

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Experimentální biologie rostlin



**Bc. Klára Ničová**

Analýza vztahu mezi funkcí proteinového komplexu ARP2/3 a exocytózou v rostlinných buňkách

Analysis of the relationship between the function of the ARP2/3 protein complex and exocytosis in plant cells

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

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

V Praze, 12. 12. 2023

Bc. Klára Ničová

## Poděkování

Tato práce vznikla za podpory velkého množství lidí. Nejdříve bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře č. 203/204. Číslo na dveřích se změnilo, vnitřní atmosféra a lidé však zůstali stále stejně úžasní. Díky též patří členům sesterské laboratoře 002. Bylo mi ctí být součástí takto všestranně talentovaného týmu. Speciální poděkování patří všem, kteří za ty roky přinesli nepřeberné množství vynikajících dortů na naše týmová setkání.

Moc děkuji své školitelce Kateřině Schwarzerové za její vřelý přístup, osvěžující nápady a odvahu zkoušet nové věci. Také si vážím svobody, kterou mi během studia poskytla. Velký dík patří Standovi Vosolsobě za pomoc se zkrocením velkého množství dat získaných během měření dynamiky exocytózy v hypokotylech. Dále jsem vděčná Honzovi Martinkovi za sdílení zkušeností s pěstováním láček a za cenné rady týkající se mikroskopie. Jemu, a také Petře Cifrové, děkuji za diskuse ohledně pylových láček a entuziasmus, který do vědy vnášejí. Dále bych chtěla poděkovat Janě Pilátové, Báře Jelínkové, a Marii Voloshině za diskuse s vědou související i nesouvisející. Zároveň vděčím kolegům z práce za to, že mi umožnili vzít si studijní volno, aby tato práce mohla být sepsána v termínu.

Na závěr bych chtěla poděkovat svým nejbližším. Velký dík patří mým rodičům za poskytnutí střechy nad hlavou a za vše, co mě v životě naučili. Petrovi děkuji za jeho bezmeznou podporu, lásku a víru v mé schopnosti. Děkuji, že jsi můj pevný bod v chaotickém vesmíru a těším se na další dobrodružství, která nás společně čekají. Nakonec vzdávám hold tisícům semenáčků a láček Arabidopsis, které obětovaly svůj život ve prospěch vědy. Bez nich by tato práce doslova nemohla vzniknout.

## Abstrakt

Rostlinné buňky vykazují dva základní typy růstu: difuzní a vrcholový. Mutace komplexu ARP2/3, což je nukleátor aktinu, vede k fenotypickým projevům u difuzně i vrcholově rostoucích buněk. Mnohé z těchto změn, např. porucha buněčné adheze pokožkových buněk hypokotylu nebo pomalejší růst pylových láček, naznačují, že pozorované fenotypy souvisí s buněčnou stěnou. Komponenty buněčné stěny jsou do apoplastického prostoru dopravovány exocytózou. Na řízené exocytóze se podílí mnoho faktorů, z nichž jeden z nejprozkoumanějších je poutací komplex exocyst. Mutanty komplexu exocyst vykazují fenotypy v difuzně i vrcholově rostoucích buňkách, což značí, že tento poutací komplex je významný pro oba typy růstu. Podjednotka exocyst komplexu EXO84b navíc interaguje s ARP2/3 komplexem. V této diplomové práci jsem zkoumala vliv mutace podjednotek ARP2/3 komplexu na exocytózu difuzně a vrcholově rostoucích buněk pomocí sledování lokalizace a dynamiky fluorescenčně značeného markeru EXO84b-GFP. V pokožkových buňkách hypokotylu (model difuzního růstu) měl EXO84b-GFP kratší čas setrvání na plazmatické membráně v ARP2/3 mutantách oproti divokému typu. Též se mírně lišil vzor jeho lokalizace na plazmatické membráně. V pylových láčkách (model vrcholového růstu) nebylo z technických důvodů možné zkoumat dynamiku EXO84b-GFP. Proto jsem se soustředila na zonaci tohoto markeru, která se v ARP2/3 mutantech významně nelišila oproti divokému typu.

**Klíčová slova:** komplex ARP2/3, rostlinná buňka, aktinový cytoskelet, růst buňky, exocytóza, exocyst, pylová láčka, hypokotyl

## **Abstract**

Plant cells exhibit two types of growth: diffuse and apical. Mutation of the ARP2/3 complex, which is an actin nucleator, leads to phenotypic expression in both diffusely and apically growing cells. Many of these changes, such as impaired epidermal cell adhesion of hypocotyl cells or slower growth of pollen tubes, suggest that the observed phenotypes are cell wall related. Cell wall components are transported into the apoplastic space by exocytosis. Many factors are involved in controlled exocytosis, one of the most studied being the exocyst tethering complex. Mutants of the exocyst complex show phenotypes in both diffusely and apically growing cells, indicating that this complex is important for both types of growth. In addition, subunit EXO84b of the exocyst complex interacts with subunits of the ARP2/3 complex. In this thesis, I investigated the effect of mutation of ARP2/3 complex subunits on exocytosis of diffusely and apically growing cells by observing the localization and dynamics of the fluorescently labeled marker EXO84b-GFP. In epidermal hypocotyl cells (a model of diffuse growth), EXO84b-GFP had a shorter lifetime at the plasma membrane in ARP2/3 mutants compared to wild type. The pattern of its localization to the plasma membrane was also slightly different. It was not possible to examine EXO84b-GFP dynamics in pollen tubes (apical growth model) for technical reasons. Therefore, I focused on the zonation of this marker, which did not significantly differ in ARP2/3 mutants compared with wild type.

**Keywords:** ARP2/3 complex, plant cell expansion, actin cytoskeleton, exocytosis, exocyst, pollen tube, hypocotyl

# Obsah

Seznam zkratek .....	1
1. Úvod a cíle práce.....	3
2. Literární přehled.....	4
2.1 Růst rostlinných buněk .....	4
2.1.1 Difuzní růst.....	5
2.1.2 Vrcholový růst .....	6
2.2 Depozice buněčné stěny a role cytoskeletu během růstu .....	11
2.2.1 Celulóza a kalóza .....	12
2.2.2 Necelulózní polysacharidy .....	14
2.2.3 Buněčné stěna pylových láček .....	15
2.3 Exocytóza v růstu rostlinných buněk.....	17
2.3.1 Komplex exocyst v růstu rostlin.....	17
3. Materiál a metody .....	20
3.1 Rostlinný materiál.....	20
3.1.1 Kultivace rostlin .....	20
3.1.2 Křížení rostlin.....	21
3.2 Mikroskopie.....	22
3.2.1 Mikroskopie hypokotylů .....	22
3.2.2 Mikroskopie pylových láček .....	22
3.3 Obrazová analýza .....	22
3.3.1 Analýza dynamiky Exo84b-GFP v hypokotylu .....	22
3.3.2 Analýza lokalizace Exo84b-GFP v pylových láčkách .....	23
3.4 Statistická analýza .....	23
3.4.1 Statistická analýza dynamiky EXO84b-GFP v hypokotylu .....	23
4. Výsledky .....	24
4.1 Výběr markeru exocytózy .....	24
4.2 Dynamika EXO84b-GFP v hypokotylu <i>A. thaliana</i> .....	24
4.3 Pylové láčky .....	28
4.3.1 Lokalizace ARPC5 a ARPC3 v pylových láčkách .....	29
4.3.2 Lokalizace EXO84b-GFP v pylové láčce.....	31
5. Diskuze .....	36

5.1	Dynamika a lokalizace EXO84b-GFP v hypokotylu.....	36
5.1.1	Lokalizace EXO84b-GFP v hypokotylu .....	36
5.1.2	Dynamika EXO84b-GFP v hypokotylu .....	37
5.2	Kultivace a mikroskopie pylových láček.....	38
5.2.1	Lokalizace ARPC5 a ARPC3 v pylových láčkách .....	39
5.2.2	Lokalizace EXO84b-GFP v pylových láčkách.....	39
6.	Závěry .....	41
	Seznam literatury.....	42

## Seznam zkratek

AU	Artificial unit, umělá jednotka
ARP2/3	Actin related protein 2/3 komplex
AF	Aktinová filamenta
ANOVA	Analysis of variance, analýza rozptylu
ARP2	Actin-related protein 2
ARP3	Actin-related protein 3
BRK1	BRICK1, podjednotka SCAR/WAVE komplexu
BS	Buněčná stěna
CalS	Callose synthase, kalózasyntáza
CATCHR	Complexes associated with tethering containing helical rods
CESA	Cellulose synthase, celulózasyntáza
CME	Clathrin-mediated endocytosis, endocytóza závislá na klathrinu
CSC	Cellulose synthase complex, komplex celulózasyntáz
CSI1	Cellulose synthase interactive protein 1
CSLC	Cellulose synthase like-C
EMMs	Estimated marginal means, odhad marginálních průměrů
ER	Endoplazmatické retikulum
FRA1	Fragile fiber1, kinesin
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching, obnovení fluorescence po fotovybělení
GA	Golgiho aparát
GFP, RFP	Green, red fluorescent protein
GLM	Generalized linear model, zobecněný lineární model
GLMM	Generalized linear mixed model, zobecněný lineární model se smíšenými efekty
KR	Kiss and run exocytóza
LatB	Latrunculin B
LT	Lifetime, doba setrvání na membráně
MT	Mikrotubuly
MUR3	MURUS3
NAP1	Nck-Associated protein 1
NO	Nitric oxide, oxid dusnatý
NPF	Nucleation promoting factor, faktor podporující nukleaci
PIN	PIN-FORMED
PM	Plasma membrane, plazmatická membrána
PME	Pectin methylesterase, pektin methylesteráza
PMEI	Pectin methylesterase inhibitor, inhibitor pektin methylesterázy
PTL	Patrol1
QUA3	Quasimodo3
RIC	ROP-interactive CRIB motif-containing protein
ROP	Rho of plants
ROS	Reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku



SCAR	Suppressor of cAMP receptor
SDCM	Spinning disc confocal microscopy, spinning disk konfokální mikroskopie
SEC	Secretory mutant
SNARE	SNAP receptor
SVC	Secretory vesicle cluster, sekreční váčkový klasr
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TGN	Trans Golgi network
TIRF	Total internal reflection fluorescence
TPC	TPLATE complex
VAEM	Variable-angle epifluorescence microscopy
WAVE	WASP family verprolin homologous
WT	wild type, divoký typ
XXT	Xyloglucan Xylosyltransferase, xyloglukan xylosyltransferáza

# 1. Úvod a cíle práce

Rostlinné buňky nabývají rozličných tvarů, což má zásadní význam pro jejich vývoj a adaptaci na podněty prostředí. Mezi faktory, které řídí buněčnou expanzi, hraje klíčovou roli souhra cytoskeletu, sekreční dráhy a syntézy buněčné stěny. Cytoskelet, který se v rostlinách skládá z mikrotubulů a aktinových vláken, vytváří uvnitř buněk dynamickou síť. Tato síť slouží jako dráha pro vnitrobuněčný transport a také jako platforma pro interakci mnoha proteinů. ARP2/3 komplex je evolučně konzervovaný nukleátor aktinového cytoskeletu, který je po aktivaci schopen tvořit větvená aktinová vlákna, čímž přispívá k tvorbě aktinové sítě. Rostliny s mutovaným ARP2/3 komplexem mají zkroucené trichomy, kratší hypokotyly, křehčí orgány, a poruchu buněčné adheze (Mathur, Mathur, Kernebeck, et al., 2003; Pratap Sahi et al., 2017; Yanagisawa et al., 2015). Nedávno byl též v naší laboratoři objeven fenotyp v pylových láčkách (nepublikované výsledky). Všechny tyto fenotypy poukazují na narušenou rovnováhu buněčné stěny.

Rostlinné buňky vykazují různé způsoby růstu, které se dají rozdělit do dvou kategorií: difuzní a vrcholové. Příkladem těchto dvou typů růstu jsou pokožkové buňky hypokotyly a pylové láčky. Regulace těchto růstových vzorců zahrnuje složité buněčné procesy, včetně dynamické reorganizace cytoskeletu, sekrece materiálů buněčné stěny a jejich cílených modifikací. Buněčná stěna funguje jako strukturní bariéra dávající buňkám tvar. Aby rostlinné buňky mohly růst, musí se stávající buněčná stěna uvolnit a být do ní syntetizován nový materiál. Syntéza nového materiálu buněčné stěny se odehrává především v Golgiho aparátu, ze kterého je sekretován na povrch buňky exocytózou. Exocytózy se účastní řada faktorů, z nichž pro cílenou lokalizaci váčků na membránu jsou důležité poutací komplexy. Jedním z nejlépe prozkoumaných poutacích komplexů v rostlinách je komplex exocyst. Mutanty tohoto komplexu vykazují fenotypy spojené se syntézou buněčné stěny a mají obzvláště závažné projevy ve vrcholově rostoucích buňkách (Kulich et al., 2015; Marković et al., 2020; Vukašinović et al., 2017). Navíc bylo zjištěno, že podjednotka exocyst komplexu EXO84b interaguje s podjednotkami ARP2/3 komplexu (Jelínková, 2021). Pochopení interakce mezi ARP2/3 a proteiny zapojenými do exocytózy může poskytnout náhled do regulace syntézy buněčné stěny a rostlinného růstu.

## Cíle práce:

Studovat úlohu ARP2/3 komplexu v exocytóze za použití konfokální mikroskopie:

- 1) Zjistit, zda absence komplexu ARP2/3 ovlivní dynamiku a lokalizaci podjednotky komplexu exocyst EXO84b v buňkách hypokotyly
- 2) Zjistit, zda absence komplexu ARP2/3 ovlivní lokalizaci podjednotky komplexu exocyst EXO84b v pylové láčce
- 3) Studovat lokalizaci komplexu ARP2/3 v rostoucí pylové láčce

## 2. Literární přehled

### 2.1 Růst rostlinných buněk

Schopnost růst je jedním za základních znaků živých organismů. Růst může být chápán na několika úrovních od jednotlivé buňky po celý organismus. Na úrovni organismu je do růstu zapojeno i dělení buněk a zakládání nových orgánů. Tato práce však pojednává pouze o růstu na buněčné úrovni, tudíž se pod pojmem růst rozumí expanzivní růst neboli zvětšování objemu a povrchu buňky, nikoliv však buněčné dělení. Růst rostlinných buněk je specifický existencí rigidní buněčné stěny (BS), která omezuje pohyb buněk. Má-li dojít k růstu, musí být BS rozvolněna.

Expanzivní růst rostlin je výsledkem dvou procesů: elastické deformace buněk a nevratného roztažení BS (Lockhart, 1965). Tento proces vyžaduje uvolnění BS prostřednictvím souhry působení mnoha proteinů a enzymů (např. expansinů, xyloglukan endotransglukosyláz/hydroláz, pektin methylesteráz), fytohormonů (především auxinu) a cytoskeletu (Cosgrove, 2018; W. Lin et al., 2021). Pro růst rostlinných buněk je též důležitým pojmem turgor, což je tlak vakuoly proti plazmatické membráně (PM), který dává buňkám pevný tvar. Rozvolnění BS musí být následováno příjmem vody, aby byl turgor udržen (Ortega, 2023).

Rostlinné buňky mohou zaujímat množství tvarů. Přestože většina buněk jsou válcovité (například parenchymatické buňky), jiné zaujímají komplexní tvary (např. pokožkové buňky listů či trichomy). Pro vytvoření těchto tvarů musí být růst přísně regulován (shrnutí v Van Spoordonk et al., 2023). Způsob, jakým se tyto komplexní tvary tvoří je dlouhodobě předmětem zájmu vědců napříč obory, díky čemuž existuje množství modelů, které popisují fyzikální i biologické principy rostlinného růstu (shrnutí v Bidhendi & Geitmann, 2018).

Růst můžeme dělit na dvě kategorie: izotropní a anizotropní. Při izotropním růstu dochází k stejnoměrnému zvětšování objemu ve všech směrech, čímž vzniká koule. Ve vyšších rostlinách však takovéto sférické buňky nenalezneme. Sférické rostlinné buňky však lze vytvořit digescí BS při tvorbě protoplastů (Jeong et al., 2021), což dokládá význam BS pro směr růstu. Většina rostlinných buněk tudíž roste anizotropně, což znamená, že některé jejich části se zvětšují více nežli jiné. V rámci anizotropního růstu rozlišujeme difuzní a vrcholový růst. Difuzní růst se odehrává na větším povrchu, příkladem mohou být podélně se prodlužující buňky hypokotylu. Extrémem anizotropního růstu je vrcholový růst, kdy ke zvětšování dochází pouze v jediném místě, jako je tomu u pylových láček. Mezi difuzním a vrcholovým růstem existuje základní rozdíl v depozici BS. Zatímco při vrcholovém růstu je vláknitý materiál BS (celulóza) deponován rovnoběžně se směrem růstu, při difuzním růstu je celulózní složka BS deponována kolmo, čímž může docházet k podélnému prodlužování (shrnutí v Braidwood et al., 2014). Principy těchto typů růstu se též liší na molekulární úrovni, například uspořádáním cytoskeletu (Adamowski et al., 2019; Idilli et al., 2013; Qu et al., 2017).

Cytoskelet tvoří v buňce trojrozměrnou, vysoce dynamickou síť proteinů, která je nezbytná pro většinu fyziologických procesů. V rostlinných buňkách se v rámci cytoskeletu hovoří pouze o

mikrotubulech (MT) a aktinových filamentech (AF), neboť existence intermediálních filament v rostlinách zatím nebyla prokázána. Obecným znakem cytoskeletu je, že se jedná o vláknité polymery složené z globulárních podjednotek (tubulin v případě MT, aktin v případě AF), jenž jsou schopny polymerizovat a depolymerizovat. Kromě polarizace a depolymerizace jsou však možnosti cytoskeletu omezeny, proto většinu jeho funkcí a interakcí s okolím zprostředkovávají proteiny asociované s cytoskeletem. Jedním z nich je proteinový komplex ARP2/3, jehož výzkumem se zabývá naše laboratoř a tato diplomová práce.

ARP2/3 komplex je evolučně konzervovaný 220 kDa proteinový komplex složený ze sedmi podjednotek (Machesky et al., 1994; Welch et al., 1997). Podjednotky ACTIN-RELATED PROTEIN2 (ARP2) a ACTIN-RELATED PROTEIN3 (ARP3), které daly komplexu jméno, sdílí strukturní podobnost s aktinem (R. C. Robinson et al., 2001). Zbylých pět podjednotek (ARPC1-ARPC5) není příbuzných aktinu a jejich jména jsou odvozena podle jejich klesající molekulové hmotnosti (Higgs & Pollard, 2001). Základní funkce ARP2/3, tj. nukleace aktinových vláken pod úhlem 70° (Volkman et al., 2001), byla též popsána v rostlinách (Fišerová et al., 2006). Kromě ARP2/3 je nukleátorem AF v eukaryotech též rodina forminů (Xu et al., 2023). Aby byl ARP2/3 komplex funkční, musí být nejprve aktivován pomocí faktorů podporujících nukleaci (NPF, nucleation promoting factors, Yasar et al., 1999). U živočichů bylo popsáno několik rodin NPF, z nichž u rostlin se dochoval pouze SCAR/WAVE komplex (Kollmar et al., 2012). I když je komplex ARP2/3 evolučně konzervován, projev jeho mutace se mezi organismy liší. Zatímco mutace ARP2/3 u opisthokont jsou letální (Zallen et al., 2002), mutované rostliny projevují relativně mírný fenotyp, například zkroucené trichomy (S. Li et al., 2003; Mathur, Mathur, Kernebeck, et al., 2003). Důvodem tohoto rozdílu může být fakt, že ARP2/3 je u živočichů důležitý pro buněčnou motilitu, která je zásadní pro embryogenezi (Sun et al., 2013). Na rozdíl od živočichů jsou rostlinné buňky obklopeny BS, která omezuje jejich motilitu, a tudíž je jejich osud určen pozicí v rámci pletiva (Yu et al., 2017).

### 2.1.1 Difuzní růst

K difuznímu růstu může docházet v celé rovině buňky, jako je tomu v případě podélné expanze buněk hypokotylu, nebo jen na části jejich povrchu, jako je tomu v případě pokožkových buněk listů. Během difuzního růstu je důležité zajistit ukládání nové BS při zachování její anizotropie (Dauphin et al., 2022). Anizotropie umožňuje BS odlišně reagovat na napětí vyvolané turgorovým tlakem v závislosti na směru působení, což řídí směr růstu (shrnuto v Braidwood et al., 2014). V této práci používám jako model pro difuzní růst pokožkové buňky hypokotylu, což je orgán, který představuje spojovací článek mezi kořenem a vrcholem rostliny. Jelikož je hypokotyl zcela embryonálního původu, růst v něm probíhá zvětšováním již existujících buněk (Scheres et al., 1994), tudíž je ideálním modelem difuzního buněčného růstu.

Orientace celulózových mikrofibril je hlavním faktorem určujícím směr difuzního růstu; obvykle jsou kolmé na osu maximálního prodloužení (Paredes et al., 2006). Díky tomu dochází působením tlaku k roztažení celulózových vláken od sebe, a tudíž dlouhivému růstu. Přesto bylo ukázáno, že vzor ukládání celulózy se mezi sousedními buňkami podobného tvaru může lišit (Duncombe et al., 2022), proto směr ukládání celulózy pravděpodobně není jediným determinantem směru růstu. Kromě celulózy hraje v dlouhivém růstu hypokotylu též důležitou

roli selektivní deesterifikace pektinu v podélných stěnách (Peaucelle et al., 2015). Strukturní vlastnosti pektinu a jeho modifikací rozebírá kapitola 2.2.2.

Depozici celulózy z velké části řídí MT (Chan & Coen, 2020), což bude detailněji popsáno v kapitole 2.2.1. MT jsou většinou orientovány ve směru mechanického stresu (S. Robinson & Kuhlemeier, 2018). Proto také bývá v souvislosti s difuzním růstem největší pozornost věnována MT cytoskeletu. Přesto existují důkazy, že v difuzním růstu též hraje roli aktin. Genetické či biochemické narušení aktinového cytoskeletu má za následek zakrslé rostliny s dezorientovanou rovinou buněčného dělení (Baluška et al., 2001; Kandasamy et al., 2009). Na roli aktinu v difuzním růstu též poukazuje fenotyp ARP2/3 mutant. ARP2/3 mutanty mají kratší hypokotyly a pomaleji rostoucí kořeny a jejich pokožkové buňky listů jsou méně laločnaté (Dyachok et al., 2008; Mathur, Mathur, Kernebeck, et al., 2003; Pratap Sahi et al., 2017). Zároveň mají ARP2/3 mutanty křehčí a tenčí děložní lístky a květní stvol (Pratap Sahi et al., 2017). Bylo též ukázáno, že tyto mutanty mají narušeno cyklování auxinových přenašečů PIN (PIN-FORMED, García-González et al., 2020). Tyto poznatky naznačují, že ARP2/3 mutanty mají sníženou kapacitu transportu v rámci sekretorické dráhy. To se projevuje například jiným obratem PIN přenašečů, ale také to nejspíš ovlivňuje sekreci složek BS, což vede ke tvorbě křehčích orgánů. ARP2/3 komplex může též fungovat jako prostředník mezi AF a MT, neboť podjednotka ARPC2 váže kromě aktinu též tubulin (Havelková et al., 2015).

Dalším nukleátorem aktinu jsou forminy. Nedávno bylo zjištěno, že bazálně lokalizovaná barelovitá struktura z aktinu polymerizovaného forminem je nezbytná pro zahájení elongace hypokotyly během klíčení semen (Cui et al., 2023). Vliv aktinu regulovaného forminem a profilinem na dlouhivý růst byl též prokázán v etiolovaných hypokotylech (L. Cao et al., 2016). Na organizaci aktinu pro dlouhivý růst hypokotyly se též podílí myosiny třídy XI (C. Cai et al., 2014; Cui et al., 2023) Je možné, že aktomyosinový systém by mohl řídit polární lokalizaci organel v buňkách hypokotyly, podobně jako ve vrcholově rostoucích buňkách (Cui et al., 2023), například by mohl dopravovat cisterny Golgiho aparátu (GA) se složkami BS do blízkosti PM.

### 2.1.2 Vrcholový růst

Vrcholový (někdy nazýván též apikální) růst je výjimečný tím, že nedochází k vyrovnané expanzi buněk do všech směrů, ale buňky se prodlužují pouze v jednom místě, tj. růstovém vrcholu. Vrcholový růst je závislý na směrovaném transportu váček z GA, které dopravují do rostoucího vrcholu složky membrány a BS (N. Luo et al., 2017). Tento transport je z velké části řízen cytoskeletem spolu s cytoskeletem asociovanými proteiny (Bou Daher & Geitmann, 2011; shrnuto v R. Zhang et al., 2023). Aby docházelo k růstu pouze v jednom místě, musí být celý proces přísně regulován (shrnuto v Scholz et al., 2020).

Vrcholový růst není specifikem rostlin, nýbrž jej najdeme i v dalších fylogenetických liniích. Příkladem mohou být hyfy hub nebo výběžky neuronů. Společnými znaky pro vrcholový růst napříč fylogenetickými skupinami jsou: zonace, podélné uspořádání cytoskeletu ve směru růstu, a cytoplazmatické proudění (shrnuto v Rounds & Bezanilla, 2013). Zonace odráží způsob růstu, pro který je zásadní směrovaná sekrece materiálů BS do rostoucí špičky. Apikální zóna vrcholově rostoucích buněk je obohacená o váčky a chybí v ní velké organely, za což zde

odpovídá dynamický aktinový cytoskelet (Idilli et al., 2013; Qu et al., 2017). Na apikální zónu navazuje zóna obohacená o mitochondrie, cisterny GA, a endoplazmatické retikulum (ER). V zadní části vrcholově rostoucí buňky se hromadí velké organely jako vakuoly a plastidy (Lovy-Wheeler et al., 2007). Vzhledem k velké míře exocytózy dochází ve špičce k vkládání ohromného množství membránového materiálu, který je následně recyklován endocytózou (Richter et al., 2012). Ketellar et al. spočítali, že v pylových láčkách je takto recyklováno 79 % a v kořenových vláscích dokonce 86,7 % nově vložené membrány (2008). Důležitou rolí endocytózy je též recyklace signalizačních molekul (např. ROP [Rho of plants] GTPáz) z PM (H. Li et al., 2018).

