž jen takto vázaný SYBR Green při osvětlení modrým světlem vlnové délky kolem 497 nm emituje záření o vlnové délce 520 nm (Zipper, 2004). V průběhu reakce PCR je v roztoku dvojřetězcová DNA přítomna jen ve stádiu elongace, jindy je denaturována. V průběhu reakce jsou použity primery, které dávají vznik produktu o délce 70–150 bází (lze i více, ale je třeba dávat pozor na délku elongace v PCR reakci vzhledem k rychlosti polymerázy). Čím více templátu je v PCR reakci, tím více excitovaného světla lze detekovat a množství světla v průběhu reakce stoupá až do vyčerpání některé komponenty. Pokud se stanoví množství excitovaného světla pro všechny vzorky stejně, každý vzorek ho dosáhne v jiný cyklus podle výchozího množství. Při vztažení k referenční hodnotě/genu tak dostaneme množství templátu ve vzorku (Bustin, 2000).

Druhou možností je použití detekčních sond. Úsek je opět kopírován pomocí primerů, ale detekce probíhá díky sondě, která hybridizuje dovnitř úseku, kde syntetizuje polymeráza. Sonda obsahuje zabudované dvě molekuly, fluorofor, který emituje na specifické vlnové délce, a zhášec, který toto excitační záření přednostně pohlcuje. Pokud se ozáří celá sonda, zhášec pohltí energii a fluorofor nezáří. Tím, jak v průběhu PCR polymeráza narazí na sondu, tak svou hydrolyzační schopností sondu zlomí. Zhášec a fluorofor se oddálí a fluorofor začne být aktivní. Dále je princip totožný s interkalačními barvivy (Holland et al., 1991). Toto řešení

má výhodu ve vysoké selektivitě. U barviv totiž dochází k nespecifickým vazbám na dimery primerů, jejich smyčky a na nespecifické vazby na templát. Tento šum na pozadí u technologie sond odpadá. Nevýhodou je vyšší cena (Bustin, 2000).

V této práci byla použita druhá metoda, a to za použití komerčně dostupných sond TaqMan (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts). Eseje pro libovolné geny lze objednat přes webovou stránku thermofisher.com. Výhodou je, že dodané reakce jsou předem ověřené výrobcem, zákazník tak dostane zaručeně funkční kit vhodný pro okamžité použití. V práci byly použity kity pro detekci transkriptů pro ACTIN 8, EPF2 a STOMAGEN. Pro detekci STOMAGENU (At4g12970) byla použita esej číslo At02219575_g1, pro detekci EPF2 (At1g34245) esej číslo At02193517_g1 a pro ACTIN 8 (At1g49240) esej číslo At02270958_gH.

Esej přichází jako 20x koncentrovaný roztok nadepsaný TaqMan Gene Expression Assay, kde je obsažena polymeráza, sonda i primery, do 20 μ l reakce se dává 1 μ l. Reakce reverzní transkripce může být do reakce přidána až do doporučeného množství 20 % v/v, a to tak, aby se v reakci vyskytovalo 1–100 ng cDNA. V našich pokusech byly použity 4 μ l cDNA 20x ředěné ultračistou vodou u všech vzorků bez předchozího měření. Do množství 10 μ l na 1 reakci byla přidána voda a následně byl přidán 2x koncentrovaný TaqMan Gene Expression Master Mix, takže objem reakce byl 20 μ l. Veškeré vzorky byly testovány v duplikátech.

Testované geny byly standardizovány na referenční gen *Actin 8*. Vzhledem k tomu, že se jeden experiment nevešel na jednu reakční desku, možnost porovnání byla zajištěna srovnáním s jedním vzorkem, který běžel na všech deskách. Pomocí permutační analýzy z hodnoty cyklu, kdy fluorescence překročila určitou mez stanovenou obslužným programem, bylo získáno v programu Excel 2016 (Microsoft, Redmont, Washington) s doplňkem Daniel's XL Toolbox (Kraus, 2014) procentuální zastoupení transkriptu ve vzorku oproti kontrole, a to pomocí metodiky upravené podle Livak and Schmittgen, 2001.

Pro qPCR byl použit přístroj StepOne (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts). Cyklus byl nastaven podle dodavatele esejí, 2 minuty temperační krok 50 °C a 10 minut denaturace při 95 °C, dále 40x opakované denaturace 15 sekund při 95 °C a kombinovaného kroku nasedání primerů a elongace při 60 °C, kde docházelo ke snímání fluorescence. Jako fluorofor byl použit FAM. V experimentech byly používány desky MicroAmp Fast Optical 48-Well Reaction Plate uzavřené adhezivní fólií MicroAmp 48-Well Optical Adhesive Film.

3.4 Analýza vosků

Izolace a testování voskové vrstvy byla provedena zaměstnancem ÚMBR. Izolace byla provedena pomocí 30s namáčení v chloroformu v kvalitě pro vysokotlakou plynovou chromatografii, do kterého se vosková vrstva smyje. Následně byla použita metoda kapilární plynové chromatografie s porovnáním se standardem. Metoda byla podrobně popsána v Hauke and Schreiber, 1998.

3.5 Detekce množství ^{13}C v rostlinném materiálu

Analýza $\delta^{13}\text{C}$ byla provedena na suchém materiálu na analyzátoru EA1110 (ThermoQuest, Italy) s přístrojem DeltaXLplus (ThermoFinnigan, Bremen, Germany). Jako standard byl použit materiál VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite), materiál s velmi vysokým množstvím uhlíku ^{13}C . Hodnota relativního množství byla získána podle vzorce:

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{vzorek}}}{R_{\text{std}}} - 1 \right) \times 1000(\text{‰})$$

kde R znamená naměřenou koncentraci.

3.6 Výběr linií s homozygotní mutací v genu *HIC*

3.6.1 Použité databáze

Nejenže je u *Arabidopsis* zmapován celý genom, jsou také dostupní inzertní mutanti defektní v určitém genu. Takto je pokryta většina genomu *Arabidopsis*. Pro práci s genomem *Arabidopsis* byl použit TAIR na webové stránce arabidopsis.org. Konkrétně byl použit nástroj GBrowse, který na schématu zobrazuje genom rostliny a je v něm možné vyhledat určitý gen. Přímo je také znázorněna pozice polymorfizmů a míst inzerce u konkrétních dostupných mutantů. Stačí tedy vybrat mutanta, jehož inzert zasahuje do požadovaného genu. Semena mutantů byla objednána z organizace NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre), která poskytuje mimo jiné linie SALK (inzertní T-DNA mutanti ze Salkova institutu), SAIL (inzertní T-DNA mutanti poskytnutí společností Syngenta) a JIC SM (taktéž inzertní mutanti vytvoření v John Innes Centre). V našich pokusech jsme pracovali právě s těmito třemi liniemi.

3.6.2 Genotypizace mutantů

3.6.2.1 Pěstování

NASC mutanty dodává ve formě několika desítek semen, u kterých neručí za mutaci a za to, jestli je mutace homozygotní, je tedy na uživateli, aby tyto informace získal. Vzhledem k menšímu počtu semen byly tyto vysety na misky s růstovým médiem Murashige & Skoog medium including vitamins (Duchefa, Haarlem, Nizozemí), kde byla u všech linií zjištěna vysoká klíčivost blížíící se 100 %. Před vysazením byla semena sterilizována v roztoku Sava a vody 1:1 po dobu půl hodiny, načež byla 4x propláchnuta sterilní čistou vodou. Pěstovány byly v komoře ve 21 °C a s 16hodinovou délkou dne. Poté byly přesazeny do zeminy, v klimatizované skleníkové kóji při teplotě 18 °C. V tomto stádiu byla provedena genotypizace. Na genotypování byly použiti mutanti SAIL_205_E06, JIC SM 3_19849, SALK 144809 a SALK 024901.

3.6.2.2 Extrakce DNA

DNA pro genotypizaci byla extrahována primitivní metodou pomocí Edwardsova pufru (Edwards et al., 1991). Extrakční pufr je tvořen 200 mM Tris-HCl při pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 mM SDS. Dále je třeba isopropanol. Kousek listu byl odebrán do 1,5ml centrifugační zkumavky a byl zalit 400 µl extrakčního pufru. Pomocí homogenizačního kopíčka bylo pletivo rozdrceno a zkumavka byla stočena 1 minutu při 13 000 rpm. Odpad klesnul na dno a 300 µl roztoku bylo přesunuto do jiné zkumavky s 300 µl isopropanolu pro vysrážení DNA a byl ponechán deset minut při pokojové teplotě. Poté byl stočen 5 minut při 13 000 rpm. Isopropanol byl odebrán, vzorek se nechal přiměřeně vysušit a pelet byl rozpuštěn ve 100 µl ultračisté vody.

3.6.2.3 PCR

Ke genotypování byla použita metoda PCR. Bylo využito faktu, že T-DNA insert obsahuje svou specifickou sekvenci, reakce s primerem v insertu a druhým v genu tedy nepoběží u nemutovaných wild-type rostlin. Wild-type varianta se může testovat buď pomocí dvou genových primerů, které jsou přes potenciální místo insertu, produkt pak bude delší, případně je možné jeden z primerů udělat do hrany insertu. U alely bez insertu bude primer normálně nasedat, u alely s insertem tato sekvence nebude existovat, bude v ní vklíněn insert. Primery použité pro genotypizaci jsou shrnuty v Tabulce 1 na další straně. Všechny primery v práci byly syntetizovány u společnosti Generi Biotech (Hradec Králové, ČR). Teplota tání (T_m) udává teplotu reakce, kdy je na DNA vázána polovina dostupných primerů (Owczarzy et al., 2008). Vypočítána byla ve webové aplikaci OligoAnalyser (Integrated DNA

Technologies, Coralville, Iowa) se zadanou koncentrací Mg^{2+} iontů 1,5 mM. K přepočtu T_m vzhledem k množství hořčnatých iontů aplikace využívá informace z práce Owczarzyho (Owczarzy et al., 2008).

Tabulka 1: Seznam primerů použitých pro genotypizaci

Mutant	Název	Účel	Sekvence	T_m [°C]
SALK	LBB1,3	Detekce insertu, revers	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	59
SALK 024901	-	Gen, forward	GCGTTCCATGTCATACTCCAC	62
SALK 024901		Gen, revers	CTGTGGTACGAGCTGGCTTAC	64
SALK 144809		Gen, forward	GCTCTTGCCACAAATCAATTC	60
SALK 144809		Gen, revers	GCTGGTGACTIONCGTTAAAGACG	62
SAIL	LB3	Detekce insertu, revers	CTGAATTCATAACCAATCTC GA	59
SAIL 205 E06		Gen, forward	ACTAACATTGACCGGTTCGTTG	62
SAIL 205 E06		Gen, revers	CCCATGGGAAACAATCATAAC	59
JIC SM	3' dSpm	Detekce insertu, forward	TACGAATAAGAGCGTCCATTT TAGAGTGA	65
SM_3_19849		Gen, forward	ACTTGCGGTAACGATTTTGTG	61
SM_3_19849		Gen, revers	GAGTGC GACTCCAACGATACC	64

U linií SALK a SAIL se prováděly následující reakce:

1. Forward + revers – pokud reakce dala produkt, rostlina má wild-type alelu.
2. LBB1,3/LB3 + revers – pokud reakce dala produkt, rostlina má mutovanou alelu.

Pokud rostlina dala produkt v obou reakcích, byla heterozygotní.

U linií SM se prováděly následující reakce

1. Forward + revers – pokud reakce dala produkt, rostlina má wild-type alelu.
2. 3' dSpm + forward – pokud reakce dala produkt, rostlina má mutovanou alelu.

Pokud DNA rostliny dala produkt v obou reakcích, rostlina byla heterozygotní.

