



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH **FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ**

Katedra genetiky a biotechnologií

Diplomová práce

Změny genové exprese při simulovaném stresu suchem u máku

Autorka práce: Bc. Natálie Kost'ová

Vedoucí práce: Ing. Mgr. Ondřej Hejna, Ph.D.

České Budějovice
2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 14. 4 2023

Podpis

Abstrakt

Tato práce shrnuje poznatky v oblasti obecných mechanismů reakce rostlin na sucho na genové úrovni, odpovědi na stres a rezistenci u rostlin. Práce je zaměřena na rostliny máku. Soustředí se na optimalizaci metody pro laboratorní testování stresu sucha u máku a následně na ověření této metody na variabilní kolekci genových zdrojů. Optimalizovaná metodika je pak využita k ověření vytipovaných stresových genů pomocí metody real-time PCR. Výsledkem byla zjištěna odlišná klíčivost jednotlivých odrůd při odlišných úrovních stresu. U vytipovaných stresových genů byla stanovena jejich relativní genová exprese při působení různých úrovní sucha.

Klíčová slova: stres, sucho, mák, rezistence, změny genové exprese

Abstract

This work summarizes findings in the field of general mechanisms of plant response to drought at the gene level, stress response and resistance in plants. The work is focused on poppy plants. It focuses on the optimization of the method for laboratory testing of drought stress in poppy and subsequently on the validation of this method on a variable collection of genotype sources. The optimized methodology is then used to verify selected stress genes using the real-time PCR method. As a result, different germination rates were found for the different varieties at different stress levels. For selected stress genes, their relative gene expression was determined under different levels of drought stress.

Keywords: stress, drought, poppy, resistance, changes in gene expression

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Mgr. Ondřeji Hejnovi, Ph.D. za skvělé vedení, ochotu, trpělivost a cenné rady při vypracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat svému příteli Martinovi Rozhoňovi a rodině, kteří mě po celou dobu studia i při psaní této práce trpělivě podporovali a motivovali.

Obsah

Úvod.....	6
1 Stres suchem	7
1.1 Molekulární mechanismus	10
1.1.1 Kyselina abscisová (ABA).....	12
1.1.2 ROS.....	14
1.2 Odpověď na stres.....	16
1.3 Rezistence.....	23
2 Mák	30
3 Cíl a metodika práce.....	33
3.1 Optimalizace metody a testování vybraných genových zdrojů.....	33
3.2 Analýza relativní exprese genů potenciálně zapojených do reakce na stres suchem.....	35
4 Výsledky	38
5 Diskuse.....	45
Závěr	50
Seznam použité literatury.....	51
Seznam obrázků	66
Seznam tabulek	67
Seznam použitých zkratk.....	68
Přílohy	69

Úvod

Tématem této diplomové práce jsou genové změny při simulovaném stresu suchem u máku. Stres suchem patří mezi abiotické typy stresů a v současné době se stává velmi významným tématem. Rostliny se na rozdíl od živočichů nemohou pohybovat a nemají tak možnost utéci z dosahu působení stresu. Proto, aby mohly přežít, jsou nuceny se účinkům stresů přizpůsobovat. Stres suchem patří k těm vůbec nejméně příznivým typům stresů pro růst a udržení života rostliny.

Zejména pro zemědělství představuje sucho velký problém, jelikož může mít negativní vliv na výnos plodin. Vzhledem k tomu, že většina zemědělských ploch je v současné době sužována stresy, například právě suchem, dochází tak ke snížené produkci. Jedná se o současný problém, který ovšem pravděpodobně bude aktuální i v budoucnosti. Populace na Zemi se totiž neustále zvyšuje a bude potřeba zajistit její obživu. Velkou hrozbou v tomto směru je také změna klimatu, která by mohla mít negativní vliv na zemědělskou produkci. Jedná se zejména o zmenšení pevninské plochy vlivem vzestupu hladiny moře a s tím související zasolování a o snížené množství vody pro zavlažování (Aydinalp a Cresser, 2008).

V poslední době je tématu sucha věnována velká pozornost. Vědci se soustředí hlavně na molekulární mechanismy působení stresu. Snaží se je pochopit a zjistit, za co jsou jednotlivé geny zodpovědné a jak jednotlivé signální dráhy fungují. Dále je důležité pochopit, jak potom rostlina spouští odpovědi na sucho a zda je při jeho intenzivnějším působení schopna vytvořit si rezistenci na tento typ stresu.

Obsahem této práce je literární rešerše zabývající se stresem ze sucha, jeho molekulárním mechanismem, odpovědí na stres a rezistencí. Následují také informace o máku v souvislosti se suchem. V praktické části této diplomové práce jsem pracovala na rostlinách máku. Zjišťovala jsem odpověď jednotlivých odrůd na působení sucha. Dále jsem ověřovala, zda se u rostlin máku vyskytují geny aktivované stresem ze sucha.

1 Stres suchem

Rostliny žijí v prostředí s proměnlivými vnějšími podmínkami, které jsou pro život buď vhodné, nebo méně vhodné a které působí na jejich růst, vývoj a rozmnožování. Méně vhodné podmínky potom rostliny nutí měnit se a přizpůsobovat se stávajícím podmínkám prostředí. Nejvíce limitujícím stresorem pro rostliny je vodní stres neboli sucho. Při působení sucha se snižuje především růst, zejména prodlužovací růst buněk, a fotosyntéza. Dochází k rychlým změnám aktivity enzymů, k tvorbě aminokyselin prolinu, cukrů, alkoholů a dalších sloučenin, které zvyšují osmotický tlak v buňkách. Zvyšuje se zejména koncentrace kyseliny abscisové (ABA) (Bláha et al., 2003).

Pokud vezmeme v úvahu všechny biotické i abiotické stresory, které mohou v přírodě na rostliny působit, je stres ze sucha jedním z nejnepříznivějších faktorů, které mohou ovlivňovat růst a výnos rostlin. Sucho může být velkou hrozbou, protože spouští širokou škálu reakcí, které mají ve výsledku vliv na výnos plodin. Nástup sucha představuje velkou hrozbu zejména v udržitelnosti produkce v podmínkách s měnícím se klimatem. Pro porozumění mechanismům odolnosti rostlin vůči suchu je důležité porozumět zejména molekulárním a biochemickým mechanismům reakcí na sucho (Anjum et al., 2011). Působením sucha dochází k výraznému snížení biomasy a výnosu (Rollins et al., 2013). Dispozice rostlin odolávat suchu jsou rozdílné u různých druhů rostlin. Záleží také na vývojovém stádiu rostliny, úrovni stresu a případně na dalších současně působících stresorech (Demirevska et al., 2009).

Stres ze sucha má za následek řadu změněných procesů v rostlině. Kvůli snížené průduchové vodivosti se snižuje míra asimilace oxidu uhličitého. Zmenšují se listy, nedochází k normálnímu prodlužování stonků a k novotvoření kořenů. Kvůli těmto změnám jsou narušeny vodní vztahy rostlin a nedochází k efektivnímu využívání vody v rostlině. Jsou narušeny také fotosyntetické pigmenty, což snižuje množství výměny plynů a to má za následek opět snížení růstu a výnosu plodin. Významnou roli při snížené dostupnosti vody hrají také koncentrace osmoticky aktivních látek. Za sucha dochází také k tvorbě aktivních forem kyslíku (ROS), jejichž vznik i zánik musí být pečlivě kontrolován pomocí antioxidačních mechanismů (Anjum et al., 2011).

Rostlinu může ovlivňovat jeden nebo kombinace více biologických faktorů a faktorů prostředí, které jsou zodpovědné za nefyziologické průběhy reakcí. Vlivem těchto reakcí může docházet k poškození rostlin, snižuje se jejich růst a v nejzazším případě

může dojít ke smrti rostliny. Vliv na výnos plodin mají zejména stresy prostředí. Z nejrůznějších odhadů vědců vyplývá, že z veškeré orné půdy na celém světě existuje jen 10 % půdy, která není ovlivněna stresem. Naopak téměř 25 % celosvětové zemědělské půdy je omezeno nedostatkem vody (Fathi a Tari, 2016).

Dle odhadů OSN se předpokládá, že populace obyvatel na Zemi dosáhne počtu devíti miliard od roku 2050 (World Population Prospects, 2022). Sedmdesát procent veškeré vody, kterou lidé využívají, spotřebovává zemědělství. Podle International Water Management Institute (IWMI) ale tato spotřeba vzroste do roku 2025 o 17 %. Se zvyšující se urbanizací také stoupá spotřeba vody, která potom chybí zemědělství. Kvůli tomuto problému požadoval institut IWMI, aby do roku 2025 došlo ke čtyřiceti procentnímu zlepšení výnosů plodin v oblastech, kde jsou rostliny sužovány suchem. Ukázalo se, že za jedno desetiletí došlo ke zlepšení jen o 10 % a není bohužel jisté, zda se i toto zlepšení dá vůbec udržet, natož zlepšovat (Pennisi, 2008).

Příkladem velkého sucha, které s sebou přineslo velké problémy, byl rok 2012 v Iowě. Škody byly způsobeny na kukuřici a sóji, protože nastaly vysoké teploty a byl nedostatek vody pro rostliny. To znamená, že byly vystaveny stresu suchem. Sucho navíc začalo působit v době, kdy byly rostliny ve fázi vývoje. Sucho způsobilo výrazné změny ve struktuře půdy, způsobovalo zvýšené lámání a zhoršenou agregaci. Vzhledem k závažnosti sucha v roce 2012 zažilo v období do října 100 % Iowy vážné sucho a 65 % dokonce extrémní sucho. Prognóza výnosů kukuřice z Iowy na rok 2012 byla 8,8 t/ha, což je 22 % pod hodnotou dlouhodobého trendu. To mělo samozřejmě také ekonomický dopad, jelikož s nižším výnosem roste cena plodin. Ekonomické ztráty však nebyly problémem jen národní, ale celosvětový. Spojené státy americké totiž produkuje přibližně 35 % celosvětové produkce kukuřice a sójových bobů. Potvrdilo se ovšem, že sucho má i dalekosáhlejší následky. Ekonomické ztráty se projevily i v živočišné výrobě. Kvůli suchu nebyl dostatek plodin, proto vzrostla jejich cena, což znamená, že vzrostla cena krmiva. Zároveň nebyl kvůli suchu ani dostatek alternativních krmiv. S těmito problémy pak samozřejmě kvůli financím upadá i živočišná výroba (Al-Kaisi et al., 2013).