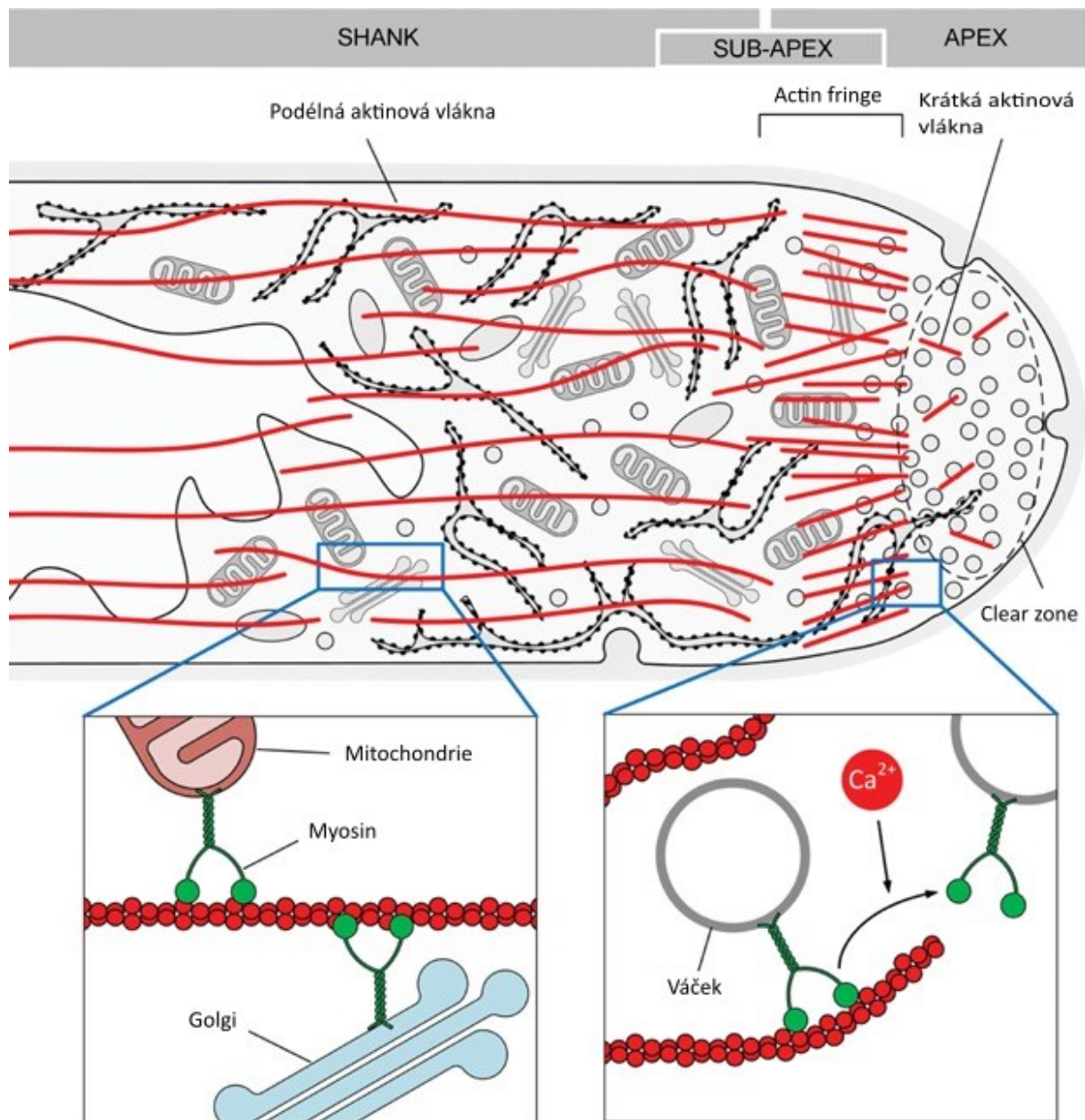
Jelikož se detaily růstu jednotlivých vrcholově rostoucích buněk liší, budu se dále zabývat pouze růstem pylových láček, které používám jako model při svých experimentech. Mezi pylovými láčkami krytosemenných a nahosemenných rostlin existují významné rozdíly (např. v rychlosti růstu, organizaci cytoskeletu a složení buněčné stěny; shrnuto v Breygina et al., 2021), proto se budu dále věnovat popisu růstu pylových láček pouze u krytosemenných rostlin, mezi něž patří též mnou zkoumaná modelová rostlina huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*).

Pylové láčky jsou zásadní strukturou pro pohlavní rozmnožování krytosemenných rostlin. Pylová láčka je výběžkem vegetativní buňky a uvnitř své cytoplazmy nese generativní spermatickou buňku či buňky (J. Zhang et al., 2017). Pylová láčka se stala oblíbeným modelem pro studium morfogeneze díky tomu, že má vcelku jednoduchou strukturu, haploidní genom, rychle roste a je kultivovatelná *in vitro* (Bloch et al., 2016). Pylové láčky jsou též zavedeným modelem výzkumu polarizované exocytózy a ukládání BS v rostlinách (N. Luo et al., 2017; R. Zhang et al., 2023).

Ve vývoji pylové láčky se odehrává několik kritických momentů. Prvně musí pylové zrno (samčí gametofyt) rozpoznat kompatibilní bliznu (samičí pletivo), následuje rychlá rehydratace pylu a klíčení láčky (Rozier et al., 2020). Láčka poté roste směrem k zárodečnému vaku, přičemž si musí razit cestu skrz pletivo čnělky a odolávat mechanickému tlaku (Burri et al., 2018). Růst je naváděn chemickými signály, které vysílá samičí pletivo (shrnuto v Mizuta & Higashiyama, 2018). Tyto signály mají za cíl navést láčku až k zárodečnému vaku, uvnitř kterého se nachází vajíčka (samičí gamety). Signalizace též zajišťuje, že do každého zárodečného vaku prorůstá pouze jedna láčka (Huck et al., 2003). V závěru své cesty, když dorazí až k samičímu gametofytu, láčka praská, čímž se uvolňují samčí gamety (Leydon et al., 2015; Mecchia et al., 2017). Celý proces od vyklíčení po průnik do zárodečného vaku trvá u *A. thaliana* při 25 °C přibližně 8–10 hodin (Kandasamy et al., 1994).

Pylová láčka je dělena na několik částí (Obrázek 1). Distální oblast láčky navazující na pylové zrno je silně vakuolizována a předělena kalózovými zátkami, díky čemuž cytoplazma proudí převážně ve vrcholové části (Franklin-Tong, 1999). Vrcholová část je rozdělena na rostoucí špičku (tip, apex), subapikální zónu (sub-apical region, subapex) a oblast za rostoucí špičkou pylové láčky (shank). Oblast v úplné špičce se nazývá „clear zone“, neboť se zde nenachází velké organely, v důsledku čehož se ve světelném mikroskopu jeví prázdná (Hepler & Winship, 2015). Existence clear zone je znakem rostoucích láček, neboť tato zóna mizí v momentě, kdy

láčka přestává růst (Qu et al., 2017). Spermatické buňky (či buňka v závislosti na rostlinném druhu) a jádro vegetativní buňky se nachází v oblasti za rostoucí špičkou (J. Zhang et al., 2017).



Obrázek 1 - V pylových láčkách se nachází tři různá uspořádání aktinových vláken: podélné svazky, „actin fringe“ a krátká aktinová vlákna ve špičce. Myozin pohání pohyb organel podél aktinových svazků. Sekreční váčky se hromadí ve vrcholové oblasti a větší organely jsou vyloučeny filtrační aktivitou actin fringe. Váčky mohou být poháněny myosinem, cytoplazmatickým prouděním nebo difúzí. Vysoká koncentrace vápníku ve vrcholu může inaktivovat myosin a podpořit rozpad aktinu, čímž se váčky uvolňují. Upraveno podle G. Cai et al., 2015.

Pylové láčky nerostou rovnoměrně, nýbrž ve vlnách, přičemž tato oscilace je závislá na mikrotubulárním i aktinovém cytoskeletu (Geitmann et al., 1996; Vidali et al., 2001). V souladu s tím na PM též oscilují regulátory aktinu (Lee et al., 2008; Zhou et al., 2015) a během růstu též dochází k oscilacím polarizované exocytózy (Bove et al., 2008; McKenna et al., 2009). K exocytóze pravděpodobně dochází po celé délce láčky, ovšem neaktivnější je v samotné

špičce (N. Luo et al., 2016), což dokazuje i směrovaný transport materiálu BS do této oblasti (Bloch et al., 2016; N. Luo et al., 2017). Stejně tak k endocytóze dochází po celé délce láčky (Kaneda et al., 2019), přičemž pro vrcholový růst je zřejmě zásadní endocytóza v subapikální zóně, která udržuje zonaci růstových regulátorů (H. Li et al., 2018; Röckel et al., 2008).

Pro růst pylových láček je významných několik signalizačních drah. Hlavními signály jsou hladina reaktivních forem kyslíku (ROS) a oxidu dusnatého (NO), gradient  $\text{Ca}^{2+}$  a gradient pH (Potocký et al., 2012; shrnuto v Scholz et al., 2020). Tyto signály jsou přijímány skrz receptory a překládány skrz činnost malých GTPáz a fosfolipidů, výsledkem čehož je regulována organizace cytoskeletu a udržována rovnováha mezi exocytózou a endocytózou (Lassig et al., 2014; Potocký et al., 2012). To dále umožňuje přesně regulovat složení buněčné stěny tak, aby turgorový tlak působil ve směru vyžadovaném pro vrcholový růst. Pro správný růst jsou zásadní především aktin, ale roli hrají i MT (Vidali et al., 2001). Obecně je přijímáno tvrzení, že hlavní transport probíhá po AF a MT zprostředkovávají specifitější funkce (shrnuté v Chebli et al., 2013). Pohyb po AF je velmi rychlý a nepravidelný, oproti tomu po pohybu po MT je pomalejší a plynulý (Romagnoli et al., 2007).

Role MT v pylových láčkách je oproti aktinu méně prozkoumána. Depolymerizace MT pomocí mikrotubulárních drog má překvapivě malý efekt na růst pylových láček (Idilli et al., 2013; Laitiainen et al., 2002). V oblasti za rostoucí špičkou pylové láčky jsou MT organizovány do dlouhých, podélně orientovaných svazků a ve špičce tvoří krátká náhodně orientovaná vlákna (Idilli et al., 2013). Není však známo, jakou mají svazky polaritu (G. Cai, 2022). MT jsou zodpovědné za pohyb spermatické buňky a vegetativního jádra (Åström et al., 1995; Laitiainen et al., 2002). Organely izolované z pylových láček jsou schopny pohybu po *in vitro* polymerizovaných MT pomocí molekulárního motoru kinesinu, ovšem rychlost tohoto pohybu je mnohem pomalejší než v případě pohybu řízeném aktomyosinovým systémem (Romagnoli et al., 2003). Tento mikrotubulo-kinesinový systém se pravděpodobně *in vivo* v láčkách účastní transportu sekretorických váčků na krátkou vzdálenost (Romagnoli et al., 2003). Též byla navržena role MT v transportu mitochondrií, v rámci kterého kinesin zpomaluje pohyb mitochondrií rapidně se pohybujících po AF (Romagnoli et al., 2007).

Aktin je v rostoucí špičce organizován do krátkých a velmi dynamických vláken, zatímco v subapikální oblasti je možné pozorovat delší aktinová vlákna, která tvoří v kortikální zóně límcovitou strukturu nazývanou „actin fringe“ (Lovy-Wheeler et al., 2005). Zároveň se zde tvoří subpopulace jemného aktinu směřující do středu láčky (Qu et al., 2017). AF v oblasti za rostoucí špičkou pylové láčky tvoří dlouhá, silná a stabilní vlákna orientovaná rovnoběžně se směrem růstu pylové láčky (Lovy-Wheeler et al., 2007), podobně jako je tomu v této oblasti u MT. Dynamika AF ve špičce je řízena ROP1 (Rho of plants1) GTPázou skrz její interaktory RIC3 (ROP-interactive CRIB motif-containing protein) a RIC4 (Lee et al., 2008). RIC4 stabilizuje AF, což je nezbytné pro koncentraci váčků do špičky, naopak depolarizace AF pomocí RIC3 je důležitá pro splnutí váčků s membránou (Lee et al., 2008). Stále však v láčkách nebyl objeven prostředník interakce mezi RIC proteiny a aktinem.

AF hrají zásadní roli v transportu organel na dlouhou vzdálenost a též vytváří cytoplazmatické proudění (shrnuté v Chebli et al., 2013). V krytosemenných rostlinách proudí organely a váčky



ve tvaru obrácené fontány, přičemž směrem do špičky proudí v kortikální vrstvě a dovnitř se vracejí středem láčky (Bove et al., 2008; Qu et al., 2017). Jednou z hypotéz pro význam cytoplazmatického proudění v láčkách je, že obstarává dopravu organel blíže k rostoucí špičce a též recykluje staré organely a váčky s přebytečnou membránou (Rounds & Bezanilla, 2013). Při změně směru růstu láčky dochází nejdříve k reorganizaci AF a až následně k pohybu váčků do nové špičky a ohybu láčky (Qu et al., 2017). Rané pokusy s nízkými koncentracemi latrunculinu B (LatB) však ukázaly, že láčky přestávají růst dříve, nežli dojde k narušení cytoplazmatického proudění (Vidali et al., 2001). Kromě role v transportu je aktin též důležitý pro vyčlenění a udržení zón láčky (Qu et al., 2017).

V rostlinných buňkách existují dva hlavní nukleátory aktinu: ARP/3 komplex a forminy. Mutanty ARP2/3 komplexu nemají výrazný fenotyp v pylových láčkách (S. Li et al., 2003), a proto byla do nedávna pozornost věnována především forminům. Formin polymerizuje aktin na plus konci, kterým jej též kotví k membráně (Cvrčková, 2000; Ingouff et al., 2005). Jemná AF ve špičce láčky jsou převážně polymerizována tímto způsobem, díky čemuž mají stejnou polaritu (Cheung et al., 2010; Lan et al., 2018). Toho je využíváno myosiny třídy XI pro dopravu váčků na PM špičky (Qu et al., 2017). Pro udržení růstu ve špičce je důležitá buněčná stěna, která musí být měkká ve špičce a pevná po stranách, díky čemuž se působením turgoru roztahuje pouze měkká špička. Pokud je zonace tuhosti stěny narušena, dochází k zduření a deformacím špičky (Zerzour et al., 2009).

## 2.2 Depozice buněčné stěny a role cytoskeletu během růstu

Buněčná stěna (BS) vytváří komplexní extracelulární matrix okolo rostlinných buněk. Hraje zásadní roli v udržení buněčného tvaru, pevnosti pletiv, ochraně před patogeny i mezibuněčné komunikaci (Feraru et al., 2011; N. Luo et al., 2017; Underwood, 2012). Konkrétní složení BS se liší mezi rostlinnými druhy i buněčnými typy (Yokoyama, 2020). Navíc se složení BS může měnit i během vývoje jediné buňky, například během sekundárního tloustnutí (J. Wang et al., 2023). V obecné rovině je však stěna tvořena polysacharidy, glykoproteiny a proteoglykany, v sekundárních stěnách též polyfenoly. Obecně je přijímáno, že vláknité složky BS (celulóza a kalóza) dodávají stěně pevnost, zatímco hemicelulózy, a především pektiny ovlivňují její pružnost. Právě tato pružnost je základním předpokladem pro anizotropní růst (Peaucelle et al., 2015).

Polymery celulózy a kalózy vznikají přímo na membráně činností enzymů celulózasyntáz a kalózasyntáz (Amor et al., 1995). Oproti tomu zbylé složky BS vznikají v GA a do apoplastu jsou dopravovány exocytózou (shrnuto v Kim & Brandizzi, 2016). Depozice materiálů BS je řízena cytoskeletem, který navádí jednotlivé složky výrobní mašinerie na svá místa (shrnuto v Szymanski & Staiger, 2018). Rostlinné buňky ošetřené aktinovou drogou (LatB) nerostou (Baluška et al., 2001). Stejně tak je růst zastaven v mutantách genů pro myosiny třídy XI, což naznačuje vliv transportu po AF na tomto fenotypu (Peremyslov et al., 2010). Předpokládá se, že hlavním důvodem zástavy růstu je přerušování transportu k BS (Peremyslov et al., 2015). V souladu s touto hypotézou mají aktinové mutanty či rostliny ošetřené LatB v BS méně celulózy, v důsledku nepravidelné distribuce GA dopravujících CSC na PM (Sampathkumar et al., 2013).

V souvislosti s vlivem aktinu na depozici BS je zajímavý projev mutace ARP2/3 komplexu. Charakteristickým projevem mutace ARP2/3 jsou pokroucené trichomy, jež vykazují všechny mutované podjednotky s výjimkou ARPC3 (Bellinvia et al., 2022; Mathur, Mathur, Kernebeck, et al., 2003; Mathur, Mathur, Kirik, et al., 2003). Bylo prokázáno, že tento fenotyp souvisí s depozicí BS (Yanagisawa et al., 2015). Nižší obsah celulózy a vyšší obsah homogalakturonanu v BS ARP2/3 mutant byl též pozorován v pravých listech a květních stvolech *A. thaliana* (Pratap Sahi et al., 2017). Snížený obsah celulózy pravděpodobně souvisí též s pomalejším pohybem komplexů celulózasyntáz (Dubenecká, 2018). V souvislosti s BS též stojí za zmínku odlišná depozice ligninu v nadzemních částech související s akumulací auxinu (Pratap Sahi et al., 2017). Pro ARP2/3 mutanty je též charakteristická porucha adheze především v rychle rostoucích buňkách, např. etiolovaných hypokotylech (Mathur, Mathur, Kernebeck, et al., 2003) a též v pokožkových buňkách listů, především v blízkosti průduchů (Pratap Sahi et al., 2017). Podobný (i když výraznější) fenotyp poruchy buněčné adheze vykazují také mutanty v dráze biosyntézy pektinu (např. QUASIMODO2 [QUA2], J. Du et al., 2020). Navíc bylo zjištěno, že PM v rozích buněk je obohacena o aktivátory ARP2/3 komplexu BRK1 and SCAR1 a *brk1* i *arp2* vytváří v této oblasti abnormální BS (Dyachok et al., 2008).

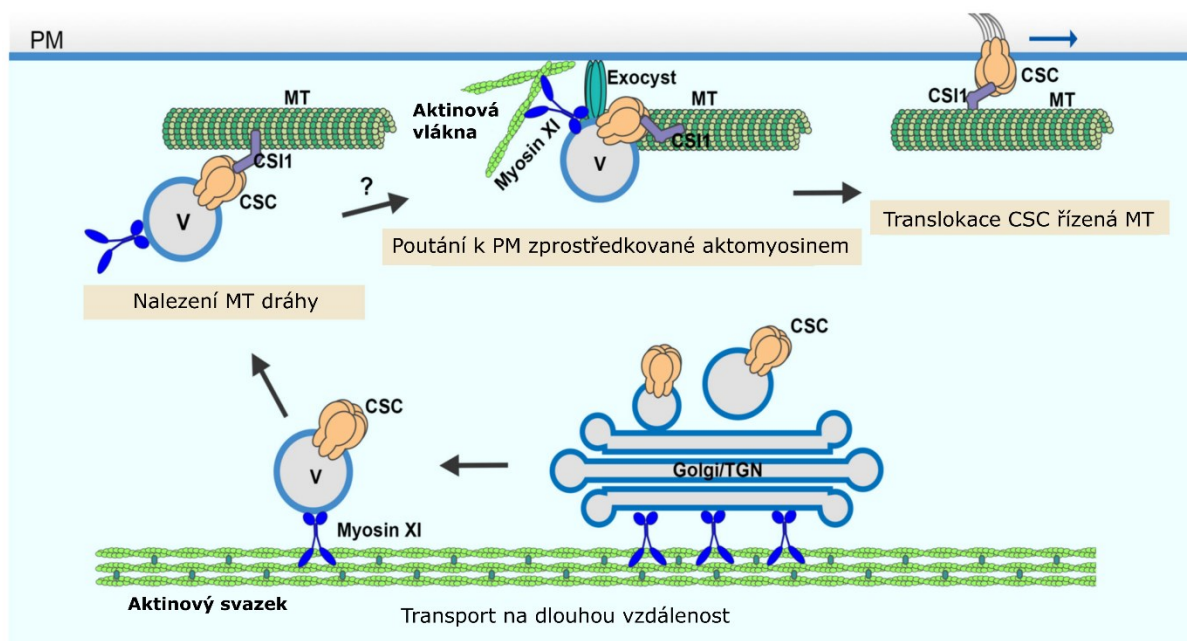
## 2.2.1 Celulóza a kalóza

Celulóza a kalóza jsou nevětvené polymery glukózy, o kterých se předpokládá, že zajišťují pevnost BS v tahu. Zatímco v celulóze jsou podjednotky glukózy propojeny  $\beta(1,4)$  vazbou, v kalóze se vyskytuje  $\beta(1,3)$  vazba. Oba polymery jsou syntetizovány enzymatickými komplexy, které svou činnost vykonávají přímo na PM (Amor et al., 1995). Tyto enzymatické komplexy jsou pravděpodobně syntetizovány v ER a poté maturují v GA, z něž jsou (nejspíš skrz trans Golgi network [TGN]) dopravovány na PM (G. Cai et al., 2011). Doprava celulózasyntáz a kalózasyntáz na PM je závislá na cytoskeletu. Aktinový cytoskelet se pravděpodobně podílí na transportu GA a váčků s komplexy na dlouhou vzdálenost, zatímco MT se pravděpodobně podílí na cílení komplexů na membránu (G. Cai et al., 2011; Chan & Coen, 2020; L. Liu et al., 2023; Parrotta et al., 2022; W. Zhang & Staiger, 2022). V následujících kapitolách bude vnitrobuněčný transport a jeho regulace cytoskeletem popsány detailněji.

Celulóza je na PM syntetizována komplexy celulózasyntáz (CSC), jejichž podjednotky jsou kódovány *CesA* geny (Kimura et al., 1999). Tyto enzymy jsou na PM dopravovány sekretorickou drahou závislou jak na AF, tak na MT (Gutierrez et al., 2009; Sampathkumar et al., 2013). Celulózové mikrofibrily jsou na PM syntetizovány podél MT (Paredez et al., 2006). Spojení mezi CSC a MT zprostředkovává protein CSII (Cellulose synthase interactive protein 1; S. Li et al., 2012). Kromě navádění CSC podél MT též existuje na MT nezávislý systém, při kterém nové CSC sledují stopy zanechané staršími CSC (pravděpodobně ve formě nascentních celulózových mikrofibril) a sledují tak jejich dráhu (Chan & Coen, 2020).

Syntéza celulózy je řízena mírou dopravy CSC na membránu a též jejich internalizací a recyklací (Y. Zhu & McFarlane, 2022). Do regulace syntézy celulózy je tudíž zapojena jak exocytóza, tak endocytóza. Mutanty v těchto dráhách syntetizují méně celulózy i přes to, že mají vyšší hustotu CSC na PM (Bashline et al., 2015; Sánchez-Rodríguez et al., 2018; X. Zhu et al., 2018). Na vině je patrně setrvávání poškozených CSC na membráně (Bashline et al., 2015).

V regulaci exocytózy CSC je implikováno mnoho proteinů (shrnuto v Y. Zhu & McFarlane, 2022), z nichž některé (např. TRAPIII) jsou obecnými regulátory TGN transportu (Rosquete et al., 2019), zatímco jiné (např. 7TM proteiny) se zdají být specifické pro transport CSC (McFarlane et al., 2021). Cílení CSC na PM se účastní AF, myosin i MT skrz interakci s CSII (Obrázek 2; L. Liu et al., 2023; W. Zhang & Staiger, 2022; X. Zhu et al., 2018)



Obrázek 2 - Model znázorňující odlišné role kortikálního cytoskeletu v sekreci CSC (komplexů celulózasyntáz). GA/TGN (Golgiho aparát/trans Golgi network) a/nebo malé váčky obsahující CSC jsou zodpovědné za dopravu CSC na plazmatickou membránu (PM). Tyto kompartmenty podstupují transport na dlouhé vzdálenosti poháněný myozinem XI, který se pohybuje podél svazků aktinových vláken umístěných v cytoplazmě. V kortikální cytoplazmě se váčky obsahující CSC spojují s kortikálními mikrotubuly (MT), které pravděpodobně označují místa vložení CSC do PM. Efektivního připoutání váček je dosaženo koordinovaným působením aktinu, myozinu XI a komplexu exocyst před následným splynutím membrán a vložení CSC do PM. Po vložení se CSC přemisťují v rovině PM po trajektoriích definovaných kortikálními MT a zároveň syntetizují celulózové mikrofibrily. CSI1: Cellulose synthase interactive protein 1; V: váček; upraveno podle W. Zhang & Staiger, 2022

Internalizaci CSC z membrány pravděpodobně zajišťuje endocytóza závislá na klathrinu (CME). V rostlinných buňkách existují dva typy adaptorových komplexů pro CME: AP2 komplex a TPLATE (Gadeyne et al., 2014; Yamaoka et al., 2013). V internalizaci CSC figurují oba systémy (Bashline et al., 2015; Sánchez-Rodríguez et al., 2018). K masivní internalizaci CSC dochází při reakci na stres. Po odeznění stresoru či adaptaci dochází k návratu CSC na PM rychlostí, za kterou nemůže být zodpovědná pouze *de novo* syntéza, tudíž se předpokládá, že endocytické CSC mají též recyklační funkci (shrnuto v Y. Zhu & McFarlane, 2022). V případě mechanismu endocytózy CSC však zůstává stále mnoho otázek, například zatím nebylo zjištěno, zda se jí účastní též endocytóza nezávislá na klathrinu (Bandmann et al., 2012).

V souhrnu z těchto experimentů vyplývá, že syntéza celulózových složek závisí na souhře endomembránového systému a cytoskeletu. Doprava CSC na membránu je především řízena aktinem a myosinem. Naopak trajektorie CSC na membráně a tím i směr depozice celulózových vláken je především pod kontrolou mikrotubulů.