Pro provedení PCR byla použita polymeráza Dreamtaq Green (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts) o obsahem 2 mM $MgCl_2^{2+}$ v pufru a dNTP mix 10 μ mol (Bioline, Londýn, Velká Británie). Použit byl přístroj Biometra Trio (Biometra, Jena, Německo). Pro test SAIL mutantů byl použit program 95 °C 3 minut pro úvodní denaturaci, dále 40x 95 °C 30 sekund, 48 °C 30 sekund a 72 °C 1 minuta, zakončené 72 °C 5 minut. Pro test dalších

mutantů byl použit podobný program, který se lišil pouze v teplotě nasedání primerů. pro SM mutanty byla použita teplota 50 °C, u reakce pro SALK mutanty s primerem LBB1,3 byla použita teplota 51 °C.

3.6.2.4 Elektroforéza

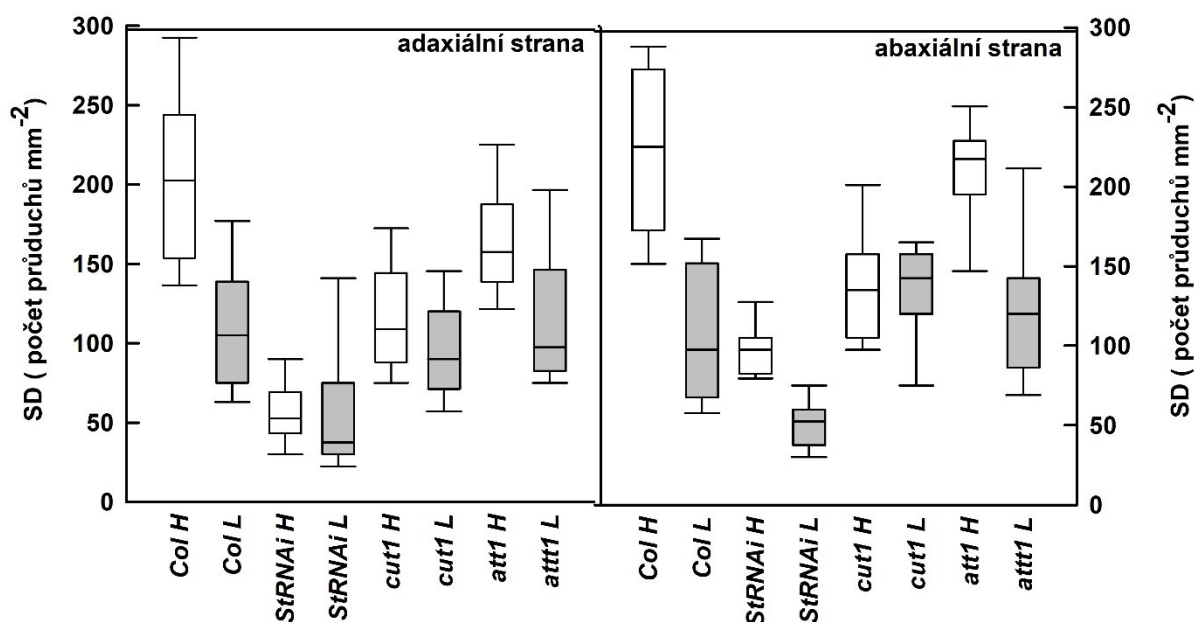
Pro detekci PCR produktů byla použita metoda elektroforézy. Použit byl 1x TAE pufr a běžná agaróza Agarose Electrophoresis Grade (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie). Použité napětí činilo 6 V/cm vzdálenosti elektrod při dosahovaném proudu maximálně 120 mA. Gely byly barveny až po elektroforéze pomocí barviva GelRed (Biotium, Fremont, Kalifornie). Jako ladder byl používán 100 bp DNA Ladder (NEB, Ipswich, Massachusetts).

4 Výsledky

4.1 Vliv světla na vývoj průduchů a množství epikutikulárních vosků

4.1.1 Počet průduchů a průduchový index závisí na mutaci i světle

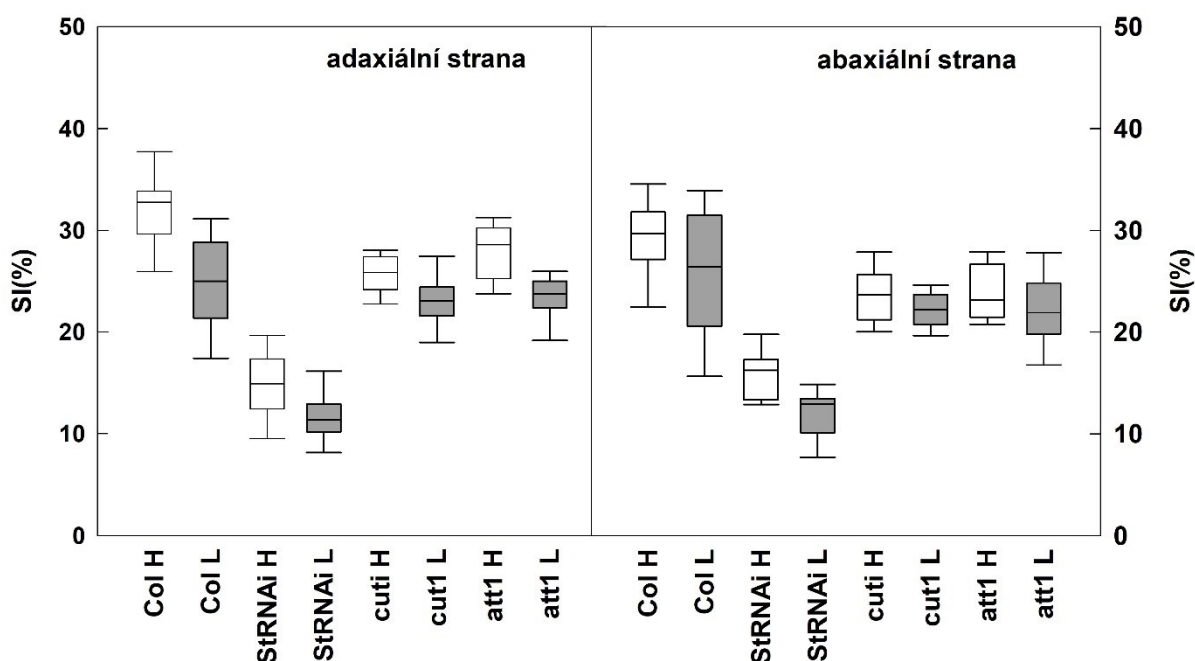
Z rostlin, které byly pěstované v testovacích podmínkách popsaných v metodologii, byly získány hodnoty počtu průduchů, které byly zpracovány do následujících grafů. Počet průduchů (SD) a průduchový index – podíl průduchů na celkovém počtu epidermálních buněk (SI) byl stanoven na obou stranách listů (adaxiální a abaxiální) zvlášť. Na Obr. 3 jsou vyneseny hodnoty pro počet průduchů, na Obr. 4 jsou vyneseny průduchové indexy v závislosti na míře osvětlení a mutantu. Statistické zpracování dat z analýzy počtu průduchů bylo prováděno na vlastních datech, statistiky u stomatálního indexu musely být prováděny na logaritmičtě transformovaných datech z toho důvodu, že podle Bartlettova testu homogenity variací nebyla splněna podmínka homogenity variací pro tento typ statistiky. Po transformaci již parametrické metody bylo možné použít.



Obr. 3 – Hustota průduchů (SD) na adaxiální a abaxiální straně listů wt (Columbia) a mutantů. Bílý box představuje rostlinu pěstovanou na vysokém světle ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), šedý na nízkém světle ($80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Čára v boxplotu znázorňuje medián, box zobrazuje standardní odchylku a úsečky znázorňují 1,5násobek kvartilu, tzn. mezikvartilové rozpětí. Graf je vytvořen z původních, netransformovaných dat.

Použitá faktoriální analýza variance zjistila rozdíl mezi skupinami. Hodnota testové statistiky $F(3, 402) = 123,27$; $p < 0,0001$.

Podle Fisherovy LSD analýzy (párové t-testy každý s každým) při 402 stupních volnosti máme průkazný rozdíl ($p < 0,001$) od kontroly Columbia u stomatální density u všech mutantů pěstovaných na vysokém světle. U rostlin pěstovaných na nízkém světle nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl od kontrolních rostlin u *att1* a *cut1* mutantů. Můžeme zde tedy vidět různé reakce mutantů při různých úrovních osvětlení. Z grafu lze vyčíst, že hustoty průduchů na vysokém světle jsou vyšší než na nízkém světle, ale mutanti (*StRNAi* a *cut1*) daleko méně reagují na vyšší intenzitu světla zvýšením počtu průduchů než kontrolní rostliny, zatímco *att1* mutant se co do počtu průduchů a své reakce neliší od kontroly.



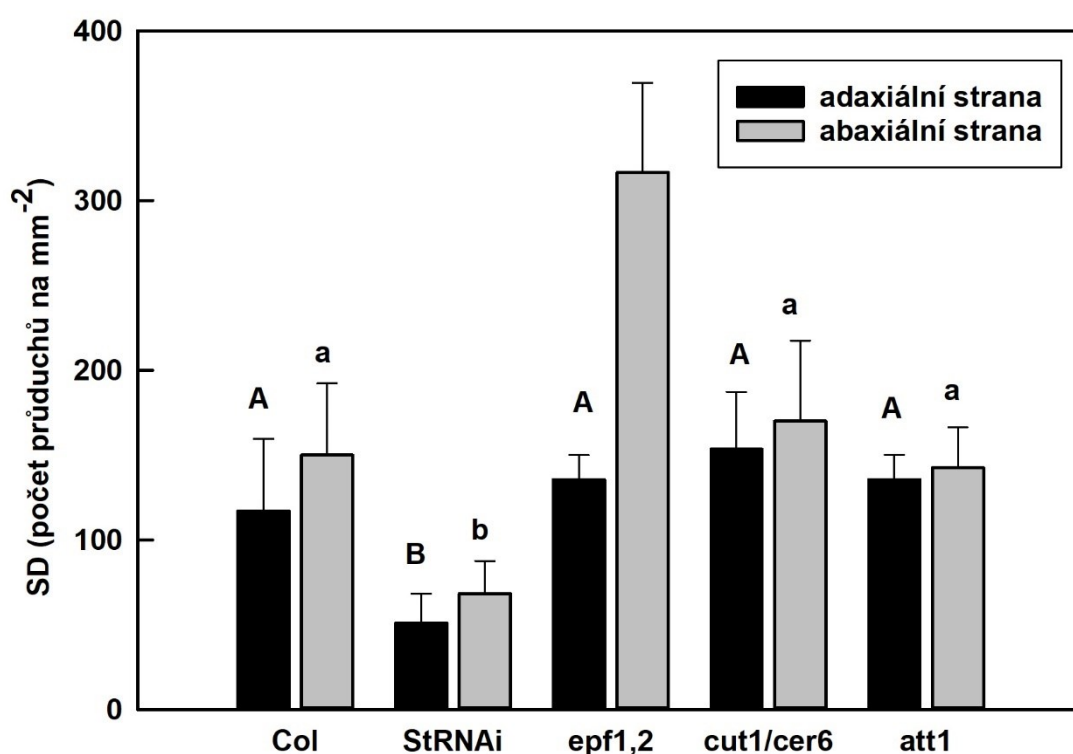
Obr. 4 – Průduchový index (SI) na adaxiální a abaxiální straně listu wt (Columbia) a mutantů. Bílý box představuje rostlinu pěstovanou při vysokém světle ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), šedý při nízkém světle ($80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Čára v boxplotu znázorňuje medián, box zobrazuje standardní odchylku a úsečky znázorňují 1,5násobek kvartilu, tzn. mezikvartilové rozpětí. Graf je vytvořen z původních, netransformovaných dat.