U rostlin je důležité, jak efektivně umějí hospodařit s vodou, což se potom projevuje na produkci. Při nedostatku vody významně poklesl výnos zrna až o 35 % (Noor-mohammadi et al., 2009). Sluneční záření způsobující sucho a oxidace buněčných součástí vznikajícími volnými kyslíkovými radikály jsou hlavní důvody vedoucími ke smrti rostliny. Zvětšující se nedostatek vody způsobuje akumulaci solí a iontů

v horních vrstvách půdy, což představuje problém, jelikož pro kořeny, které se zde nacházejí, tak vzniká osmotický stres a iontová toxicita. Jako první odpověď na působení stresových podmínek reaguje rostlina biofyzikální reakcí. S rostoucím stresem ze sucha se zmenšuje objem cytoplazmy a následně se plazmatická membrána uvolňuje od buněčné stěny. Snižuje se tak objem buňky a s ním i tlak. Klesá potenciál pro vývoj buňky a její růst se tedy snižuje. Působením sucha dochází k dehydrataci buněk mezofylu u listů. V ochranných buňkách a v buňkách mezofylu se zvyšuje produkce ABA spolu s draslíkem a vápníkem. V důsledku těchto procesů se uzavřou průduchy. Při stresu ze sucha dochází také k poklesu fotosyntetických enzymů a tedy i k poklesu rychlosti samotné fotosyntézy. Nedostatek vody způsobuje změnu barvy listů a na povrchích listů přibývají listové trichomy (Fathi a Tari, 2016). V podmínkách závažného sucha dochází k poškození biochemických reakcí závislých na světle. Dochází k významnému poklesu množství chlorofylu A a B a je vysoce utlumena míra asimilace oxidu uhličitého (Ghotbi-Ravandi et al., 2014).

Všeobecně je uznáván názor, že nejdůležitějším rostlinným hormonem je ABA. Hraje totiž důležitou roli v životním cyklu rostlin. Významnou roli má také na fyziologické a morfologické úrovni při procesech v adaptaci na prostředí (Fathi a Tari, 2016). Rostliny mohou dát najevo pomocí kořenů, že se nachází ve vodním deficitu. Prostřednictvím kořenů mohou vysílat signály. Tímto signálem může být rostlinný hormon ABA, kterou jsou rostliny schopny produkovat ve svých apikálních oblastech kořene při působení sucha (Robertson et al., 1985).

Pro správný průběh fotosyntézy je důležitý zejména chlorofyl nacházející se v chloroplastech. Jeho množství pozitivně koreluje s rychlostí fotosyntézy. Při působení sucha dochází k degradaci chlorofylu a k fotooxidaci pigmentů, které jsou pro rostliny důležité hlavně pro zachytávání světla. V buňce tak vzniká oxidační stres, jehož známkou je pokles chlorofylu (Anjum et al., 2011).

Snížení množství chlorofylu během stresu z nedostatku vody závisí na plodině i délce trvání sucha (Zhang a Kirkham, 1996). Podle typu odrůdy také dochází k různé úrovni postižení (Yasar et al., 2010). Kvůli tomu, že během působení sucha dochází k poklesu celkového chlorofylu, je snížena i kapacita pro zachytávání světla. Ve fotosyntetickém aparátu tak dochází k absorpci nadměrné energie a k produkci ROS, které mohou poškozovat buňku. Tomu lze předejít degradací absorbujících pigmentů (Herbinger et al., 2002). Vodní stres způsobuje nejprve hydrolýzu v tylakoidních protei-

nech. Po jeho působení dochází k významnému snížení tylakoidního chlorofylu a proteinu thylakoidu, zatímco poměry chlorofyl a/chlorofyl b a protein/chlorofyl zůstávají stabilní (Sgherri et al., 1993).

Sucho je specifickým typem stresu, jelikož se jedná o multidimenzionální stres, který je zodpovědný za velké spektrum reakcí. Jedná se o reakce na různých úrovních metabolismu rostlin, jako jsou molekulární, biochemické nebo fyziologické reakce. Jednou z hlavních reakcí na stres ze sucha je zvýšená produkce ROS, které jsou signálem ke spuštění dalších obranných nebo adaptačních reakcí. Ke zvýšené produkci dochází v různých buněčných strukturách, zejména v chloroplastech a mitochondriích. Signalizace ROS má za následek pohyb ABA a Ca^{2+} v buňkách. Existuje spousta látek, které jsou spojeny s reakcemi na sucho. Jsou jimi nejrůznější geny, transkripční faktory, aquaporiny, proteiny hojně se vyskytující v pozdní embryogenezi, proteiny tepelného šoku nebo dehydriny (Kaur a Asthir, 2017).

1.1 Molekulární mechanismus

Mechanismus reakcí na sucho nebo adaptace na sucho se na molekulární úrovni dá obecně popsat následujícím způsobem. Buňka svými senzory na cytoplazmatické membráně vnímá vnější podněty způsobené suchem. Takto zachycené signály buňka prostřednictvím mnoha signálních drah předá do nitra buňky. Tyto informace pak spouští expresi genů reagujících na sucho a následně expresi genů působících v adaptaci rostliny na stres. V signálních drahách, které přenášejí informace o působení sucha, se také uplatňuje množství různých sekundárních posílů. Patří sem například diacylglycerol, fosfoglycerol, ABA, ROS, Ca^{2+} nebo regulátory transkripce (Kaur a Asthir, 2017). V signálních drahách spouštějících expresi genů reagujících na sucho se uplatňují nejrůznější transkripční faktory, vazebné proteiny a faktory, proteinkinázy, proteinové fosfatázy a receptory (Nakashima et al., 2014)

Sucho spouští v rostlinách akumulaci ABA, která ovlivňuje uzavírání průduchů, čímž dochází k zastavení transpirace. Díky uzavřeným průduchům dochází k menším ztrátám vody a ke snížené výměně plynů, což vede ke snížení aktivity fotosyntézy (Mittler a Blumwald, 2015).

Reakce rostlin na sucho jsou vyvolány množstvím signálních sítí, které lze v závislosti na indukci ABA rozdělit do dvou hlavních skupin na ABA-závislé a ABA-

nezávislé. (Kim, 2014). Díky podrobnějším analýzám genů, které jsou indukovány suchem, se zjišťuje, že jednotlivé geny vykazují rozdíly v čase indukce exprese i v citlivosti na ABA. Mezi transkripční faktory závislé na ABA patří proteiny se zinkovým prstem (bZIP). Jedná se o velkou rodinu proteinů, jichž bylo jen u *Arabidopsis* charakterizováno 75 členů. Dalšími prvky reagujícími na suchu na transkripční a posttranskripční úrovni jsou AREB proteiny (ABA-responsive elements-binding), které zvyšují toleranci vůči suchu (Kaur a Asthir, 2017).

Naopak mezi transkripční faktory nezávislé na ABA patří například homeodomeny zinkového prstu (ZFHD). Například nadměrná exprese genu OsNLI-IF může vést u rostlin tabáku k toleranci sucha (Phuong et al., 2015). U transgenních rostlin petúnie byl nadměrně exprimován NCED (9-cis-epoxykarotenoid dioxygenáza), což je důležitý enzym při biosyntéze ABA. Při působení sucha měly tyto rostliny sníženou průduchovou vodivost a fotosyntézu. Během sucha sice zvadly, ale po opětovném zalití se byly schopné plně zotavit (Estrada-Melo et al., 2015).

Mezi různými funkčními kategoriemi proteinů vyčnívá jedna, která obsahuje největší množství proteinů reagujících na suchu. Spadají sem různé proteiny, které se účastní skládání bílkovin, proteiny tepelného šoku, chaperony nebo chaperoniny (Kaur a Asthir, 2017). Dalšími typy proteinů jsou aquaporiny, což jsou proteiny tvořící membránové kanály. Jejich hlavní rolí je tedy transport a u rostlin se nachází největší diverzita homologů aquaporinů. Různé homology aquaporinů jsou zapojeny do různých stresových reakcí reagujících jak na biotické tak na abiotické stresy (Afzal et al., 2016). Pro zachování relativně normálního metabolismu ve ztížených podmínkách sucha se rostliny snaží na molekulární úrovni reagovat regulací transkriptů. U některých genů dochází ke snížení exprese, u jiných naopak k jejímu zvýšení. Například v kořenech laskavce dochází při působení sucha ke zvýšené regulaci transkriptů souvisejících s obranou, signalizací a transportem vody. Naopak regulovány směrem dolů byly geny související s buněčnou diferenciací a sekundárním metabolismem (Huerta-Ocampo et al., 2011). Při studiu listů silně stresovaných rostlin fazolu obecného došlo ke změnám v hladinách 15 transkriptů. U osmi genů došlo ke zvýšení transkripce, u sedmi ke snížení (Kavar et al., 2008). Broin et al. (2000) identifikovali nový typ rostlinného thioredoxinu CDSP 32 pro chloroplastový protein indukovaný stresem. Po působení oxidačního stresu došlo k výrazné akumulaci CDSP 32 mRNA a proteinu. Zdá se, že CDSP 32 může chránit chloroplastové struktury proti oxidačnímu poškození při působení sucha (Broin et al., 2000).

Jedněmi z důležitých transkripčních faktorů jsou DREB proteiny (dehydration responsive element binding proteins), které aktivují geny související s abiotickým stresem a jsou zodpovědné za odolnost vůči stresu. DREB proteiny se dělí na dvě základní skupiny DREB1 a DREB2. První skupina funguje v signálních drahách fungujících za nízkých teplot, druhá při suchu. Tyto transkripční faktory patří do větší rodiny faktorů ERF (ethylene responsive element binding factors). Rodina transkripčních faktorů DREB obsahuje unikátní konzervované oblasti, díky kterým mohou interagovat s řadou genů nacházejících se po proudu směrem ke 3' konci nezávisle na působení kyseliny abscisové. Jsou ovšem zahrnuty i v signálních drahách závislých na regulaci ABA, což značí další interakce mezi ABA-závislými a ABA-nezávislými drahami přenosu signálu. Vytvořením transgenních rostlin se změněnou expresí DREB vznikly jedinci se zvýšenou tolerancí vůči stresu (Agarwal et al., 2006).

Při působení sucha také v rostlinách dochází k regulaci transdukčních drah přenosu signálu. Díky tomu může docházet ke snazší regulaci růstu rostliny. Existuje mechanismus odezvy včasného varování. Funguje v kořenech a aktivuje proteiny vodíkové pumpy ATPázy (H^+ -ATPáza), která se nachází na plazmatické membráně kořenových vlásků. Mechanismus varuje před podstatným poklesem RWC (= relative water content = relativní obsah vody) v rostlině. Pokud je tato ATPáza aktivována, spouští zvýšenou produkci hlavních osmolytů jako je listový prolin a GB (glycin betain), aby si rostlina mohla udržet správné hospodaření s vodou (Farooq et al., 2012). Bylo také prokázáno, že existují rozdíly v načasování spouštění časné reakce mezi jednotlivými druhy. Odrůdy odolné vůči suchu vykazovaly lepší schopnosti udržovat vodu a lepší hydraulickou vodivost než rostliny citlivé na suchu. Proto mohou správně zahájit reakci včasného varování (Gong et al., 2010).

V následujícím přehledu se pokusím u jednotlivých molekul popsat transkripční regulační dráhy v reakci na suchu.

1.1.1 Kyselina abscisová (ABA)

Kyselina abscisová je inhibiční fytohormon. V období sucha zabraňuje úniku vody z listů, protože způsobuje uzavírání průduchů. Při působení stresu brání předčasnému klíčení a při extrémním stresu dochází k prudkému nárůstu její hladiny. V důsledku jejího vlivu na cytoskelet také způsobuje v mladých pletivech růst do šířky a naopak inhibuje dlouhivý růst (Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, online).