Kalóza je v rostlinných buňkách syntetizována pouze ve specifických místech a situacích (shrnuto v Ušák et al., 2023). Nachází se například v sítkovicích floému, ve spirálovitých výztužích tracheid, v plasmodesmech, v pylové tetradě, mateřské buňce pylových zrn, a též v

pylových láčkách a kořenových vláscích (Barratt et al., 2011; Brodzki, 2015; Ridgeway, 1913; Shi et al., 2016; Vatén et al., 2011; Xie et al., 2011). Kalóza je rostlinami využívána jako ochranná bariéra v odpovědi na stres, například při napadení patogeny (Beffa et al., 1996). Také slouží pro vyztužení pletiv čnělky, čímž brání prorůstání nekompatibilního pylu (Dumas & Knox, 1983). Dále se kalóza objevuje během cytokineze v prvotních stádiích tvorby buněčné přepážky (Thiele et al., 2009), kde je následně degradována a nahrazena celulózou (Samuels et al., 1995).

Kalóza svou roli v životě buňky často vykonává pouze přechodně. Výjimkou jsou pylové láčky, kde má dominantní pozici. Kalóza se vyskytuje po celé délce stěny pylové láčky, kromě úplného vrcholu (Parre & Geitmann, 2005). Předpokládá se, že kalóza dodává stěnám láčky pevnost, díky čemuž turgor roztahuje pouze špičku (Parre & Geitmann, 2005). Navíc vytváří takzvané kalózové zátky, které se tvoří jako prstencovité ztloustnutí, které se dostředivě roztahuje, až se spojí a vytvoří přepážku mezi cytoplazmou v aktivně rostoucí špičce a starší částí láčky (Kapoor & Geitmann, 2023). Pro tvorbu kalózových zátek jsou též důležité, ne však nezbytné, mikrotubuly (Laitiainen et al., 2002).

Kalóza je syntetizována pomocí kalózasyntáz (CalS), které jsou stejně jako CSC lokalizovány na PM (Hong et al., 2001; Turner et al., 1998). Jelikož kalóza vykonává řadu specifických funkcí, musí být její depozice přesně regulována. Podobně jako u celulózy se i zde nabízí regulace exocytózou a endocytózou CalS. Neaktivní CalS byly nalezeny ve váčkových kompartmentech pod PM (Parrotta et al., 2022), přesto není zřejmé, zdali se jedná pouze o dopravu *de novo* syntetizovaných komplexů, nebo též o recyklaci. Spojení s cytoskeletem je v případě kalózy méně prozkoumané než u celulózy. CalS částečně kolokalizují s MT na PM, pomocí biochemických metod však nebyla pozorována přímá interakce CalS ani s aktinem, ani s tubulinem (G. Cai et al., 2011; Parrotta et al., 2022).

### 2.2.2 Necelulózní polysacharidy

Mezi necelulózní polysacharidy se řadí hemicelulózy a pektin. Hlavní rolí těchto polysacharidů je tvorba matrix, do které jsou zasazeny vlákna celulózy a též propojení těchto vláken mezi sebou. Tyto složky BS jsou syntetizovány v GA činností mnoha enzymů (Sterling et al., 2001; G. F. Zhang & Staehelin, 1992) a dopravovány na PM skrz sekretorickou dráhu (shrnuto v Hoffmann et al., 2021).

Hemicelulózy jsou chemicky rozmanitou skupinou, která zahrnuje xyloglukany, xylany, manany, glukomanany a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)-glukany (Scheller & Ulvskov, 2010). Hemicelulózy přispívají k tuhosti a odolnosti BS vůči tlaku (Cavalier et al., 2008). Pětinasobná mutace všech genů CSLC (cellulose synthase like-C) syntetizujících xyloglukan překvapivě způsobuje vcelku mírný fenotyp (zakrsklost, poškození kořenových vlásků a snížená klíčivost pylových láček) i přesto, že tyto mutanty nemají ve stěnách detekovatelný xyloglukan (Kim et al., 2020). Podobný fenotyp byl pozorován v rostlinách s mutovanými oběma geny xylosyltransferáz (XXT1 a XXT2), ve kterých též nebyl detekován xyloglukan (Cavalier et al., 2008). V kontrastu s tím má mutace galactosyltransferázy MURUS3 (MUR3), která přidává fukózu na postranní řetězce xyloglukanu, za následek extrémní zakrsklost a další vážné projevy (Kong et al., 2015). Zdá se, že pro rostliny je závažnější přítomnost nesprávně modifikovaného xyloglukanu, nežli

jeho úplná absence, jelikož trojitý mutant *xxt1/xxt2/mur3* částečně zachraňuje fenotyp *mur3* (Kong et al., 2015). Příčinou tohoto rozdílu může být také to, že *mur3* mutanty též mají problém se sekrecí xyloglukanů a pektinu a dochází k jejich hromadění v agregátech uvnitř buňky (Kong et al., 2015).

Pektin je složitý heteropolysacharid, který se nachází převážně v primární BS a mezibuněčných oblastech (středí lamele). Pektiny jsou bohaté na kyselinu galakturonovou a jsou známé svými rozmanitými funkcemi, včetně interakcí s dvojmocnými kationty ( $\text{Ca}^{2+}$ ) prostřednictvím demethylesterifikovaných skupin kyseliny galakturonové (Willats et al., 2001). Pektin přispívá ke složitým fyziologickým procesům, jako je buněčný růst a diferenciace, a určuje integritu a tuhost rostlinných pletiv (J. Du et al., 2020; Haas et al., 2020; Peaucelle et al., 2015). Pro své želírující, emulgující a antioxidační vlastnostmi jsou též pektiny cennou surovinou pro potravinářství i jiná průmyslová odvětví (shrnuto v Freitas et al., 2021).

K syntéze pektinů dochází v GA a následně jsou exocytózou dopravovány na PM (shrnuto v Hoffmann et al., 2021; Sterling et al., 2001). Pektin je do BS dopravován v methylesterifikované formě, tudíž následně musí být do BS dopraveny i pektin methylesterázy (PME) a jejich inhibitory (PMEI), které regulují esterifikační status pektinu a tím jeho vlastnosti (Bosch et al., 2005; Giovane et al., 2004). Na dopravě pektinu se zřejmě podílí sekreční váčkové klastry (SVC, secretory vesicle clusters) odvozené z TGN, které jsou charakterizovány přítomností proteinu SCAMP2 (SECRETORY CARRIER MEMBRANE PROTEIN 2, Toyooka et al., 2009). Předpokládá se, že polární exocytózu pektinu do špičky pylových láček regulují ROP GTPázy (např. ROP1, N. Luo et al., 2017). Sekreci pektinu na PM pak (alespoň v semenných obalech) napomáhá poutací komplex exocyst (Kulich et al., 2010), kterému je věnována kapitola 2.3.1. Role aktinu v transportu pektinu je relativně málo prozkoumané téma. Regulaci aktinového cytoskeletu totiž obstarává mnoho proteinů, jejichž funkce jsou často redundantní (Avisar et al., 2009; Peremyslov et al., 2010). AF však pravděpodobně tvoří dráhu, po které myosiny dopravují váčky s pektiny a enzymy pro jejich úpravu na PM. V pylových láčkách tabáku bylo ukázáno, že disrupce apikálních AF pomocí inhibitoru wortmanninu narušila polarizovanou sekreci pektin methylesterázy NtPPME1 do špičky (H. Wang et al., 2013). Zároveň se dopravy pektinů nejspíš účastní i MT skrz interakci s kinesinem FRA1 (FRAGILE FIBER 1, C. Zhu et al., 2015).

### 2.2.3 Buněčné stěna pylových láček

V pylových láčkách se vyskytuje celulóza, kalóza, hemicelulózy i pektiny (Chebli et al., 2012; Dardelle et al., 2010). Jednotlivé složky zde sledují jasnou zonaci, která je pro správný vývoj láčky nezbytná (Zerzour et al., 2009). Oproti většině rostlinných buněk je v pylových láčkách relativně málo celulózy, a naopak obsahují velké množství kalózy (Chebli et al., 2012). Po celé délce láčky je také zastoupen pektin, jehož esterifikační status je regulován v čase a prostoru (Chebli et al., 2012; N. Luo et al., 2017; Parre & Geitmann, 2005). Methylesterifikovaný pektin je omezen pouze na vrchol láčky a po stranách nalezneme deesterifikovaný pektin (Chebli et al., 2012). Předpokládá se, že tento rozdíl ve složení BS špičky a nerostoucí oblasti hraje roli v mechanické roztažnosti stěny a tím přispívá k vrcholovému růstu (N. Luo et al., 2017). V souladu s tím jsou PMEI udržovány pouze ve špičce, neboť jsou ze starších částí láčky

aktivně odstraňovány endocytózou (Röckel et al., 2008). Role aktinového cytoskeletu v endocytóze není u rostlin jasně vymezena. V difuzně rostoucích buňkách (pokožkové buňky listů) však bylo ukázáno, že se ARP2/3 komplex podílí na recyklaci proteinů z PM do endosomů (García-González et al., 2020). Pro zonaci pektinu v pylových láčkách je též důležitá signalizace integrity BS. Na této signalizaci se podílí RALF (Rapid Alkalinization Factor) peptidy interagující s kinázou Feronia (FER). Při narušení této signální kaskády se zvětšila zóna methylesterifikovaného pektinu, díky čemuž láčky předčasně praskaly (Mecchia et al., 2017).

Závěrem lze konstatovat, že buněčná stěna hraje klíčovou roli v procesu růstu a udržování celkové struktury rostlinných buněk. Růst buněčné stěny je regulován mnoha faktory, jedním z nichž je dynamika cytoskeletu. Jelikož je většina složek buněčné stěny (nebo enzymatického aparátu pro jejich tvorbu) dopravována na povrch exocytózou, bude tomuto procesu věnována následující kapitola.

## 2.3 Exocytóza v růstu rostlinných buněk

Exocytóza je proces, kterým se extracelulární materiál, membránové lipidy a proteiny dostávají na povrch buňky. Jedná se o poslední krok sekretorické dráhy, při kterém sekretorické váčky splývají s PM a jejich obsah je vypuštěn do apoplastického prostoru. Exocytózou je například doručován na povrch materiál BS a enzymy pro jeho modifikaci (Bosch et al., 2005; McKenna et al., 2009). S exocytózou též úzce souvisí endocytóza, při které je naopak náklad z extracelulárního prostoru internalizován do buňky, odkud může být buďto recyklován zpět na PM nebo degradován (shrnutí v Rodriguez-Furlan et al., 2019). Nyní převládá názor, že exocytóza a endocytóza jsou v buňkách úzce propojeny a jejich vzájemná regulace je nezbytná pro funkční ustanovení a udržení buněčné polaridy, morfogenezi a růst (shrnutí v L. Zhang et al., 2019).

Mezi hlavní faktory regulující exocytózu patří Rab GTPázy, poutací komplexy a SNARE komplexy (shrnutí v Rodriguez-Furlan et al., 2019). Rab GTPázy jsou buněčné „spínače“, které se vyskytují ve dvou stavech a fungují jako master regulátory exocytické dráhy (Mayers et al., 2017; Pang et al., 2022). Příkladem funkce Rab GTPáz v syntéze BS může být RAB-H1b, která v *A. thaliana* reguluje exocytózu CSC, pravděpodobně skrz modulaci membrán GA, v důsledku čehož mají mutanty RAB-H1b ve stěnách snížený obsah celulózy a problém s elongací buněk (He et al., 2018). Poutací komplexy slouží k zprostředkování prvotní interakce mezi váčkem a cílovou membránou a pomáhají cílit váčky na konkrétní membránu (X. Cao et al., 1998). Poutací komplexy se dělí do dvou širokých skupin: dlouhé coiled-coil proteiny a multi-podjednotkové komplexy (Bröcker et al., 2010), přičemž obě skupiny jsou zastoupeny v rostlinách (Paul et al., 2014). SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) komplexy zajišťují splynutí váčku s cílovou membránou (Söllner et al., 1993). SNARE tvoří v rostlinách velkou rodinu, jejíž členové mají rozdělené role a lokalizaci na různých membránových strukturách a jsou tak základními regulátory endomembránového transportu, potažmo celého růstu (C. Luo et al., 2022; Sanderfoot, 2007).

Kromě kompletní fúze, při které dochází k úplnému splynutí váčku s cílovou membránou existuje též tzv. „kiss and run“ exocytóza (KR). Při KR váčky nespývají úplně, ale jen co vypustí náklad, tak se zase oddělí, díky čemuž se nezvětšuje povrch membrány. Tento typ exocytózy je hojně využíván v savčích sekretorických buňkách (An et al., 2021), ale bylo též navrženo, že se podílí na růstu pylových láček (Bove et al., 2008).

### 2.3.1 Komplex exocyst v růstu rostlin

Jak je vidno, exocytózy se účastní řada faktorů, z nichž ne všechny ne všechny jsou zatím známy. Mezi jeden z nejvíce prozkoumaných faktorů v rostlinách však patří poutací komplex exocyst. Tento komplex patří do rodiny CATCHR (complexes associated with tethering containing helical rods) ze skupiny multi-podjednotkových komplexů (Bröcker et al., 2010). Jedná se o evolučně konzervovaný komplex, který se skládá z osmi podjednotek: SEC3, SEC5, SEC6, SEC8, SEC10, SEC15, EXO70, a EXO84 (Cvrčková et al., 2012; Hála et al., 2008; Heider et al., 2016). V rostlinách došlo ke zmnožení většiny podjednotek, především EXO70, který má v *Arabidopsis* 23 paralogů a existují důkazy pro jejich funkční specializaci (Cvrčková et al., 2012; Kulich et al., 2015; Synek et al., 2017). EXO84 se nachází v *A. thaliana* ve třech



variantách (Cvrčková et al., 2012). Neprozkoumanější je role EXO84b (Fendrych et al., 2010, 2013; Hématy et al., 2022), jehož fluorescenčně značený konstrukt používám jakožto marker exocytózy v této práci.

Exocyst se skládá ze dvou subkomplexů. Subkomplex I obsahuje SEC3, SEC5, SEC6 a SEC8, subkomplex II tvoří zbylé podjednotky SEC10, SEC15, EXO70 a EXO84 (Heider et al., 2016). Každý subkomplex obsahuje podjednotku, která váže lipidy. V případě subkomplexu I se jedná o SEC3, u subkomplexu II to je EXO70 (Bloch et al., 2016; Synek et al., 2021). V rostlinných buňkách, ovšem ne v živočišných, spolu tyto dvě podjednotky přímo interagují a celý holokomplex je tak na PM stabilizován v porovnání s volnou cytoplazmickou formou (Fendrych et al., 2013; Synek et al., 2021). Přesto fluorescenčně značené podjednotky vizualizované na PM tvoří velmi dynamické struktury (Fendrych et al., 2013). Tyto struktury (tečky) mají větší hustotu nežli váčky v blízkosti PM, tudíž je možné, že nesymbolizují jednotlivé exocytické události, nýbrž předpřipravený komplex na PM (Fendrych et al., 2013).

Komplex exocyst má v rostlinách řadu funkcí. Mimo jiné byla popsána jeho role v polárním růstu (Synek et al., 2006), morfogenezi (Hála et al., 2008), autofagii (Kulich et al., 2013; T. Zhang et al., 2023), obraně proti patogenům (Pečenková et al., 2011) a v budování buněčné stěny (Y. Li et al., 2017; Vukašinović et al., 2017). Převážně se jedná o evolučně konzervované funkce, neboť role exocystu v polarizovaném růstu, autofagii i obraně proti patogenům, byla prokázána také v živočišných modelech (shrnutí v Heider & Munson, 2012). Podjednotka EXO84b je důležitá pro morfogenezi vrcholové i difuzně rostoucích buněk. Mutanty EXO84b jsou zakrslé, pravděpodobně v důsledku narušené sekrece do tvořících se buněčných desek (Fendrych et al., 2010). Podobně jako ARP2/3 mutanty jsou pokožkové buňky listů *exo84b* méně laločnaté, navíc se u nich objevují výběžky BS do buňky. Trichomy *exo84b* buď chybí úplně nebo jsou deformované, a narušená je též morfologie průduchů. Velmi silný je fenotyp v pylových láčkách a mutované rostliny vykazují samčí sterilitu (Fendrych et al., 2010).

Existuje mnoho prací zabývajících se spojením mezi exocystem a BS. Bylo zjištěno, že komplex exocyst hraje roli v dopravě nových CSC na PM ve spolupráci s PATROL1 a CSII (X. Zhu et al., 2018). Exocyst při této činnosti interaguje s myosiny třídy XIK, které pravděpodobně napomáhají jeho správné lokalizaci a funkci (W. Zhang et al., 2021). Komplex exocyst též řídí dopravu CSC pro budování sekundární BS trachejí za účasti podjednotky EXO70A1 (Vukašinović et al., 2017). Tato podjednotka je též důležitá pro dopravu pektinů (Kulich et al., 2010). Exocyst též reguluje syntézu kalózy. Mutanty většiny podjednotek exocyst komplexu vytváří méně kalózy v odpovědi na patogeny (Y. Du et al., 2018; Ortmannová et al., 2022). Ze zmnožených podjednotek EXO70 hraje v depozici kalózy (pravděpodobně skrz sekreci CalS) hlavní roli EXO70H4 (Kulich et al., 2015, 2018). Komplex exocyst hraje též významnou roli v růstu pylových láček. Důkazem toho je, že rostliny s mutovaným komplexem často vykazují samčí sterilitu (Bloch et al., 2016; Fendrych et al., 2010; Hála et al., 2008).

V savcích buňkách bylo zjištěno, že sestavení holokomplexu regulují malé GTPázy (Moskalenko et al., 2003). Také v rostlinách byla pozorována regulační role ROP8 skrz podjednotku SEC5 při autofagii (Y. Lin et al., 2021). GTPáza RABE1 zase reguluje skládání komplexu exocyst během recyklace auxinového přenašeče PIN2 během cytokineze (Mayers et

al., 2017). Kromě regulace pomocí malých GTPáz exocyst též obsahuje řadu fosforylovatelných míst (Ganesan et al., 2020). V kvasinkách bylo zjištěno, že fosforylace EXO84 brání sestavení komplexu, v následku čehož dochází k blokadě exocytózy a zástavě růstu buněk (Duan et al., 2019; G. Luo et al., 2013). Fosforylace EXO84 je navíc řízena buněčným cyklem, neboť ji zprostředkovává CDK1 (cyklin dependentní kináza, Duan et al., 2019). V rostlinách jsou fosforylací regulovány některé izoformy EXO70 (Brillada et al., 2021; Saccomanno et al., 2021). Například fosforylační status EXO70B2 rozhoduje o tom, zda-li bude komplex cílen na PM či do vakuoly skrz autofagickou dráhu (Brillada et al., 2021).

Kromě kanonické role exocystu jakožto poutacího komplexu (G. Luo et al., 2014) byly pro tento komplex navrženy další funkce (vyplývající především z výzkumu na opisthokontech). V kvasinkách bylo zjištěno, že exocyst reguluje skládání a funkci SNARE komplexu (Peer et al., 2022; Yue et al., 2017). Interakce exocystu (podjednotky EXO70) s podjednotkami SNARE komplexů byla popsána i v rostlinných buňkách (Larson et al., 2020; Ortmannová et al., 2022). V živočišných buňkách bylo navíc prokázáno spojení mezi exocystem a cytoskeletem. Bylo zjištěno, že EXO70 stimuluje aktivitu ARP2/3 komplexu při tvorbě lamelopodií (J. Liu et al., 2012). EXO70 je též schopno oligomerizací navozovat zakřivení membrány nezávisle na aktinu, čímž přispívá migrační schopnosti buněk (Zhao et al., 2013). Rostlinné buňky nemigrují, ani netvoří lamelopodia (ovšem některé specializované rostlinné buňky mají schopnost tvořit výběžky). Přesto byla v rostlinách nalezena interakce ARP2/3 komplexu s podjednotkou EXO84b (Jelínková, 2021). Funkční význam této interakce však zatím nebyl objasněn. Abychom se dozvěděli více o roli aktinu a ARP2/3 v exocytóze, bylo cílem této diplomové práce analyzovat exocytotické procesy v ARP2/3 mutantách během difuzního a vrcholového růstu.

## 3. Materiál a metody

### 3.1 Rostlinný materiál

Transgenní linie rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) využité v této práci jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1 - Transgenní linie *A.thaliana* použité v rámci této diplomové práce

	<b>Linie</b>	<b>Pozadí</b>	<b>Promotor</b>	<b>Zdroj/autor</b>
L1	EXO84b-GFP	WT	pEXO84b	Fendrych et al., 2010
L2	<i>arp2</i> :EXO84b-GFP	<i>arp2</i>	pEXO84b	Křížení s L1
L3	<i>arp4</i> :EXO84b-GFP	<i>arp4</i>	pEXO84b	Křížení s L1
L4	<i>arp5</i> :EXO84b-GFP	<i>arp5</i>	pEXO84b	Křížení s L1
L5	<i>nap1</i> :EXO84b-GFP	<i>nap1</i>	pEXO84b	Křížení s L1
L6	C3-GFP	<i>arp3</i>	pUBQ	E. Kollárová (nepublikováno)
L7	C5-GFP	<i>arp5</i>	pUBQ	E. Kollárová (nepublikováno)
L8	Lifeact-GFP	WT	pUBQ	E. Kollárová

#### 3.1.1 Kultivace rostlin

Kultivace rostlin *A. thaliana* probíhala v kultivační místnosti za teploty 23 °C a při fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Rostliny rostly jednotlivě v rašelinných peletách (jiffy). Jiffy byly rehydratované ve vodě s přidavkem hnojiva Kristalon o koncentraci 1 g/l. Rostliny exprimující fluorescenční marker byly vysety *in vitro* na agarové plotny a po týdnu kultivace přeneseny do *ex vitro* podmínek na jiffy. Před přenesením *ex vitro* byly selektovány dle kvality fluorescence na mikroskopu Olympus Provis AX70.

##### 3.1.1.1 *In vitro* kultivace

Pro *in vitro* kultivaci byla semena sterilizována následujícím protokolem. Nejprve byla semena vystavena krátkému působení 95% EtOH (30-60 s). Následně byla 10 minut promyta v 50% roztoku bělidla SAVO. Po uplynutí 10 minut bylo SAVO odpipetováno a zkumavka se semeny 4x promyta ultra čistou destilovanou vodou. Celý proces sterilizace semen probíhal v laminárním boxu.

Semena následně podstoupila stratifikaci při 4 °C trvající minimálně 2 dny. Po stratifikaci byla sterilizovaná a stratifikovaná semena rovnoměrně vyseta na plastovou Petriho misku s kultivačním médiem (Tabulka 2). Misky byly zalepeny chirurgickou samolepící páskou a přeneseny do kultivační místnosti s teplotou 23 °C a fotoperiodou 16 hodin světlo/8 hodin tma a kultivovány v šikmé poloze.

Tabulka 2 - Kultivační medium pro *A. thaliana* (minimální MS medium), hodnoty pro 1l media, pH upraveno na 5,7 pomocí KOH.

Složka	Množství (pro 1 l media)
Sacharóza	10 g
Agar (Duchefa Biochemie, P1001)	8 g
MS soli (Merck, M5524)	2,2 g

### 3.1.1.2 Kultivace pylových láček

Pylové láčky *A. thaliana* byly kultivovány na tuhém médiu (Tabulka 3) podle Boavida a McCormick (2007). Médium bylo před použitím ohřáto v mikrovlnné troubě. Kapka teplého klíčícího média byla pipetou nanesena na mikroskopické sklíčko a přibližně po 30 sekundách překlopena krycím sklíčkem, čímž se vytvořila rovná plocha. Krycí sklíčko bylo odstraněno a povrch média byl jemně potřen čerstvě nasbíranými otevřenými květy, aby se uvolnila pylová zrna. Na jeden vzorek bylo použito 3–5 květů ze stejné rostliny. Tuhé médium s pylovými zrny bylo následně překlopeno pylem dolů na krycí sklo o rozměrech 22x40 mm. Mikroskopická skla s pylem byla inkubována v uzavřené plastové Petriho misce naplněné vlhčenou buničinou pro udržení vysoké vlhkosti. Inkubace probíhala ve tmě při pokojové teplotě po dobu 4 hodin.

Tabulka 3 - Kultivační medium pro pylové láčky (podle Boavida & McCormick, 2007), pH pufrováno na hodnotu 6.

Složka	Finální koncentrace
Sacharóza	10 %
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01 %
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
Agar	1,5 %

### 3.1.2 Křížení rostlin

Rodičovské rostliny pro křížení byly pěstovány dle výše popsaného protokolu (kapitola 3.1.1). Na přibližně tři týdny starých kvetoucích rostlinách byla vybrána vrcholová květenství, ze kterých byly odstraněny všechny šešule a již otevřené květy. Pod stereoskopickým mikroskopem byly následně vybrány 2-3 vhodné květy s receptivní bliznou, které ještě neměly otevřené prašníky. Ostatní květy byly odstraněny pinzetou. Z vybraných květů byly hodinářskou pinzetou odstraněny kališní a korunní lístky a prašníky. Z dárcovské rostliny byl sebrán rozkvetlý květ, který byl prašníky ořen o čerstvě odhalenou bliznu, aby došlo k opylení.

Takto byla vytvořena linie *nap1:EXO84b-GFP* použitá v této práci. Zbylé linie EXO84b-GFP v ARP2/3 mutantách jsem získala již nakřížené v F1 generaci. Mým dílem byla selekce rostlin vykazující fenotyp ARP2/3 mutant (pokroucené trichomy), které zároveň zeleně svítily (důkaz přítomnosti EXO84b-GFP) a jejich dopěstování do neštěpící generace.

## 3.2 Mikroskopie

### 3.2.1 Mikroskopie hypokotylů

Pro mikroskopii byly použity 5 dnů staré semenáčky *A. thaliana* pěstované *in vitro*. Ze semenáčků byly nůžkami odstraněny dělohy pro optimalizaci kontaktu hypokotylu s krycím sklem. Následně byl preparát přenesen do kapky vody na podložní sklo, překryt krycím sklem a okamžitě pozorován na mikroskopu. Pro pozorování byl použit konfokální Spinning disk mikroskop Nikon (Ústav experimentální botaniky, AV ČR). Pro snímání byla použita kamera Photometrics Prime BSI, objektiv Plan-Apochromat L 100x/1.45 Oil a excitační laser Omicron LightHUB ULTRA o vlnové délce 488 nm. Kompletní technické parametry přístroje lze najít na webových stránkách ústavu: <http://www.ueb.cas.cz/cs/if/equipment>.