Podle Fisherovy LSD analýzy transformovaných hodnot průduchových indexů jsou signifikantní rozdíly na hladině statistické významnosti nejhůře $p = 0,02$ u všech mutantních rostlin, v rámci stejné hladiny osvětlení. Hodnota testové statistiky pro celý soubor $F(3, 402) = 322,02$, $p < 0,0001$.

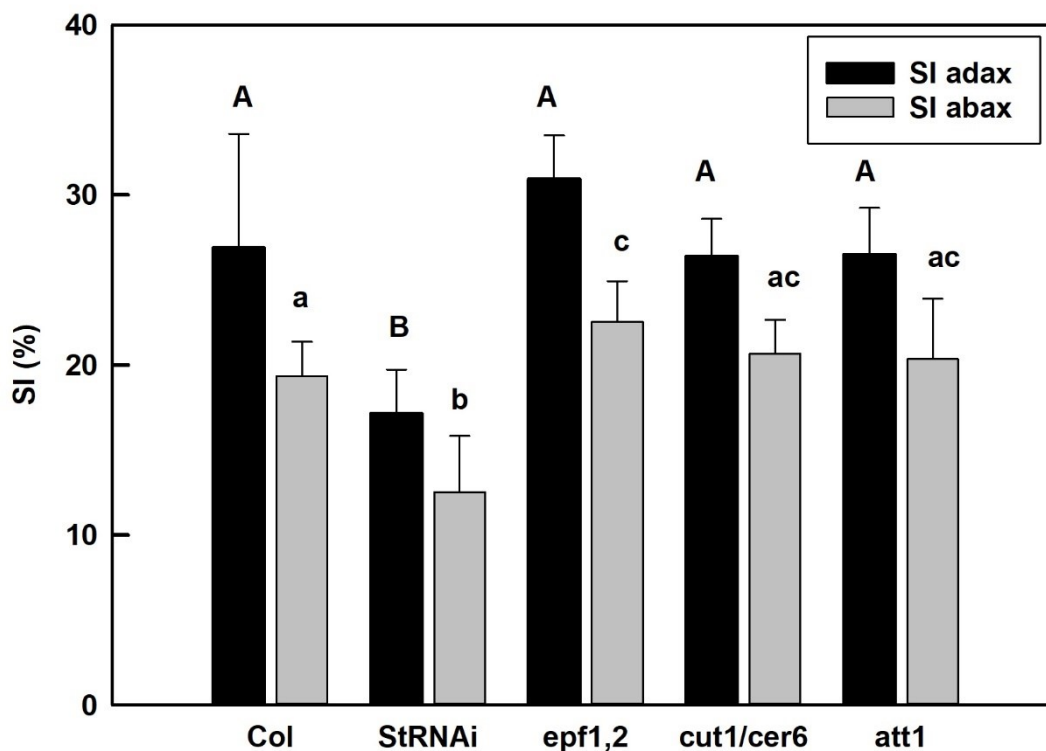
Kontrolní rostliny ekotypu Columbia dle očekávání na nižším světle tvořily méně průduchů. Tento fenomén se opakoval i u mutantních rostlin. Mutant s potlačenou expresí STOMAGENU tvořil menší počet průduchů a měl menší průduchový index na obou stranách listu, silencing je v rostlině tedy stále aktivní. Mutant v genu *ATT*, který má porušenou syntézu kutinu, mírně, snižuje počet i průduchů i průduchový index. Mutant s poruchou tvorby vosků v genu *CUT1/CER6* reagoval snížením počtu průduchů. Zajímavý je minimální rozdíl v počtu průduchů v obou světelných režimech u tohoto mutantu. Podobně sníženou reakci na světlo vykázal i *StRNAi* mutant s interferencí ve STOMAGENU, zvláště na adaxiální straně listu.

4.1.2 Počet průduchů u *epf1,2* mutantů

Z technických důvodů nebyla provedena analýza počtu průduchů u tohoto mutantu společně s ostatními. Pro porovnání charakteristického fenotypu mutantu *epf1,2* tedy v Obr. 5 a Obr. 6 přikládám výsledky z jiného pokusu při optimální intenzitě světla ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).



Obr. 5 – Počet průduchů (SD) mutantních rostlin se zahrnutou skupinou *epf1,2* mutantů. Chybové úsečky znamenají směrodatnou odchylku průměru z pěti rostlin a celkem 25 listových plošek. Různá písmena vyjadřují statistickou odlišnost genotypů v rámci adaxiální strany listu (velká písmena) a abaxiální strany listu (malá písmena) při optimální intenzitě světla ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).



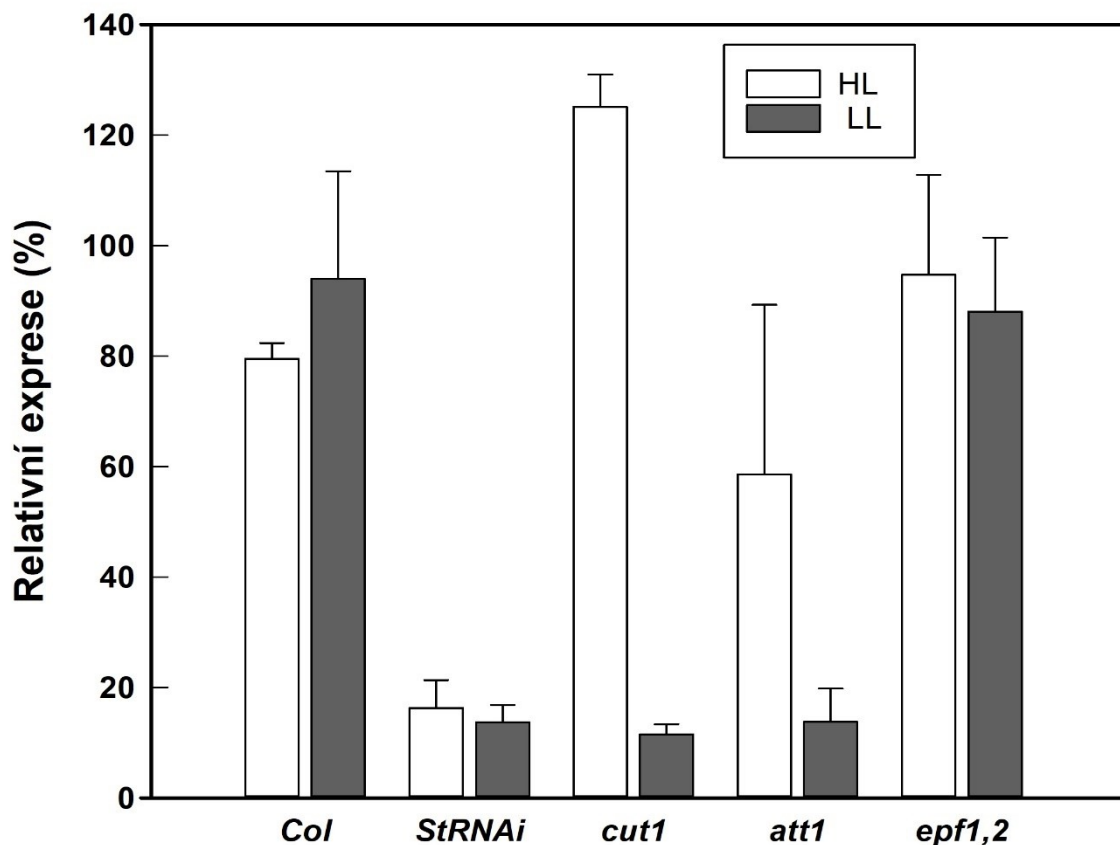
Obr. 6 – Průduchový index (SI) mutantních rostlin se zahrnutou skupinou *epf1,2* mutantů. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku průměru z pěti rostlin a celkem 25 listových plošek. Různá písmena vyjadřují statistickou odlišnost genotypů v rámci adaxiální strany listu (velká písmena) a abaxiální strany listu (malá písmena) při optimální intenzitě světla ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

4.1.3 Analýza exprese genů

Dále byly stanoveny hodnoty relativní míry exprese dvou vybraných genů nutných pro vývoj průduchů, a to STOMAGENu (EPFL9) a EPF2. Oba jsou popsány výše v textu.

4.1.3.1 STOMAGEN

Výsledky míry exprese tohoto genu jsou vyobrazeny na Obr. 7, kde jsou srovnány relativní míry exprese oproti kontrolní skupině rostlin Col-0.

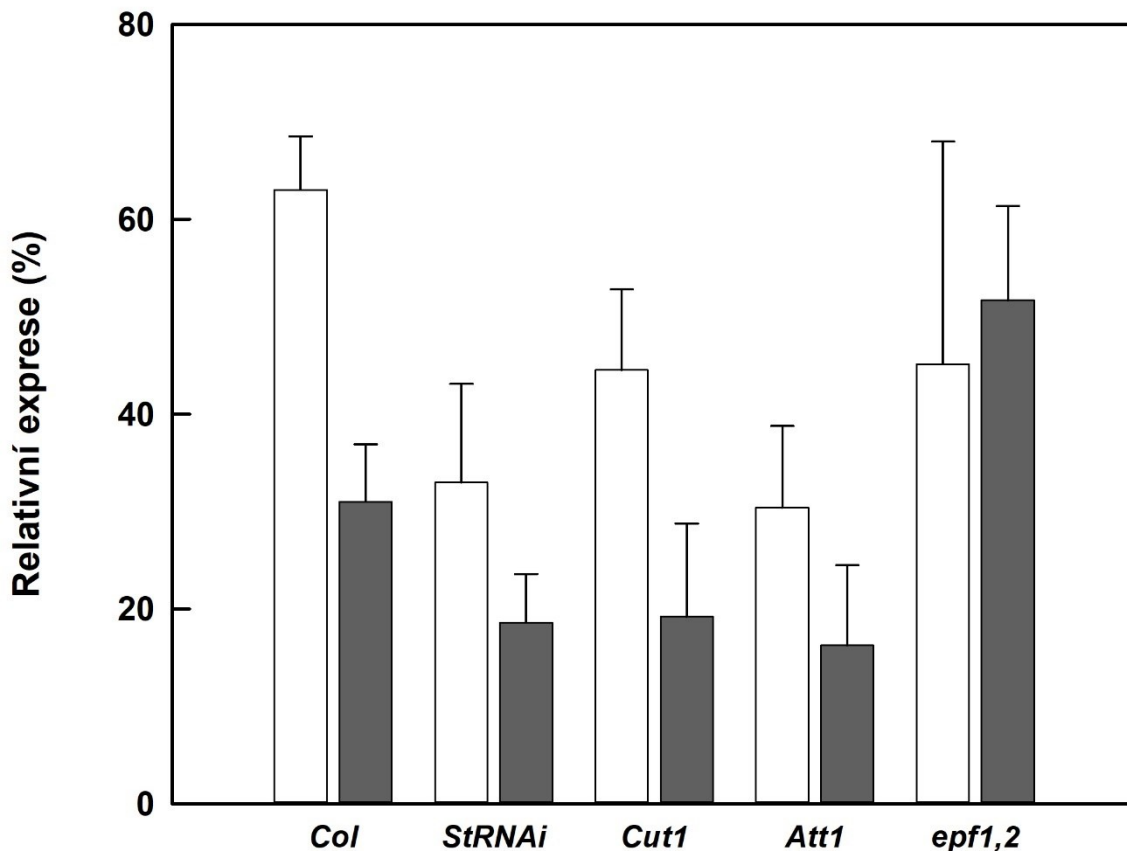


Obr. 7 – Relativní míra exprese STOMAGENU u ekotypu Columbia a mutantních rostlin. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku průměru tří reakcí ze tří různých biologických vzorků, u kterých byla qPCR prováděna. HL = vysoké světlo ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), LL = nízké světlo ($80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

StRNAi mutant vykazuje statisticky významné snížení exprese *STOMAGENU*. Bez ohledu na úroveň světla. Výraznou reakci na světlo ukázal mutant *cut1*, kdy při vysokém světle měl zvýšenou expresi *STOMAGENU*, avšak nízké světlo jeho expresi silně inhibovalo. *att* mutant zato měl nižší expresi *STOMAGENU* v obou úrovních světla. Mutant *epf1,2* má lehce zvýšenou expresi *STOMAGENU*, která se neliší v závislosti na světle.