Za podmínek osmotického stresu, který je důsledkem sucha, se ABA v rostlinách akumuluje. Má významnou roli jak v reakci na stres, tak v adaptačních reakcích na něj. Ukazuje se, že ABA ovlivňuje expresi mnoha genů při působení stresu. V promotorové oblasti těchto genů se nachází konzervovaný cis element, který řídí genovou expresi. Jedná se o ABRE (ABA-responzivní element) element. Transkripční elementy jsou všeobecně považovány za hlavní známé regulátory genové exprese a uplatňují se taktéž i při signální dráze závislé na ABA. Při tomto způsobu řídí genovou expresi kombinace ABRE-vazebný protein a ABRE-vazebný transkripční faktor. Další transkripční faktory, které se podílejí na pozměněné expresi za působení sucha, se účastní signálních drah nezávislých na ABA a jsou jimi například proteinové transkripční faktory vázající prvky reagující na dehydrataci a NAC transkripční faktory. Z výzkumů však vyplývá, že dochází k interakcím mezi prvky těchto dvou drah (Nakashima et al., 2014).

Promotorový cis element ABRE obsahuje konzervovanou sekvenci PyACG-TGG/TC. Díky analýzám bylo odhaleno, že pro expresi ABA – responzivních genů je potřeba, aby měly tyto geny funkční promotor. Pro správnou funkci jejich promotoru je vyžadován více než jeden ABRE element nebo kombinace ABRE elementu a CE (coupling element) (Nakashima et al., 2014). Transkripční faktory v dráze závislé na ABA patří do skupiny proteinů bZIP. Ta obsahuje dvě odlišné rodiny proteinů, což jsou ABI5 a AREB/ABF. Při dehydrataci mají podobnou buněčnou signalizaci v semenech a ve vegetativním stádiu (Fujita et al., 2011). Jedním z členů rodiny AREB/ABF je transkripční faktor AREB1. Jeho samostatná aktivace nevede k expresi genů dráhy reagující na sucho. Ovšem u transgenních rostlin se zvýšenou expresí AREB1 se ukázala zvýšená citlivost k ABA a zvýšená odolnost vůči suchu. Dále se ukázalo, že AREB1 řídí expresi regulačních genů indukovaných ABA a dehydratací (Fujita et al., 2005).

U genů exprimovaných při působení sucha, ale nezávisle na ABA, byly v promotorových oblastech objeveny cis elementy se sekvencí A/GCCGAC. Tyto transkripční faktory jsou označovány DRE/CRT (Nakashima et al., 2014). Transgenní rostliny *Arabidopsis* se zvýšenou expresí DREB1A vykazovali toleranci vůči dehydrataci (Liu et al., 1998).

Už bylo nastíněno, že existuje několik genů, které fungují v reakci na sucho a mohou být regulovány signálními drahami závislými nebo nezávislými na ABA. Méně informací je už ale známo o souhře a komunikaci mezi těmito drahami. Liu et al.

(2018) se pokusili tuto souhru analyzovat u *Arabidopsis thaliana*. Identifikovali 211 genů exprimovaných v závislosti na ABA a 1118 genů exprimovaných nezávisle na ABA. Podle očekávání byly ABA závislé geny významně zvýšeny v reakci na sucho a po působení ABA, naopak ABA nezávislé geny byly zvýšeny v reakci na působení kyseliny jasmonové, salicylové a gibberelinu. Zároveň identifikovali 94 genů, které jsou zodpovědné za interakce mezi oběma drahami (Liu et al., 2018).

Studie naznačují, že do signalizace ABA může být zapojena také fosforylace proteinů. Jeden z počátečních kroků v ABA závislé signální dráze by měl být řízen lokusem ABI1. Gen ABI1 kóduje protein, který má velkou podobnost se serinovými nebo threoninovými fosfatázami typu 2C. Produkt tohoto genu tedy může řídit stav fosforylace jednotlivých složek signální dráhy (Meyer et al., 1994).

Myšlenku silného působení genu ABI1 prostřednictvím de/fosforylace na K⁺ kanály strážných buněk podporuje i další studie. De/fosforylace proteinu přispívá ke kontrole transportu strážných buněk za účasti ABA. Tento gen kóduje právě protein fosfatázu. Výsledky naznačují, že ABI1 je nejspíš součástí fosfatázové/kinázové dráhy, která moduluje citlivost K⁺ kanálů strážných buněk na ABA-dependentní signální kaskády (Armstrong et al., 1995).

I následující studie potvrzuje, že fosforylace proteinů má klíčovou roli v signalizaci ABA a osmotického stresu u vyšších rostlin. Ukázalo se, že gen proteinové fosfatázy ABI2 je negativním regulátorem signalizace ABA u *Arabidopsis* (Merlot et al., 2001). Yoshida et al. (2002) ukazují, že dvě proteinkinázy, p44 a p42, byly aktivovány pomocí ABA. Díky analýzám zjistili, že p44 je kódován genem proteinkinázy typu SnRK2, genem SRK2E. Mutantní rostliny srk2e měly porušenou schopnost uzavírat průduchy. Potvrdilo se, že SRK2E hraje důležitou roli v ABA signalizaci v reakci na vodní stres (Yoshida et al., 2002).

1.1.2 ROS

ROS v rostlinných buňkách vznikají jako jedny z produktů metabolismu kyslíku. Existuje několik forem ROS lišících se svou aktivitou vůči kyslíku, který mohou buď aktivovat, nebo redukovat. Mezi nejvýznamnější formy ROS se řadí superoxidový aniont (O₂⁻), peroxid vodíku (H₂O₂), hydroxylový radikál (•OH) a singletový kyslík (¹O₂) (Kang a Udvardi, 2012). V důsledku působení sucha vzniká v určitých buněčných strukturách, zejména v chloroplastech, mitochondriích a peroxizomech, zvýšené množství ROS. Buňka se však snaží tuto produkci regulovat a kontrolovat množství

ROS v buňce na přijatelné úrovni. Využívá k tomu antioxidační systém, který nastavuje redoxní stav buňky. Pokud dojde ke zvýšení množství ROS, je to pro buňku podnět, aby spustila obranné reakce. Specifické signální cesty pak využívají H₂O₂ jako sekundárního posla. Předpokládá se, že signalizace ROS bude zapojena po proudu i proti proudu od signálních drah závislých na ABA, jelikož je spojena s toky ABA a Ca²⁺. Pokud je však stres ze sucha velmi silný nebo působí velmi dlouho, antioxidační mechanismus nestíhá pracovat správně a nadprodukce ROS poškozuje buňku a může vést k její smrti (Cruz de Carvalho, 2008).

Jako společný výsledek působení nejen biotických, ale i abiotických stresů prostředí (např. vysoká slanost, sucho, nízké nebo vysoké teploty) je obecně považována právě produkce ROS. ROS vznikají v buňce i za normálních podmínek jako vedlejší produkty metabolismu (Cruz de Carvalho, 2008). Hlavním místem, kde jsou v rostlinných buňkách produkovány ROS, je elektronový transportní řetězec v mitochondriích. NADP-isocitrátdehydrogenáza a transhydrogenáza, která nečerpá protony, produkuje matrixovou NADPH, která udržuje antioxidanty v redukovaném stavu. Jedná se tak o obranný mechanismus buňky, který může být působením biotického i abiotického stresu prolomen a tím vznikne poškození mitochondrií vlivem oxidačního stresu (Møller, 2001). ROS jsou také za normálních podmínek generovány v peroxisomech (Corpas et al., 2001) nebo chloroplastech během fotosyntetických procesů (Khorobrykh et al., 2020). ROS mohou způsobit oxidační poškození buněčných složek, jako jsou polynenasycené mastné kyseliny, DNA, sacharidy a proteiny (Møller et al., 2007).

Jako odpovědi na nepříznivé podmínky je spuštěno několik signálních drah, ve kterých klíčovou roli hrají transkripční faktory (Lee a Park, 2012). Mezi transkripční regulátory typické pro rostliny patří geny obsahující NAC doménu. Při výzkumech bylo objeveno 75 NAC proteinů u *Oryza sativa* a 105 u *Arabidopsis thaliana*. Tyto proteiny vykazují rozmanitost sekvencí v jednotlivých subdoménách, což může mít vliv na expresi v různých vývojových stádiích a tkáních. Je tedy zřejmé, že NAC transkripční faktory se podílejí na různých vývojových a morfogenních reakcích rostlin (Ooka, 2003). Některé transkripční faktory NAC jsou vázány na membránu a aktivovány proteolytickým štěpením po vystavení vnějším stimulům (Kim et al., 2006; Kim et al., 2007).

Lee et al. (2012) objevili jeden z NAC transkripčních faktorů NTL4, který je u *Arabidopsis* nutný pro tvorbu ROS v podmínkách sucha. Při stárnutí listů kvůli suchu se NTL4 váže přímo na promotory genů kódující biosyntetické enzymy ROS.

V transgenních rostlinách nadměrně exprimujících aktivní formu NTL4 bylo pozorováno rychlejší stárnutí listů. Naopak mutantní rostliny s deficitem NTL4 byly méně citlivé na stres ze sucha, obsahovaly snížené hladiny ROS, vykazovaly opožděné stárnutí listů a zvýšenou odolnost vůči suchu. Díky těmto pozorováním se ukazuje, že NTL4 je u *Arabidopsis* během působení sucha schopný propojovat metabolismus ROS se stárnutím listů. Navíc je NTL4 indukován v listech při působení stresu a v dráze závislé na ABA. Signály ABA spouštějí jeho uvolňování z plazmatické membrány (Lee et al., 2012).

U kořenů a výhonků vojtěšky byla provedena globální genová analýza pro hlavní proteiny spojené s produkcí ROS. Rostliny byly vystaveny stresu suchem po dobu 11 dnů a poté následovalo jednodenní zotavení. Byly porovnávány dvě odrůdy vojtěšky. První odrůdou byla odrůda Wisfal, což je odrůda odolná vůči suchu a druhou odrůdou byla odrůda Chilean, kde se jednalo o odrůdu citlivou na suchu. Během silného stresu suchem se zvýšila exprese většiny NADPH oxidáz jak v kořenech, tak ve výhoncích vojtěšky. Její exprese se však ukázala citlivější na suchu u odrůdy Chilean, tedy u odrůdy citlivé na suchu. Expres glykolát oxidázy (GLO), která v peroxisomech produkuje ROS, se rychle snížila v kořenech při stresu ze sucha a ve výhoncích došlo k jejímu snížení až při silném stresu. Dále byly sledovány hladiny askorbát peroxidázy (APX), která zachytává H_2O_2 . U výhonků byla její transkripce zvýšená za dobře zavlažovaných podmínek, ale se vzrůstajícím suchem postupně klesala. V kořenech byla její regulace slabá a nestálá. Některé důležité geny (např. APX), které vychytávají ROS, jsou za normálních podmínek exprimovány ve vysokých hladinách. Při zvýšeném stresu suchem sice dojde ke snížení hladiny exprese, přesto však stále mohou mít hlavní roli při vychytávání ROS. Z této studie také závěrem vyplývá, že nelze počítat s pravidlem, že během působení sucha zvýšená exprese genů pohlcujících ROS bude mít vždy pozitivní efekt na růst rostliny (Kang a Udvardi, 2012).