Pro výzkum dynamiky EXO84b-GFP byly vytvořeny časoběrné snímky. Expoziční čas byl 400 ms a interval mezi snímky 500 ms. Jedno snímání trvalo 120 s. Experiment byl proveden ve třech biologických opakováních. V každém biologickém opakování bylo nasnímáno několik buněk od každé varianty z nejméně dvou různých rostlin.

### 3.2.2 Mikroskopie pylových láček

Pozorovány byly 4–6 hodin staré pylové láčky *A. thaliana* kultivované *in vitro* dle výše popsaného protokolu (kapitola 3.1.1.2). Pro pozorování byly vybrány živé láčky vykazující cyklózu. Pro mikroskopii pylových láček byl použit konfokální mikroskop Leica SP8 (Laboratoř konfokální a fluorescenční mikroskopie PřF UK, Viničná 7). Pro snímání byl použit HyD detektor, objektiv HC PL APO CS2 63x/1,20 W a excitační laser o vlnové délce 488 nm.

## 3.3 Obrazová analýza

### 3.3.1 Analýza dynamiky EXO84b-GFP v hypokotylu

Mikroskopická videa byla nejprve upravena v programu NIS Elements funkcí Equalize Intensity, aby se zmínil projev photobleachingu (vysvícení fluoroforů). K photobleachingu dochází, když jsou fluorofory vystaveny delšímu či intenzivnímu působení laseru, v důsledku změny vazebné interakce mezi fluoroforem a zkoumaným proteinem (Waters, 2013). Upravená videa byla následně importována do programu FIJI, ve kterém byly vytvořeny čtvercové výřezy o rozměru 100x100  $\mu\text{m}$ . Výřezy byly vybrány tak, aby se celé nacházely uvnitř buňky a pokud možno neobsahovaly v záběru chloroplast či jinou organelu, která by mohla vnést do měření chybu. Takto bylo vytvořeno mezi jedním až třemi nepřekrývajícími se výřezy na buňku, dle velikosti ostrého obrazu splňujícího výše zmíněné požadavky. Takto vytvořená videa byla použita jako vstupní data pro analýzu.

Analýza dynamiky EXO84b-GFP probíhala v programu Matlab pomocí skriptu `singChan_cellSurfaceAnalysis` podle Johnson et al. (2020). Tento skript slouží k automatické detekci událostí na plazmatické membráně (v mém případě EXO84b-GFP teček) a počítá jejich lifetime (LT, čas, po který byly tečky pozorovatelné na membráně) a hustotu. Tento skript filtruje

detekované události tak, že do analýzy nezahrnuje události, které se nacházejí na prvních a posledních 10 snímcích filmu, dále události, které se nacházejí do 10 pixelů od okraje filmu, a závěrem události, které se objevují na méně než pěti po sobě jdoucích snímcích (v mém případě odpovídající 2,5 s). Data ze všech tří opakování jsem zkompletovala v programu Microsoft Excel (verze 2108) pro další statistickou analýzu (kapitola 3.4.1).

### **3.3.2 Analýza lokalizace EXO84b-GFP v pylových láčkách**

Mikroskopické snímky byly importovány do programu FIJI. Nejprve byla vytvořena maximální projekce ze tří snímků procházejících středem pylové láčky. V této projekci pak byla středem láčky proložena 2  $\mu\text{m}$  široká sonda o délce 20  $\mu\text{m}$ . Sonda začínala vně láčky, kde nebyl detekovatelný GFP signál. Pomocí funkce Plot profile byla získána průměrná intenzita EXO84b-GFP signálu v celé délce sondy. Získaná data byla uložena pro další analýzu. Tvorba grafů distribuce intenzity EXO84b-GFP signálu probíhala v programu Microsoft Excel (verze Verze 2309). Statistická analýza byla provedena v programu RStudio (R verze 4.2.3) pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA).

## **3.4 Statistická analýza**

### **3.4.1 Statistická analýza dynamiky EXO84b-GFP v hypokotylu**

Statistickou analýzu dynamiky EXO84b-GFP v hypokotylu navrhl a provedl dr. Stanislav Vosolsobě za použití mnou naměřených dat. Distribuce LT exocytických událostí (reprezentovaných tečkami EXO84b-GFP) byla získána sečtením zastoupení jednotlivých LT v rámci každé analyzované linie. Rozdíl mezi liniemi byl testován bootsrapováním, kdy bylo získáno 1000 distribucí založených na variacích s opakováním z původního souboru dat. Randomizace byla prováděna buď na základě náhodného faktoru identity snímané rostliny, nebo na základě faktoru identity konkrétní časové série. Z distribucí odvozených z randomizovaných souborů dat byly odhadnuty 95% konfidenční intervaly výchozí distribuce jako percentily 2,5 % a 97,5 % pro každou dobu z měřeného intervalu. Data byla paralelně fitována zobecněným lineárním modelem (GLM) založeným na Poissonově distribuci. Protože byla data snímaná s časovým rozlišením 0,5 s, byla vynásobena dvěma za účelem převedení na celočíselnou škálu, pro kterou je aplikovatelná zvolená distribuce. Fitovaný model byl diagnostikován Q-Q plotem a poněvadž byla detekována značná overdispersion dat (reziduály modelu systematicky narůstaly pro delší doby) byla data logaritmována a zaokrouhlena po vynásobení 1000 za účelem získání celočíselných hodnot na logaritmické škále. U takto získaných hodnot již nedocházelo k overdispersi. Model byl dále rozšířen zahrnutím náhodných efektů (GLMM, použity identifikátory rostliny, buňky a snímané série) a fitován funkcí glmer z balíčku lme4 (Bates et al., 2015). Signifikance efektu genotypu byla stanovena likelihood-ratio testem oproti referenčnímu modelu obsahujícímu pouze náhodné efekty. Signifikance rozdílu LT exocytických událostí byla pro jednotlivé linie stanovena post-hoc testem založeným na odhadu marginálních průměrů (EMMs, funkce emmeans z balíčku emmeans, Searle et al., 1980). Statistické hodnocení bylo provedeno v prostředí R (<https://www.R-project.org/>).

## 4. Výsledky

### 4.1 Výběr markeru exocytózy

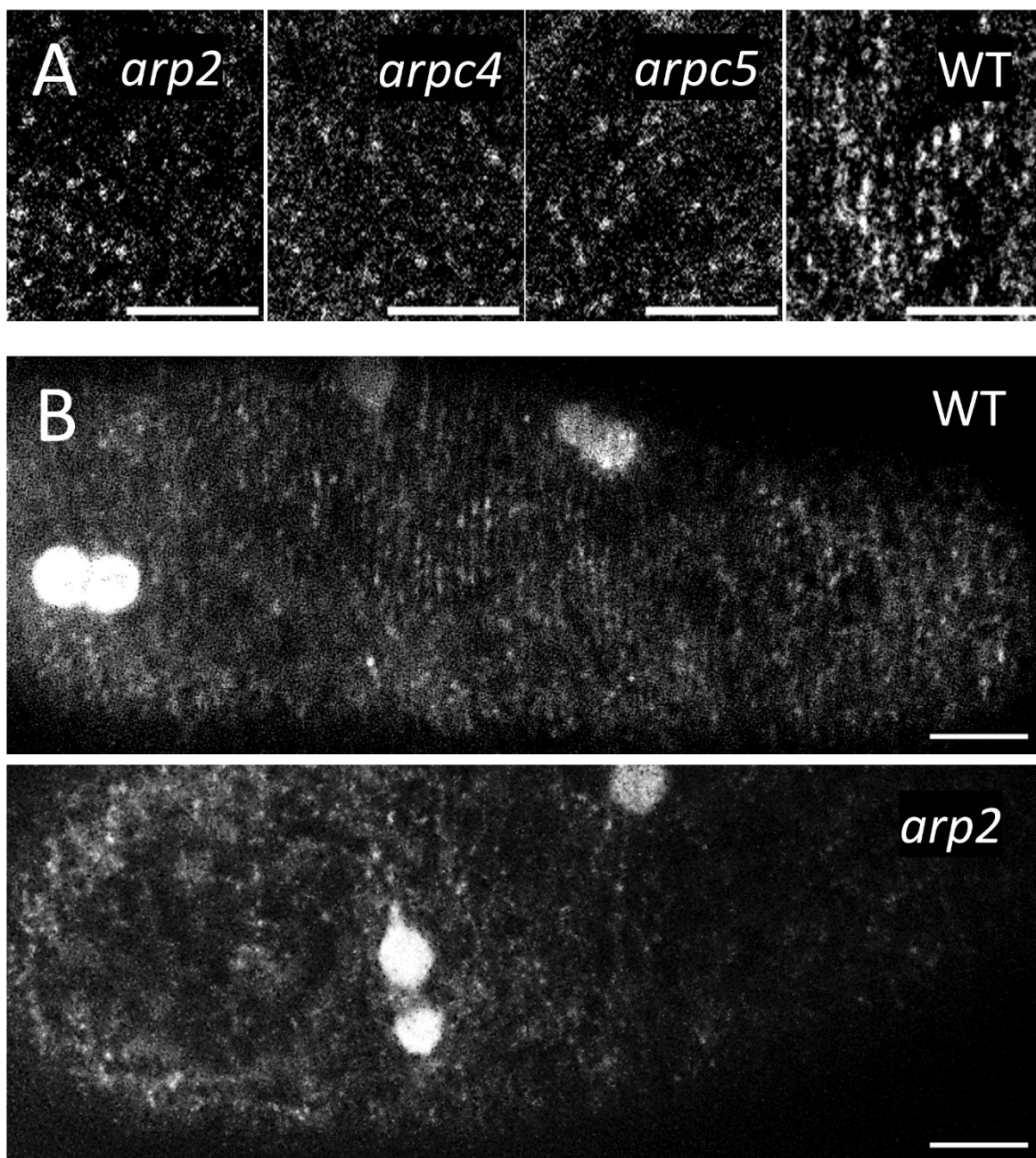
Pro studium dynamiky exocytózy byl vybrán fluorescenční marker EXO84b-GFP. Protein EXO84b byl vybrán na základě předchozích výsledků naší laboratoře, kdy Barbora Jelínková zjistila, že EXO84b-RFP částečně kolokalizuje s podjednotkami ARP2/3 komplexu a tato interakce byla též potvrzena biochemicky (Jelínková, 2021). Na rozdíl od Barbory Jelínkové jsem použila zeleně značený EXO84b-GFP. Důvodem byla především dostupnost, neboť EXO84b-GFP již byl v laboratoři nakřížen do tří linií ARP2/3 mutant (*arp2*, *arp4* a *arp5*). Tato volba mutantního pozadí pokrývá oba typy podjednotek ARP2/3 komplexu: aktinu podobné ARP proteiny (v zastoupení *arp2*:EXO84b-GFP) a s aktinem nepřibuzné ARPC proteiny (zastoupeny *arp4*:EXO84b-GFP a *arp5*:EXO84b-GFP). Dřívější studie prokázala, že marker EXO84b-GFP je funkční, neboť byl schopen zachránit trpasličí fenotyp homozygotní mutanty (Fendrych et al., 2010). Jedná se navíc o expresi pod nativním promotorem, díky čemuž je větší šance, že pozorovaná lokalizace a dynamika markeru má fyziologický význam.

### 4.2 Dynamika EXO84b-GFP v hypokotylu *A. thaliana*

Již dříve bylo publikováno, že fluorescenční marker EXO84b-GFP vytváří na plazmatické membráně (PM) kořene malé dynamické tečky (Fendrych et al., 2013). Tyto tečky vytváří i červeně značený EXO84b-RFP v pokožkových buňkách hypokotylu (Jelínková, 2021). Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda mutace podjednotek ARP2/3 komplexu bude mít vliv na dynamiku nebo lokalizaci těchto teček.

Pro pozorování byly zvoleny linie WT:EXO84b-GFP, *arp2*:EXO84b-GFP, *arp4*:EXO84b-GFP a *arp5*:EXO84b-GFP. Mikroskopovala jsem pokožkové buňky hypokotylu, neboť tyto buňky mají dobrý kontakt s krycím sklem a umožňují snímat naráz velký úsek PM. Zároveň bylo již dříve ukázáno, že hypokotyl mutant ARP2/3 komplexu vykazuje fenotyp v podobě nedokonalé buněčné adheze, kvůli níž vznikají mezery mezi buňkami (Mathur, Mathur, Kernebeck, et al., 2003). Hypokotyly ARP2/3 mutant jsou též kratší oproti WT, což signalizuje problém v buněčné elongaci (Mathur, Mathur, Kernebeck, et al., 2003).

V souladu s publikovanými výsledky v kořeni (Fendrych et al., 2013), EXO84b-GFP i v hypokotylu vytvářel dynamické tečky na PM (Obrázek 3). Tečky EXO84b-GFP vykazovaly minimální laterální dynamiku. Pověšinou se objevily, setrvaly na několika snímcích a zase zmizely. V některých případech (Obrázek 3, B, WT) tečky vytvářely transverzální pruhy připomínající orientaci MT v kortikální zóně rostoucích hypokotylů (Adamowski et al., 2019). Též v ARP2/3 mutantech EXO84b-GFP tvořil dynamické tečky na PM. Na rozdíl od WT však transverzální pruhy nebyly tak výrazné, jelikož byl signál rovnoměrněji rozptýlen v buňce (Obrázek 3, B, *arp2*).



Obrázek 3 - Lokalizace EXO84b-GFP v kortikální vrstvě pokožkových buněk hypokotylu *A.thaliana*. A) Jednotlivé snímky zobrazující výřezy plazmatické membrány WT a ARP2/3 mutant (*arp2*, *arpc4* a *arpc5*) exprimujících EXO84b-GFP, které byly použity pro analýzu. B) Průměrná projekce časosběrného snímku (120 s) celé buňky ukazující existenci transverzálních pruhů v WT a jejich absenci v mutantě *arp2*. Obrázek *a2*:EXO84b-GFP je reprezentativní pro všechny sledované ARP2/3 mutanty. Všechny snímky byly pořízeny pomocí spinning-disk mikroskopu. Měřítko = 5  $\mu$ m.

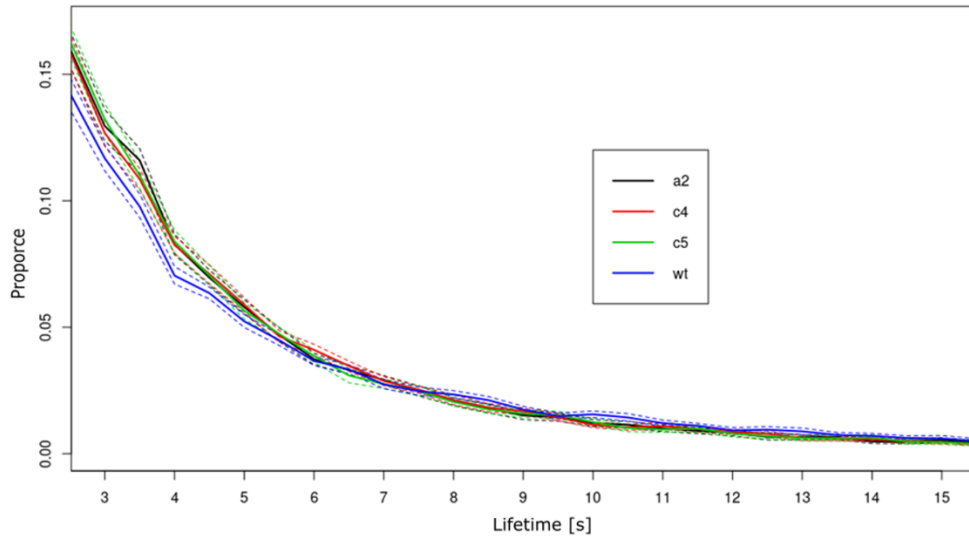
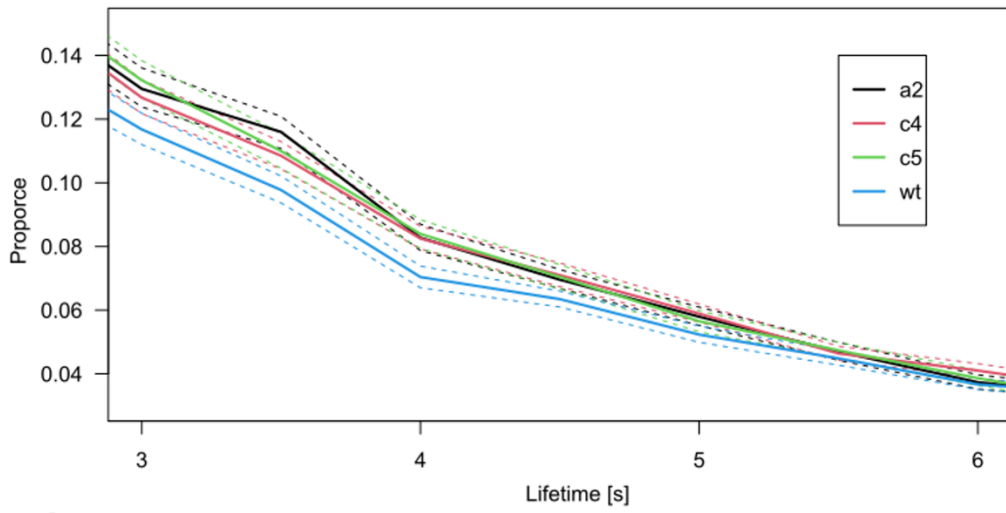
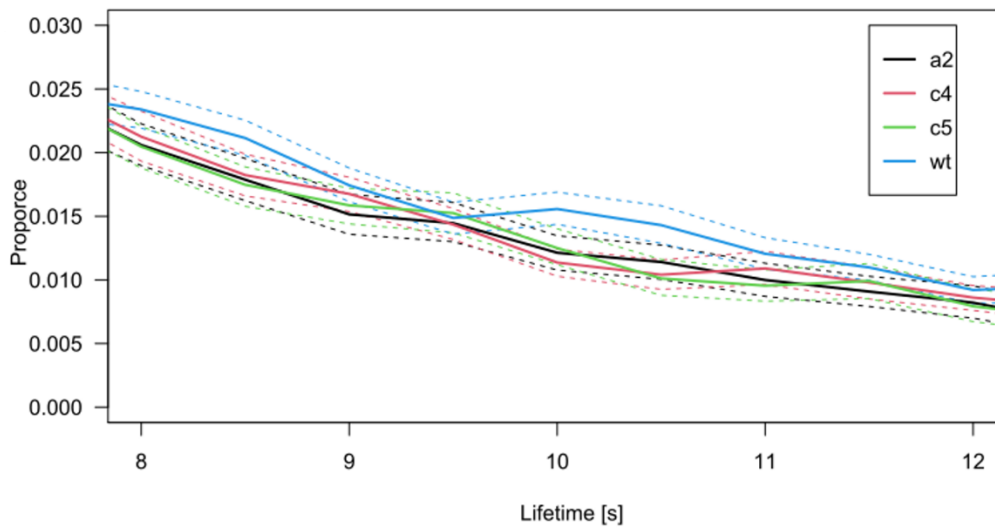


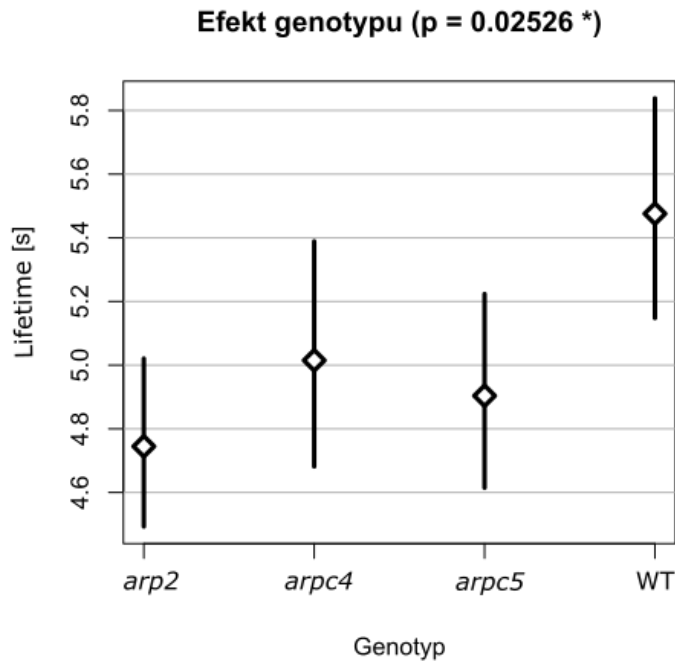
U všech variant byl měřen LT. Použití automatické analýzy nám umožnilo vygenerovat veliké množství dat (Tabulka 4). Například pro WT:EXO84b-GFP bylo nasnímáno 38 buněk ve kterých bylo detekováno 35 511 teček. Vzhledem k nadstandartnímu objemu dat bylo potřeba použít speciální analýzu, proto jsem o pomoc požádala dr. Stanislava Vosolsobě. Ten navrhl a provedl analýzu, ve které byla vypočtena distribuce LT EXO84b-GFP teček na PM sečtením zastoupení jednotlivých LT v rámci každé analyzované linie. Následně byl hodnocen rozdíl mezi liniemi bootstrapováním, kdy bylo získáno 1000 distribucí založených na variacích s opakováním z původního souboru dat. Data byla paralelně fitována zobecněným lineárním modelem (GLM) založeným na Poissonově distribuci. Bootstrapováním získané konfidenční intervaly distribuce LT EXO84b-GFP teček na PM ukazují na signifikantně vyšší zastoupení kratších LT (interval 3-5 s) a naopak nižší zastoupení delších LT (10-11 s) u všech mutantních linií oproti WT (Obrázek 4). Celková signifikance efektu genotypu odvozená ze zobecněného lineárního modelu se smíšenými efekty (GLMM) je  $p = 0.02526$ , přičemž největší pokles signifikance je spojen se zahrnutím náhodné proměnné identity rostliny do modelu (Obrázek 5). Na základě odhadu marginálních průměrů (EMMs) vychází signifikantní rozdíl mezi WT:EXO84b-GFP a linií *arp2*:EXO84b-GFP. Slabší průkaznost tohoto testu oproti GLMM je dána tím, že GLMM fituje křivku, která nezohledňuje lokální rozdíly v distribuci na dílčích intervalech.

Tabulka 4 - Počet snímaných rostlin, buněk, vytvořených výřezů a teček detekovaných automatickou analýzou (Johnson et al., 2020)

Varianta	Počet rostlin	Počet buněk	Výřezů	Počet teček
WT:EXOb-GFP	10	38	82	35 519
<i>arp2</i> : EXOb-GFP	9	38	67	27 529
<i>arpc4</i> :EXO84b-GFP	7	42	74	34 130
<i>arpc5</i> :EXO84b-GFP	9	39	65	30 383

Obrázek 4 (na další stránce) - Distribuce lifetimes (LT) EXO84b-GFP teček v pokožkových buňkách hypokotylů linií nesoucích mutace v podjednotkách komplexu ARP2/3 (*arp2*, *arpc4* a *arpc5*). LT EXO84b-GFP byly měřeny prostřednictvím Spinning-disk mikroskopu s časovým rozlišením 0,5 s. Grafy ukazují proporční zastoupení jednotlivých událostí (standardizováno podle celkového počtu změřených událostí v každé linii) a 95% konfidenční intervaly odhadnuté bootstrapováním (randomizace dat byla provedena na úrovni jednotlivých časových sérií). Pokud se v určitém intervalu pro dané dvě linie nepřekrývají konfidenční intervaly, je rozdíl v dynamice exocytózy signifikantní. Všechny grafy zahrnují data ze tří biologických opakování. A) Celkový pohled na distribuci EXO84b-GFP. B) Distribuce krátkých událostí (LT 3–6 s), kde zřetelně převažuje proporce ARP2/3 mutant oproti WT. C) Distribuce LT středně dlouhých událostí (LT 8–12 s), kde je WT více zastoupen oproti ARP2/3 mutantům. B) a C) jsou zvětšeninami grafu A)-

**A****B****C**



Obrázek 5 - Zobecněný lineární model se smíšenými efekty (GLMM) dynamiky EXO84b-GFP v mutantních liniích podjednotek komplexu ARP2/3. Lifetime (LT) exocytických událostí (symbolizovaných tečkami EXO84b-GFP) byl měřen pomocí Spinning-disk mikroskopu v hypokotylech linií *Arabidopsis thaliana* exprimujících EXO84b-GFP na genetických pozadích s mutacemi v genech ARP2, ARPC4 či ARPC5 a v divoké linii (WT) jako kontrole. Graf ukazuje střední LT exocytických událostí (GLMM založený na Poissonově distribuci; identity rostliny, buněk a jednotlivých snímaných časových sérií byly zohledněny v rámci náhodných efektů; celková signifikance genotypu je  $p = 0.02526$ ) a jejich 95% konfidenční intervaly určené mnohočetným porovnáním. Signifikantně se liší linie *arp2* od WT ( $p = 0.0035$ ).

### 4.3 Pylové láčky

V dalších experimentech jsem se zaměřila na další buněčný typ, kterým jsou pylové láčky. Na rozdíl od difuzně rostoucích pokožkových buněk hypokotylu představují pylové láčky systém vrcholově rostoucích buněk. Mechanismus vrcholového růstu závisí především na přesně koordinované exocytóze v aktivně rostoucí apikální části (N. Luo et al., 2017). Z experimentů naší laboratoře víme, že pylové láčky ARP2/3 mutant vykazují fenotyp (jsou kratší a širší, nepublikované výsledky). Z tohoto důvodu se lze domnívat, že se ARP2/3 komplex podílí na vrcholovém růstu pylových láček. Proto jsem se zajímala, zdali se bude lišit lokalizace (např. zonace) EXO84b-GFP jakožto markeru exocytózy v láčkách ARP2/3 mutant oproti WT. Pro snímání jsem použila konfokální mikroskop, který je pro studium markerů exocytózy v pylových láčkách běžně využíván (Marković et al., 2020).