4.1.3.2 EPF2

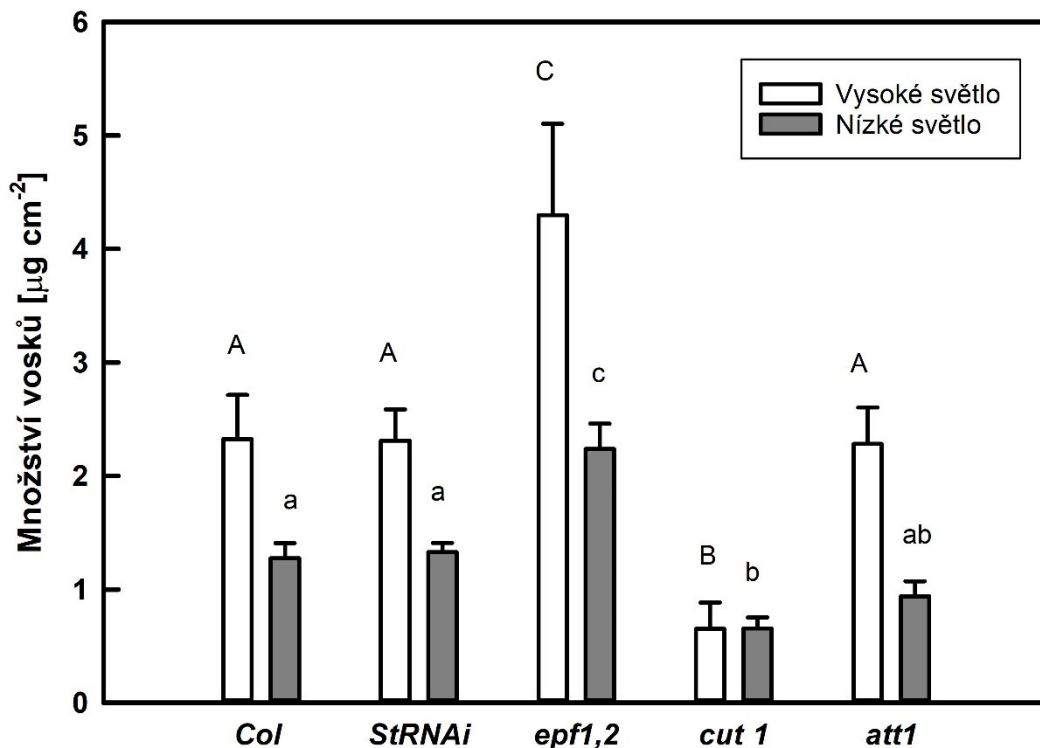
Podobný graf pro gen *EPF2* je na Obr. 8, exprese je opět vyjádřena relativními hodnotami ve srovnání s kontrolní skupinou (ekotyp Columbia při vysokém světle). Exprese *EPF2* byla vesměs nižší na nízkém světle. Výrazné snížení exprese *EPF2* bylo zaznamenáno opět u *att1* mutanta, relativně menší a nezávislá na světle se ukazuje exprese v listech *epf1,2*.



Obr. 8 – Relativní míra exprese genu EPF2 u mutantů a kontroly. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku průměru tří reakcí ze tří biologických vzorků. Bílý sloupec = vysoké světlo ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), šedý sloupec = nízké světlo ($80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

4.1.4 Analýza vosků

V rámci tohoto pokusu zde ukazujeme pouze celkové množství všech epikutikulárních vosků smytých z celých listů (obou stran) přepočtené na plochu listu bez dělení do chemických skupin, a to pro oba světelné režimy. Analýza byla provedena J. Neuwirthovou v laboratoři L. Schreibera na univerzitě v Bonnu. Výsledky jsou vidět na Obr. 9. Pokud se zastavíme u míry osvětlení rostlin, bylo zjištěno, že mutant v *CUTI* jako jediný nereaguje na změnu světla, jinde vidíme signifikantní rozdíly. Mutant se sníženou expresí genů *EPF1* a *2* jako jediný vykázal vyšší množství epikutikulárních vosků oproti kontrole v obou světelných režimech v souladu s vyšším počtem průduchů a zvýšeným SI. K ověření byla použita jednocestná ANOVA. Pro vysoké světlo u rostliny s posílenou expresí *EPF* vyšla testová statistika $F(4,1) = 14,58$, $p = 0,019$. Pro nízkou hladinu světla byla dosažena hodnota $F(4,1) = 41,65$, $p < 0,01$.

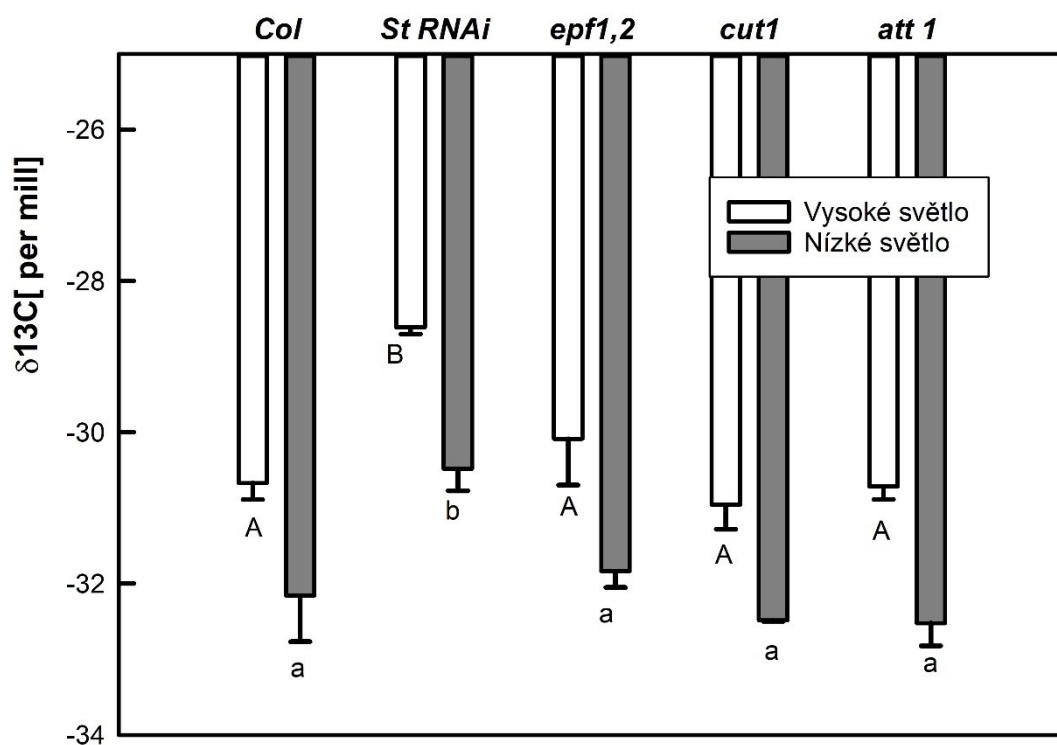


Obr. 9 – Graf ukazuje celková množství epikutikulárních vosků na obou stranách celých listů *Arabidopsis thaliana*. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku průměru tří nezávislých biologických vzorků. Různá písmena představují statisticky významně odlišné hodnoty odděleně pro vysoké světlo ($250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ – velká písmena a nízké světlo ($80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) – malá písmena.

4.1.5 Výsledky izotopové analýzy

Analýzy izotopového poměru $\delta^{13}\text{C}$ byly provedeny v laboratoři KEBR Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity. Výsledky jsou vyneseny do grafu na Obr. 10.

Pro provedení analýz variance byl tento soubor dat rozdělen na rostliny pěstované na vysokém a nízkém světle zvlášť. F statistika jednocestné ANOVY pro vyšší hladinu ozáření vyšla následovně: $F(4,13) = 20,32$, $p < 0,001$. Následný Bonferroni-Holmův posthoc test ukázal na signifikantní rozdíl oproti kontrolní Columbii pouze u jednoho mutanta, a to u *StRNAi*, $p < 0,0001$ při požadované kritické hodnotě 0,006. Ostatní se v hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ nelišily od kontrolních rostlin ekotypu Columbia.



Obr. 10 - Graf ukazuje hodnoty izotopového poměru δ izotopu ^{13}C u různých mutantních rostlin ve srovnání s kontrolními rostlinami ekotypu Columbia při dvou úrovních osvětlení (HL odpovídá ozáření 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a LL 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Sloupce jsou průměrem hodnot ze 3 biologických vzorků sušiny listů. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku průměru.

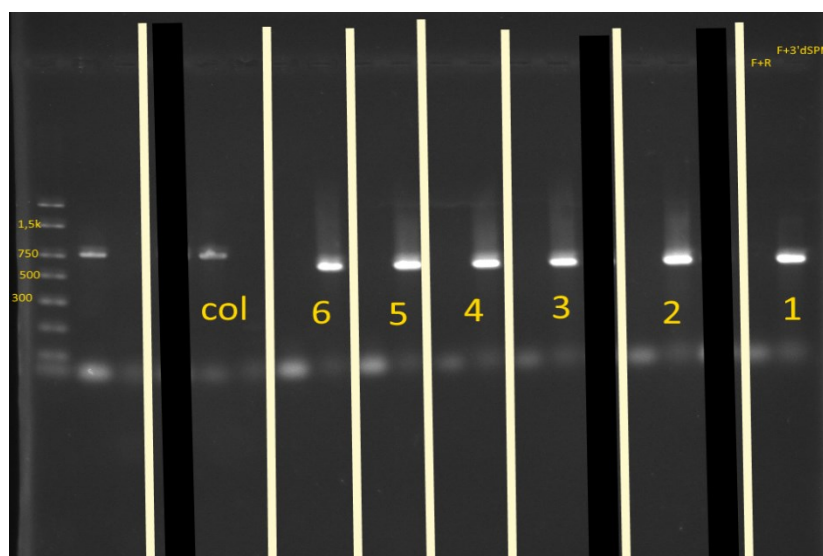
Pro nižší hladinu osvětlení vyšly podobné výsledky – $F(4,130 = 22,08, p < 0,0001$. Bonferroni-Holmův posthoc test zjistil signifikantní rozdíl opět pouze u *StRNAi*, a to signifikancí $p = 0,0005$ při požadované kritické hodnotě 0,006. Z těchto analýz můžeme vyvodit, že vnitřní koncentrace CO_2 v listu se snížila pouze u mutantu *StRNAi* s výrazně sníženým množstvím průduchů. Kutikulární mutanti a překvapivě ani dvojitý *epf1,2* mutant se nelišili statisticky významně od kontrolních rostlin Col-0.

4.2 Výběr linií s homozygotní mutací v genu *HIC*

4.2.1 Linie SM

Semena mutantní linie SM byla získána z laboratoře prof. Julie Gray a prof. Stuarta Cassona z Univerzity v Sheffieldu, VB. Ačkoliv bylo deklarováno, že se jedná o homozygotní linii s mutací v genu *HIC*, chtěli jsme si ověřit, že se skutečně jedná o homozygotní mutantní linii. Ověření jsme provedli na vzorcích DNA z jednotlivých rostlin metodou PCR s následnou vizualizací produktů reakce na agarózovém gelu, jak je popsáno v metodologii. Vzhledem ke

stáří semen a horší klíčivosti bylo vypěstováno pouze 6 rostlin, které byly otestovány genotypovacími primery (viz tabulka v kapitole Materiál a metody). Snímek výsledného elektroforetického gelu je zachycen na Obr. 11. Všech 6 rostlin je tedy homozygotních v mutaci v genu *HIC*.