1.2 Odpověď na stres

Pokud se rostliny chtějí nějak vyrovnat se suchem, mají v zásadě dvě hlavní možnosti: redukce ztrát vody pomocí snížení průduchové vodivosti nebo udržení dostatečného příjmu vody. Právě s tím rostlině pomáhá proces zvaný osmotická úprava (OA z anglického osmotic adjustment), díky němuž se rostlina snaží vyrovnat s podmínkami sucha nebo se salinitou (Sanders a Arndt, 2012). Termín osmotická úprava je

definován jako akumulace nebo de novo syntéza rozpuštěných látek v buňce, která způsobí změnu osmotického potenciálu buňky (Boyer et al., 2008). Při OA dochází ke zvýšení osmoticky aktivních látek uvnitř buňky. Tím vzniká negativnější osmotický potenciál, který dovoluje udržovat turgor v metabolicky aktivních buňkách, potažmo v tkáni listů a zlepšuje se tak hydratace buněk. Napětí v buňce totiž musí být takové, aby bylo schopno odolávat vnějšímu napětí, které se vysycháním půdy zvyšuje. OA tedy vytváří dostatečné napětí, které je schopno udržovat turgor buňky. Znamená to tedy, že pokud u rostlin dojde k tomuto procesu, mohou lépe a déle přežívat v nepříznivých podmínkách sucha. OA se vyskytuje u různých druhů rostlin, nejvíce však byla studována na zemědělských plodinách. K OA přispívá spousta organických i anorganických látek. Organické rozpuštěné látky mohou být pro buňku přínosné nejen díky tomu, že udržují její turgor, ale mohou ji také chránit před poškozením. Spadají sem látky, které obsahují velké množství hydroxylových skupin, díky nimž mohou v cytoplazmě vznikat vodíkové vazby s molekulami vody. Díky tomu jsou v buňce stále udržovány funkční makromolekuly. Mezi rozpuštěné látky zodpovědné za tuto funkci patří různé cukry (např. fruktóza, sacharóza, glukóza), cukerné alkoholy (např. glycerol, manitol, sorbitol) nebo aminokyseliny (zejména prolin). Z uvedených poznatků vyplývá, že na ustavení OA nemá vliv jedna jediná látka, ale že se spíše jedná o akumulaci velkého množství rozpuštěných látek, které pak vedou k OA. OA je tedy důležitým mechanismem reakcí rostlin na stres suchem a může hrát roli při zlepšené toleranci na stres (Sanders a Arndt, 2012).

Někdy se objevuje rozdělení OA na aktivní a pasivní. Jako aktivní OA je označován reálný nárůst rozpuštěných látek nebo de novo syntéza rozpuštěných látek v buňce. Tento nárůst vede ke snížení osmotického potenciálu buňky a tím pádem i ke snížení vodního potenciálu. V tomto případě se spíše než o reakci na sucho jedná o adaptaci na sucho. Jako pasivní OA je označován případ, kdy dochází k úniku vody z buňky, tím pádem ke snížení jejího objemu a ke zvýšené koncentraci rozpuštěných látek. To opět vede ke snížení vodního potenciálu. Zde se naopak nejedná o adaptaci, ale o běžnou reakci na sucho. (Sanders a Arndt, 2012).

Osmotická úprava je reakce, která se vyskytuje u rostlin stresovaných suchem i solí (Boyer et al., 2008). Se změnou turgoru souvisí také elasticita tkání. Pletiva s vyšší elasticitou jsou schopny udržet turgor déle než málo pružná pletiva. Tato vlastnost může být užitečná u rostlin, které nevyužívají reakci OA (Kozłowski a Pallardy, 2002).

ROS vedou k poškození buněčných součástí, případně k jejich zániku. Buňky proto musí ovládat nějaký mechanismus, který jim pomůže vyrovnat se s nadbytečnou produkcí ROS při působení sucha. Rostliny disponují řadou antioxidačních mechanismů, které jim napomáhají udržovat hladiny ROS v přijatelné míře (Hernández et al., 2012). Jako antioxidanty byly u rostlin definovány molekuly, které mohou darovat elektrony nebo atomy vodíku, poskytují radikál odvozený od antioxidantu, který je potom účinně zhasen jinými zdroji elektronu nebo vodíku z důvodu zabránění poškození buňky a jejichž vlastnosti prostorově a časově vzájemně souvisí s oxidačním stresem (Hernández et al., 2009). U rostlin se nachází jak enzymatické, tak neenzymatické antioxidanty. Neenzymatické antioxidanty poskytují elektrony enzymatickým oxidantům, které díky nim potom katalyzují vychytávání prooxidantů. Další rozdělení může být na primární a sekundární antioxidanty. Primární antioxidanty vychytávají prooxidanty a sekundární recyklují primární antioxidanty (Hernández et al., 2012). Nejčastějšími cíli, které ROS napadají, jsou membránové polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) a proteiny. Jako výsledek peroxidace lipidů vznikají lipidové peroxidy. Ty mohou oxidovat sousední PUFA, čímž se tato reakce může šířit po celé membráně a vést v důsledku k jejímu poškození a nefunkčnosti. Dalšími složkami náchylnými k oxidaci jsou aminokyseliny, zejména ty, které obsahují síru (Hernández et al., 2012).

Při nedostatku vody nastává u rostlin mnoho změn, ať už se jedná o fyziologické nebo vývojové. Odpověď rostlin na tento stav také závisí na čase, můžeme rozlišovat krátkodobé a dlouhodobé reakce. Mezi krátkodobé reakce patří uzavírání průduchů, rolování listů nebo vadnutí. Dlouhodobé reakce naopak zahrnují například změny v kořenové architektuře nebo zvýšené ukládání listových vosků. Pro všechny odpovědi je ovšem důležitá molekulární úroveň reakcí. Jedná se o nejrůznější kombinace regulací genů, kdy u některých dochází ke zvýšení nebo snížení jejich exprese. Správně vyvážená regulace těchto genů reagujících na suchu má za následek správný růst rostliny i v nepříznivém prostředí, případně i zvýšenou toleranci vůči suchu (Chen a Xiong, 2012). Příkladem je indukce exprese mnoha genů reagujících na suchu pomocí transkripčního faktoru. Tyto geny pak mohou způsobit zvýšenou toleranci vůči suchu. Mohou mít ovšem také nežádoucí vedlejší účinky jako je například zpomalení růstu (Kasuga et al., 1999).

Aby bylo možné zbavit se těchto nežádoucích účinků, je potřeba co nejvíce porozumět molekulární podstatě regulace genů při působení sucha. V současnosti existuje

několik metod, díky kterým jsme schopni odhalovat fungování transkriptomu při nedostatku vody. Ukazuje se, že koordinace regulace směrem dolů nebo nahoru ve spoustě genů je poměrně dynamická, je časově a prostorově specifická a že souvisí se signálními cestami fytohormonů (Chen a Xiong, 2012).

Pro získání hlubších znalostí o molekulárních reakcích, které reagují na stres ze sucha a na adaptaci na sucho, je potřeba studovat buď již vytipované geny, u kterých je známo, že na stres suchem reagují nebo sledovat celkové transkripční přeprogramování genomu (Chen a Xiong, 2012). V současné době se používá porovnání exprese všech genů v transkriptomu při reálném nebo simulovaném stresu suchem. Srovnání může vycházet buď z porovnání rostlin se stejným nebo velmi podobným genomem (odrůda, inbrední linie, dihaploid), kdy část rostlin je pěstována v normálních podmínkách a druhá část je stresována na nedostatek vody (Samarah, 2005). Druhou hojně využívanou možností je srovnání dvou odlišných odrůd, které charakterizuje rozdílná reakce na stres suchem (Kundráťová et al., 2021). V současnosti existují dvě hlavní kategorie metod, kterými jsou metody založené na hybridizaci a přímé sekvenování. Typem metod založených na hybridizaci je například analýza mikročipů. Pro vytvoření mikročipu musíme znát sekvence sledovaných genů, můžeme ji tedy používat pro druhy s více či méně známými genomy. Vzhledem k nákladům se jedná o relativně efektivní metodu. Naopak u metod typu přímého sekvenování pomocí technologií nové generace není nutná předchozí znalost genomu daného druhu. Mohou tedy být detekovány neznámé geny. Analýzy pomocí sekvenování nové generace jsou poměrně drahé, ale jelikož dochází k jejich neustálému vývoji a zlepšování, stávají se využívanějšími, a tudíž i cenově dostupnějšími (Chen a Xiong, 2012).

Některé geny aktivované stresem ze sucha mohou být u různých rostlinných druhů regulovány podobným způsobem. Díky rozsáhlým studiím profilování genové exprese se ukazuje, že existují velké rozdíly v expresích mnoha genů u různých druhů rostlin, ale v některých případech i rozdíly v rámci stejného druhu. Toto transkripční přeprogramování celého genomu způsobené stresem ze sucha je pravděpodobně velmi plastické. Obecně se ukázalo, že mezi různými druhy nebo mezi různými experimenty na stejných druzích najdeme poměrně malou shodu v genové expresi. Ovšem tyto rozdíly mohou být také způsobené rozdílným typem zvoleného experimentálního postupu, odlišným vývojovým stádiem zvolených rostlin nebo zvoleným typem tkáně. Je tedy vidět, že u rostlin je za reakce na sucho zodpovědná koordinace v expresích genů

reagujících na sucho. Existuje tedy více cest, které reagují na sucho a propůjčují rostlinám toleranci vůči suchu a které mohou fungovat buď samostatně, nebo spolu různými způsoby komunikovat (Chen a Xiong, 2012). Příkladem mohou být významné rozdíly jak mezi transkripty *Arabidopsis* a rýže pro sucho tak mezi jejich regulacemi, což dokazuje, že různé rostlinné druhy využívají různé kombinace v expresích genů reagujících na sucho (Narsai et al., 2010).

Hazen et al. (2005) prováděli jednu z několika transkriptomových analýz, kdy měřili profil exprese fenotypově odlišných přírůstků rýže a jejich transgresivních segregantů u odrůd s nižší a vyšší tolerancí sucha (Hazen et al., 2005). Díky této a podobným studiím byly odhaleny dva běžné scénáře, které se vykytují u rostlin s rozdílnou odolností vůči stresu. Prvním scénářem je, že odrůdy s nižší tolerancí sucha mají pomalejší reakce na stres a je u nich indukováno méně genů (Hazen et al., 2005; Chen a Xiong, 2012). Druhým scénářem je, že odlišná genová exprese pod vodním stresem vykazuje opačné profily genové exprese u rostlin tolerujících sucho oproti rostlinám citlivým. Zdá se, že tento rozdíl je spojen spíše s kvalitativními změnami exprese mRNA než s kvantitativními změnami (Roche et al., 2007).

Díky všem provedeným transkriptomickým analýzám je možné geny reagující na stres ze sucha rozdělit podle jejich biologických funkcí do tří funkčních kategorií. První skupina obsahuje geny, které kódují složky zapojené do přenosu signálu při stresu ze sucha. Do druhé skupiny spadají geny, které kódují látky zmírňující poškození způsobené stresem. Třetí skupina pak obsahuje geny kódující proteiny související s růstem a vývojem (Chen a Xiong, 2012).