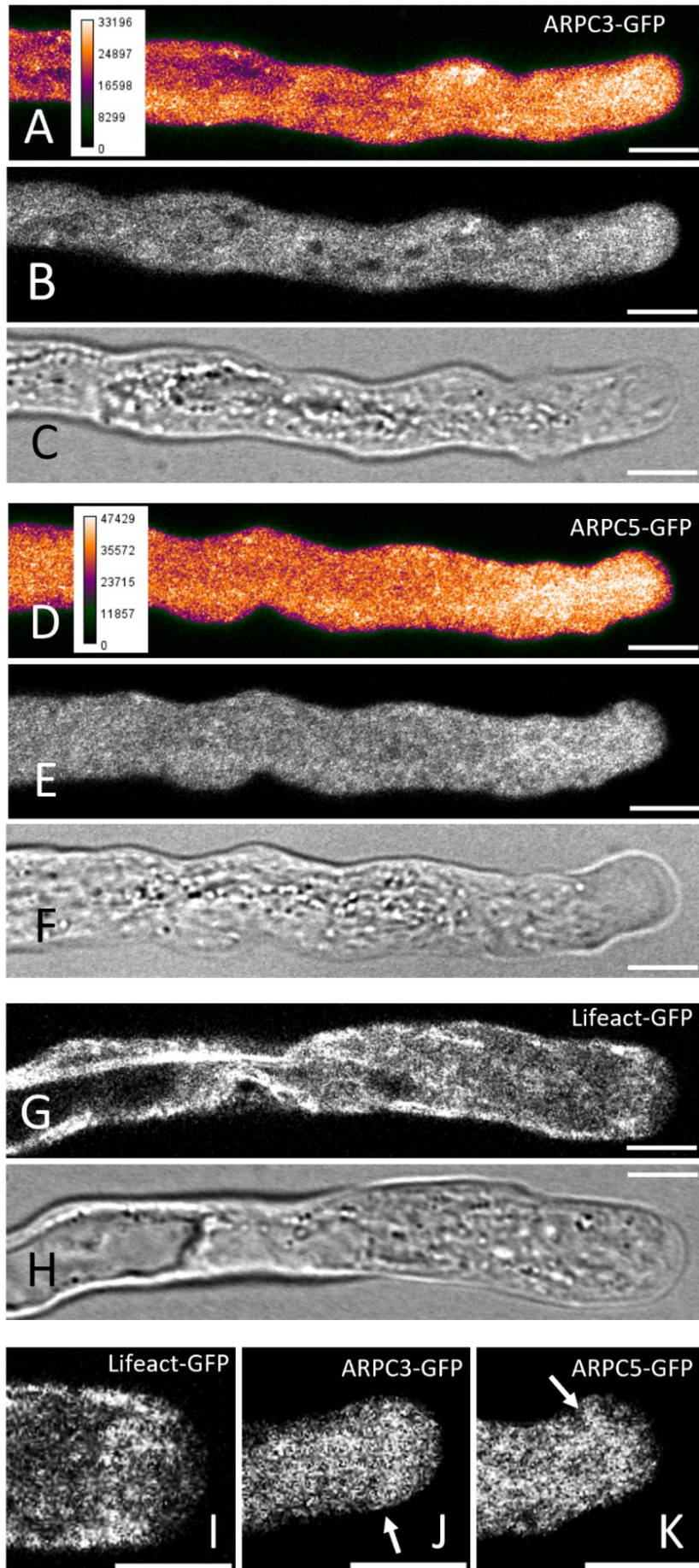
Během provádění těchto experimentů se v laboratoři poprvé vyskytly fluorescenční markery pro ARP2/3 podjednotky exprimované pod ubiquitinovým promotorem (pUBQ). Ubiquitinem řízená exprese je na rozdíl od CaMV 35S promotoru aktivní i v pylových láčkách (Kollárová et

al., 2021; Wilkinson et al., 1997), proto jsem do experimentu zahrnu i tyto markery a studovala lokalizaci těchto markerů v pylových láčkách.

### 4.3.1 Lokalizace ARPC5 a ARPC3 v pylových láčkách

Pro tento experiment byly použity linie pUBQ::ARPC3-GFP a pUBQ::ARPC5-GFP (autor: Eva Kollárová). Zároveň jsem snímala i linii Lifeact-GFP (*in vivo* marker pro F-aktin) pro srovnání lokalizace ARP2/3 podjednotek s aktinovými strukturami v láčce. Signál ARPC5-GFP i ARPC3-GFP je zřetelný po celé délce pylové láčky. Signál se vyskytuje v cytoplazmě bez náznaku membránové lokalizace. Nejvíce signálu bylo často nahromaděno ve špičce pylové láčky. V maximální projekci je možné vidět maximální intenzitu signálu v oblasti připomínající obrácenou fontánu (Obrázek 6, A a D). Někdy se akumulace signálu vyskytla v pruhu přibližně 2  $\mu\text{m}$  pod špičkou (Obrázek 6, I–K), v oblasti, kde se běžně vyskytuje tzv. „actin fringe“ (Lovy-Wheeler et al., 2005). Po celé délce láčky se objevovaly pohyblivé větší tečky, které by mohly představovat ARP2/3 komplex asociovaný s peroxisomy (Martinek et al., 2023).

Obrázek 6 (na následující straně) - Lokalizace pUBQ::ARPC3-GFP, pUBQ::ARPC5-GFP a Lifeact-GFP v pylové láčce *A. thaliana*. A) a D) Maximální projekce Z-stacku. B) a E) Snímek jedné roviny totožné láčky, ve které je viditelný prstenec intenzivnějšího signálu v subapikální zóně. C) a F) Snímek stejné roviny totožné láčky jako v B) a E) v průchozím světle. G) Snímek jedné roviny láčky exprimující Lifeact-GFP. H) Snímek totožné láčky a roviny jako v G) v průchozím světle. I), J) a K) představují zvětšenou špičku láček ze snímků G), B) a E). Šipky znázorňují prstenec v subapikální zóně. Snímky byly zpracovány pro zvýraznění kontrastu. Měřítka = 5  $\mu\text{m}$ . A) a D) škála v AU (artificial unit, umělá jednotka)



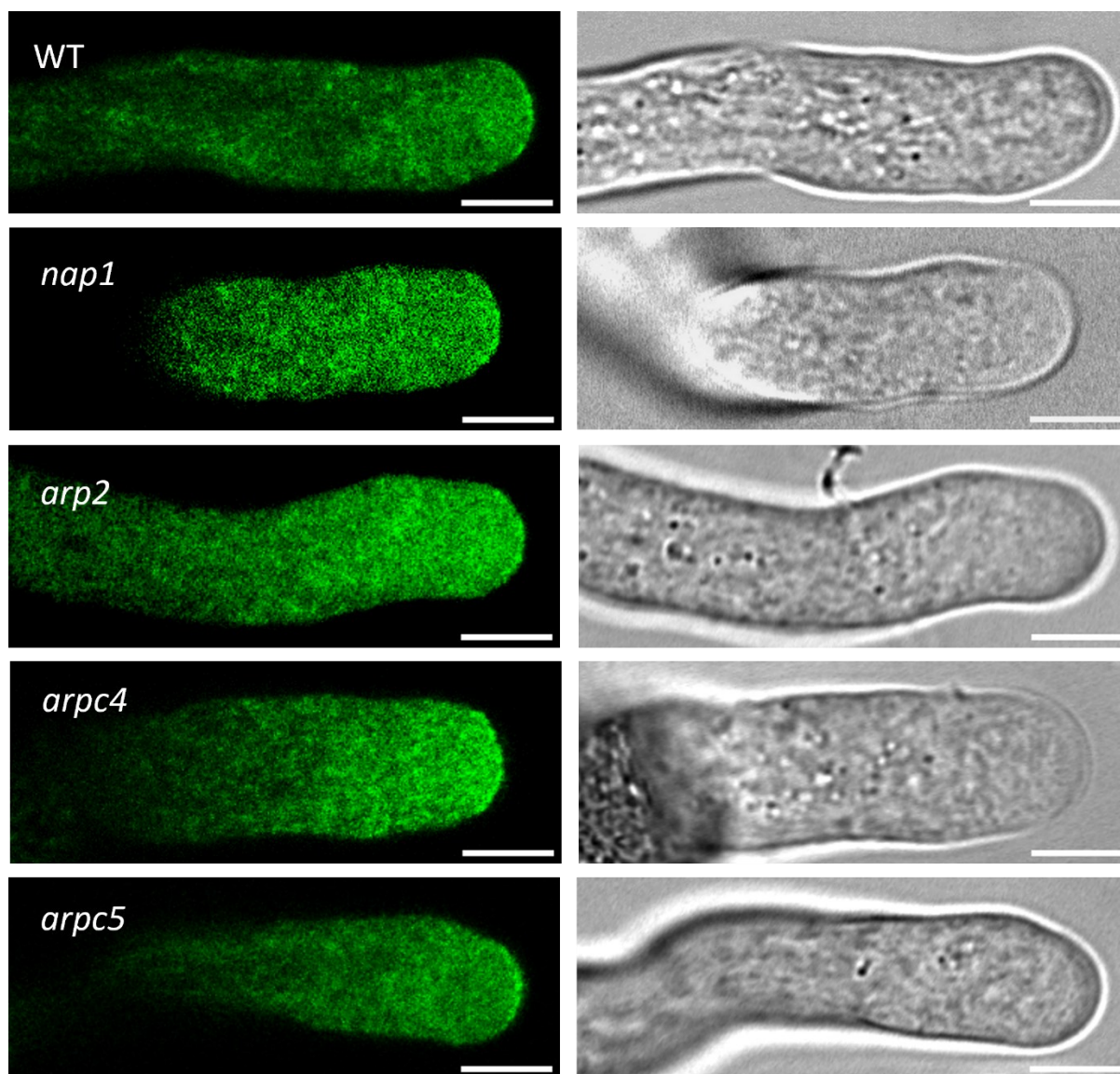
### 4.3.2 Lokalizace EXO84b-GFP v pylové láčce

Dalším cílem práce bylo pozorovat lokalizaci markeru EXO84b-GFP v pylových láčkách ARP2/3 mutant a srovnat ji s lokalizací tohoto markeru ve WT. Základem pro pokusy bylo zjištění kolegů z naší laboratoře, že ARP2/3 mutanty vykazují poruchy v růstu pylových láček (nepublikované výsledky). Jelikož je komplex exocyst zapojen do polární sekrece v pylových láčkách (Marković et al., 2020) a v dřívějších pokusech byla pozorována částečná kolokalizace EXO84b-RFP s podjednotkami ARP2/3 komplexu (Jelínková, 2021), zajímalo mě, zdali se liší lokalizace (zonace) EXO84b-GFP v pylových láčkách WT a ARP2/3 mutant.

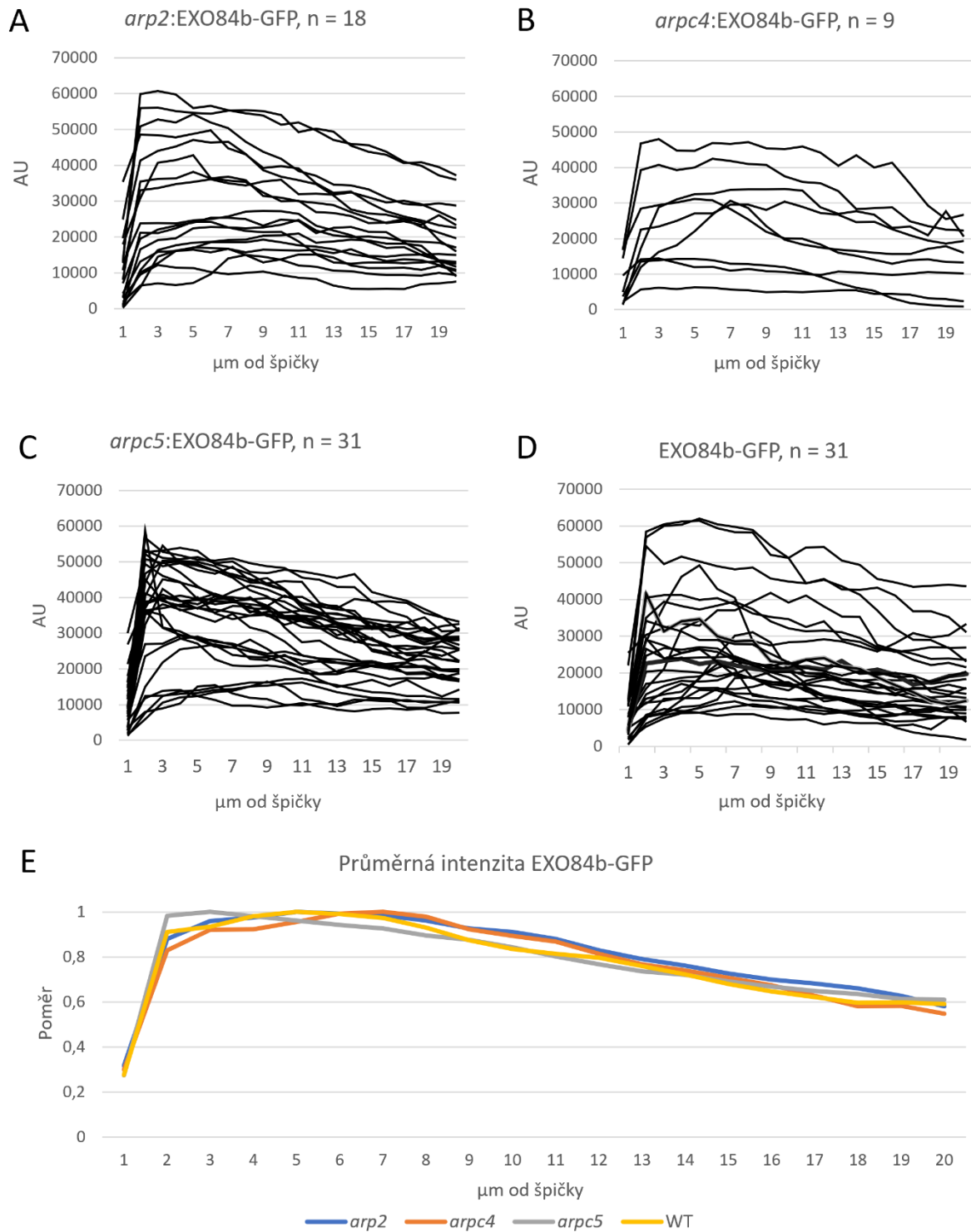
Pro výzkum byly vybrány linie WT:EXO84b-GFP, *arp2*:EXO84b-GFP, *arp4*:EXO84b-GFP a *arp5*:EXO84b-GFP. Jedná se o stejné linie, které byly použity v předchozím pokusu, který zkoumal dynamiku EXO84b-GFP v pokožkových buňkách hypokotylu. EXO84b-GFP v pozadí *nap1* (podjednotka SCAR/WAVE komplexu, což je aktivátor ARP2/3 komplexu) jsem získala až úplným závěrem práce, a proto jsem nenasbírala dostatek dat pro jeho analýzu spolu s ARP2/3 mutantami. Pro porovnání však ukazují snímky lokalizace EXO84b-GFP i v této mutantě (Obrázek 7). Láčky byly snímány konfokálním mikroskopem. Jelikož mě zajímala zonace, proložila jsem 20  $\mu\text{m}$  sondu o síle 2  $\mu\text{m}$  středem láčky (centrální optický řez) od špičky směrem k pylovému zrnu a generovala křivky intenzity signálu EXO84b-GFP, které jsem následně mezi sebou srovnávala. Podobný postup je pro sledování lokalizace fluorescenčních markerů v pylových láčkách běžně používán (T. Fan et al., 2023; Kollárová et al., 2021).

Marker EXO84b-GFP vydával nejsilnější signál ve špičce. Vypozorovala jsem korelaci mezi lokalizací markeru a rychlostí růstu láčky. Rychleji rostoucí láčky měly výrazněji akumulovaný signál EXO84b-GFP na membráně špičky, zatímco u pomaleji rostoucích láček se více signálu nacházelo v cytoplasmě. Nezdá se však, že by existoval signifikantní rozdíl v lokalizaci EXO84b-GFP mezi WT a námi testovanými ARP2/3 mutantami. U všech linií došlo k prudkému vzestupu signálu ve špičce, po kterém následoval pozvolný pokles (Obrázek 8). Jelikož signál silně kolísal, pro vnesení do grafu průběhu intenzity jsem rozdělila kontinuální měření intenzity EXO84b-GFP do kategorií po jednom mikrometru ( $\mu\text{m}$ ). Hodnota pro každý  $\mu\text{m}$  odpovídá průměru pro tento interval. Obrázek 8, (A–D) zobrazuje naměřené křivky intenzity pro jednotlivé varianty. Obecně mezi jednotlivými měřeními panovala velká variabilita v intenzitě signálu, která znemožňovala vyčíst z dat trend. Proto jsem intenzitu standardizovala vnesením poměru průměrného signálu pro daný  $\mu\text{m}$  ku dosaženému maximu. Obrázek 8 (E) ukazuje takto standardizované průměrné hodnoty pro jednotlivé varianty.

Pro srovnání obecného chování markeru EXO84b-GFP mezi ARP2/3 mutantami a WT mě zajímalo, jak často v průběhu měřené vzdálenosti 20  $\mu\text{m}$  signál roste a klesá. Pro tuto analýzu jsem odečetla od hodnoty pro každý  $\mu\text{m}$  hodnotu následující. Takto jsem analyzovala jednotlivě každou láčku a výsledné hodnoty zprůměrovala (Obrázek 9). Dále jsem pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) vyhodnotila, zdali se tento poměr klesání ku stoupání liší mezi jednotlivými genetickými variantami (Obrázek 10). WT měl nejvyšší medián, následovaný *arp2*, *arp4* a nakonec *arp5*. Z dat lze vyčíst trend, ovšem není statisticky signifikantní. Nezdá se tudíž, že by tento rozdíl v lokalizaci EXO84b-GFP byl schopen vysvětlit pozorovaný fenotyp pylových láček ARP2/3 mutant.

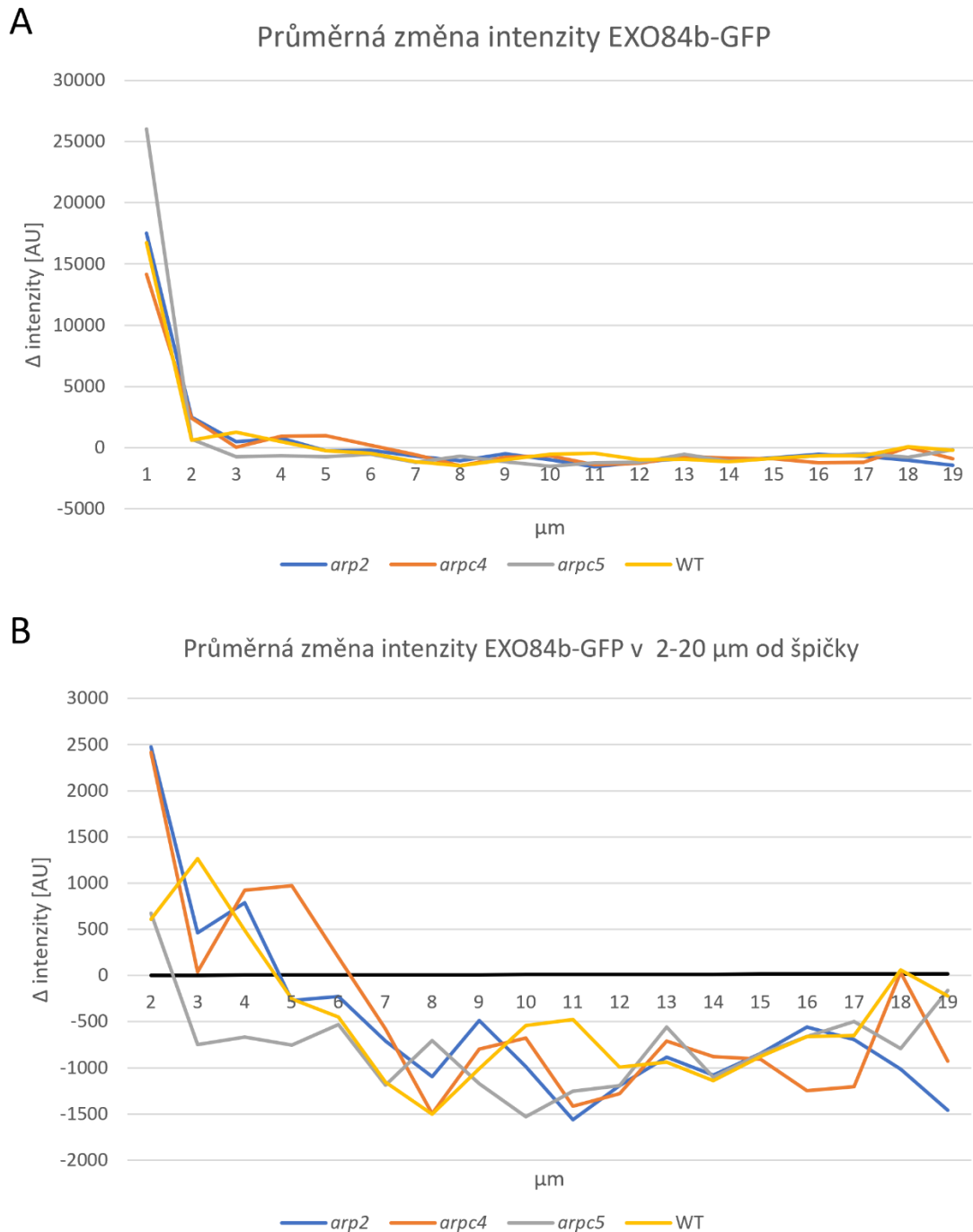


Obrázek 7 - Lokalizace EXO84b-GFP v pylových láčkách *A.thaliana*. Vlevo fluorescenční signál ve střední rovině láček WT a mutant genů pro ARP2/3 komplex (*nap1*, *arp2*, *arpc4*, a *arpc5* mutanty). Vpravo snímek stejné roviny láčky v průchozím světle. Měřítko = 5  $\mu$ m

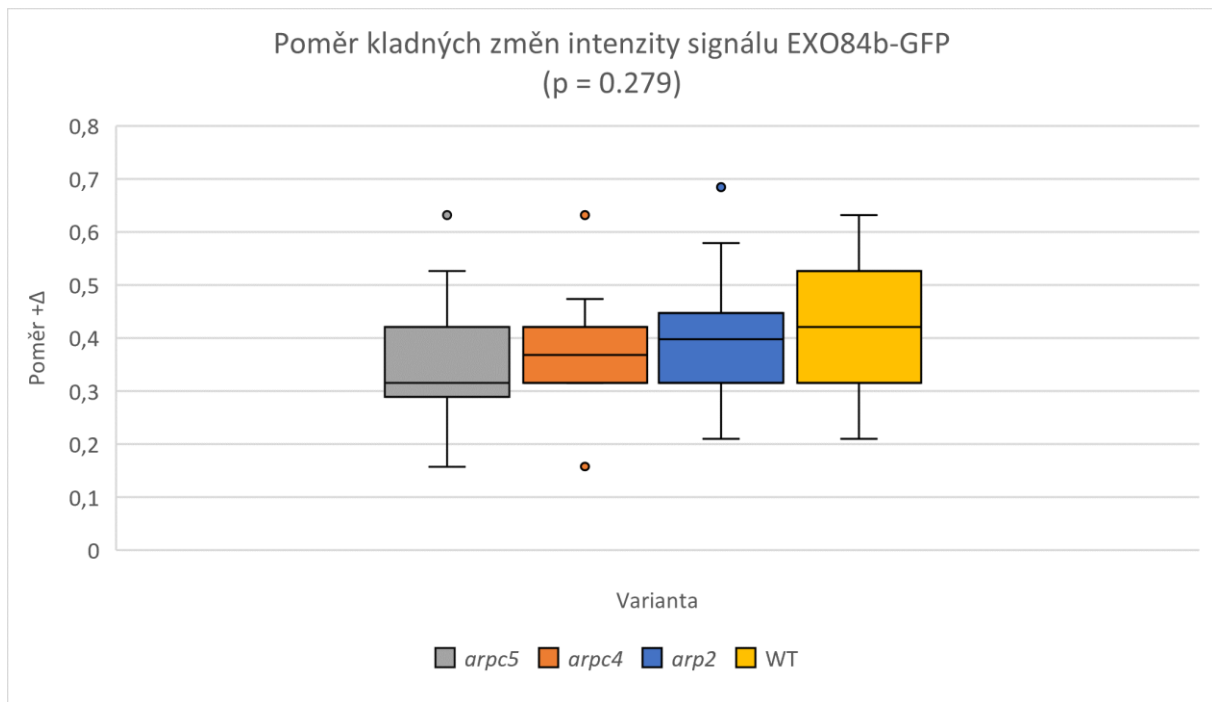


Obrázek 8 - Graf průběhu intenzity signálu EXO84b-GFP v pylových láčkách *A. thaliana* v mutantách ARP2/3 komplexu *arp2* (A), *arpc4* (B) a *arpc5* (C) a divokém typu (WT). (E) Srovnání průměrných hodnot EXO84b-GFP signálu všech 4 variant (*arp2*, *arpc4*, *arpc5* a WT) vyjádřených jako poměr z maximální dosažené intenzity. Zobrazeny jsou výsledky 3 biologických opakování. AU = umělá jednotka (artificial unit)





Obrázek 9 - Graf průměrné změny intenzity signálu EXO84b-GFP v pylových láčkách *A. thaliana* v mutantách ARP2/3 (*arp2*, *arpc4* a *arpc5*) a divokém typu (WT). Kladné hodnoty značí, že signál klesal, záporné, že signál rostl. Graf vyjadřuje průměr tří biologických opakování. (A) Graf průměrné změny intenzity signálu EXO84b-GFP v celé délce pylové láčky. (B) Graf průměrné změny intenzity signálu EXO84b-GFP v intervalu 2-20 μm od špičky láčky. První μm byl z měření odfiltrován, jelikož se jednalo o změnu z nulového signálu vně láčky směrem k maximálnímu signálu na plazmatické membráně špičky. Tato změna svou magnitudou znemožnila vidět v grafu menší rozdíly v intenzitě signálu uvnitř láčky. AU = umělá jednotka (artificial unit)



Obrázek 10 - Krabicový diagram znázorňující poměr zastoupení kladných změn intenzity EXO84b-GFP oproti záporným (viz graf změna intenzity) v 20  $\mu\text{m}$  od špičky pylových láčkách *A. thaliana* v mutantách ARP2/3 (*arp2*, *arp4* a *arp5*) a divokém typu (WT). Zvýrazněná čára představuje medián, krabice značí mezikvartálové rozpětí (IQR), „vousy“ značí minimální a maximální hodnoty nebo 1,5\*IQR v případě odlehlých hodnot (vyznačených jako samostatné body). Na základě jednofaktorového ANOVA testu není rozdíl mezi variantami statisticky signifikantní ( $p = 0.279$ ).