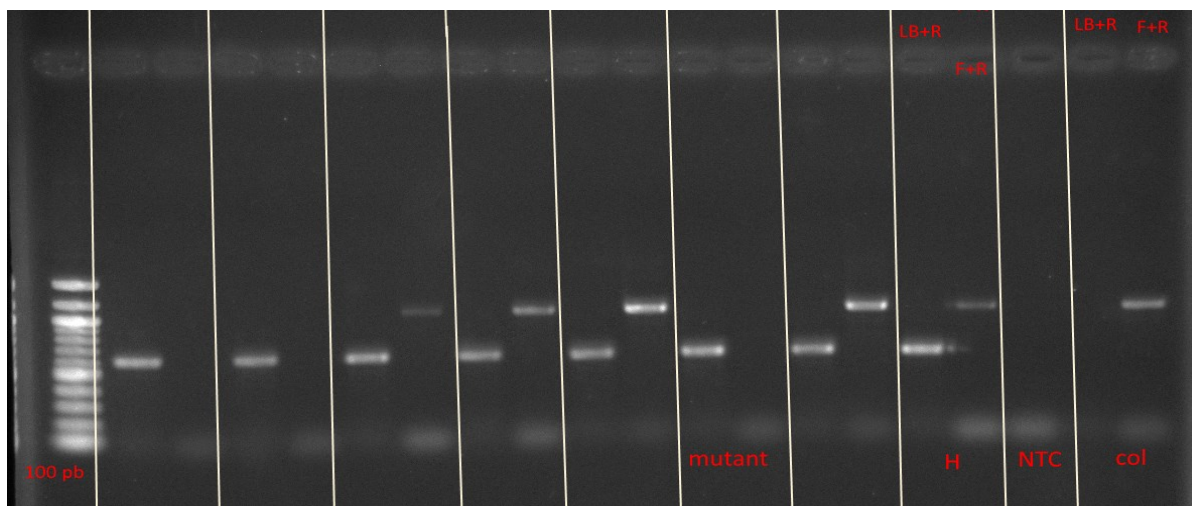


Obr. 11 - Snímek elektroforetického gelu zachycující PCR produkty genotypování mutantní linie SM. Col je kontrolní rostlina ekotypu Columbia bez mutace. Čísla označují jednotlivé rostliny. V každé části oddělené světlou čarou jsou PCR reakce z izolátu jedné rostliny. Vpravo byla nanesena reakce detekující mutantní konstrukt, vlevo reakce detekující wild-type alelu. V každé části oddělené světlou čarou jsou PCR reakce z izolátu jedné rostliny. Vpravo byla nanesena reakce detekující mutantní konstrukt, vlevo byla nanesena reakce detekující wild-type alelu.

Všech 6 rostlin je tedy homozygotních v mutaci.

4.2.2 Linie SAIL

Semena linie SAIL205 E06 pochází z NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre), semenné banky ve Velké Británii. Semena měla dobrou klíčivost, proto bylo získáno několik desítek rostlin. Na Obr. 12 je ukázka jednoho z několika elektroforetických gelů, který byl získán při genotypování mutantů této linie stejně jako v případě předchozí linie s využitím specifických primerů (viz tabulka v kapitole Materiál a metody). Bylo získáno více než deset homozygotních mutantů, vytvořili jsme si tedy homozygotní mutantní linii v genu *HIC*, kterou budeme dále používat v našich pokusech.



Obr. 12 - Snímek elektroforetického gelu zachycující PCR produkty genotypování mutantní linie SAIL. Část označená „mutant“ slouží jako ukázka záchytu homozygotního mutantu v HIC, část označená „H“ zobrazuje záchyt heterozygotní rostliny, kde je mutační konstrukt pouze v jedné alele. Col je kontrolní rostlina ekotypu Columbia bez mutace. NTC označuje kontrolu bez templátu, kdy byla do reakce místo vzorku přidána voda.

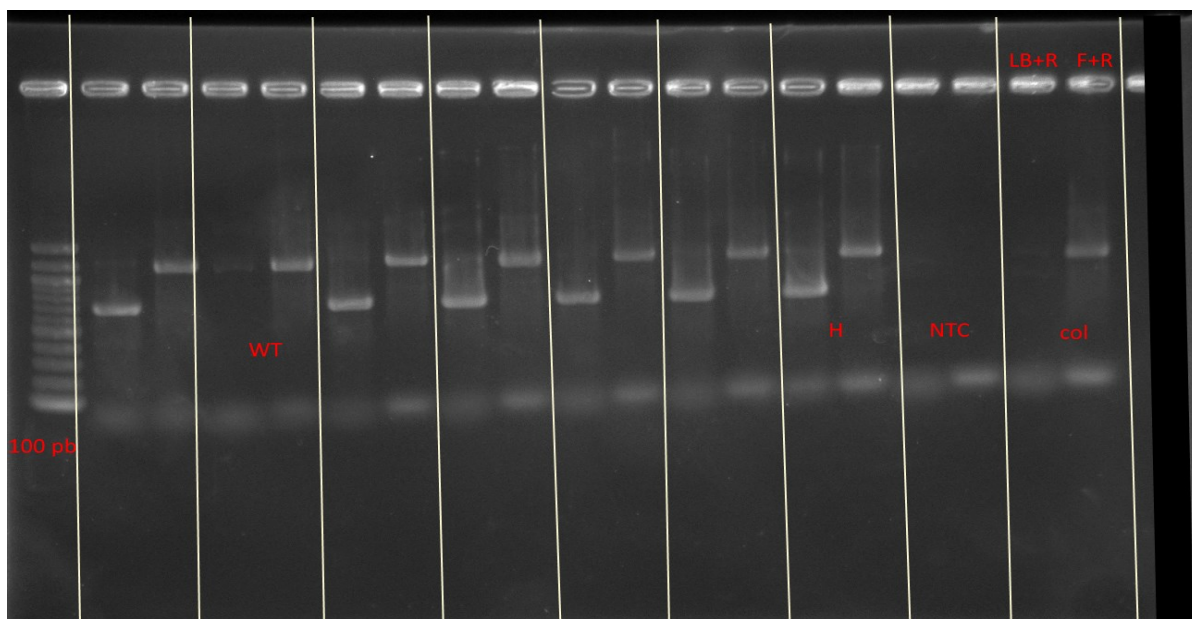
4.2.3 Linie SALK

K dispozici jsme měli dvě linie SALK (SALK 024901 a SALK 144809) z NASC (Nottingham, VB). Rostliny dobře klíčily a rostly. Při genotypování bylo zjištěno, že dodaná semena neobsahovala homozygotního mutantu. V linii SALK 024901 byla většina rostlin bez mutantní alely, v případě SALK 144809 jsme našli většinu heterozygotů. Ukázka gelu je na Obr. 13. Pokud bychom chtěli z této linie získat mutantní homozygotní linii, museli bychom počkat do další generace. Semena heterozygotů znovu vyset a testovat, zda se nám vyšťepí recesivní homozygot.

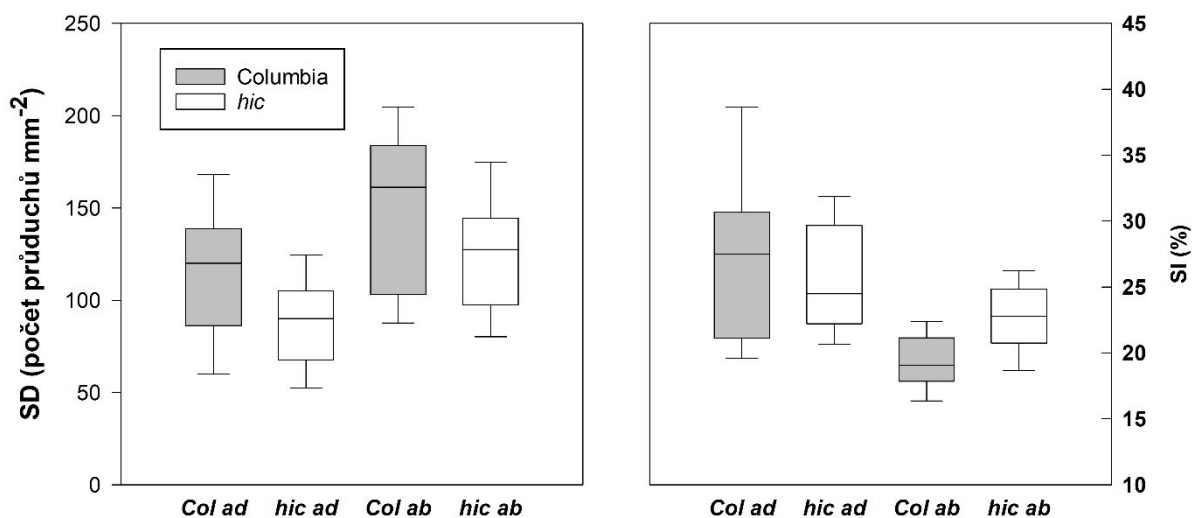
4.3 Fenotyp *hic* mutantů za atmosférických podmínek

4.3.1 Počet průduchů ve srovnání s wt rostlinou

Pro upřesnění mi byla poskytnuta data o počtu průduchů u mutantní linie SM v genu *HIC*. Z nich zpracovaný graf je na Obr. 14.



Obr. 13 - Snímek elektroforetického gelu zachycující PCR produkty genotypování mutantní linie SALK 144809. část označená „H“ představuje heterozygotní rostliny, kde je mutační konstrukt pouze v jedné alele. WT označuje nemutovanou rostlinu vypěstovanou ze semen mutantní linie. Col představuje kontrolní rostlinu ekotypu Columbia. NTC označuje kontrolu bez templátu, kdy byla do reakce místo vzorku přidána voda.

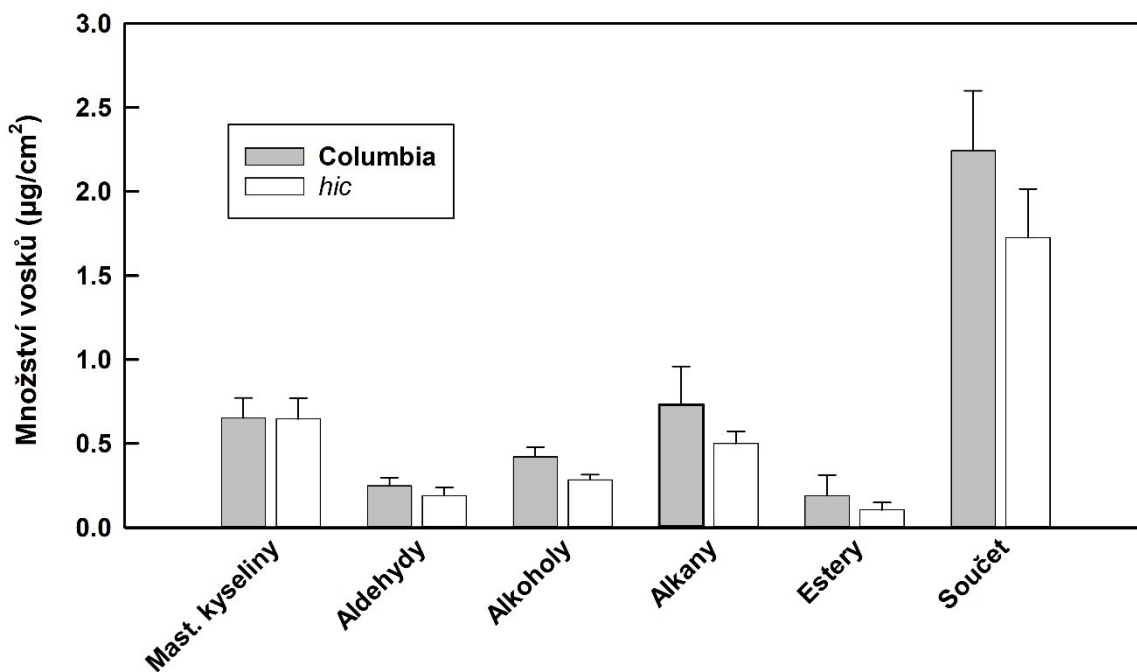


Obr. 14 – Data o stomatální densitě a stomatálním indexu u kontrolní rostliny a u mutanta v genu HIC. Čára v boxplotu znázorňuje medián, box zobrazuje standardní odchylku a úsečky znázorňují 1,5násobek kvartilu, tzn. mezikvartilové rozpětí.