Do první skupiny genů, tedy mezi složky zapojené do signální transdukce při stresu ze sucha, patří různé transkripční faktory (např. AP2/EREBP, MYB, NAC, WRKY, zinkové prsty, bHLH, DREB/ CBF a bZIP/AREB/ABF). Tyto transkripční faktory často regulují geny hojně se vyskytující po proudu směrem ke 3' konci, různé složky fosfoproteinových kaskád, kde hraje roli vápník, enzymy, které metabolizují fosfolipidy, protein kinázy a protein fosfatázy. Dále sem patří geny, které kódují proteiny, které pak regulují metabolismus a stabilitu RNA, translaci i degradaci proteinů (např. ubiquitin ligázy, proteázy nebo jejich inhibitory). Jedná se o složky, které by malými změnami mohly vylepšit signální výstup (Chen a Xiong, 2012).

Mezi látky zmírňující poškození způsobené stresem patří proteiny tepelného šoku, proteiny pozdní embryogeneze nebo chladem indukovatelné proteiny. Dále sem patří

enzymy, které se účastní syntézy látek pomáhajících udržovat objem buněk při hyperosmolalitě. Řadí se sem například prolin, spermidin, rafinóza, trehalóza, mannitol nebo inositol. Dalšími enzymy jsou enzymy spojené s detoxikací (např. aldehyddehydrogenáza, aminotransferázy i enzymy tokoferolu) nebo enzymy vystupující v metabolismu ABA. Neméně významné jsou enzymy zapojené do procesů vzniku a zbařování se ROS. Všechny tyto proteiny mohou mít ve výsledku pozitivní vliv na toleranci rostlin vůči suchu (Chen a Xiong, 2012).

Do třetí kategorie genů reagujících se sucho, tedy genů souvisejících s růstem a vývojem, patří geny, které kódují proteiny podílející se na buněčném dělení – cyklin-dependentní kinázy. Dále se sem řadí cytoskeletální složky aktin a tubulin, proteiny světelné fáze fotosyntézy. Spadají sem také některé enzymy, jako jsou enzymy pro metabolismus pigmentů, enzymy spojené se vznikem buněčné membrány a úpravami buněčné stěny (např. proteiny a expansiny bohaté na prolin nebo glycin) a enzymy spojené s anabolismem ligninu. Různé kombinace v expresích těchto genů mohou mít opět pozitivní vliv na toleranci rostlin vůči suchu, případně snižovat škody jím způsobené (Chen a Xiong, 2012).

Při stresu ze sucha může být rozdíl v zapínání a vypínání genů v různých typech tkání, buněk nebo v různých stádiích působení stresu. Existují geny, které mohou mít v různých tkáních opačnou regulaci. Například u pšenice při použití sond dostupných pro homology prolinoxidázy/dehydrogenázy se ukázalo, že v pletivech listů byly většinou regulovány směrem dolů, zatímco v kořenové tkáni docházelo většinou k regulaci směrem ke zvýšení (Ergen et al., 2009). Také u rýže se nacházejí stresem ze sucha regulované geny, které jsou tkáňově specifické. Podle výzkumu v listech převažovaly geny spojené s fotosyntézou a v kořenech a mladých latách převažovaly geny účastnící se vzniku buněčné membrány a úprav buněčných stěn. Také byly objeveny některé geny, které jsou ve stejném vývojovém stádiu ve dvou různých tkáních (listech a kořenech) regulovány recipročně. Jedná se o geny GA2ox, SAP15 a chitináza III (Wang et al., 2011a).

Přeprogramování genové exprese vyvolané stresem ze sucha je také rozdílné v různých vývojových stádiích. U rýže bylo zjištěno 5 284 genů s rozdílnou expresí při stresu ze sucha. Výsledky naznačují, že reakce genů na suchu u rýže jsou velmi závislé na vývojovém stádiu rostliny a na konkrétním pletivu. Je tedy pravděpodobné, že existuje spojitost mezi vnějšími signály z prostředí a podněty vývojovými, které spolu komunikují a mohou se vzájemně ovlivňovat (Wang et al., 2011a).

Ze současných znalostí víme, že některé geny z transkriptomu jsou regulovány i jinými typy stresů a dráhy jejich aktivace se překrývají s dalšími abiotickými stresy a také s drahami rostlinných hormonů. Jedná se o geny, které můžeme zařadit do všech tří kategorií popsaných výše. To znamená, že jsou tyto geny aktivovány více stresy, kterými jsou například kromě sucha ještě salinita nebo chlad. Můžeme z toho odvozovat, že tyto stresy mají nejspíš společné složky v průběhu celé reakce na stres od jeho zaznamenání, předání informace v rostlině a následné spuštění odpovědi (Chen a Xiong, 2012). Proteiny vznikající při působení stresů jsou pravděpodobně společně zodpovědné za detoxifikaci rostlin, protože odstraňují ROS, které by jinak poškozovaly buňky (Zhu, 2001).

Molekulární úroveň procesů, které regulují transkripční přeprogramování v reakci na stres ze sucha, je stále málo prozkoumanou oblastí. Z nových studií se ovšem dozvídáme nové mechanismy, které v těchto reakcích fungují (Chen a Xiong, 2012). Při celogenomové studii rýže bylo zjištěno, že změny methylace DNA způsobené suchem představovaly přibližně 12,1 % celkových místně specifických methylačních rozdílů v genomu rýže. Je navíc zajímavé, že většina těchto metylačních nebo demetylačních míst indukovaných suchem se dá rozdělit do dvou kategorií podle reverzibility. Místa methylace nebo demetylace DNA vyvolaná suchem byla v 70 procentech případů po zotavení vrácena do původního stavu a ve 29 procentech zůstaly změny i po zotavení. Zároveň se tato methylace DNA jevila jako vývojově a tkáňově specifická. Je pravděpodobné, že tyto změny jsou důležitým mechanismem, který má velký vliv na reakci rýže na sucho a případně i na její adaptaci (Wang et al., 2011b).

V nedávných studiích se objevují další poznatky, které odhalují proteiny podobné peptidům. Ty reagují na stres ze sucha a spouští signalizaci podobnou rostlinným hormonům. Opětovná analýza genomu *Arabidopsis* ukázala více než 7000 nových genů. Některé z nich pravděpodobně kódují tyto proteiny podobné hormonům. Ukázalo se, že většina těchto peptidů je vysoce konzervovaná u suchozemských rostlin. Hrají také důležitou roli v meziorgánové komunikaci během morfogeneze (Takahashi et al., 2019).

1.3 Rezistence

Pro vyšlechtění nových odrůd odolnějších vůči suchu je potřeba co nejvíce pochopit interakce mezi působením podmínek okolního prostředí a genetickým založením rostliny. Tomu nejvíce pomáhá porozumění molekulárním mechanismům rezistence. Ukazuje se, že reakce na suchu mohou být různého charakteru. Může se jednat o morfologické nebo fyziologické změny. Z výzkumů vyplývá, že nejčastěji jsou za tyto změny zodpovědné stovky genů a spousta lokusů malých účinků (Hu a Xiong, 2014).

Často se jako kritérium pro hodnocení míry odolnosti plodin využívají znaky na listech. S těmi je totiž spojeno několik mechanismů rezistence na suchu. Pro objasnění genetického založení mechanismů vědci využívají toho, že existuje velká genetická variabilita ve vlastnostech listů souvisejících s rezistencí. Využívá se mapování lokusů kvantitativních vlastností (QTL) (Hu a Xiong, 2014). Ishimaru et al. (2001) se ve své práci zaměřili na identifikaci stomatální frekvence, která je jedním z hlavních faktorů určující fotosyntetickou schopnost a stomatální vodivost. U rýže identifikovali čtyři QTL řídící adaxiální a abaxiální stomatální frekvence. Jejich výsledky naznačují, že stejný gen může pleiotropně určovat stomatální frekvenci na obou povrchích listu. Dále také mapovali lokusy související s rolováním listů, které nastává při působení osmotického stresu. Zjistili, že QTL pro rolování listů a QTL pro stomatální frekvenci se nepřekrývaly. Z toho vyplývá, že osmotická tolerance je alespoň částečně samostatná a nezávisí na stomatální frekvenci (Ishimaru et al., 2001).

Při screeningu mutantů a profilování genové exprese bylo odvozeno několik kandidátních genů, které se účastní reakce na suchu. Ukázalo se, že v těchto reakcích hrají klíčovou roli regulační proteiny. Jedněmi ze základních mechanismů vyvolaných stresovými podmínkami sucha jsou fosforylace a defosforylace proteinů. Těchto reakcí, a tudíž i reakcí na suchu, se účastní několik typů kináz, jako jsou proteinkinázy závislé na vápníku (CDPK), proteinkinázy interagující s CBL (calcineurin B - like) (CIPK) a mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) (Fang a Xiong, 2015). U *Arabidopsis* byl popsán jeden z genů protein kináz závislých na vápníku CPK10. Linie, které nadměrně exprimují CPK10, vykazují zvýšenou toleranci vůči stresu ze sucha. Dle výsledků studie se také ukázalo, že CPK10 je důležitý při regulaci stomatálních pohybů zprostředkovaných v závislosti na ABA a Ca^{2+} (Zou et al., 2010). Další objevenou proteinkinázou u *Arabidopsis* je proteinkináza 2 související s SNF1 (SnRK2) - SRK2C. Je aktivovaná osmotickým stresem a může hrát významnou roli při toleranci

sucha u rostlin *Arabidopsis*. SRK2C je pozitivním regulátorem tolerance sucha u kořenů *Arabidopsis* a je schopna zprostředkovat signály iniciované během stresu ze sucha, což má za následek vhodnou genovou expresi. Analýza mikročipů transgenních rostlin pro tento gen odhalila, že díky zvýšené toleranci došlo k regulaci směrem ke zvýšení v mnoha genech reagujících na stres. Jednalo se například o geny RD29A, COR15A a DREB1A/CBF3 (Umezawa et al., 2004).

Další důležitou skupinou regulačních proteinů jsou transkripční faktory. Ty jsou zodpovědné za změněnou genovou expresi a pomáhají tak rostlinám reagovat na stresové podmínky na transkripční úrovni. Těchto reakcí na sucho se účastní mnoho transkripčních faktorů, které spadají do různých rodin. Příkladem jsou AP2/EREBP (APE-TALA2/Ethylene-responsive element binding protein), bazický leucinový zip (bZIP), MYB, NAM-ATAF1/2-CUC2 (NAC) a zinkový prst (Fang a Xiong, 2015). Konkrétním příkladem je studie provedená na *Arabidopsis thaliana* s genem shn, který spadá do rodiny transkripčních faktorů AP2/EREBP. Tento gen je zodpovědný za zvýšené množství kutikulárního vosku na listech. Vosková vrstva na povrchu rostlin se nazývá kutikula a slouží jako ochranná vrstva před vlivy prostředí, a tudíž má svůj význam i při působení sucha. Nadměrná exprese všech tří genů kladu SHN vykazovala až šestinásobně zvýšené hladiny kutikulárního vosku a významnou toleranci vůči suchu a zotavení, což pravděpodobně souvisí se sníženou hustotou průduchů (Aharoni et al., 2004).