## 5. Diskuze

### 5.1 Dynamika a lokalizace EXO84b-GFP v hypokotylu

Do pozorování dynamiky EXO84b-GFP v hypokotylu *A. thaliana* jsem zařadila mutanty v podjednotce ARP2, ARPC4 a ARPC5. Bylo by též zajímavé otestovat mutanty v některé z podjednotek SCAR/WAVE komplexu, jež slouží jako aktivátor ARP2/3 komplexu (Eden et al., 2002). V době mých experimentů však bohužel nebyla žádná linie exprimující EXO84b-GFP v mutantním pozadí aktivátoru k dispozici. EXO84b-GFP jsem do mutantního pozadí *nap1* nakřížila až v závěru práce a z časových důvodů proto nebylo možné experiment vykonat.

#### 5.1.1 Lokalizace EXO84b-GFP v hypokotylu

Fluorescenční marker EXO84b-GFP vytváří na PM kořene malé dynamické tečky (Fendrych et al., 2013). Mé pozorování potvrzuje dřívější zjištění Barbory Jelínkové, že EXO84b tvoří dynamické tečky též na PM hypokotylu (2021). Podobné tečky na PM tvoří také fluorescenčně značené podjednotky ARP2/3 komplexu, přičemž malá subpopulace těchto teček kolokalizuje s EXO84b (Jelínková, 2021). Oproti pozorování výše zmíněných kolegů byly mnou pozorované tečky méně zřetelné. Tento rozdíl by mohl být způsoben tím, že na rozdíl od Fendrych et al. (2013) a Barbory Jelínkové (2021), kteří používali mikroskopickou metodu VAEM (Variable-angle epifluorescence microscopy), jsem hypokotylu snímala na Spinning disk konfokálním mikroskopu (SDCM). VAEM umožňuje excitovat a tím pádem pozorovat fluorescenční markery v rovině PM a k ní těsně přilehlé kortikální cytoplazmě. Oproti tomu konfokální mikroskopie sice též umožňuje pozorovat pouze jednu optickou rovinu, ale k excitaci fluoroforů dochází v celém vzorku, což zásadně snižuje rozlišení.

Z dřívějších výzkumů vyplývá, že existence teček EXO84b-GFP na PM, tedy tvorba komplexu exocyst na membráně, není závislá na aktinu (Fendrych et al., 2013). Toto tvrzení podporuje i mé pozorování, neboť v mutantech ARP2/3 lokalizoval EXO84b-GFP do stejných struktur jako ve WT, i když došlo ke změně jejich distribuce. V některých případech (Obrázek 3) tečky vytvářely transversální pruhy připomínající orientaci MT v kortikální zóně rostoucích hypokotylů (Adamowski et al., 2019). Není ovšem vyloučeno, že mnou pozorovaná lokalizace EXO84b-GFP pouze reflektuje transversální uspořádání kortikální cytoplazmy určené MT a pohybujícími se CSC. Fendrych et al. zkoumali asociaci markeru EXO84b-mRFP s MT a nenašli signifikantní kolokalizaci (2013). Oproti tomu v živočiších byla asociace komplexu exocyst s MT prokázána (Vega & Hsu, 2001; S. Wang et al., 2004). V rostlinách byla pozorována kolokalizace komplexu exocyst s MT v místech tvorby sekundárních BS cévních svazků (Vukašinović et al., 2017). Interakce mezi exocystem a MT však není přímá, nýbrž je zprostředkována interakcí EXO70A1 s dalšími proteiny (Oda et al., 2015). Pro potvrzení, zda se v mých pozorováních jedná doopravdy po lokalizaci podél MT by bylo zapotřebí použít mikrotubulární marker. Zajímavé by též bylo pozorovat, jaký efekt by na orientaci teček měla aplikace mikrotubulární drogy a zda by došlo k narušení lokalizace do transversálních pruhů.

### 5.1.2 Dynamika EXO84b-GFP v hypokotylu

Z analýzy dynamiky EXO84b-GFP je patrné, že tento marker má větší dynamiku v ARP2/3 mutantách oproti WT (Obrázek 4). Všechny mutanty se chovaly podobně, což naznačuje, že pro dynamiku EXO84b-GFP je potřeba funkční ARP2/3 komplex jako celek. U mutant je signifikantně větší incidence kratších LT (mezi 2,5–6 s) a naopak nižší incidence v intervalu od (8–10 s), kde bylo pozorováno maximum u Fendrych et al. (2013). Tudíž je pravděpodobné, že ARP2/3 komplex vykonává v blízkosti PM funkci, která prodlužuje dobu setrvání EXO84b-GFP na PM. Jedna z teorií tvrdí, že jemná aktinová síť v kortikální vrstvě rostlinných buněk slouží jako bariéra pro endocytózu (Nagawa et al., 2012). Není vyloučeno, že se ARP2/3 podílí na budování této sítě. Velmi recentní článek potvrzuje, že mutace ARP2/3 komplexu vede k snížení množství větveného aktinu v hypokotylech, a též že AF nukleovaná pomocí ARP2/3 vykazují specifickou dynamiku odlišnou od aktinu polymerovaného forminem (Xu et al., 2023). Vliv aktinu na dynamiku EXO84b-GFP sledovali též Fendrych et al. (2013), kteří pozorovali pomalejší obnovení fluorescence po fotovybělení (FRAP) u buněk ošetřených LatB. Tento výsledek se na první pohled může zdát protichůdný vůči mému měření. Pokud však uvážíme, že mutace ARP2/3 ovlivňuje strukturu a dynamiku aktinového cytoskeletu spíše mírně (Cifrová et al., 2020), je možno se též domnívat, že ztráta komplexu ARP2/3 může ovlivnit pouze určitou část polymerovaného aktinu, která má specifickou roli v oblasti PM. Oproti tomu narušení aktinu pomocí LatB vede ke kompletní depolymerizaci aktinových vláken (Staiger et al., 2009).

Mnou pozorovaná dynamika EXO84b-GFP v hypokotylech všech genetických variant byla významně rychlejší oproti pozorování v kořeni, kde medián pro EXO84b-GFP činil 11 s (Fendrych et al., 2013). Pro srovnání, mnou pozorovaný medián EXO84b-GFP v hypokotylu činil 5 s pro WT a 4,5 s pro mutanty ARP2/3 komplexu. Důvodem této odlišnosti může být použití odlišného modelu (hypokotyl vs. kořen) a také odlišná metodika měření. Fendrych et al. (2013) měřili LT teček manuálně pomocí kymogramů. V mém případě byla použita automatická detekce EXO84b-GFP teček, která umožňuje zachytit i velmi krátké jevy, které by při ručním měření mohly zůstat přehlédnuty. Velmi rychlé LT byly též pozorovány i pro další markery hodnocené automatickou analýzou (Narasimhan et al., 2020; Voloshina, 2023). Není však vyloučeno, že se automatická analýza dopouští chyb a detekuje i události, které by člověk z analýzy jednoznačně vyloučil. V současné době se jedná o velmi aktuální otázku, zda je pro podobný typ experimentů vhodnější automatická či manuální analýza. Tuto polemiku by bylo vhodné vyřešit komparativními experimenty, což je ovšem nad rámec této diplomové práce.

Otázkou též zůstává biologický význam těchto velmi krátkých událostí. Zdá se, že existence podjednotek komplexu exocyst nemusí vždy představovat fúzní událost, nýbrž část komplexů čeká předpřipravena na PM (Fendrych et al., 2013). Pozorovat probíhající exocytické události lze buď kolokalizací dvou fluorescenčních markerů nebo pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Studium za použití TEM je náročné, neboť exocytóza je velmi dynamická a zřídka dochází k zachycení události (Toyooka et al., 2009). Při použití dvojitě značených linií zase může být problémem správná volba markeru váčku, stejně jako možné protékání signálu z jednoho kanálu do druhého (Jelínková, 2021). Zjistit konkrétní funkci a význam těchto krátkých LT tudíž představuje výzvu pro experimentální biologii.

## 5.2 Kultivace a mikroskopie pylových láček

Pro růst pylové láčky je důležitá komunikace se samičímí pletivy (Mizuta & Higashiyama, 2018). Přesto je možné láčky pěstovat také *in vitro*. Ve své práci používám upravený protokol podle Boavida & McCormick (2007). Kultivace pylových láček je obtížná, neboť jsou velmi citlivé k teplotě, vlhkosti, pH a osmotickému prostředí (Boavida & McCormick, 2007; Burke et al., 2004; L.-M. Fan et al., 2003). Naše laboratoř začala používat pylové láčky jako pokusný materiál teprve nedávno, a proto stále optimalizujeme kultivační postupy. První půl rok mých pokusů na láčkách provázely nezdary. Mnou pěstované láčky měly nízkou klíčivost, rostly pomalu a při pozorování pod mikroskopem praskaly.

Obzvláště obtížné bylo pozorovat láčky ARP2/3 mutant. V literatuře sice zatím nebyl popsán láčkový fenotyp mutant ARP2/3 (Yanagisawa et al., 2013), v naší laboratoři přesto byly u těchto mutant pozorovány odchylky od normálního vývoje pylových láček. Mezi tyto odchylky patří kratší, širší, pomaleji rostoucí láčky s odchylkami v zonaci buněčné stěny (nepublikované výsledky). Pomalejší růst láček mutant ARP2/3 jsem pozorovala i ve svých experimentech. Navíc se v pylu ARP2/3 mutant vyskytovalo větší množství abortovaných pylových zrn než u WT (nepublikované výsledky).

Jednou z příčin nezdarů při kultivaci pylových láček mohlo být roční období. S pokusy jsem začala na podzim 2022 a většina pokusů na láčkách probíhala přes zimu 2022 a 2023. Kvetení *Arabidopsis* závisí především na teplotě a délce dne (Chew et al., 2012). Pokusné rostliny byly po celou dobu pěstovány v kultivační místnosti se světelným režimem napodobujícím dlouhý den (16 hodin světla/8hodin tmy) s konstantní teplotou 23°C. Chew et al. (2012) ukazují, že obzvláště na podzim a v zimě je pro kvetení důležitý noční pokles teplot, k čemu v kultivační místnosti nedochází. Navíc v průběhu kultivace několikrát došlo k poruchám klimatizace a přehřátí místnosti, v důsledku čehož byl pyl nekvalitní. Zároveň byly láčky na cestě z kultivační místnosti k mikroskopu vystaveny venkovní teplotě. Jednalo se o krátkodobé vystavení (v řádu minut), které ovšem přesto mohlo mít vliv na chování láček. Dalším vlivem mohlo být pH. Zpočátku jsem používala kultivační protokol bez úprav. Jan Martinek později zjistil, že lze dosáhnout lepší klíčivosti, při úpravě pH na hodnotu 6. Po úpravě protokolu jsme dosáhli výrazně lepší klíčivosti.

Závěrečným problémem bylo najít vhodné nastavení pro pozorování *in vitro* kultivovaných láček, aby bylo co nejbližší jejich přirozenému prostředí. Při pozorování láček kultivovaných na povrchu tuhého média zakápnutých před pozorováním kapkou tekutého média a přikrytých krycím sklíčkem, docházelo k častému praskání pylových láček. V kombinaci s nízkou klíčivostí pylu to znamenalo nedostatek materiálu pro pozorování. Proto jsem spolu se školitelkou vyvinula systém, ve kterém pylová zrna rovnou klíčí v kontaktu s krycím sklem překrytá tuhým médiem a během klíčení si musí prorážet cestu tímto médiem. Tudíž je simulován přirozený proces, při kterém si láčky razí cestu pletivy čnělky (Burri et al., 2018). Tento systém se osvědčil a všechny snímky láček prezentované v této práci byly mikroskopovány tímto způsobem. K podobnému zjištění, že láčky *A. thaliana* lépe rostou v tužším médiu došly také Kapoor & Geitmann (2023).

### 5.2.1 Lokalizace ARPC5 a ARPC3 v pylových láčkách

Fluorescenčně značené podjednotky ARPC3-GFP a ARPC5-GFP mají v pylových láčkách čisté cytoplazmatickou lokalizaci. Nejvíce signálu ARPC3-GFP a ARPC5-GFP jsem pozorovala ve špičce láčky. K hromadění signálu ve špičce láčky však dochází i za použití volného GFP (nepublikované výsledky), tudíž tato lokalizace nejspíš pouze odráží proudění cytoplazmy v lácce. Jedná se navíc o nadměrnou expresi řízenou ubiquitinovým promotorem (Holtorf et al., 1995), která může do pozorování zanést artefakty. Mé pozorování lokalizace ARP2/3 podjednotek však odpovídá lokalizaci komplexu v jiných buňkách (Havelková et al., 2015; Martinek et al., 2023). Lokalizace podjednotek ARP2/3 v pylových láčkách *A. thaliana* zatím nebyla publikována. Mé výsledky však lze srovnat s homology ARP2/3 z rajčete (*Solanum lycopersicum*) transientně exprimovanými v láčkách tabáku (*Nicotiana tabacum*), které též mají převážně cytoplazmatickou lokalizaci (H. K. Liu et al., 2020).

V mých experimentech, stejně jako u Liu et al. (2020), fluorescenčně značené ARP2/3 podjednotky značily malé pohyblivé cytoplazmatické struktury. Tyto struktury by mohly představovat ARP2/3 komplex asociovaný s peroxisomy (Martinek et al., 2023). Pro potvrzení této hypotézy by však bylo nutné použít peroxisomální marker. Zajímavý je též zvýšený výskyt signálu ARPC3-GFP a ARPC5-GFP v místě odpovídajícímu actin fringe (Obrázek 6). Bylo by zajímavé sledovat lokalizaci těchto markerů v přítomnosti markeru aktinu a zjistit tak, zdali spolu tyto struktury kolokalizují. Podobnou lokalizaci v oblasti actin fringe mají i další proteiny asociované s aktinem, například FIMBRIN5, který svazuje AF (Wu et al., 2010).

### 5.2.2 Lokalizace EXO84b-GFP v pylových láčkách

V rostlinách je největší koncentrace exocystu pozorována ve špičkách pylových láček, kořenových vlásků a v buněčné přepážce během dělení, což značí, že hraje roli v polární sekreci (Fendrych et al., 2010; Genre et al., 2012; Hála et al., 2008). Přestože o markeru EXO84b-GFP vyšlo několik publikací, jeho lokalizace v pylové lácce zatím nebyla publikována. V literatuře však existuje popis lokalizace jiných podjednotek komplexu exocyst, například EXO70A2, nebo SEC3 (Bloch et al., 2016; Marković et al., 2020). Mnou pozorovaná lokalizace EXO84b-GFP v pylových láčkách se podobala výše zmíněným podjednotkám (Obrázek 7). Podobně jako EXO70A2, i EXO84b-GFP vydávalo nejsilnější signál na PM ve špičce. V kontrastu s tím podjednotka EXO70C2 vykazuje cytoplazmatickou lokalizaci a bylo navrženo že může fungovat jako regulátor exocytózy mimo komplex exocyst (Synek et al., 2017). Membránová lokalizace EXO84b-GFP podporuje hypotézu, že EXO84b-GFP v pylové lácce interaguje s ostatními podjednotkami komplexu exocyst a účastní se polarizované sekrece jako součást komplexu.

Na rozdíl od pozorování v kořeni a hypokotylu jsem nebyla schopná detekovat na PM láček tečky EXO84b-GFP. Důvodem je pravděpodobně rozdíl v použité mikroskopické technice. Pro snímání pylových láček jsem použila klasickou konfokální mikroskopii, zatímco buňky hypokotylu jsem snímala na SDCM. Klasický laserový konfokální mikroskop není vhodný pro snímání dynamických událostí, neboť je limitován rychlostí snímání. Zároveň pylové láčky nejsou vhodný model pro výzkum membránových struktur, neboť mají válcovitý tvar, a tudíž není snadné pozorovat větší úsek membrány v jedné optické rovině. V naší laboratoři se zatím

nepodařilo láčky pozorovat pomocí VAEM, kvůli špatnému kontaktu s krycím sklíčkem (nepublikované výsledky), přestože je u nás tato metoda na jiných buněčných typech zavedená (Martinek et al., 2023). V jiných výzkumných skupinách je však VAEM pro pozorování pylových láček používán (Chebli et al., 2012; Kaneda et al., 2019). Chebli et al. (2012) například použili VAEM v láčkách *A. thaliana* pro pozorování fluorescenčně značeného markeru CESA6-YFP. Kaneda et al. zase použili VAEM pro sledování CME (2019).

V mých pozorováních jsem nebyla schopna detekovat statisticky signifikantní rozdíl v lokalizaci EXO84b-GFP v pylových láčkách WT a ARP2/3 mutant. Pro vrcholový růst láček je regulace polarizované exocytózy nezbytná, což dokazuje i fenotyp EXO84b mutantů (samčí sterilita; Fendrych et al., 2010). Proto se dá předpokládat, že při výrazném narušení lokalizace EXO84 by láčky ARP2/3 mutant vykazovaly silnější fenotyp. V této práci jsem nehodnotila dynamiku EXO84b na membráně v pylových láčkách. Otázkou proto zůstává, jakou by měla mutace ARP2/3 komplexu vliv na dynamiku tohoto markeru. V této práci jsem ukázala, že EXO84b-GFP má větší dynamiku v PM pokožkových buněk hypokotylů ARP2/3 mutant, přesto že lokalizace markeru na membráně je podobná (Obrázek 3). Sledovat dynamiku EXO84b-GFP však nebylo možné z technických důvodů, jelikož konfokální mikroskop neposkytuje dostatečné rozlišení a pozorování pomocí TIRF/VAEM se nezdařilo.

## 6. Závěry

- 1) Pomocí spinning disk konfokální mikroskopie byla sledována lokalizace a dynamika EXO84b-GFP v ARP2/3 mutantech a divokém typu (WT). EXO84b-GFP tvoří na plazmatické membráně pokožkových buněk hypokotylu tečky (z nichž alespoň část nejspíš reprezentuje exocytické události). V ARP2/3 mutantách má oproti WT větší proporce těchto událostí kratší lifetime (LT) v intervalu 0-5 s, a naopak menší proporce se jich vyskytuje v intervalu 8-11 s. Zároveň se mírně liší lokalizace tohoto markeru na plazmatické membráně (PM), neboť ve WT tvoří transverzální pruhy, zatímco v ARP2/3 mutantách je signál více rozptýlený.
- 2) Pomocí konfokální mikroskopie byla dále sledována lokalizace EXO84b-GFP v pylových láčkách ARP2/3 mutant a WT. Všechny genetické varianty vykazovaly nejsilnější signál EXO84b-GFP na špičce pylové láčky v blízkosti PM. Slabší signál byl též pozorovatelný v cytoplazmě. Mutace podjednotek ARP2/3 komplexu nevedla k statisticky významné změně lokalizace EXO84b-GFP v pylové láčce.
- 3) Pomocí konfokální mikroskopie byla pozorována lokalizace ARPC3-GFP a ARPC5-GFP v pylových láčkách. Obě podjednotky vydávaly difuzní cytoplazmatický signál s maximem tvořícím prstenec v subapikální zóně a též jasněji značily malé pohyblivé struktury v cytoplazmě.



## Seznam literatury

- Adamowski, M., Li, L., & Friml, J. (2019). Reorientation of Cortical Microtubule Arrays in the Hypocotyl of *Arabidopsis thaliana* Is Induced by the Cell Growth Process and Independent of Auxin Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133337>
- Amor, Y., Haigler, C. H., Johnson, S., Wainscott, M., & Delmer, D. P. (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9353–9357. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9353>
- An, S. J., Rivera-Molina, F., Anneken, A., Xi, Z., McNellis, B., Polejaev, V. I., & Toomre, D. (2021). An active tethering mechanism controls the fate of vesicles. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25465-y>
- Åström, H., Sorri, O., & Raudaskoski, M. (1995). Role of microtubules in the movement of the vegetative nucleus and generative cell in tobacco pollen tubes. *Sexual Plant Reproduction*, 8(2), 61–69. <https://doi.org/10.1007/BF00230890>
- Avisar, D., Abu-Abied, M., Belausov, E., Sadott, E., Hawes, C., & Sparkes, I. A. (2009). A comparative study of the involvement of 17 arabidopsis myosin family members on the motility of golgi and other organelles. *Plant Physiology*, 150(2). <https://doi.org/10.1104/pp.109.136853>
- Baluška, F., Jasik, J., Edelmann, H. G., Salajová, T., & Volkmann, D. (2001). Latrunculin B-induced plant dwarfism: Plant cell elongation is F-actin-dependent. *Developmental Biology*, 231(1), 113–124. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0115>
- Bandmann, V., Müller, J. D., Köhler, T., & Homann, U. (2012). Uptake of fluorescent nano beads into BY2-cells involves clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. *FEBS Letters*, 586(20), 3626–3632. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.08.008>
- Barratt, D. H. P., Kölling, K., Graf, A., Pike, M., Calder, G., Findlay, K., Zeeman, S. C., & Smith, A. M. (2011). Callose Synthase *GSL7* Is Necessary for Normal Phloem Transport and Inflorescence Growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 155(1), 328–341. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166330>
- Bashline, L., Li, S., Zhu, X., & Gu, Y. (2015). The TWD40-2 protein and the AP2 complex cooperate in the clathrin-mediated endocytosis of cellulose synthase to regulate cellulose biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(41), 12870–12875. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509292112>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. M., & Walker, S. C. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1). <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Beffa, R. S., Hofer, R. M., Thomas, M., & Meins, F. (1996). Decreased Susceptibility to Viral Disease of [beta]-1,3-Glucanase-Deficient Plants Generated by Antisense Transformation. *The Plant Cell*, 24(2), 1001–1011. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.6.1001>
- Bellinvia, E., García-González, J., Cifrová, P., Martinek, J., Sikorová, L., Havelková, L., & Schwarzerová, K. (2022). CRISPR-Cas9 *Arabidopsis* mutants of genes for ARPC1 and ARPC3

- subunits of ARP2/3 complex reveal differential roles of complex subunits. *Scientific Reports*, 12(1), 18205. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22982-8>
- Bidhendi, A. J., & Geitmann, A. (2018). Finite Element Modeling of Shape Changes in Plant Cells. *Plant Physiology*, 176(1), 41–56. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01684>
- Bloch, D., Pleskot, R., Pejchar, P., Potocký, M., Trpkošová, P., Cwiklik, L., Vukašinović, N., Sternberg, H., Yalovsky, S., & Žárský, V. (2016). Exocyst SEC3 and phosphoinositides define sites of exocytosis in pollen tube initiation and growth. *Plant Physiology*, 172(2), 980–1002. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00690>
- Boavida, L. C., & McCormick, S. (2007). Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 52(3), 570–582. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03248.x>
- Bosch, M., Cheung, A. Y., & Hepler, P. K. (2005). Pectin Methyltransferase, a Regulator of Pollen Tube Growth. *Plant Physiology*, 138(3), 1334–1346. <https://doi.org/10.1104/pp.105.059865>
- Bou Daher, F., & Geitmann, A. (2011). Actin is Involved in Pollen Tube Tropism Through Redefining the Spatial Targeting of Secretory Vesicles. *Traffic*, 12(11), 1537–1551. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01256.x>
- Bove, J., Vaillancourt, B., Kroeger, J., Hepler, P. K., Wiseman, P. W., & Geitmann, A. (2008). Magnitude and direction of vesicle dynamics in growing pollen tubes using spatiotemporal image correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching. *Plant Physiology*, 147(4), 1646–1658. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120212>
- Braidwood, L., Breuer, C., & Sugimoto, K. (2014). My body is a cage: Mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytologist*, 201(2), 388–402. <https://doi.org/10.1111/nph.12473>
- Breygina, M., Klimenko, E., & Schekaleva, O. (2021). Pollen Germination and Pollen Tube Growth in Gymnosperms. *Plants*, 10(7), 1301. <https://doi.org/10.3390/plants10071301>
- Brillada, C., Teh, O. K., Ditengou, F. A., Lee, C. W., Klecker, T., Saeed, B., Furlan, G., Zietz, M., Hause, G., Eschen-Lippold, L., Hoehenwarter, W., Lee, J., Ott, T., & Trujillo, M. (2021). Exocyst subunit Exo70B2 is linked to immune signaling and autophagy. *The Plant Cell*, 33(2), 404–419. <https://doi.org/10.1093/plcell/koaa022>
- Bröcker, C., Engelbrecht-Vandré, S., & Ungermann, C. (2010). Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. In *Current Biology* (Vol. 20, Issue 21). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.015>
- Brodzki, P. (2015). Callose in compression wood tracheids. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 41(3), 321–327. <https://doi.org/10.5586/asbp.1972.025>
- Burke, J. J., Velten, J., & Oliver, M. J. (2004). In Vitro Analysis of Cotton Pollen Germination. *Agronomy Journal*, 96(2), 359–368. <https://doi.org/10.2134/agronj2004.3590>
- Burri, J. T., Vogler, H., Läubli, N. F., Hu, C., Grossniklaus, U., & Nelson, B. J. (2018). Feeling the force: how pollen tubes deal with obstacles. *New Phytologist*, 220(1), 187–195. <https://doi.org/10.1111/nph.15260>