4.3.2 Analýza vosků

V rámci práce byly mimo jiné vyhledávány mutantní rostliny defektní v genu *HIC/KCSI3*, který kóduje 3-ketoacyl-CoA syntázu 13. Již dříve publikovaný efekt je popsán v souhrnu literatury. Výsledky analýzy našich mutantních rostlin jsou na Obr. x. Analýza byla

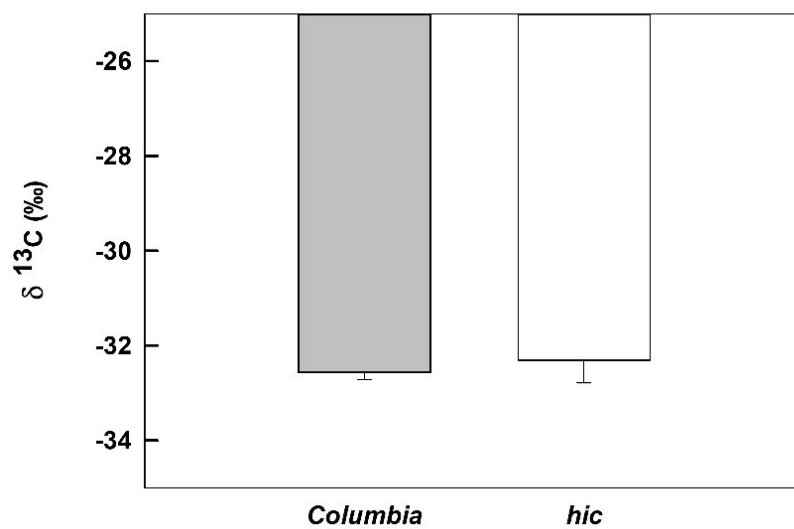
provedena J. Neuwirthovou v laboratoři L. Schreiber na univerzitě v Bonnu (Německo). Výsledky analýzy našich mutantních rostlin jsou na Obr. 15. Mutant obsahuje méně vosků a z konkrétního složení lze vyčíst, že je to na úkor všech součástí kromě mastných kyselin.



Obr. 15 – Graf znázorňuje množství jednotlivých součástí kutikuly u genotypu wt Columbia a u mutantů defektních pro tvorbu HIC/KCS13. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku průměru tří biologických vzorků.

4.3.3 Izotopová analýza

Na Obr. 16 je vynesena graf ukazující míru diskriminace ^{13}C . Rozdíl mezi kontrolním genotypem a mutantem v *HIC* není průkazný. K porovnání průměrů byla použita jednocestná ANOVA. Hodnota F testové statistiky $F(1,4)=0,83$, $p=0,41$.



Obr. 16 - Graf porovnává množství izotopu ^{13}C vztažené ke kontrole u *Columbia* a mutantu *HIC*. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku průměru tří hodnot, ze kterých byl počítán průměr.

5 Diskuze

5.1 Vliv světla na vývoj průduchů a kutikuly

Je známo, že vývoj průduchů je závislý mimo jiné i na podmínkách vnějšího prostředí, v nichž rostliny rostou. Vzájemné interakce s molekulárními drahami řídicími vývoj průduchů uvádí například revue Han a Torii (2016). Jedním z nejdůležitějších faktorů je světlo, jeho intenzita i spektrální složení. Vliv intenzity světla jsme zde použili jako nástroj ke změně počtu průduchů u mutantů z kategorie „průduchových“ a „kutikulárních“.

Kontrolní rostliny genotypu Col-0 reagovaly podle očekávání na zvýšenou intenzitu světla významným zvýšením hustoty průduchů i průduchového indexu. Mutant s potlačenou expresí *STOMAGENu*, který má významně sníženou hustotu průduchů na listu (zhruba čtvrtina ve srovnání s kontrolními wt rostlinami ekotypu Col-0) i průduchový index (Sugano et al., 2010), reagoval i v našem pokusu na světlo méně než rostliny kontrolní v souladu s již publikovanými výsledky (Hronková et al., 2015), přesto si zachoval rozdíl v počtu průduchů i průduchovém indexu mezi oběma úrovněmi světla. Rozdíl jde vidět hlavně při vyjádření pomocí density, kdy mají wt rostliny pěstované na vyšším světle 2,5krát více průduchů, zato u *StRNAi* mutantů rozdíl nedosahuje ani dvojnásobku.

Dvojnásobný mutant v genech pro negativní EPF faktory (*EPF1* a *EPF2*) *epf1,2* má naopak zhruba dvojnásobnou hustotu průduchů na listu (Obr. 5) a zvýšený průduchový index (Obr. 6). Změna v počtu průduchů je u mutantu *epf1,2* v našich pokusech spojena také s významnou změnou ve složení kutikuly. Rostliny mají významně větší množství epikutikulárních vosků než kontrola či ostatní mutanti při obou úrovních světla (Obr. 9). Množství epikutikulárních vosků (Obr. 9) je výsledkem měření J. Neuwirthové v laboratoři prof. L. Schreibra v Bonnu. V literatuře jsou sice uvedena obecná tvrzení o změnách kutikuly v závislosti na světle, ale konkrétní data pro *Arabidopsis* jsme nenalezli. Ukazuje se, že se zvýšením počtu průduchů u rostlin pěstovaných na vysokém světle je spojeno rovněž se zvýšením množství epikutikulárních vosků u všech testovaných genotypů ve srovnání s nízkou intenzitou světla (Obr. 9).

U „kutikulárního“ mutantu *cut1* (*cer6*) s narušenou syntézou vosků, který byl popsán Millarem et al., (1999) a charakterizován v Sadler et al., 2016, kde se uvádí 2,4násobné snížení množství epikutikulárních vosků, vidíme v regulaci vývoje průduchů výrazně sníženou reakci na světlo ve srovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 3). Tento mutant tvoří méně průduchů na

vysokém světle, ale počet průduchů na nízkém světle je dotčený minimálně. Na rozdíl od něj mutant v syntéze kutinu *att1*, popsáný Xiao et al. (2004), jehož Sadlerová et al. (2016) charakterizuje 2,3násobným snížením množství kutinu v kutikule a jen nevýznamným rozdílem v obsahu epikutikulárních vosků, se chová z hlediska vývoje průduchů velmi podobně jako wt rostliny ekotypu Columbia. Co se týká množství epikutikulárních vosků, byly výsledky našich analýz ve shodě s těmi, které se uvádí v Sadler et al., 2016. Podle našich výsledků tedy změna v množství epikutikulárních vosků souvisí s vývojem průduchů a rostliny defektní v jejich syntéze méně reagují na zvýšení intenzity světla ve srovnání s rostlinami kontrolními, a to jak v hustotě průduchů a průduchovém indexu, tak i v množství syntetizovaných epikutikulárních vosků (Obr. 3, 4 a 9).

Měřili jsme také relativní míru exprese *STOMAGENu* (EPFL9), což jediný známý pozitivní EPFL faktor, a EPF2 negativní faktor, a to pomocí qPCR. Tyto geny jsou součástí regulační dráhy pro vývoj průduchů, a zatímco *STOMAGEN* patrně souvisí s vnímáním světla rostlinou (Hronková et al, 2015), je EPF2 spojován s vnímáním koncentrace CO₂ (Engineer et al., 2014). Proto také byly v pokusu použity mutanti v těchto genech k ovlivnění počtu průduchů na listu. Expres *STOMAGENu* se ukázala být ovlivněna i u kutikulárních mutantů, exprese byla inhibována u rostlin pěstovaných na nízkém světle (Obr. 7). U EPF2 byl vliv světla na expresi nižší (Obr. 8), ale bude potřeba získané výsledky potvrdit opakováním pokusu.

Je tedy možné, že jsou dráhy pro vývoj průduchů a kutikuly, obzvláště pro syntézu epikutikulárních vosků, nějak propojené? A mohou být dráhy propojeny skrze regulaci některého z těchto epidermálních faktorů? Žádné literární zdroje na toto téma se nám nepodařilo nalézt, mechanismus případného spojení vývoje epidermis a kutikuly není znám. Jediným literárním pramenem popisujícím vzájemnou interakci vývoje kutikuly a epidermis je několik prací z přelomu tisíciletí o úloze genu *HIC*, což je jeden člen rozsáhlé rodiny KCS (kóduje 3-ketoacylkoenzym A syntázu). Rostlina díky genu *HIC* reaguje na vysokou koncentraci CO₂ v okolní atmosféře zvýšením počtu průduchů a průduchového indexu ve srovnání s kontrolními rostlinami, které na vysokou koncentraci CO₂ reagují naopak snížením počtu průduchů (Gray et al., 2000).

U *CUT1* bylo již dříve zjištěno, že reaguje na intenzitu světla (Qin et al., 2007), ale nebylo to dáno do dalších souvislostí. V našem pokusu mutant *cut1* skutečně produkoval stejné množství vosků nezávisle na světle, tento gen tedy může fungovat jako jakýsi „detektor“

okolního světla pro další procesy. *CUTI* zasahuje do elongace buněk přes aktivaci syntézy ethylenu (Qin et al., 2007). *CUT1* (*CER6*) je dalším členem rodiny KCS (*KCS6*). Na rozdíl od genu *HIC* (*KCS 13*), který je patrně exprimován jen ve svěřacích buňkách průduchů, syntéza *CUTI*(*CER6*) je lokalizována v epidermis.

STOMAGEN je podle Konda et al., 2010 a Sugana et al., 2010 produkován v mezofylu, čímž se mezofyl podílí na regulaci vývoje a utváření pokožky a možná i kutikuly. STOMAGEN může být teoreticky ovlivňován na své cestě k cílovému receptoru nejen na úrovni transkripce, ale i na posttranskripční či posttranslační úrovni.

Podle dostupných údajů geny *EPF1* i *EPF2* aktivují MAP kinázu MPK6, zatímco STOMAGEN ji inaktivuje, všechny tyto faktory zasahují do regulace vývoje průduchů soutěží o vazebné místo na komplexu membránového receptoru (Jewaria et al., 2013). Jiný efekt těchto epidermálních faktorů samotných dosud nebyl popsán, na druhou stranu MPK6 kináza, na kterou působí, je značně multifunkční protein. Z mnohých funkcí bych zde vyzdvihl reakce na UV-B, kdy je *mpk6* mutant méně citlivý na UV-B stres (González Besteiro et al., 2011). Zároveň kutikula dokáže účinně chránit rostlinu před UV zářením (Jansen et al., 1998). Byl pozorován i efekt expozice UV-B světlu, kdy bylo zaznamenáno vyšší množství vosků na listech. UV záření tedy tvorbu voskové vrstvy stimuluje (například Steinmüller and Tevini, 1985). To naznačuje, že by se teoreticky mohlo jednat o nějaký vedlejší mechanismus ochrany. Bohužel ale práce Gonzálezové-Besteirové neobsahuje data o obsahu vosků v kutikule, takže neznáme v tomto smyslu fenotypový projev jejích mutantů.