V promotorových oblastech genů reagujících na sucho se vyskytují cis-elementy označované ABRE (ABA responzivní elementy). Jedná se o promotory genů reagujících na stres ze sucha, které ale pro svou aktivaci potřebují ABA. Tyto promotory řídí genovou expresi prostřednictvím AREB/ABF transkripčních faktorů, které spadají do podrodiny transkripčních faktorů bZIP. Mezi členy této podrodiny patří transkripční faktory AREB1, AREB2 a ABF3. Jejich úplná aktivace je závislá na ABA. Trojitý mutant areb1-areb2-abf3 má sníženou toleranci vůči suchu. Z těchto výsledků vyplývá, že transkripční faktory AREB1, AREB2 a ABF3 jsou klíčovými složkami pro regulaci genové exprese závislou na ABRE při vystavení rostlin stresu suchem (Yoshida et al., 2010). Do rodiny základních transkripčních faktorů leucinového zipu patří také faktor OsbZIP23. Ten byl studován u rýže, kde jeho nadměrná exprese vykazovala výrazně zlepšenou toleranci vůči suchu. Z výsledků studie vyplývá, že OsbZIP23 je dalším regulátorem transkripce, který může působit na expresi velkého

množství genů v odpovědi na stres ze sucha v regulační dráze závislé na ABA. (Xiang et al., 2008).

Při reakci na sucho je také důležitý pohyb stomatálních buněk. Při těchto pohybech se u *Arabidopsis* jako důležitý ukázal další transkripční faktor. Je jím transkripční faktor AtMYB60. Je exprimován ve většině rostlinných orgánů kromě kořenů a specificky exprimován v ochranných buňkách. Jeho exprese je rychle regulována směrem dolů při působení sucha. Nulová mutace v AtMYB60 způsobovala podstatné snížení průduchů a snížené vadnutí při působení sucha (Cominelli et al., 2005). V ochranných buňkách je také suchem indukován gen SNAC1, který kóduje další důležité transkripční faktory. Jsou jimi NAM, ATAF a CUC, které spadají do NAC rodiny transkripčních faktorů. Nadměrná exprese SNAC1 genu (stress-responsive NAC 1) u transgenní rýže významně zvyšuje odolnost vůči suchu. Tato rýže vykazovala odolnost za podmínek závažného sucha v reprodukčním stádiu a zároveň nedocházelo k žádným fenotypovým změnám. Významné zlepšení odolnosti vůči suchu prokazovala i ve vegetativním stádiu. Ve srovnání s divokým typem ztrácela transgenní rýže díky uzavírání více stomatálních pórů mnohem pomaleji vodu. Tato studie tedy ukazuje, že SNAC1 má velký potenciál při zlepšování tolerance rostlin rýže vůči suchu (Hu et al., 2006).

Jednou z vlastností, které se rostlinám mohou při působení sucha hodit, je zvětšení kořenů. Za vylepšení reakcí v podmínkách sucha je zodpovědný gen OsNAC10, který spadá do domény NAC genů. Jedná se opět o gen, jehož exprese je vyvolána suchem. K jeho expresi dochází především v květech a kořenech. Tento gen má dva promotory, jeden základní GOS2 a druhý RCc3 je specifický pro kořenové části. Gen OsNAC10 byl studován v rýži v polních podmínkách sucha a jeho nadměrná exprese jak s konstitutivním, tak s kořenově specifickým promotorem vedla ke zvýšení tolerance vůči suchu během vegetativního růstu díky tomu, že byly v různých tkáních aktivovány různé skupiny genů. U rostlin s kořenově specifickým promotorem RCc3 byl výrazně zvýšen výnos zrna za sucha i za normálních podmínek oproti rostlinám s konstitučním promotorem GOS2. Tyto transgenní rostliny s kořenově specifickým promotorem také měly 1,25krát větší průměr kořenů, díky čemuž mohou lépe odolávat podmínkám sucha a zároveň mají i vyšší produkci (Jeong et al., 2010). Do transkripčních faktorů také spadají faktory zinkových prstů. Protein zinkového prstu typu Cys2/His2 je kódován genem ZPT2-3. Ukázalo se, že je také zodpovědný za toleranci vůči suchu. Jeho nadměrná exprese u transgenních rostlin petúnie měla za následek zvýšenou toleranci vůči

suchu (Sugano et al., 2003). Dalším objeveným transkripčním faktorem spadajícím opět do třídy zinkových prstů typu Cys2/His2 je DST (tolerance vůči suchu a soli, z anglického drought and salt tolerance). Bylo zjištěno, že se jedná o negativní regulátor tolerance sucha. Mutantní rostliny *dst* jsou totiž schopny lépe udržovat vodu a méně ji ztrácet při vystavení suchu oproti rostlinám divokého typu. Za stresových podmínek má tento mutant také výrazně nižší průduchovou vodivost než rostliny divokého typu, což má za následek její vyšší toleranci vůči stresu ze sucha (Huang et al., 2009).

Dalšími složkami, které hrají důležitou roli při toleranci rostlin vůči suchu a které zabraňují vysychání, jsou LEA (z anglického late embryogenesis abundant) proteiny. Jedná se o proteiny, které se v hojném množství tvoří v pozdní fázi vývoje semen při dehydrataci. U vyšších rostlin obsahují hydrofilní aminokyseliny (např. glycin a lysin), které jsou uspořádané v opakující se sekvenci. Díky tomu propůjčují proteinům vlastnosti jako je hyperhydrofilnost a teplotní stabilita. Zachycují tak vodu a chrání buněčné součásti před poškozením stresem ze sucha. Hrají tedy roli při toleranci sucha nejen při skladování semen, ale pro celou rostlinu. Expresi genů, které kódují LEA proteiny, může ovlivňovat řada faktorů, podmínek nebo procesů (Hong-Bo et al., 2005). Jeden z genů, které kódují LEA proteiny, byl studován u rýže. Jednalo se o gen *OsLEA3-1*, který je indukován suchem. Nadměrná exprese tohoto genu u transgenních rostlin vykazuje zvýšenou toleranci vůči stresu. Navíc při použití vhodných promotorů byl prokázán znatelně větší výnos zrna (Xiao et al., 2007).

Dalšími hráči, kteří mohou ovlivňovat rezistenci rostlin na suchu, jsou transportérové proteiny. Pro správnou reakci rostlin na podmínky sucha jsou důležité stomatální pohyby. Ty mohou být regulovány několika signálními drahami a jsou za ně zodpovědné především strážné buňky, které obsahují transportní kanály regulující vstup látek do buněk a ven. Jedná se o ABC (ATP-binding cassette) kanály. Jeden z těchto transportérů *AtMRP5* byl zkoumán u *Arabidopsis*. Některé signální dráhy, které jsou zodpovědné za otevírání průduchů, jsou právě ovlivňovány mutací v tomto genu. Mutantní rostliny *mrp5-1* měly za světla sníženou rychlost transpirace, snížené ztráty i spotřebu vody a na nezavlažovaných půdách přežily mnohem déle. Také byly zkoumány rozdíly v otevírání průduchů za tmy a za světla mezi mutantními rostlinami a rostlinami divokého typu. Za tmy nebyly pozorovány větší rozdíly mezi mutantními a divokými rostlinami, naopak za světla bylo otevírání průduchů u mutantních rostlin značně sníženo (Klein et al., 2003). Dalším zkoumaným genem podílejícím se na regulaci průduchů byl gen *AtMRP4*. Po fluorescenčním označení byl protein viditelný

zejména v okrajových částech buněk, z čehož vyplývá, že se nachází na plazmatické membráně. Stejně tak bylo detekováno, že dochází k jeho silné expresi v průduchách. Mutantní rostliny *atmrp4* vykazují zvýšenou transpiraci a kvůli tomu jsou citlivější na stres ze sucha oproti divokým rostlinám. Pravděpodobným důvodem bude to, že mají oproti mutantním rostlinám větší póry. Zvýšená transpirace u mutantů ovšem nezávisí jen na velikosti pórů, ale také na kinetice jejich otevírání. Po působení světla totiž u mutantních rostlin dochází k rychlejšímu otevírání průduchů oproti divokým rostlinám (Klein et al., 2004).

U rýže byl studován aquaporinový gen *RWC3*, který je zapojen do mechanismu vyhýbání se suchu. U transgenních rostlin, které nadměrně exprimovaly tento gen a obsahovaly stresem ze sucha indukovaný promotor, byl zjištěn vyšší vodní potenciál v listech a vyšší relativní kumulativní rychlost transpirace oproti rostlinám divokého typu. Výsledky ukazují, že transgenní rostliny jsou schopny lépe hospodařit s vodou za podmínek dehydratace a gen *RWC3* hraje roli při mechanismu vyhýbání se suchu (Lian et al., 2004). Další aquaporinový gen byl sledován u *Arabidopsis*. Jednalo se o gen *PgTIP1* kódující vnitřní protein tonoplastu u ženšenu (*Panax ginseng*). Studie dokazuje, že hraje roli při reakcích rostlin na stres ze sucha, jelikož je zapojen do procesů spojených s transportem vody přes tonoplast prostřednictvím aquaporinů. Nadměrná exprese tohoto genu v transgenních rostlinách *Arabidopsis* zvyšovala za příznivých podmínek růst rostlin. Byly také sledovány rozdíly mezi transgenními rostlinami a rostlinami divokého typu za podmínek dehydratace. Zde podle výsledků záviselo také na podmínkách pěstování, zejména na hloubce dostupné půdy. Při pěstování na mělkých miskách hlubokých 10 cm uvádaly transgenní rostliny mnohem dříve než rostliny divokého typu. Naopak při pěstování v hlubokých miskách dosahujících hloubky 45 cm neuvadal ani jeden typ rostlin. Transgenní rostliny ovšem vykazovaly mnohem lepší stav růstu, zejména měly podstatně delší kořeny. Tyto výsledky budou dány nejspíše tím, že hluboké misky lépe navozují přirozené podmínky pro rostliny (Peng et al., 2007).