- Cai, C., Henty-Ridilla, J. L., Szymanski, D. B., & Staiger, C. J. (2014). Arabidopsis Myosin XI: A Motor Rules the Tracks. *Plant Physiology*, *166*(3), 1359–1370. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244335>
- Cai, G. (2022). The legacy of kinesins in the pollen tube 30 years later. In *Cytoskeleton* (Vol. 79, Issues 1–3, pp. 8–19). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cm.21713>
- Cai, G., Faleri, C., Casino, C. D. C., Emons, A. M. C., & Cresti, M. (2011). Distribution of callose synthase, cellulose synthase, and sucrose synthase in tobacco pollen tube is controlled in dissimilar ways by actin filaments and microtubules. *Plant Physiology*, *155*(3), 1169–1190. <https://doi.org/10.1104/pp.110.171371>
- Cai, G., Parrotta, L., & Cresti, M. (2015). Organelle trafficking, the cytoskeleton, and pollen tube growth. *Journal of Integrative Plant Biology*, *57*(1), 63–78. <https://doi.org/10.1111/jipb.12289>
- Cao, L., Henty-Ridilla, J. L., Blanchoin, L., & Staiger, C. J. (2016). Profilin-Dependent Nucleation and Assembly of Actin Filaments Controls Cell Elongation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *170*(1), 220–233. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01321>
- Cao, X., Ballew, N., & Barlowe, C. (1998). Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO Journal*, *17*(8), 2156–2165. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2156>
- Cavalier, D. M., Lerouxel, O., Neumetzler, L., Yamauchi, K., Reinecke, A., Freshour, G., Zabolina, O. A., Hahn, M. G., Burgert, I., Pauly, M., Raikhel, N. V., & Keegstra, K. (2008). Disrupting two Arabidopsis thaliana xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *Plant Cell*, *20*(6), 1519–1537. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059873>
- Chan, J., & Coen, E. (2020). Interaction between Autonomous and Microtubule Guidance Systems Controls Cellulose Synthase Trajectories. *Current Biology*, *30*(5), 941–947.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.066>
- Chebli, Y., Kaneda, M., Zerzour, R., & Geitmann, A. (2012). The Cell Wall of the Arabidopsis Pollen Tube—Spatial Distribution, Recycling, and Network Formation of Polysaccharides. *Plant Physiology*, *160*(4), 1940–1955. <https://doi.org/10.1104/pp.112.199729>
- Chebli, Y., Kroeger, J., & Geitmann, A. (2013). Transport Logistics in Pollen Tubes. *Molecular Plant*, *6*(4), 1037–1052. <https://doi.org/10.1093/mp/sst073>
- Cheung, A. Y., Niroomand, S., Zou, Y., & Wu, H.-M. (2010). A transmembrane formin nucleates subapical actin assembly and controls tip-focused growth in pollen tubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(37), 16390–16395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008527107>
- Chew, Y. H., Wilczek, A. M., Williams, M., Welch, S. M., Schmitt, J., & Halliday, K. J. (2012). An augmented Arabidopsis phenology model reveals seasonal temperature control of flowering time. *The New Phytologist*, *194*(3), 654–665. <https://doi.org/10.2307/newphytologist.194.3.654>
- Cifrová, P., Oulehlová, D., Kollárová, E., Martinek, J., Rosero, A., Žárský, V., Schwarzerová, K., & Cvrčková, F. (2020). Division of Labor Between Two Actin Nucleators—the Formin FH1 and the ARP2/3 Complex—in Arabidopsis Epidermal Cell Morphogenesis. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00148>

- Cosgrove, D. J. (2018). Diffuse Growth of Plant Cell Walls. *Plant Physiology*, 176(1), 16–27. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01541>
- Cui, X., Zou, M., & Li, J. (2023). Basally distributed actin array drives embryonic hypocotyl elongation during the seed-to-seedling transition in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 240(1), 191–206. <https://doi.org/10.1111/nph.19149>
- Cvrčková, F. (2000). Are plant formins integral membrane proteins? *Genome Biology*, 1(1), research001.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-1-research001>
- Cvrčková, F., Grunt, M., Bezvoda, R., Hála, M., Kulich, I., Rawat, A., & Žárský, V. (2012). Evolution of the Land Plant Exocyst Complexes. *Frontiers in Plant Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00159>
- Dardelle, F., Lehner, A., Ramdani, Y., Bardor, M., Lerouge, P., Driouich, A., & Mollet, J. C. (2010). Biochemical and immunocytological characterizations of arabidopsis pollen tube cell wall. *Plant Physiology*, 153(4). <https://doi.org/10.1104/pp.110.158881>
- Dauphin, B. G., Ranocha, P., Dunand, C., & Burlat, V. (2022). Cell-wall microdomain remodeling controls crucial developmental processes. *Trends in Plant Science*, 27(10), 1033–1048. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.05.010>
- Du, J., Kirui, A., Huang, S., Wang, L., Barnes, W. J., Kiemle, S. N., Zheng, Y., Rui, Y., Ruan, M., Qi, S., Kim, S. H., Wang, T., Cosgrove, D. J., Anderson, C. T., & Xiao, C. (2020). Mutations in the Pectin Methyltransferase QUASIMODO2 influence cellulose biosynthesis and wall integrity in arabidopsis. *Plant Cell*, 32(11), 3576–3597. <https://doi.org/10.1105/TPC.20.00252>
- Du, Y., Overdijk, E. J. R., Berg, J. A., Govers, F., & Bouwmeester, K. (2018). Solanaceous exocyst subunits are involved in immunity to diverse plant pathogens. *Journal of Experimental Botany*, 69(3), 655–666. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx442>
- Duan, Y., Guo, Q., Zhang, T., Meng, Y., Sun, D., Luo, G., & Liu, Y. (2019). Cyclin-dependent kinase-mediated phosphorylation of the exocyst subunit Exo84 in late G1 phase suppresses exocytic secretion and cell growth in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 294(29), 11323–11332. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008591>
- Dubenecká, K. (2018). *Analýza dynamiky CESA komplexů v rostlinách s narušeným cytoskeletem* [Diplomová práce]. Karlova Universita.
- Dumas, C., & Knox, R. B. (1983). Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theoretical and Applied Genetics*, 67(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF00303914>
- Duncombe, S. G., Chethan, S. G., & Anderson, C. T. (2022). Super-resolution imaging illuminates new dynamic behaviors of cellulose synthase. *Plant Cell*, 34(1), 273–286. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab227>
- Dyachok, J., Shao, M. R., Vaughn, K., Bowling, A., Facette, M., Djakovic, S., Clark, L., & Smith, L. (2008). Plasma membrane-associated SCAR complex subunits promote cortical F-actin accumulation and normal growth characteristics in arabidopsis roots. *Molecular Plant*, 1(6). <https://doi.org/10.1093/mp/ssn059>

- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., & Kirschner, M. W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, *418*(6899). <https://doi.org/10.1038/nature00859>
- Fan, L.-M., Wang, Y.-F., & Wu, W.-H. (2003). Outward K<sup>+</sup> channels in *Brassica chinensis* pollen protoplasts are regulated by external and internal pH. *Protoplasma*, *220*(3–4), 143–152. <https://doi.org/10.1007/s00709-002-0037-4>
- Fan, T., Fan, Y., Yang, Y., Qian, D., Niu, Y., An, L., & Xiang, Y. (2023). SEC1A and SEC6 synergistically regulate pollen tube polar growth. *Journal of Integrative Plant Biology*, *65*(7), 1717–1733. <https://doi.org/10.1111/jipb.13486>
- Fendrych, M., Synek, L., Pečenková, T., Drdová, E. J., Sekereš, J., De Rycke, R., Nowack, M. K., & Žárský, V. (2013). Visualization of the exocyst complex dynamics at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(4), 510–520. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-06-0492>
- Fendrych, M., Žárský, V., Synek, L., Pečenková, T., Toupalová, H., Cole, R., Drdová, E., Nebesářová, J., Sedinová, M., Hála, M., & Fowler, J. E. (2010). The *Arabidopsis* exocyst complex is involved in cytokinesis and cell plate maturation. *Plant Cell*, *22*(9), 3053–3065. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074351>
- Feraru, E., Feraru, M. I., Kleine-Vehn, J., Martinière, A., Mouille, G., Vanneste, S., Vernhettes, S., Runions, J., & Friml, J. (2011). PIN Polarity Maintenance by the Cell Wall in *Arabidopsis*. *Current Biology*, *21*(4), 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.036>
- Fišerová, J., Schwarzerová, K., Petrášek, J., & Opatrný, Z. (2006). ARP2 and ARP3 are localized to sites of actin filament nucleation in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, *227*(2–4), 119–128. <https://doi.org/10.1007/s00709-006-0146-6>
- Franklin-Tong, V. E. (1999). Signaling and the Modulation of Pollen Tube Growth. *The Plant Cell*, *11*(4), 727–738. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.727>
- Freitas, C. M. P., Coimbra, J. S. R., Souza, V. G. L., & Sousa, R. C. S. (2021). Structure and Applications of Pectin in Food, Biomedical, and Pharmaceutical Industry: A Review. *Coatings*, *11*(8), 922. <https://doi.org/10.3390/coatings11080922>
- Gadeyne, A., Sánchez-Rodríguez, C., Vanneste, S., Di Rubbo, S., Zauber, H., Vanneste, K., Van Leene, J., De Winne, N., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Cannoot, B., Vercruyse, L., Mayers, J. R., Adamowski, M., Kania, U., Ehrlich, M., Schweighofer, A., Ketelaar, T., ... Van Damme, D. (2014). The TPLATE Adaptor Complex Drives Clathrin-Mediated Endocytosis in Plants. *Cell*, *156*(4), 691–704. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.039>
- Ganesan, S. J., Feyder, M. J., Chemmama, I. E., Fang, F., Rout, M. P., Chait, B. T., Shi, Y., Munson, M., & Sali, A. (2020). Integrative structure and function of the yeast exocyst complex. *Protein Science*, *29*(6), 1486–1501. <https://doi.org/10.1002/pro.3863>
- García-González, J., Kebrlová, Š., Semerák, M., Lacek, J., Kotannal Baby, I., Petrášek, J., & Schwarzerová, K. (2020). Arp2/3 Complex Is Required for Auxin-Driven Cell Expansion Through Regulation of Auxin Transporter Homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00486>

- Geitmann, A., Li, Y. Q., & Cresti, M. (1996). The Role of the Cytoskeleton and Dictyosome Activity in the Pulsatory Growth of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida* Pollen Tubes. *Botanica Acta*, *109*(2), 102–109. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1996.tb00549.x>
- Genre, A., Ivanov, S., Fendrych, M., Faccio, A., Žárský, V., Bisseling, T., & Bonfante, P. (2012). Multiple exocytotic markers accumulate at the sites of perifungal membrane biogenesis in arbuscular mycorrhizas. *Plant and Cell Physiology*, *53*(1), 244–255. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr170>
- Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'Avino, R., Tamburrini, M., Ciardiello, M. A., & Camardella, L. (2004). Pectin methylesterase inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1696*(2), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.08.011>
- Gutierrez, R., Lindeboom, J. J., Paredez, A. R., Emons, A. M. C., & Ehrhardt, D. W. (2009). Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nature Cell Biology*, *11*(7), 797–806. <https://doi.org/10.1038/ncb1886>
- Haas, K. T., Wightman, R., Meyerowitz, E. M., & Peaucelle, A. (2020). Pectin homogalacturonan nanofilament expansion drives morphogenesis in plant epidermal cells. *Science*, *367*(6481), 1003–1007. <https://doi.org/10.1126/science.aaz5103>
- Hála, M., Cole, R., Synek, L., Drdová, E., Pečenková, T., Nordheim, A., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Hochholdinger, F., Fowler, J. E., & Žárský, V. (2008). An exocyst complex functions in plant cell growth in Arabidopsis and tobacco. *Plant Cell*, *20*(5), 1330–1345. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059105>
- Havelková, L., Nanda, G., Martinek, J., Bellinvia, E., Sikorová, L., Šlajchero, K., Seifertová, D., Fischer, L., Fišerová, J., Petrášek, J., & Schwarzerová, K. (2015). Arp2/3 complex subunit ARPC2 binds to microtubules. *Plant Science*, *241*, 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.10.001>
- He, M., Lan, M., Zhang, B., Zhou, Y., Wang, Y., Zhu, L., Yuan, M., & Fu, Y. (2018). Rab-H1b is essential for trafficking of cellulose synthase and for hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, *60*(11), 1051–1069. <https://doi.org/10.1111/jipb.12694>
- Heider, M. R., Gu, M., Duffy, C. M., Mirza, A. M., Marcotte, L. L., Walls, A. C., Farrall, N., Hakhverdyan, Z., Field, M. C., Rout, M. P., Frost, A., & Munson, M. (2016). Subunit connectivity, assembly determinants and architecture of the yeast exocyst complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, *23*(1), 59–66. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3146>
- Heider, M. R., & Munson, M. (2012). Exorcising the Exocyst Complex. *Traffic*, *13*(7), 898–907. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01353.x>
- Hématy, K., De Bellis, D., Wang, X., Mähönen, A. P., & Geldner, N. (2022). Analysis of exocyst function in endodermis reveals its widespread contribution and specificity of action. *Plant Physiology*, *189*(2), 557–566. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac019>
- Hepler, P. K., & Winship, L. J. (2015). The pollen tube clear zone: Clues to the mechanism of polarized growth. *Journal of Integrative Plant Biology*, *57*(1), 79–92. <https://doi.org/10.1111/jipb.12315>

- Higgs, H. N., & Pollard, T. D. (2001). Regulation of Actin Filament Network Formation Through ARP2/3 Complex: Activation by a Diverse Array of Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 649–676. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.649>
- Hoffmann, N., King, S., Samuels, A. L., & McFarlane, H. E. (2021). Subcellular coordination of plant cell wall synthesis. *Developmental Cell*, 56(7), 933–948. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.004>
- Holtorf, S., Apel, K., & Bohlmann, H. (1995). Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 29(4). <https://doi.org/10.1007/BF00041155>
- Hong, Z., Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (2001). A Cell Plate–Specific Callose Synthase and Its Interaction with Phragmoplastin. *The Plant Cell*, 13(4), 755–768. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.755>
- Huck, N., Moore, J. M., Federer, M., & Grossniklaus, U. (2003). The *Arabidopsis* mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. *Development*, 130(10), 2149–2159. <https://doi.org/10.1242/dev.00458>
- Idilli, A. I., Morandini, P., Onelli, E., Rodighiero, S., Caccianiga, M., & Moscatelli, A. (2013). Microtubule depolymerization affects endocytosis and exocytosis in the tip and influences endosome movement in tobacco pollen tubes. *Molecular Plant*, 6(4), 1109–1130. <https://doi.org/10.1093/mp/sst099>
- Ingouff, M., Gerald, J. N. F., Guérin, C., Robert, H., Sørensen, M. B., Damme, D. Van, Geelen, D., Blanchoin, L., & Berger, F. (2005). Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis. *Nature Cell Biology*, 7(4), 374–380. <https://doi.org/10.1038/ncb1238>
- Jelínková, B. (2021). *Analýza lokalizace endomembránových markerů v kortikální vrstvě rostlinných buněk a jejich interakce s komplexem Arp2/3* [Diplomová práce]. Univerzita Karlova.
- Jeong, Y. Y., Lee, H. Y., Kim, S. W., Noh, Y. S., & Seo, P. J. (2021). Optimization of protoplast regeneration in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00720-x>
- Johnson, A., Gnyliukh, N., Kaufmann, W. A., Narasimhan, M., Vert, G., Bednarek, S. Y., & Friml, J. (2020). Experimental toolbox for quantitative evaluation of clathrin-mediated endocytosis in the plant model *Arabidopsis*. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.248062>
- Kandasamy, M. K., McKinney, E. C., & Meagher, R. B. (2009). A single vegetative actin isovariant overexpressed under the control of multiple regulatory sequences is sufficient for normal *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 21(3), 701–718. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061960>
- Kandasamy, M. K., Nasrallah, J. B., & Nasrallah, M. E. (1994). Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Development*, 120(12), 3405–3418. <https://doi.org/10.1242/dev.120.12.3405>
- Kaneda, M., van Oostende-Triplet, C., Chebli, Y., Testerink, C., Bednarek, S. Y., & Geitmann, A. (2019). Plant AP180 N-Terminal Homolog Proteins Are Involved in Clathrin-Dependent Endocytosis

- during Pollen Tube Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 60(6), 1316–1330. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz036>
- Kapoor, K., & Geitmann, A. (2023). Pollen tube invasive growth is promoted by callose. *Plant Reproduction*. <https://doi.org/10.1007/s00497-023-00458-7>
- Ketelaar, T., Galway, M. E., Mulder, B. M., & Emons, A. M. C. (2008). Rates of exocytosis and endocytosis in *Arabidopsis* root hairs and pollen tubes. *Journal of Microscopy*, 231(2), 265–273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02031.x>
- Kim, S.-J., & Brandizzi, F. (2016). The plant secretory pathway for the trafficking of cell wall polysaccharides and glycoproteins. *Glycobiology*, 26(9), 940–949. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww044>
- Kim, S.-J., Chandrasekar, B., Rea, A. C., Danhof, L., Zemelis-Durfee, S., Thrower, N., Shepard, Z. S., Pauly, M., Brandizzi, F., & Keegstra, K. (2020). The synthesis of xyloglucan, an abundant plant cell wall polysaccharide, requires CSLC function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(33), 20316–20324. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007245117>
- Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, C. R., & Brown, R. M. (1999). Immunogold Labeling of Rosette Terminal Cellulose-Synthesizing Complexes in the Vascular Plant *Vigna angularis*. *The Plant Cell*, 11(11), 2075–2085. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.11.2075>
- Kollárová, E., Baquero Forero, A., & Cvrčková, F. (2021). The *Arabidopsis thaliana* Class II Formin FH13 Modulates Pollen Tube Growth. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.599961>
- Kollmar, M., Lbik, D., & Enge, S. (2012). Evolution of the eukaryotic ARP2/3 activators of the WASP family: WASP, WAVE, WASH, and WHAMM, and the proposed new family members WAWH and WAML. *BMC Research Notes*, 5(1), 88. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-88>
- Kong, Y., Peña, M. J., Renna, L., Avcı, U., Pattathil, S., Tuomivaara, S. T., Li, X., Reiter, W. D., Brandizzi, F., Hahn, M. G., Darvill, A. G., York, W. S., & O’neill, M. A. (2015). Galactose-depleted xyloglucan is dysfunctional and leads to dwarfism in arabidopsis. *Plant Physiology*, 167(4), 1296–1306. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255943>
- Kulich, I., Cole, R., Drdová, E., Cvrčková, F., Soukup, A., Fowler, J., & Žárský, V. (2010). *Arabidopsis* exocyst subunits *SEC8* and *EXO70A1* and exocyst interactor *ROH1* are involved in the localized deposition of seed coat pectin. *New Phytologist*, 188(2), 615–625. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03372.x>
- Kulich, I., Pečenková, T., Sekereš, J., Smetana, O., Fendrych, M., Foissner, I., Höftberger, M., & Žárský, V. (2013). *Arabidopsis* Exocyst Subcomplex Containing Subunit EXO70B1 Is Involved in Autophagy-Related Transport to the Vacuole. *Traffic*, 14(11), 1155–1165. <https://doi.org/10.1111/tra.12101>
- Kulich, I., Vojtková, Z., Glanc, M., Ortmannová, J., Rasmann, S., & Žárský, V. (2015). Cell wall maturation of *arabidopsis* trichomes is dependent on exocyst subunit EXO70H4 and involves callose deposition. *Plant Physiology*, 168(1), 120–131. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00112>



- Kulich, I., Vojtková, Z., Sabol, P., Ortmannová, J., Neděla, V., Tihlaříková, E., & Zárský, V. (2018). Exocyst subunit EXO70H4 has a specific role in callose synthase secretion and silica accumulation. *Plant Physiology*, *176*(3), 2040–2051. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01693>
- Laitinen, E., Nieminen, K. M., Vihinen, H., & Raudaskoski, M. (2002). Movement of generative cell and vegetative nucleus in tobacco pollen tubes is dependent on microtubule cytoskeleton but independent of the synthesis of callose plugs. *Sexual Plant Reproduction*, *15*(4), 195–204. <https://doi.org/10.1007/s00497-002-0155-3>
- Lan, Y., Liu, X., Fu, Y., & Huang, S. (2018). Arabidopsis class I formins control membrane-originated actin polymerization at pollen tube tips. *PLOS Genetics*, *14*(11), e1007789. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007789>
- Larson, E. R., Ortmannová, J., Donald, N. A., Alvim, J., Blatt, M. R., & Žárský, V. (2020). Synergy among Exocyst and SNARE Interactions Identifies a Functional Hierarchy in Secretion during Vegetative Growth. *The Plant Cell*, *32*(9), 2951–2963. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00280>
- Lassig, R., Gutermuth, T., Bey, T. D., Konrad, K. R., & Romeis, T. (2014). Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *The Plant Journal*, *78*(1), 94–106. <https://doi.org/10.1111/tbj.12452>
- Lee, Y. J., Szumlanski, A., Nielsen, E., & Yang, Z. (2008). Rho-GTPase-dependent filamentous actin dynamics coordinate vesicle targeting and exocytosis during tip growth. *The Journal of Cell Biology*, *181*(7), 1155–1168. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801086>
- Leydon, A. R., Tsukamoto, T., Dunatunga, D., Qin, Y., Johnson, M. A., & Palanivelu, R. (2015). Pollen Tube Discharge Completes the Process of Synergid Degeneration That Is Initiated by Pollen Tube-Synergid Interaction in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *169*(1), 485–496. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00528>
- Li, H., Luo, N., Wang, W., Liu, Z., Chen, J., Zhao, L., Tan, L., Wang, C., Qin, Y., Li, C., Xu, T., & Yang, Z. (2018). The REN4 rheostat dynamically coordinates the apical and lateral domains of Arabidopsis pollen tubes. *Nature Communications*, *9*(1), 2573. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04838-w>
- Li, S., Blanchoin, L., Yang, Z., & Lord, E. M. (2003). The Putative Arabidopsis Arp2/3 Complex Controls Leaf Cell Morphogenesis. *Plant Physiology*, *132*(4), 2034–2044. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028563>
- Li, S., Lei, L., Somerville, C. R., & Gu, Y. (2012). Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1) links microtubules and cellulose synthase complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(1), 185–190. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118560109>
- Li, Y., Tan, X., Wang, M., Li, B., Zhao, Y., Wu, C., Rui, Q., Wang, J., Liu, Z., & Bao, Y. (2017). Exocyst subunit SEC3A marks the germination site and is essential for pollen germination in Arabidopsis thaliana. *Scientific Reports*, *7*(1), 40279. <https://doi.org/10.1038/srep40279>
- Lin, W., Zhou, X., Tang, W., Takahashi, K., Pan, X., Dai, J., Ren, H., Zhu, X., Pan, S., Zheng, H., Gray, W. M., Xu, T., Kinoshita, T., & Yang, Z. (2021). TMK-based cell-surface auxin signalling activates cell-wall acidification. *Nature*, *599*(7884), 278–282. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03976-4>

- Lin, Y., Zeng, Y., Zhu, Y., Shen, J., Ye, H., & Jiang, L. (2021). Plant Rho GTPase signaling promotes autophagy. *Molecular Plant*, *14*(6), 905–920. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.03.021>
- Liu, H. K., Li, Y. J., Wang, S. J., Yuan, T. L., Huang, W. J., Dong, X., Pei, J. Q., Zhang, D., McCormick, S., & Tang, W. H. (2020). Kinase partner protein plays a key role in controlling the speed and shape of pollen tube growth in tomato. *Plant Physiology*, *184*(4). <https://doi.org/10.1104/pp.20.01081>
- Liu, J., Zhao, Y., Sun, Y., He, B., Yang, C., Svitkina, T., Goldman, Y. E., & Guo, W. (2012). Exo70 stimulates the Arp2/3 complex for lamellipodia formation and directional cell migration. *Current Biology*, *22*(16), 1510–1515. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.055>
- Liu, L., Wang, T., Bai, Y., Yan, P., Dai, L., Du, P., Persson, S., & Zhang, Y. (2023). Actomyosin and CSI1/POM2 cooperate to deliver cellulose synthase from Golgi to cortical microtubules in Arabidopsis. *Nature Communications*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43325-9>
- Lockhart, J. A. (1965). An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology*, *8*(2), 264–275. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(65\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0022-5193(65)90077-9)
- Lovy-Wheeler, A., Cárdenas, L., Kunkel, J. G., & Hepler, P. K. (2007). Differential organelle movement on the actin cytoskeleton in lily pollen tubes. *Cell Motility*, *64*(3), 217–232. <https://doi.org/10.1002/cm.20181>
- Lovy-Wheeler, A., Wilsen, K. L., Baskin, T. I., & Hepler, P. K. (2005). Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube. *Planta*, *221*(1), 95–104. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1423-2>
- Luo, C., Shi, Y., & Xiang, Y. (2022). SNAREs Regulate Vesicle Trafficking During Root Growth and Development. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.853251>
- Luo, G., Zhang, J., & Guo, W. (2014). The role of Sec3p in secretory vesicle targeting and exocyst complex assembly. *Molecular Biology of the Cell*, *25*(23), 3813–3822. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0907>
- Luo, G., Zhang, J., Luca, F. C., & Guo, W. (2013). Mitotic phosphorylation of Exo84 disrupts exocyst assembly and arrests cell growth. *Journal of Cell Biology*, *202*(1), 97–111. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211093>
- Luo, N., Yan, A., Liu, G., Guo, J., Rong, D., Kanaoka, M. M., Xiao, Z., Xu, G., Higashiyama, T., Cui, X., & Yang, Z. (2017). Exocytosis-coordinated mechanisms for tip growth underlie pollen tube growth guidance. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01452-0>
- Luo, N., Yan, A., & Yang, Z. (2016). Measuring Exocytosis Rate Using Corrected Fluorescence Recovery After Photoconversion. *Traffic*, *17*(5), 554–564. <https://doi.org/10.1111/tra.12380>
- Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., & Pollard, T. D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose. *Journal of Cell Biology*, *127*(1), 107–115. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.1.107>
- Marković, V., Cvrčková, F., Potocký, M., Kulich, I., Pejchar, P., Kollárová, E., Synek, L., & Žárský, V. (2020). EXO70A2 is critical for exocyst complex function in pollen development. *Plant Physiology*, *184*(4), 1823–1839. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01340>