5.2 Vliv počtu průduchů na izotopovou diskriminaci uhlíku ($\delta^{13}\text{C}$)

Je známo, že koncentrace CO_2 v listu není dána jen množstvím CO_2 v okolní atmosféře, ale například i intenzitou světla. I proto byly provedeny analýzy izotopového složení uhlíku sušiny rostlinné biomasy listů ($\delta^{13}\text{C}$) jako indikátor vnitřní koncentrace CO_2 . Rozdíl oproti kontrole při stejné intenzitě světla nebyl nalezen ani u *att1* (mutanta v syntéze kutinu), ani u *cut1* mutanta (v tvorbě epikutikulárních vosků). A dokonce ani u dvojitého mutanta *epf1,2*, který má výrazně více průduchů i epikutikulárních vosků, jsme nezaznamenali statisticky významnou změnu izotopového poměru $\delta^{13}\text{C}$. Tento fakt je zajímavý, pokud přihlídneme k rozdílnému počtu průduchů kontrolních rostlin a průduchových mutantů. Jednou z možných variant je, že rostliny *epf1,2* mají průduchy částečně přivřené nebo mají rychlejší fotosyntézu a spotřebovávají více CO_2 . Rychlost fotosyntézy jsme neměřili.

Jedině *StRNAi* mutant vykazuje zvýšení $\delta^{13}\text{C}$ a tedy sníženou koncentraci CO_2 v listu ve srovnání s rostlinami kontrolními, což můžeme odvodit z Farquharovy teorie izotopové diskriminace. K tomuto jevu dochází u rostlin, které rostou ve stresových podmínkách, vliv na to mají environmentální faktory, převážně míra osvětlení a sucho, dále i například zasolení či přítomnost škodlivin v ovzduší, jako je ozon či oxid siřičitý (Farquhar et al., 1989). Naše rostliny byly pěstovány v ideálních a standardních podmínkách (v hydroponii), proto lze předpokládat, že nebyly vystaveny stresu. Nabízí se logické vysvětlení, že počet průduchů je nízký, a tudíž do rostliny proudí díky tomu méně CO_2 . Za snížením $\delta^{13}\text{C}$ u všech genotypů na vysokém světle ve srovnání s nízkým světlem stojí zvýšená rychlost fotosyntézy. Malá změna počtu průduchů u „kutikulárních“ mutantů a ani změna ve struktuře kutikuly nevedla ke změně $\delta^{13}\text{C}$ a tedy ani vnitřní koncentrace CO_2 . Také je třeba vzít v úvahu, že se jedná o nepřímou metodu stanovení vnitřní koncentrace CO_2 .

5.3 Charakteristika fenotypu *hic* mutantů

Grayová ve svém článku z roku 2000 uvádí zvýšení počtu průduchů u voskového mutantu *hic*, zvláště za zvýšené koncentrace CO_2 v okolní atmosféře, na níž kontrolní wt rostliny reagují snížením počtu průduchů. V našich pokusech jsme neovlivňovali množstvím CO_2 v okolní atmosféře, rostliny jsme pěstovali při atmosférické koncentraci CO_2 .

Byl hodnocen fenotyp mutantu defektního v genu *HIC*. Ukazuje se, že tento mutant má poněkud méně epikutikulárních vosků, mírné snížení jednotlivých složek jsme zaznamenali s výjimkou mastných kyselin (Obr. 15). Výsledky analýzy vosků nebyly v původní práci provedeny. Co se týká hustoty průduchů, u našich *hic* rostlin byla na obou stranách nižší než u kontrol, ale průduchový index byl na abaxiální straně vyšší ve srovnání s Columbií, což koresponduje s výsledky v Gray et al., 2000. U většiny starších prací jsou uváděny jen hodnoty počtu průduchů (SD) a SI na abaxiální, tedy dolní straně listu. Malá změna v počtu průduchů neměla odezvu ve změně $\delta^{13}\text{C}$.

Uvádí se, že se *HIC* exprimuje pouze ve svěracích buňkách, je tedy zajímavé se zamyslet nad tím, co a čemu tedy signalizuje. Z dostupných dat nelze zjistit, jestli je právě sám *HIC* tím faktorem, který reguluje průduchy, nebo se tak děje sekundárně díky jinému složení vosků. Nepodařilo se dohledat, jestli se *HIC* exprimuje v protodermálních buňkách, které dávají vzniknout průduchům, případně jak tyto buňky na *HIC* reagují. Na druhou stranu se průduchy zdají jako strategické místo, kde detekovat množství CO_2 v okolí, a to vzhledem k tomu, že tudy CO_2 do rostliny vstupuje.

6 Závěr

Provázání různých biochemických a molekulárně-biologických dějů je nezbytnou součástí fyziologie všeho živého. Nekontrolovaný růst, zbytečná inhibice, nepoměr různých soustav, nekoordinovaný příjem živin, to je jen pár příkladů, kdy nespolečná vede k výraznému omezení fitness či k zániku organismu včetně rostlin. Úkolem této práce bylo sledování vzájemného ovlivňování počtu (hustoty) průduchů a struktury kutikuly (množství epikutikulárních vosků), a to u *Arabidopsis thaliana* genotypu Col-0 a u rostlin s mutací v genech souvisejících s vývojem průduchů (*StRNAi* a *epfl,2*) i kutikuly (*cut1*, *att1*).

Testovány byly rostliny s výrazně sníženým počtem průduchů, se zvýšeným počtem průduchů, rostliny s defektem v genu pro syntézu epikutikulárních vosků a s defektem v genu pro syntézu kutinu. Dále byly započaty práce s mutantem v genu *HIC*, u nějž byl před dvaceti lety popsán vliv kutikuly na vývoj průduchů v závislosti na vnějším prostředí. Porovnávány byly rostliny pěstované při dvou různých intenzitách osvětlení – na vysokém světle při $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a na nízkém světle při $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

V rámci práce bylo zjištěno několik zajímavých skutečností. U rostlin, které byly pěstovány při vyšší hladině osvětlení, s čímž souvisí vyšší množství průduchů, bylo zjištěno, že mají na svých listech více vosků. Tento efekt ale nebyl pozorován u rostlin s mutací v genu *CUTI* pro syntézu 3-ketoacyl syntázy. Tento mutant je také méně citlivý na světlo. Na druhou stranu se mutace v genech pro tvorbu kutikuly neprojevují významnými změnami v počtu průduchů.

U mutantů se zvýšeným počtem průduchů díky mutaci v EPF faktorech byla zjištěna také významná změna v množství kutikulárních vosků. Tyto změny byly dány do molekulárně-biologických souvislostí, ty naznačují, kam se zaměřit v dalším výzkumu vzájemného ovlivňování těchto dvou struktur. Dále bylo zjištěno, že výrazné snížení průduchového indexu/hustoty mutací ve *STOMAGENU* vede k ovlivnění izotopového poměru $\delta^{13}\text{C}$ v sušině biomasy listů a, což svědčí pro nízkou koncentraci CO_2 v mezofylu.

Nakonec naše první testy mutantů *hic*, u nichž se v literatuře uvádí změna ve vývoji průduchů při zvýšené koncentraci CO_2 , které byly v rámci této práce vyselektovány, ukázaly mírné snížení množství epikutikulárních vosků oproti kontrole, provázené mírným zvýšením průduchového indexu na abaxiální straně listu, a to bez vlivu na izotopovou diskriminaci uhlíku.

7 Zdroje

- Bird, S.M., Gray, J.E., 2003. Signals from the cuticle affect epidermal cell differentiation. *New Phytologist* 157, 9-23.. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00543.x
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169-193.. doi:10.1677/jme.0.0250169
- Casson, S.A., Franklin, K.A., Gray, J.E., Grierson, C.S., Whitelam, G.C., Hetherington, A.M., 2009. Phytochrome B and PIF4 Regulate Stomatal Development in Response to Light Quantity. *Current Biology* 19, 229-234.. doi:10.1016/j.cub.2008.12.046
- Cernusak, L.A., Ubierna, N., Winter, K., Holtum, J.A.M., Marshall, J.D., Farquhar, G.D., 2013. Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants. *New Phytologist* 200, 950-965.. doi:10.1111/nph.12423
- Desikan, R., 2003. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany* 55, 205-212.. doi:10.1093/jxb/erh033
- Edwards, D., Read, D.J., Duckett, J.G., Renzaglia, K.S., Joel Duff, R., Nickrent, D.L., Garbary, D.J., 2000. Vegetative and reproductive innovations of early land plants: implications for a unified phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355, 769-793.. doi:10.1098/rstb.2000.0615
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19, 1349.. doi:10.1093/nar/19.6.1349
- Engineer, C.B., Ghassemian, M., Anderson, J.C., Peck, S.C., Hu, H., Schroeder, J.I., 2014. Carbonic anhydrases, EPF2 and a novel protease mediate CO₂ control of stomatal development. *Nature* 513, 246-250.. doi:10.1038/nature13452
- Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R., Hubick, K.T., 1989. Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 503-537.. doi:10.1146/annurev.pp.40.060189.002443
- Farquhar, G.D., O'Leary, M.H., Berry, J.A., 1982. On the Relationship Between Carbon Isotope Discrimination and the Intercellular Carbon Dioxide Concentration in Leaves. *Functional Plant Biology* 9, 121-137.. doi:10.1071/PP9820121
- Fiebig, A., 2000. Alterations in CER6, a Gene Identical to CUT1, Differentially Affect Long-Chain Lipid Content on the Surface of Pollen and Stems. *THE PLANT CELL ONLINE* 12, 2001-2008.. doi:10.1105/tpc.12.10.2001
- Frechijia, S., Zhu, J., Talbott, L.D., Zeiger, E., 1999. Stomata from npq1, a Zeaxanthin-less Arabidopsis Mutant, Lack a Specific Response to Blue Light. *Plant and Cell Physiology* 40, 949-954.. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029627
- Girard, A.-L., Mounet, F., Lemaire-Chamley, M., Gaillard, C., Elmorjani, K., Vivancos, J., Runavot, J.-L., Quemener, B., Petit, J., Germain, V., Rothan, C., Marion, D., Bakan, B., 2012. Tomato GDSL1 Is Required for Cutin Deposition in the Fruit Cuticle. *The Plant Cell* 24, 3119-3134.. doi:10.1105/tpc.112.101055
- González Besteiro, M.A., Bartels, S., Albert, A., Ulm, R., 2011. Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1 and its target MAP kinases 3 and 6 antagonistically determine UV-B stress tolerance, independent of the UVR8 photoreceptor pathway. *The Plant Journal* 68, 727-737.. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04725.x
- Gray, J.E., Holroyd, G.H., van der Lee, F.M., Bahrami, A.R., Sijmons, P.C., Woodward, F.I., Schuch, W., Hetherington, A.M., 2000. The HIC signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature* 408, 713-716.. doi:10.1038/35047071
- Gudesblat, G.E., Schneider-Pizoń, J., Betti, C., Mayerhofer, J., Vanhoutte, I., van Dongen, W., Boeren, S., Zhiponova, M., de Vries, S., Jonak, C., Russinova, E., 2012. SPEECHLESS integrates brassinosteroid and stomata signalling pathways. *Nature Cell Biology* 14, 548-554.. doi:10.1038/ncb2471