Dalším typem procesů, který může přispívat k rezistenci rostlin, je akumulace osmoprotektivních látek neboli osmoprotektorů, jinak také nazývaných jako kompatibilní soluty. Jedná se o velmi dobře rozpustné sloučeniny, které i při vysokých koncentracích nejsou toxické. Najdeme je u rostlin i u živočichů. Podle chemického složení je můžeme rozdělit do tří skupin na betainy a příbuzné sloučeniny, polyoly a cukry (např. mannitol a trehalóza) a aminokyseliny (např. prolin). Během působení stresu,

jako je například sucho, dochází k indukci biosyntetických enzymů a osmoprotektivní látky jsou syntetizovány ve vyšším množství. Kompatibilní soluty za nepříznivých podmínek zvyšují osmotický tlak v buňce a stabilizují proteiny a membrány. Nacházejí se zejména v cytoplazmě (McNeil et al., 1999). Pro zvýšení tolerance některých plodin se rostliny upravují tak, aby nadměrně exprimovaly enzymy zodpovědné za syntézu kompatibilních solutů. Jedním z příkladů takto geneticky upravených rostlin byly rostliny bramboru. Studie byla provedená na odrůdě bramboru Gannongshu 2, do které byl vpraven gen BADH (betain aldehyddehydrogenáza). Ten ještě obsahoval promotor rd29A z *Arabidopsis thaliana*, k jehož indukci dochází při působení stresu. Gen se povedlo integrovat do genomu bramboru a analýzy potvrdily, že u kontrolních rostlin k jeho expresi vůbec nedocházelo, zatímco u transgenních rostlin jeho exprese stoupala se zvyšujícím se působením stresu. Také se ukázalo, že BADH pozitivně ovlivňuje permeabilitu membrány při působení stresu, jelikož buněčné membrány transgenních rostlin byly při působení stresu poškozeny méně než membrány kontrolních rostlin. Obecně vykazovaly transgenní rostliny normální a lepší růst oproti kontrolním rostlinám. Gen BADH tedy zlepšil u rostlin schopnost tolerance stresu. Potvrdilo to tedy myšlenku, že geny zapojené do drah syntézy rozpuštěných látek lze využívat při tvorbě transgenních plodin, které tyto geny neobsahují, a zvyšovat tak jejich odolnost vůči stresům (Zhang et al., 2011). V dalším výzkumu bylo testováno, zda zvýšené množství aminokyseliny prolinu má vliv na zvýšenou toleranci rostlin. Do rostlin tabáku byl opět zaveden gen P5CS se specifickým promotorem a u rostlin tak byla nadměrně exprimována A1-pyrrolin-5-karboxylát syntetáza. Jedná se o enzym, který katalyzuje reakce, kde konečným produktem je prolin. Transgenní rostliny produkovaly významně větší množství prolinu oproti kontrolním rostlinám a rostliny, které exprimovaly vyšší hladiny P5CS, obsahovaly více prolinu. Z výsledků vyplývá, že akumulace prolinu v buňkách transgenních rostlin jim pomáhá udržet osmotický potenciál a tím lépe tolerovat stresové podmínky sucha. Prolin tedy působí jako osmoprotektivní látka (Kishor et al., 1995).

Do poslední skupiny látek, které se u rostlin podílejí na toleranci sucha, by se daly zařadit nejrůznější proteiny, které jsou spojené s metabolismem rostlin. Jak již bylo zmíněno výše, při působení sucha hraje důležitou roli také kutikulární vosk na listech rostlin, který může pomáhat zamezovat ztrátám vody. U rýže byl objeven gen pro suchem indukovanou akumulaci vosku (DWA1), který kóduje velmi velký protein. Bylo

pozorováno, že u mutantních rostlin *dwa1* se ztrátou funkce dochází při působení sucha k rychlejšímu vadnutí, k rolování listů a po opětovné závlaze nejsou schopny přežít na rozdíl od rostlin divokého typu. Zároveň bylo u mutantních rostlin pozorováno výrazně snížené množství biomasy a plodnost klásků. Bylo zjištěno, že homolog DWA1 se vyskytuje u většiny druhů vyšších rostlin. K expresi DWA1 dochází zejména ve vaskulárních tkáních a ve vrstvách epidermálních buněk. Oproti reprodukčním stádiím, kdy je exprese poměrně vysoká, nedochází ve vegetativních stádiích téměř vůbec k jeho expresi. U *dwa1* mutantů bylo po působení sucha výrazně snížené usazování voskových krystalů na kutikule, v některých místech listů se dokonce nenacházely žádné. Kvůli sníženému množství vosku může rostlina ztrácet vodu a tím pádem má zvýšenou citlivost na stres ze sucha. Potvrdilo se, že nadměrná exprese DWA1 hraje roli při toleranci stresu ze sucha díky regulaci ukládání kutikulárního vosku, protože při působení sucha rostliny nadměrně exprimující DWA1 produkovaly zvýšené hodnoty mastných kyselin pro kutikulárního vosku (Zhu a Xiong, 2013). Důležitou roli při toleranci hraje i gen *OsOAT*, který kóduje ornitin δ -aminotransferázu. Jeho regulace směrem ke zvýšení byla zaznamenána v rostlinách, které nadměrně exprimovaly NAC transkripční faktor *SNAC2*. Tento transkripční faktor se váže na protomor genu *OsOAT*. Při působení sucha docházelo k transkripci genu *OsOAT*. Pro otestování tolerance byly vytvořeny transgenní rostliny rýže nadměrně exprimující gen *OsOAT* a byly pozorovány rozdíly mezi nimi a rostlinami divokého typu. Nejprve proběhlo testování v laboratorních podmínkách. Tam transgenní rostliny po působení stresu uvádaly pomaleji než kontrolní rostliny a zároveň se po opětovné závlaze byly schopny lépe zotavit. Při testování v polních podmínkách vykazovaly transgenní rostliny také lepší výsledky. Při působení sucha oproti kontrolním rostlinám vadly pomaleji, a navíc prokazovaly znatelně vyšší rychlost vzcházení semen, což je důležitý znak při hodnocení tolerance. Potvrdilo se tím, že nadměrná exprese genu *OsOAT* může hrát u rýže důležitou roli při rezistenci vůči suchu (You et al., 2012).

2 Mák

Mák je pro střední Evropu a Českou republiku tradiční rostlina. Pěstování rostlin máku a jejich využití zde má dlouhou historii, o čemž svědčí například jeho častý výskyt v lidovém umění nebo ve spoustě názvů a vlastních jménech. Rostliny máku jsou už od středověku pěstovány jako okrasné rostliny, ale také pro použití semen v potravinářství díky své výjimečné chuti. Rostliny ovšem obsahují alkaloidy, které mají narkotické účinky, což by mohli zneužívat drogově závislí. V České republice je z tohoto důvodu stanoven možný obsah opiových alkaloidů v tobolkách. Ze zákona je dán maximální limit, kdy obsah opiových alkaloidů v suchých tobolkách se stopkou nejvýše 15 cm pod tobolkou nesmí překročit 0,8 %. Většina odrůd máku, které se v České republice pěstují, mají semena s typicky modrou barvou. Mají příjemnou vůni a sladkou chuť. Tento mák nese označení Český modrý mák. V České republice se v malé míře, která představuje 3 % plochy oseté touto plodinou, pěstují i odrůdy mající bílá semena. Jejich chuť už je ovšem jiná (Mikšík a Lohr, 2020).

Mák pěstovaný v České republice můžeme podle různých parametrů rozdělovat do několika skupin. Podle doby výsevu rozlišujeme dvě hlavní skupiny, což jsou mák jarní a mák ozimý. Mák jarní se v závislosti na konkrétním roce pěstuje na 90 – 100 % plochy oseté touto plodinou. Zbytek plochy zaujímá mák ozimý, který je charakteristický intenzivně chlupatými mladými listy s mléčnými skvrnami (Mikšík a Lohr, 2020).

Již od počátku tohoto století pěstuje Česká republika největší objem potravinářského máku na světě a produkuje až jednu třetinu veškerého máku uvedeného na světový trh. 85 % z celkového objemu máku vyprodukovaného v České republice se vyváží. Tuzemská spotřeba vychází přibližně na 400 gramů máku na obyvatele za rok (Mikšík a Lohr, 2020).

Přestože se u nás mák pěstoval i v minulosti, jeho produkce se zvýšila až ke konci 20. století, kdy se zvedala poptávka po kvalitním máku i ze zahraničí. Dnešní plochy oseté mákem jsou 5x větší oproti plochám ve 20. a 30. letech 20. století. Mák se na našem území pěstuje téměř ve všech oblastech kromě vyšších nadmořských výšek nad 700 m n. m. a velmi suchých oblastí, kde může být výnos výrazně zmenšen suchem (Mikšík a Lohr, 2020).

Díky mnohaletému šlechtění se v České republice produkuje kvalitní mák, který má velmi nízký obsah alkaloidů. Díky tomu není tak nahořklý, ale má příjemnou chuť.

Jsme významným producentem máku, který je kvalitní a určen výhradně pro potravinářské účely. Díky jeho kvalitě patří Česká republika k těm nejvýznamnějším zemím na světě, kde se pěstuje mák pro potravinářské účely. Vysévají se u nás hlavně odrůdy, které byly dlouhodobě šlechtěny. Mezi nejčastější v současnosti patří například Major, Aplaus, Marathon, Opál, Onyx nebo Opex. Díky své kvalitě a specifickým vlastnostem požádala Česká republika o registraci názvu Český modrý mák jako chráněného zeměpisného označení v EU (Mikšík a Lohr, 2020). Velikost osevních ploch máku se podle Českého statistického úřadu v jednotlivých letech mění. V roce 2009 byla například osevní plocha máku 53 623 ha, v roce 2012 to bylo 18 363 ha, v roce 2016 35 543 ha a v roce 2021 43 867 ha (Český statistický úřad, online).

Vliv stresu suchem byl u máku v několika případech studován. První studie se zaměřovala na transkriptomickou a proteomickou analýzu při působení sucha. Kundrátová et al. (2021) porovnávali transkriptomický a proteomický profil u dvou odrůd máku *Papaver somniferum*, kdy jedna byla citlivá na sucho (Prevalskij 133) a druhá tolerantní (Extaz). Nejprve se zaměřili na analýzu dehydrinů, které by měly reagovat na sucho. U odrůdy Extaz nedošlo k výrazným rozdílům v expresi dehydrinů mezi rostlinami vystavenými suchu a kontrolními rostlinami. U odrůdy Prevalskij 133 byly vidět rozdíly v expresi dehydrinů, ovšem nebyly tak výrazné, jak se očekávalo. Soustředili se tedy na jiné geny a proteiny. Dále byly sledovány rozdíly mezi diferenciálně exprimovanými geny (DEG). U odrůdy Extaz bylo při porovnávání kontrolního stavu a působení sucha analyzováno 233 DEG, kdy 122 z nich mělo zvýšené hladiny při působení sucha. U odrůdy Prevalskij 133 došlo ke změně v 1259 DEG, z nichž 576 bylo zvýšeno za sucha. Ukázaly se jasné rozdíly v reakcích na stres ze sucha mezi jednotlivými odrůdami. Byly sledovány také diferenciálně exprimované proteiny (DEP). Zde nebyl žádný významný rozdíl u odrůdy Extaz mezi kontrolním stavem a působením sucha. U odrůdy Prevalskij 133 došlo ke změně v 11 DEP, z nichž 6 bylo výrazně zvýšeno při působení sucha. Při ošetření suchem byl významný rozdíl mezi odrůdami v 52 DEP. Ve výsledku se ukázalo, že při analýze DEG se odrůdy liší zejména v transkriptomických reakcích na stres suchem. Naopak díky analýze DEP se ukázalo, že jsou větší rozdíly mezi odrůdami než mezi ošetřeními v rámci každé odrůdy (Kundrátová et al., 2021).

Další studie se zaměřovala na akumulaci prolinu v rostlinách při působení sucha. Patel a Vora (1985) se ve své studii zaměřili na porovnání akumulace prolinu u různých druhů, čímž chtěli zjistit, zda prolin může být indikátorem odolnosti vůči suchu.

Podle pozorování, při jak velkém vodním deficitu rostliny začínají akumulovat prolin, mohli rostliny rozdělit do dvou skupin na rostliny s nízkou a vysokou akumulací prolinu. Z jejich analýz vyplynulo, že rostlinami odolnými vůči suchu jsou mák, jitrocel a pšenice. Mák začal akumulovat prolin při 13% vodním deficitu a s rostoucím stresem ze sucha se jeho hladina zvyšovala. Naopak jako rostlina citlivá na sucho se ukázala hořčice (Patel a Vora, 1985).