- Martinek, J., Cifrová, P., Vosolsobě, S., García-González, J., Malínská, K., Mauzerová, Z., Jelínková, B., Krtková, J., Sikorová, L., Leaves, I., Sparkes, I., & Schwarzerová, K. (2023). ARP2/3 complex associates with peroxisomes to participate in pexophagy in plants. *Nature Plants*. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01542-6>
- Mathur, J., Mathur, N., Kernebeck, B., & Hülskamp, M. (2003). Mutations in Actin-Related Proteins 2 and 3 Affect Cell Shape Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *15*(7), 1632–1645. <https://doi.org/10.1105/tpc.011676>
- Mathur, J., Mathur, N., Kirik, V., Kernebeck, B., Srinivas, B. P., & Hülskamp, M. (2003). Arabidopsis CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development*, *130*(14), 3137–3146. <https://doi.org/10.1242/dev.00549>
- Mayers, J. R., Hu, T., Wang, C., Cárdenas, J. J., Tan, Y., Pan, J., & Bednarek, S. Y. (2017). SCD1 and SCD2 form a complex that functions with the exocyst and RabE1 in exocytosis and cytokinesis. *Plant Cell*, *29*(10), 2610–2625. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00409>
- McFarlane, H. E., Mutwil-Anderwald, D., Verbančič, J., Picard, K. L., Gookin, T. E., Froehlich, A., Chakravorty, D., Trindade, L. M., Alonso, J. M., Assmann, S. M., & Persson, S. (2021). A G protein-coupled receptor-like module regulates cellulose synthase secretion from the endomembrane system in Arabidopsis. *Developmental Cell*, *56*(10), 1484-1497.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.031>
- McKenna, S. T., Kunkel, J. G., Bosch, M., Rounds, C. M., Vidali, L., Winship, L. J., & Hepler, P. K. (2009). Exocytosis precedes and predicts the increase in growth in oscillating pollen tubes. *Plant Cell*, *21*(10), 3026–3040. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069260>
- Mecchia, M. A., Santos-Fernandez, G., Duss, N. N., Somoza, S. C., Boisson-Dernier, A., Gagliardini, V., Martínez-Bernardini, A., Fabrice, T. N., Ringli, C., Muschietti, J. P., & Grossniklaus, U. (2017). RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in Arabidopsis. *Science*, *358*(6370), 1600–1603. <https://doi.org/10.1126/science.aao5467>
- Mizuta, Y., & Higashiyama, T. (2018). Chemical signaling for pollen tube guidance at a glance. *Journal of Cell Science*, *131*(2). <https://doi.org/10.1242/jcs.208447>
- Moskalenko, S., Tong, C., Rosse, C., Mirey, G., Formstecher, E., Daviet, L., Camonis, J., & White, M. A. (2003). Ral GTPases Regulate Exocyst Assembly through Dual Subunit Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(51), 51743–51748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308702200>
- Nagawa, S., Xu, T., Lin, D., Dhonukshe, P., Zhang, X., Friml, J., Scheres, B., Fu, Y., & Yang, Z. (2012). ROP GTPase-Dependent Actin Microfilaments Promote PIN1 Polarization by Localized Inhibition of Clathrin-Dependent Endocytosis. *PLoS Biology*, *10*(4), e1001299. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001299>
- Narasimhan, M., Johnson, A., Prizak, R., Kaufmann, W. A., Tan, S., Casillas-Pérez, B., & Friml, J. (2020). Evolutionarily unique mechanistic framework of clathrin-mediated endocytosis in plants. *ELife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.52067>

- Oda, Y., Iida, Y., Nagashima, Y., Sugiyama, Y., & Fukuda, H. (2015). Novel coiled-coil proteins regulate exocyst association with cortical microtubules in xylem cells via the conserved oligomeric golgi-complex 2 protein. *Plant and Cell Physiology*, *56*(2). <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu197>
- Ortega, J. K. E. (2023). Theoretical Analyses of Turgor Pressure during Stress Relaxation and Water Uptake, and after Changes in Expansive Growth Rate When Water Uptake Is Normal and Reduced. *Plants*, *12*(9). <https://doi.org/10.3390/plants12091891>
- Ortmannová, J., Sekereš, J., Kulich, I., Šantrůček, J., Dobrev, P., Žárský, V., & Pečenková, T. (2022). Arabidopsis EXO70B2 exocyst subunit contributes to papillae and encasement formation in antifungal defence. *Journal of Experimental Botany*, *73*(3), 742–755. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab457>
- Pang, L., Ma, Z., Zhang, X., Huang, Y., Li, R., Miao, Y., & Li, R. (2022). The small GTPase RABA2a recruits SNARE proteins to regulate the secretory pathway in parallel with the exocyst complex in Arabidopsis. *Molecular Plant*, *15*(3), 398–418. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.11.008>
- Paredez, A. R., Somerville, C. R., & Ehrhardt, D. W. (2006). Visualization of Cellulose Synthase Demonstrates Functional Association with Microtubules. *Science*, *312*(5779), 1491–1495. <https://doi.org/10.1126/science.1126551>
- Parre, E., & Geitmann, A. (2005). More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiology*, *137*(1), 274–286. <https://doi.org/10.1104/pp.104.050773>
- Parrotta, L., Faleri, C., Del Casino, C., Mareri, L., Aloisi, I., Guerriero, G., Hausman, J. F., Del Duca, S., & Cai, G. (2022). Biochemical and cytological interactions between callose synthase and microtubules in the tobacco pollen tube. *Plant Cell Reports*, *41*(5), 1301–1318. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02860-3>
- Paul, P., Simm, S., Mirus, O., Scharf, K. D., Fragkostefanakis, S., & Schleiff, E. (2014). The complexity of vesicle transport factors in plants examined by orthology search. *PLoS ONE*, *9*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097745>
- Peaucelle, A., Wightman, R., & Höfte, H. (2015). The Control of Growth Symmetry Breaking in the Arabidopsis Hypocotyl. *Current Biology*, *25*(13), 1746–1752. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.022>
- Pečenková, T., Hála, M., Kulich, I., Kocourková, D., Drdová, E., Fendrych, M., Toupalová, H., & Žárský, V. (2011). The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction. *Journal of Experimental Botany*, *62*(6), 2107–2116. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq402>
- Peer, M., Yuan, H., Zhang, Y., Korbula, K., Novick, P., & Dong, G. (2022). Double NPY motifs at the N-terminus of the yeast t-SNARE Sso2 synergistically bind Sec3 to promote membrane fusion. *ELife*, *11*. <https://doi.org/10.7554/eLife.82041>
- Peremyslov, V. V., Cole, R. A., Fowler, J. E., & Dolja, V. V. (2015). Myosin-Powered Membrane Compartment Drives Cytoplasmic Streaming, Cell Expansion and Plant Development. *PLOS ONE*, *10*(10), e0139331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139331>

- Peremyslov, V. V., Prokhnevsky, A. I., & Dolja, V. V. (2010). Class XI Myosins Are Required for Development, Cell Expansion, and F-Actin Organization in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *22*(6), 1883–1897. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076315>
- Potocký, M., Pejchar, P., Gutkowska, M., Jiménez-Quesada, M. J., Potocká, A., Alché, J. de D., Kost, B., & Žárský, V. (2012). NADPH oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. *Journal of Plant Physiology*, *169*(16), 1654–1663. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.014>
- Pratap Sahi, V., Cifrová, P., García-González, J., Kotannal Baby, I., Mouillé, G., Gineau, E., Müller, K., Baluška, F., Soukup, A., Petrášek, J., & Schwarzerová, K. (2017). *Arabidopsis thaliana* plants lacking the ARP2/3 complex show defects in cell wall assembly and auxin distribution. *Annals of Botany*. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx178>
- Qu, X., Zhang, R., Zhang, M., Diao, M., Xue, Y., & Huang, S. (2017). Organizational Innovation of Apical Actin Filaments Drives Rapid Pollen Tube Growth and Turning. *Molecular Plant*, *10*(7), 930–947. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.05.002>
- Richter, S., Müller, L. M., Stierhof, Y.-D., Mayer, U., Takada, N., Kost, B., Vieten, A., Geldner, N., Koncz, C., & Jürgens, G. (2012). Polarized cell growth in *Arabidopsis* requires endosomal recycling mediated by GBF1-related ARF exchange factors. *Nature Cell Biology*, *14*(1), 80–86. <https://doi.org/10.1038/ncb2389>
- Ridgeway, C. S. (1913). The Occurrence Of Callose In Root Hairs. *The Plant World*, *16*(4), 116–122. <http://www.jstor.org/stable/43477003>
- Robinson, R. C., Turbedsky, K., Kaiser, D. A., Marchand, J.-B., Higgs, H. N., Choe, S., & Pollard, T. D. (2001). Crystal Structure of Arp2/3 Complex. *Science*, *294*(5547), 1679–1684. <https://doi.org/10.1126/science.1066333>
- Robinson, S., & Kuhlemeier, C. (2018). Global Compression Reorients Cortical Microtubules in *Arabidopsis* Hypocotyl Epidermis and Promotes Growth. *Current Biology*, *28*(11), 1794–1802.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.028>
- Röckel, N., Wolf, S., Kost, B., Rausch, T., & Greiner, S. (2008). Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PME1 at the pollen tube tip involves PME1 endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *The Plant Journal*, *53*(1), 133–143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03325.x>
- Rodriguez-Furlan, C., Minina, E. A., & Hicks, G. R. (2019). Remove, recycle, Degrade: Regulating plasma membrane protein accumulation. In *Plant Cell* (Vol. 31, Issue 12, pp. 2833–2854). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00433>
- Romagnoli, S., Cai, G., & Cresti, M. (2003). In Vitro Assays Demonstrate That Pollen Tube Organelles Use Kinesin-Related Motor Proteins to Move along Microtubules. *The Plant Cell*, *15*(1), 251–269. <https://doi.org/10.1105/tpc.005645>
- Romagnoli, S., Cai, G., Faleri, C., Yokota, E., Shimmen, T., & Cresti, M. (2007). Microtubule- and actin filament-dependent motors are distributed on pollen tube mitochondria and contribute differently to their movement. *Plant and Cell Physiology*, *48*(2), 345–361. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm001>

- Rosquete, M. R., Worden, N., Ren, G., Sinclair, R. M., Pflieger, S., Salemi, M., Phinney, B. S., Domozych, D., Wilkop, T., & Drakakaki, G. (2019). AtTRAPPC11/ROG2: A Role for TRAPPs in Maintenance of the Plant *Trans*-Golgi Network/Early Endosome Organization and Function. *The Plant Cell*, *31*(8), 1879–1898. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00110>
- Rounds, C. M., & Bezanilla, M. (2013). Growth mechanisms in tip-growing plant cells. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 64, pp. 243–265). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120150>
- Rozier, F., Riglet, L., Kodera, C., Bayle, V., Durand, E., Schnabel, J., Gaude, T., & Fobis-Loisy, I. (2020). Live-cell imaging of early events following pollen perception in self-incompatible *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, *71*(9), 2513–2526. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAA008>
- Sacomanno, A., Potocký, M., Pejchar, P., Hála, M., Shikata, H., Schwechheimer, C., & Žárský, V. (2021). Regulation of Exocyst Function in Pollen Tube Growth by Phosphorylation of Exocyst Subunit EXO70C2. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.609600>
- Sampathkumar, A., Gutierrez, R., McFarlane, H. E., Bringmann, M., Lindeboom, J., Emons, A.-M., Samuels, L., Ketelaar, T., Ehrhardt, D. W., & Persson, S. (2013). Patterning and Lifetime of Plasma Membrane-Localized Cellulose Synthase Is Dependent on Actin Organization in *Arabidopsis* Interphase Cells. *Plant Physiology*, *162*(2), 675–688. <https://doi.org/10.1104/pp.113.215277>
- Samuels, A. L., Giddings, T. H., & Staehelin, L. A. (1995). Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *The Journal of Cell Biology*, *130*(6), 1345–1357. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.6.1345>
- Sánchez-Rodríguez, C., Shi, Y., Kesten, C., Zhang, D., Sancho-Andrés, G., Ivakov, A., Lampugnani, E. R., Sklodowski, K., Fujimoto, M., Nakano, A., Bacic, A., Wallace, I. S., Ueda, T., Van Damme, D., Zhou, Y., & Persson, S. (2018). The Cellulose Synthases Are Cargo of the TPLATE Adaptor Complex. *Molecular Plant*, *11*(2), 346–349. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.012>
- Sanderfoot, A. (2007). Increases in the Number of SNARE Genes Parallels the Rise of Multicellularity among the Green Plants. *Plant Physiology*, *144*(1), 6–17. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092973>
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, *61*, 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., & Weisbeek, P. (1994). Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development*, *120*(9), 2475–2487. <https://doi.org/10.1242/dev.120.9.2475>
- Scholz, P., Anstatt, J., Krawczyk, H. E., & Ischebeck, T. (2020). Signalling Pinpointed to the Tip: The Complex Regulatory Network That Allows Pollen Tube Growth. *Plants*, *9*(9), 1098. <https://doi.org/10.3390/plants9091098>
- Searle, S. R., Speed, F. M., & Milliken, G. A. (1980). Population marginal means in the linear model: An alternative to least squares means. *American Statistician*, *34*(4). <https://doi.org/10.1080/00031305.1980.10483031>

- Shi, X., Wu, J., Zhou, H., Yang, X., Li, T., Zhang, X., Yang, C., & Han, X. (2016). Defective callose walls and cell plates during abnormal meiosis cause male-sterility in the oat mutant zbs1. *Journal of Integrative Agriculture*, *15*(2), 241–248. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61086-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61086-3)
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., & Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, *362*(6418), 318–324. <https://doi.org/10.1038/362318a0>
- Staiger, C. J., Sheahan, M. B., Khurana, P., Wang, X., McCurdy, D. W., & Blanchoin, L. (2009). Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array. *Journal of Cell Biology*, *184*(2), 269–280. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806185>
- Sterling, J. D., Quigley, H. F., Orellana, A., & Mohnen, D. (2001). The Catalytic Site of the Pectin Biosynthetic Enzyme  $\alpha$ -1,4-Galacturonosyltransferase Is Located in the Lumen of the Golgi. *Plant Physiology*, *127*(1), 360–371. <https://doi.org/10.1104/pp.127.1.360>
- Sun, S.-C., Wang, Q.-L., Gao, W.-W., Xu, Y.-N., Liu, H.-L., Cui, X.-S., & Kim, N.-H. (2013). Actin nucleator Arp2/3 complex is essential for mouse preimplantation embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, *25*(4), 617. <https://doi.org/10.1071/RD12011>
- Synek, L., Pleskot, R., Sekereš, J., Serrano, N., Vukašinić, N., Ortmannová, J., Klejchová, M., Pejchar, P., Batystová, K., Gutkowska, M., Janková-Drdová, E., Marković, V., Pečenková, T., Šantrůček, J., Žárský, V., & Potocký, M. (2021). Plasma membrane phospholipid signature recruits the plant exocyst complex via the EXO70A1 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(36). <https://doi.org/10.1073/pnas.2105287118>
- Synek, L., Schlager, N., Eliáš, M., Quentin, M., Hauser, M. T., & Žárský, V. (2006). AtEXO70A1, a member of a family of putative exocyst subunits specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development. *Plant Journal*, *48*(1), 54–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02854.x>
- Synek, L., Vukašinić, N., Kulich, I., Hála, M., Aldorfová, K., Fendrych, M., & Žárský, V. (2017). EXO70C2 is a key regulatory factor for optimal tip growth of pollen. *Plant Physiology*, *174*(1), 223–240. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01282>
- Szymanski, D., & Staiger, C. J. (2018). The Actin Cytoskeleton: Functional Arrays for Cytoplasmic Organization and Cell Shape Control. *Plant Physiology*, *176*(1), 106–118. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01519>
- Thiele, K., Wanner, G., Kindzierski, V., Jürgens, G., Mayer, U., Pachl, F., & Assaad, F. F. (2009). The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *58*(1), 13–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03760.x>
- Toyooka, K., Goto, Y., Asatsuma, S., Koizumi, M., Mitsui, T., & Matsuoka, K. (2009). A Mobile Secretory Vesicle Cluster Involved in Mass Transport from the Golgi to the Plant Cell Exterior. *The Plant Cell*, *21*(4), 1212–1229. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058933>
- Turner, A., Bacic, A., Harris, P. J., & Read, S. M. (1998). Membrane fractionation and enrichment of callose synthase from pollen tubes of *Nicotiana glauca* Link et Otto. *Planta*, *205*(3), 380–388. <https://doi.org/10.1007/s004250050334>

- Underwood, W. (2012). The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion. *Frontiers in Plant Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00085>
- Ušák, D., Haluška, S., & Pleskot, R. (2023). Callose synthesis at the center point of plant development—An evolutionary insight. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad274>
- van Spoorndonk, R., Schneider, R., & Sampathkumar, A. (2023). Mechano-chemical regulation of complex cell shape formation: Epidermal pavement cells—A case study. *Quantitative Plant Biology*, 4, e5. <https://doi.org/10.1017/qpb.2023.4>
- Vatén, A., Dettmer, J., Wu, S., Stierhof, Y.-D., Miyashima, S., Yadav, S. R., Roberts, C. J., Campilho, A., Bulone, V., Lichtenberger, R., Lehesranta, S., Mähönen, A. P., Kim, J.-Y., Jokitalo, E., Sauer, N., Scheres, B., Nakajima, K., Carlsbecker, A., Gallagher, K. L., & Helariutta, Y. (2011). Callose Biosynthesis Regulates Symplastic Trafficking during Root Development. *Developmental Cell*, 21(6), 1144–1155. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.006>
- Vega, I. E., & Hsu, S.-C. (2001). The Exocyst Complex Associates with Microtubules to Mediate Vesicle Targeting and Neurite Outgrowth. *The Journal of Neuroscience*, 21(11), 3839–3848. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-11-03839.2001>
- Vidali, L., McKenna, S. T., & Hepler, P. K. (2001). Actin Polymerization Is Essential for Pollen Tube Growth. *Molecular Biology of the Cell*, 12(8), 2534–2545. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2534>
- Volkman, N., Amann, K. J., Stoilova-Mcphie, S., Egile, C., Winter, D. C., Hazelwood, L., Heuser, J. E., Li, R., Pollard, T. D., & Hanein, D. (2001). Structure of Arp2/3 Complex in Its Activated State and in Actin Filament Branch Junctions. *Science*, 293, 2456–2459. [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)
- Voloshina, M. (2023). *Interakce ARP2/3 s komponentami rostlinné sekretorické dráhy* [Diplomová práce]. Univerzita Karlova.
- Vukašinović, N., Oda, Y., Pejchar, P., Synek, L., Pečenková, T., Rawat, A., Sekereš, J., Potocký, M., & Žárský, V. (2017). Microtubule-dependent targeting of the exocyst complex is necessary for xylem development in Arabidopsis. *New Phytologist*, 213(3), 1052–1067. <https://doi.org/10.1111/nph.14267>
- Wang, H., Zhuang, X., Cai, Y., Cheung, A. Y., & Jiang, L. (2013). Apical F-actin-regulated exocytic targeting of NtPPME1 is essential for construction and rigidity of the pollen tube cell wall. *Plant Journal*, 76(3). <https://doi.org/10.1111/tpj.12300>
- Wang, J., Jia, H., Daniel, G., Gao, J., Jiang, X., Ma, L., Yue, S., Guo, J., & Yin, Y. (2023). Insights into asynchronous changes of cell wall polymers accumulated in different cell types during conifer xylem differentiation. *Carbohydrate Polymers*, 316, 121076. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121076>
- Wang, S., Liu, Y., Adamson, C. L., Valdez, G., Guo, W., & Hsu, S. C. (2004). The mammalian exocyst, a complex required for exocytosis, inhibits tubulin polymerization. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35958–35966. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313778200>
- Waters, J. C. (2013). Live-cell fluorescence imaging. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 114). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407761-4.00006-3>



- Welch, M. D., DePace, A. H., Verma, S., Iwamatsu, A., & Mitchison, T. J. (1997). The Human Arp2/3 Complex Is Composed of Evolutionarily Conserved Subunits and Is Localized to Cellular Regions of Dynamic Actin Filament Assembly. *The Journal of Cell Biology*, *138*(2), 375–384. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.2.375>
- Wilkinson, J. E., Twell, D., & Lindsey, K. (1997). Activities of CaMV 35S and *nos* promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. *Journal of Experimental Botany*, *48*(2), 265–275. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.2.265>
- Willats, W. G. T., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H. C., van Alebeek, G.-J. W. M., Voragen, A. G. ., Marcus, S. E., Christensen, T. M. I. E., Mikkelsen, J. D., Murray, B. S., & Knox, J. P. (2001). Modulation of the Degree and Pattern of Methyl-esterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(22), 19404–19413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011242200>
- Wu, Y., Yan, J., Zhang, R., Qu, X., Ren, S., Chen, N., & Huang, S. (2010). Arabidopsis FIMBRIN5, an actin bundling factor, is required for pollen germination and pollen tube growth. *Plant Cell*, *22*(11). <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080283>
- Xie, B., Wang, X., Zhu, M., Zhang, Z., & Hong, Z. (2011). *Cals7* encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *The Plant Journal*, *65*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04399.x>
- Xu, L., Cao, L., Li, J., & Staiger, C. J. (2023). Cooperative actin filament nucleation by the Arp2/3 complex and formins maintains the homeostatic cortical array in Arabidopsis epidermal cells. *The Plant Cell*, koad301. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad301>
- Yamaoka, S., Shimono, Y., Shirakawa, M., Fukao, Y., Kawase, T., Hatsugai, N., Tamura, K., Shimada, T., & Hara-Nishimura, I. (2013). Identification and Dynamics of *Arabidopsis* Adaptor Protein-2 Complex and Its Involvement in Floral Organ Development. *The Plant Cell*, *25*(8), 2958–2969. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114082>
- Yanagisawa, M., Desyatova, A. S., Belteton, S. A., Mallery, E. L., Turner, J. A., & Szymanski, D. B. (2015). Patterning mechanisms of cytoskeletal and cell wall systems during leaf trichome morphogenesis. *Nature Plants*, *1*(3), 15014. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.14>
- Yanagisawa, M., Zhang, C., & Szymanski, D. B. (2013). ARP2/3-dependent growth in the plant kingdom: SCARs for life. *Frontiers in Plant Science*, *4*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00166>
- Yarar, D., To, W., Abo, A., & Welch, M. D. (1999). The Wiskott–Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Current Biology*, *9*(10), S55–S1. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80243-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80243-7)
- Yokoyama, R. (2020). A Genomic Perspective on the Evolutionary Diversity of the Plant Cell Wall. *Plants*, *9*(9), 1195. <https://doi.org/10.3390/plants9091195>
- Yu, Q., Li, P., Liang, N., Wang, H., Xu, M., & Wu, S. (2017). Cell-Fate Specification in Arabidopsis Roots Requires Coordinative Action of Lineage Instruction and Positional Reprogramming. *Plant Physiology*, *175*(2), 816–827. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00814>

- Yue, P., Zhang, Y., Mei, K., Wang, S., Lesigang, J., Zhu, Y., Dong, G., & Guo, W. (2017). Sec3 promotes the initial binary t-SNARE complex assembly and membrane fusion. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14236>
- Zallen, J. A., Cohen, Y., Hudson, A. M., Cooley, L., Wieschaus, E., & Schejter, E. D. (2002). SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*. *The Journal of Cell Biology*, 156(4), 689–701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200109057>
- Zerzour, R., Kroeger, J., & Geitmann, A. (2009). Polar growth in pollen tubes is associated with spatially confined dynamic changes in cell mechanical properties. *Developmental Biology*, 334(2), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.07.044>
- Zhang, G. F., & Staehelin, L. A. (1992). Functional Compartmentation of the Golgi Apparatus of Plant Cells. *Plant Physiology*, 99(3), 1070–1083. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.1070>
- Zhang, J., Huang, Q., Zhong, S., Bleckmann, A., Huang, J., Guo, X., Lin, Q., Gu, H., Dong, J., Dresselhaus, T., & Qu, L. J. (2017). Sperm cells are passive cargo of the pollen tube in plant fertilization. *Nature Plants*, 3. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.79>
- Zhang, L., Xing, J., & Lin, J. (2019). At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants. *New Phytologist*, 224(4), 1479–1489. <https://doi.org/10.1111/nph.16018>
- Zhang, R., Xu, Y., Yi, R., Shen, J., & Huang, S. (2023). Actin cytoskeleton in the control of vesicle transport, cytoplasmic organization, and pollen tube tip growth. *Plant Physiology*, 193(1), 9–25. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad203>
- Zhang, T., Li, Y., Li, C., Zang, J., Gao, E., Kroon, J. T., Qu, X., Hussey, P. J., & Wang, P. (2023). Exo84c interacts with VAP27 to regulate exocytotic compartment degradation and stigma senescence. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40729-5>
- Zhang, W., Huang, L., Zhang, C., & Staiger, C. J. (2021). Arabidopsis myosin XIX interacts with the exocyst complex to facilitate vesicle tethering during exocytosis. *Plant Cell*, 33(7), 2454–2478. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab116>
- Zhang, W., & Staiger, C. J. (2022). Revising the role of cortical cytoskeleton during secretion: Actin and myosin xi function in vesicle tethering. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010317>
- Zhao, Y., Liu, J., Yang, C., Capraro, B. R., Baumgart, T., Bradley, R. P., Ramakrishnan, N., Xu, X., Radhakrishnan, R., Svitkina, T., & Guo, W. (2013). Exo70 generates membrane curvature for morphogenesis and cell migration. *Developmental Cell*, 26(3), 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.07.007>
- Zhou, Z., Shi, H., Chen, B., Zhang, R., Huang, S., & Fu, Y. (2015). Arabidopsis RIC1 Severs Actin Filaments at the Apex to Regulate Pollen Tube Growth. *The Plant Cell*, 27(4), 1140–1161. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135400>
- Zhu, C., Ganguly, A., Baskin, T. I., McClosky, D. D., Anderson, C. T., Foster, C., Meunier, K. A., Okamoto, R., Berg, H., & Dixit, R. (2015). The Fragile Fiber1 Kinesin Contributes to Cortical Microtubule-Mediated Trafficking of Cell Wall Components. *Plant Physiology*, 167(3), 780–792. <https://doi.org/10.1104/pp.114.251462>

Zhu, X., Li, S., Pan, S., Xin, X., & Gu, Y. (2018). CSII, PATROL1, and exocyst complex cooperate in delivery of cellulose synthase complexes to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(15), E3578–E3587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800182115>

Zhu, Y., & McFarlane, H. E. (2022). Regulation of cellulose synthesis via exocytosis and endocytosis. *Current Opinion in Plant Biology*, *69*, 102273. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102273>