- Han, S.-K., Torii, K.U., 2016. Lineage-specific stem cells, signals and asymmetries during stomatal development. *Development* 143, 1259-1270.. doi:10.1242/dev.127712
- Hara, K., Yokoo, T., Kajita, R., Onishi, T., Yahata, S., Peterson, K.M., Torii, K.U., Kakimoto, T., 2009. Epidermal Cell Density is Autoregulated via a Secretory Peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis Leaves. *Plant and Cell Physiology* 50, 1019-1031.. doi:10.1093/pcp/pcp068
- Hauke, V., Schreiber, L., 1998. Ontogenetic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Hedera helix* L.) sun and shade leaves. *Planta* 207, 67-75.. doi:10.1007/s004250050456
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 7276-7280.. doi:10.1073/pnas.88.16.7276
- Hronková, M., Wiesnerová, D., Šimková, M., Skůpa, P., Dewitte, W., Vráblová, M., Zažímalová, E., Šantrůček, J., 2015. Light-induced STOMAGEN-mediated stomatal development in Arabidopsis leaves. *Journal of Experimental Botany* 66, 4621-4630.. doi:10.1093/jxb/erv233
- Hsiao, T.C., Allaway, W.G., Evans, L.T., 1973. Action Spectra for Guard Cell Rb+ Uptake and Stomatal Opening in *Vicia faba*. *PLANT PHYSIOLOGY* 51, 82-88.. doi:10.1104/pp.51.1.82
- Jansen, M.A.K., Gaba, V., Greenberg, B.M., 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* 3, 131-135.. doi:10.1016/S1360-1385(98)01215-1
- Jewaria, P.K., Hara, T., Tanaka, H., Kondo, T., Betsuyaku, S., Sawa, S., Sakagami, Y., Aimoto, S., Kakimoto, T., 2013. Differential Effects of the Peptides Stomagen, EPF1 and EPF2 on Activation of MAP Kinase MPK6 and the SPCH Protein Level. *Plant and Cell Physiology* 54, 1253-1262.. doi:10.1093/pcp/pct076
- Kerstiens, G., 1996. Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany* 47, 1813-1832.. doi:10.1093/jxb/47.12.1813
- Kolattukudy, P.E., 2001. Polyesters in Higher Plants, in: *Biopolyesters, Advances In Biochemical Engineering/biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1-49.. doi:10.1007/3-540-40021-4_1
- Kondo, T., Kajita, R., Miyazaki, A., Hokoyama, M., Nakamura-Miura, T., Mizuno, S., Masuda, Y., Irie, K., Tanaka, Y., Takada, S., Kakimoto, T., Sakagami, Y., 2010. Stomatal Density is Controlled by a Mesophyll-Derived Signaling Molecule. *Plant and Cell Physiology* 51, 1-8.. doi:10.1093/pcp/pcp180
- Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lu, S., Joubes, J., Jenks, M.A., 2009. The Impact of Water Deficiency on Leaf Cuticle Lipids of Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY* 151, 1918-1929.. doi:10.1104/pp.109.141911
- Kraus, D., 2014. Consolidated data analysis and presentation using an open-source add-in for the Microsoft Excel® spreadsheet software. *Medical Writing* 23, 25-28.. doi:10.1179/2047480613Z.000000000181
- Kriedemann, P.E., Loveys, B.R., Fuller, G.L., Leopold, A.C., 1972. Abscisic Acid and Stomatal Regulation. *PLANT PHYSIOLOGY* 49, 842-847.. doi:10.1104/pp.49.5.842
- Lake, J.A., Quick, W.P., Beerling, D.J., Woodward, F.I., 2001. Signals from mature to new leaves. *Nature* 411, 154-154.. doi:10.1038/35075660
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402-408.. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Merced, A., Renzaglia, K.S., 2017. Structure, function and evolution of stomata from a bryological perspective. *Bryophyte Diversity and Evolution* 39, 7-20.. doi:10.11646/bde.39.1.4
- Millar, A.A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E.M., Taylor, D.C., Kunst, L., 1999. CUT1, an Arabidopsis Gene Required for Cuticular Wax Biosynthesis and Pollen Fertility, Encodes a Very-Long-Chain Fatty Acid Condensing Enzyme. *THE PLANT CELL ONLINE* 11, 825-838.. doi:10.1105/tpc.11.5.825

- Owczarzy, R., Moreira, B.G., You, Y., Behlke, M.A., Walder, J.A., 2008. Predicting Stability of DNA Duplexes in Solutions Containing Magnesium and Monovalent Cations. *Biochemistry* 47, 5336-5353.. doi:10.1021/bi702363u
- Pighin, J.A., 2004. Plant Cuticular Lipid Export Requires an ABC Transporter. *Science* 306, 702-704.. doi:10.1126/science.1102331
- Pillitteri, L.J., Dong, J., 2013. Stomatal Development in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* 11, 16.. doi:10.1199/tab.0162
- Pulsifer, I.P., Kluge, S., Rowland, O., 2012. Arabidopsis LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1), LACS2, and LACS3 facilitate fatty acid uptake in yeast. *Plant Physiology and Biochemistry* 51, 31-39.. doi:10.1016/j.plaphy.2011.10.003
- Qin, Y.-M., Hu, C.-Y., Pang, Y., Kastaniotis, A.J., Hiltunen, J.K., Zhu, Y.-X., 2007. Saturated Very-Long-Chain Fatty Acids Promote Cotton Fiber and Arabidopsis Cell Elongation by Activating Ethylene Biosynthesis. *THE PLANT CELL ONLINE* 19, 3692-3704.. doi:10.1105/tpc.107.054437
- Qin, Y.-M., Hu, C.-Y., Pang, Y., Kastaniotis, A.J., Hiltunen, J.K., Zhu, Y.-X., 2007. Saturated Very-Long-Chain Fatty Acids Promote Cotton Fiber and Arabidopsis Cell Elongation by Activating Ethylene Biosynthesis. *THE PLANT CELL ONLINE* 19, 3692-3704.. doi:10.1105/tpc.107.054437
- Roelfsema, M.R.G., Hanstein, S., Felle, H.H., Hedrich, R., 2002. CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *The Plant Journal* 32, 65-75.. doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01403.x
- Ruszala, E. M., Beerling, D. J., Franks, P. J., Chater, C., Casson, S. A., Gray, J. E., Hetherington, A. M., 2011. Land Plants Acquired Active Stomatal Control Early in Their Evolutionary History. *Current Biology* 21, 1030-1035.. doi:10.1016/j.cub.2011.04.044
- Sadler, C., Schroll, B., Zeisler, V., Waßmann, F., Franke, R., Schreiber, L., 2016. Wax and cutin mutants of Arabidopsis: Quantitative characterization of the cuticular transport barrier in relation to chemical composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861, 1336-1344.. doi:10.1016/j.bbalip.2016.03.002
- Seo, P.J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J.-Y., Lee, Y.N., Kim, S.-G., Lee, Y.-H., Park, W.J., Park, C.-M., 2009. The MYB96 Transcription Factor Mediates Abscisic Acid Signaling during Drought Stress Response in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY* 151, 275-289.. doi:10.1104/pp.109.144220
- Shimazaki, K.-ichiro, Doi, M., Assmann, S.M., Kinoshita, T., 2007. Light Regulation of Stomatal Movement. *Annual Review of Plant Biology* 58, 219-247.. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105434
- Shpak, E.D., 2013. Diverse Roles of ERECTA Family Genes in Plant Development. *Journal of Integrative Plant Biology* 55, 1238-1250.. doi:10.1111/jipb.12108
- Schoch, P.-G., Zinsou, C., Sibi, M., 1980. Dependence of the Stomatal Index on Environmental Factors during Stomatal Differentiation in Leaves of *Vigna sinensis* L. *Journal of Experimental Botany* 31, 1211-1216.. doi:10.1093/jxb/31.5.1211
- Steinmüller, D., Tevini, M., 1985. Action of ultraviolet radiation (UV-B) upon cuticular waxes in some crop plants. *Planta* 164, 557-564.. doi:10.1007/BF00395975
- Sugano, S.S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M., Hara-Nishimura, I., 2010. Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. *Nature* 463, 241-244.. doi:10.1038/nature08682
- Šantrůček, J., Šantrůčková, H., 2018. Stabilní izotopy biogenních prvků: použití v biologii a ekologii, *Živá příroda*. Academia, Praha.
- Taiz, L., Zeiger, E., c2006. *Plant physiology*, 4th ed. ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Takada, S., Takada, N., Yoshida, A., 2013. ATML1 promotes epidermal cell differentiation in Arabidopsis shoots. *Development* 140, 1919-1923.. doi:10.1242/dev.094417
- Talbott, L.D., Zeiger, E., 1998. The role of sucrose in guard cell osmoregulation. *Journal of Experimental Botany* 49, 329-337.. doi:10.1093/jxb/49.Special_Issue.329

- Vatén, A., Bergmann, D.C., 2012. Mechanisms of stomatal development: an evolutionary view. *EvoDevo* 3.. doi:10.1186/2041-9139-3-11
- Ward, J.M., Schroeder, J.I., 1994. Calcium-Activated K⁺ Channels and Calcium-Induced Calcium Release by Slow Vacuolar Ion Channels in Guard Cell Vacuoles Implicated in the Control of Stomatal Closure. *THE PLANT CELL ONLINE* 6, 669-683.. doi:10.1105/tpc.6.5.669
- Wu, R., Li, S., He, S., Waßmann, F., Yu, C., Qin, G., Schreiber, L., Qu, L.-J., Gu, H., 2011. CFL1, a WW Domain Protein, Regulates Cuticle Development by Modulating the Function of HDG1, a Class IV Homeodomain Transcription Factor, in Rice and Arabidopsis. *The Plant Cell* 23, 3392-3411.. doi:10.1105/tpc.111.088625
- Xiao, F., Mark Goodwin, S., Xiao, Y., Sun, Z., Baker, D., Tang, X., Jenks, M.A., Zhou, J.-M., 2004. Arabidopsis CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *The EMBO Journal* 23, 2903-2913.. doi:10.1038/sj.emboj.7600290
- Yeats, T.H., Rose, J.K.C., 2013. The Formation and Function of Plant Cuticles. *PLANT PHYSIOLOGY* 163, 5-20.. doi:10.1104/pp.113.222737
- Zeiger, E., Stebbins, G.L., 1972. DEVELOPMENTAL GENETICS IN BARLEY: A MUTANT FOR STOMATAL DEVELOPMENT. *American Journal of Botany* 59, 143-148.. doi:10.1002/j.1537-2197.1972.tb10073.x
- Zeiger, E., Stebbins, G.L., 1972. DEVELOPMENTAL GENETICS IN BARLEY: A MUTANT FOR STOMATAL DEVELOPMENT. *American Journal of Botany* 59, 143-148.. doi:10.1002/j.1537-2197.1972.tb10073.x
- Zeiger, E., Talbott, L.D., Frechilla, S., Srivastava, A., Zhu, J., 2002. The guard cell chloroplast: a perspective for the twenty-first century. *New Phytologist* 153, 415-424.. doi:10.1046/j.0028-646X.2001.NPH328.doc.x
- Zeiger, E., Hepler, P.K., 1977. Light and Stomatal Function: Blue Light Stimulates Swelling of Guard Cell Protoplasts. *Science* 196, 887-889.. doi:10.1126/science.196.4292.887
- Zipper, H., 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32, e103-e103.. doi:10.1093/nar/gnh101

8 Seznam obrázků

Obr. 1 – Schéma vývoje průduchů.	6
Obr. 2 – Schéma popisující externí i interní faktory pro tvorbu průduchů.	8
Obr. 3 – Stomatální densita mutantů a kontroly.....	22
Obr. 4 – Stomatální index mutantů a kontroly.	23
Obr. 5 – Počet průduchů mutantních rostlin s <i>epf</i>	24
Obr. 6 – Stomatální index mutantních rostlin s <i>epf</i>	25
Obr. 7 – Míra exprese STOMAGENU u mutantních rostlin..	26
Obr. 8 – Míra exprese EPF2 u mutantů a kontroly..	27
Obr. 9 – Celková množství vosků.	28
Obr. 10 - Hodnoty izotopového poměru δ izotopu ^{13}C u mutantů	29
Obr. 11 – ELFO gel genotypování mutantů SM	30
Obr. 12 – ELFO gel genotypování mutantů SAIL	31
Obr. 13 – ELFO gel genotypování mutantů SALK.....	32
Obr. 14 – Data o SD a SI <i>hic</i>	32
Obr. 15 – Součásti kutikuly u <i>hic</i>	33
Obr. 16 – Izotopová diskriminace u <i>hic</i>	34