3 Cíl a metodika práce

Praktická část diplomové práce obsahuje dvě části. První část se zaměřuje na optimalizaci metody pro laboratorní testování stresu sucha u máku a následné ověření této metody na variabilní kolekci genových zdrojů. Druhá polovina práce využívá optimalizovanou metodiku k analýze exprese vytipovaných genů potenciálně zapojených do reakce na stres suchem pomocí metody real-time PCR.

3.1 Optimalizace metody a testování vybraných genových zdrojů

Prvním úkolem mé praktické práce bylo optimalizovat metodu pro laboratorní testování stresu sucha u máku.

Pokus byl proveden na semenech máku, která byla pro navození podmínek sucha ošetřena PEGem. PEG neboli polyethylenglykol je látka rozpustná ve vodě i v organických rozpouštědlech. Z chemického hlediska se jedná o polymer, kde jsou jednotlivé uhlovodíkové jednotky spojeny etherovými vazbami. Jedná se o poměrně hojně používanou látku v různých oborech jako je chemie, zdravotnictví, kosmetika nebo farmacie (Velký lékařský slovník, online). Ve výzkumu už byl v minulosti použit na navození podmínek sucha například u kukuřice (Khodarahmpour, 2011) nebo u sóji (Basal et al., 2020).

Semena po samotném působení PEGu plesnivěla, proto bylo potřeba je nejdříve ošetřit desinfekcí. Jako nejlepší se ukázalo ošetření Chloraminem T 5%. Každých 25 semen bylo po dobu 30 min necháno namočených v 500 μ l Chloraminu T 5%. Po uplynutí této doby byla semena 3x propláchnuta destilovanou vodou o objemu 1000 μ l. Tímto způsobem byla ošetřena všechna semena, která byla určena k následnému klíčení v různých koncentracích PEGu. Dále bylo každých 25 semen přeneseno do jedné Petriho misky. K přenesení byla použita sterilní pinzeta, aby se zamezilo nežádoucí kontaminaci z okolí a nedošlo ke znehodnocení vzorků případnými bakteriemi nebo houbami. Každá miska byla opatřena sterilním filtračním papírem a každá miska obsahovala různé koncentrace PEGu. Vzhled Petriho misek s naklíčenými semínky je vidět na obrázcích v příloze č. 1 a 2.

Bylo použito osm koncentrací PEGu. Následující tabulka 3.1 zobrazuje koncentrace PEGu a jim odpovídající hodnoty osmotického potenciálu, které byly použity při pokusu.

Tabulka 3.1: PEG koncentrace

Koncentrace [g PEG/kg H₂O]	Osmotický potenciál ψ_s [mPa]
72,5	- 0,1
112,2	- 0,2
143,2	- 0,3
169,4	- 0,4
192,6	- 0,5
213,6	- 0,6
233,0	- 0,7
251,0	- 0,8

Pro každou koncentraci PEGu (-0,2 mPa, -0,3 mPa, -0,4 mPa, -0,5 mPa, -0,6 mPa, - 0,7 mPa a -0,8 mPa) bylo vytvořeno 6 Petriho misek a pro dalších 6 Petriho misek byla použita jen sterilizovaná destilovaná voda jako kontrola. Tato kombinace byla otestována na semenech laboratorně stresované odrůdy Onyx.

V dalším kroku už byla testována odrůdová odlišnost. Ten samý postup byl zopakován u následujících odrůd, jen zde už vždy po třech Petriho miskách u každé koncentrace u každé odrůdy. Další testovanou odrůdou byl opět Onyx, kdy byly laboratorně stresované už i rodičovské rostliny. Následně byla testována odrůda Zavolzskij, kde získaná semena byla z rostlin stresovaných na poli. Jednalo se o porovnání normálních (zalévaných) semen této odrůdy se semeny stresovanými suchem. Poté byly postupně stejným způsobem testovány další odrůdy. Jednalo se o odrůdy: Onyx, Stupický bělosemenný, Zavolzskij, Ferrara 2, Amarin, Florian, Malsar, Opava - Komarov, R7, Papaver 41, R2, Papaver 7, Chlumecky I/45, R3, S 188, Erbachshofsky, Pulawski bialy, Boehmuv belosemenny, Prevalskij 133 a šlechtitelské materiály č. 15O0800168 a č. 365 (15O0800172).

Všechny Petriho misky byly uzavřeny parafilmem a postaveny vždy na stejné místo, aby měly všechny odrůdy stejné podmínky. Semínka byla ponechána týden klíčit a poté bylo zhodnoceno množství vyklíčených a nevyklíčených semen jak u jednotlivých odrůd, tak také v závislosti na koncentraci PEGu.

Poslední tři odrůdy nevyklíčily, jelikož byly napadeny plísní. Proto byl PEG znovu sterilizován, aby se zabránilo dalšímu plesnivění a pokus mohl být správně vyhodnocen. Bohužel sterilizace nejspíše PEG rozložila a ten pak způsobil, že v něm nevyklíčila téměř žádná semena v žádné koncentraci. Proto byl u odrůdy Prevalskij 133 a u šlechtitelského materiálu č. 15O0800168 a č. 365 (15O0800172) proveden pokus znovu a jeho výsledky jsou zaznamenány níže v tabulce. Tentokrát byly použity už jen Petriho misky s vodou a s koncentracemi -0,2; -0,3; -0,4; -0,5 a -0,6 mPa. U každé koncentrace byly vytvořeny opět tři Petriho misky. U odrůdy Boehmuv belosemenný už bohužel na zopakování pokusu nezbyl materiál.

Dále byla porovnávána semena z odrůdy Onyx pěstované v laboratoři, kdy jednou rostliny rostly v hydroponickém roztoku a jednou byly stresované PEGem už při růstu. V obou případech bylo vytvořeno 5 Petriho misek s vodou a poté se všemi koncentracemi, tzn. -0,2; -0,3; -0,4; -0,5; -0,6; -0,7 a -0,8 mPa.

3.2 Analýza relativní exprese genů potenciálně zapojených do reakce na stres suchem

V laboratoři byla testována relativní exprese tří genů, které byly na základě dostupné literatury vytipovány jako potenciálně zapojené do reakce na stres suchem. V experimentu byla použita odrůda máku Onyx. Semena (25 ks) byla nakličována v Petriho miskách s filtračním papírem ve třech variantách – s vodou (kontrolní varianta), s PEGem o koncentraci odpovídající změně osmotického potenciálu -0,2 mPa a s PEGem o koncentraci odpovídající změně osmotického potenciálu -0,4 mPa. Každá varianta byla provedena ve třech opakováních.

Semínka byla v souladu s předchozím experimentem ponechána klíčit týden. Poté byly děložní rostliny otrhány sterilní pinzetou, vloženy do sterilní mikrozkušky a ihned následovala izolace RNA pomocí TRI Reagentu podle zavedeného protokolu.

V mikrozkuškách byly vzorky nejprve homogenizovány v 1 ml roztoku TRI Reagent přehřátém na 60 °C. Poté byly vzorky ponechány stát 5 minut při pokojové teplotě. Následně byly centrifugovány po dobu 20 minut při 3000 otáčkách za minutu a poté byl tekutý supernatant přenesen do nových mikrozkušek. Následující kroky byly provedeny dvakrát za sebou. Do zkušky bylo přidáno 0,2 ml chloroformu, po dobu 15 sekund byly protřepány a následně nechány stát po dobu 10 min při pokojové teplotě. Vzniklá směs byla poté centrifugována při 10 500 otáčkách za minutu při 4 °C

po dobu 15 minut. Tento proces byl následně ještě jednou zopakován. Vzniklá vodná fáze byla přenesena do nových mikrozkušavek a bylo k ní přidáno 0,5 objemu 2-propanolu a 0,5 objemu 1,2 M NaCl. Vše bylo promícháno a ponecháno stát po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Směs byla centrifugována při 10 500 otáčkách za minutu po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Následující krok byl opět proveden dvakrát. Supernatant byl odstraněn a RNA pelet byl promyt přidáním 1 ml 75procentního ethanolu. Vzorky byly protřepány a centrifugovány při 8 500 otáčkách za minutu při 4 °C po dobu 5 minut. Tento krok byl opět zopakován. Vzorky s RNA peletem byly poté krátce vysušeny na vzduchu po dobu 10 minut. Poté bylo k RNA peletu přidáno 20 µl DEPC-MQ vody a 1 µl inhibitoru RNázy. Opakovaným pipetováním s mikropipetou byly vzorky promíchány, aby se lépe rozpustily, a poté byly inkubovány při 37 °C po dobu 15 minut. Vzorky byly centrifugovány a vloženy do spektrofotometru pro stanovení koncentrace a kvality RNA. Vzorky byly po izolaci uloženy do mrazicího boxu s teplotou -80 °C.

U všech vzorků byla v přístroji NanoDrop změřena koncentrace a vzorky byly naředěny na stejnou koncentraci pro další potřeby k detekci pomocí real-time PCR. Dále bylo potřeba všechny RNA vzorky přečistit pomocí DNA-free Kit (Invitrogen):

Bylo použito vždy 10 µl roztoku RNA. K němu byl přidán 1 µl 10x DNase pufru a 1 µl rDNázy I. Vše bylo promícháno a ponecháno inkubovat při 37 °C po dobu 20 minut. Následně byla přidána 1/10 objemu činidla pro inaktivaci DNázy a vše promícháno. Vzorky byly inkubovány 2 minuty při pokojové teplotě za občasného promíchání. Poté byly centrifugovány při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 1 minuty a 30 s. RNA byla poté přenesena do nové mikrozkušavky.

Následovala vlastní syntéza cDNA pomocí Reverse transcription systém (Promega):

Ke 3 µl RNA byl přidán vždy 1 µl vody a 1 µl oligo (dT)15 primer. Směs byla inkubována při 70 °C po dobu 5 minut. Dále byl vytvořen master mix, který obsahoval 6,6 µl vody, 1 µl dNTP, 4 µl pufru, 2,4 µl MgCl₂ a 1 µl reverzní transkriptázy. Master mix byl přidán ke vzorkům a ty byly následně inkubovány. Nejprve byly inkubovány při 25 °C po dobu 5 minut, následně 1 hodinu při teplotě 42 °C a na následujících 15 min byla zvýšena teplota na 70 °C. Celou dobu bylo se vzorky a činidly pracováno na ledu.

Pro analýzu genové exprese byly vytipovány geny: lactoylglutathione lyase GLX1-like (GLX), phospholipase D alpha1-like (PLD) a 1-Cys peroxiredoxin-like

(PER). Přesné sekvence kódujících genů byly získány z analýzy transkriptomu máku (Kundrátová et al., 2021) a byly vytvořeny pomocí nástroje Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research) a dále testovány pomocí BLAST (NCBI). Pro každý gen byly objednány dva páry primerů, které byly následně testovány na směsném vzorku a pro vlastní expresní analýzu byl použit primerový pár vybraný podle analýzy křivky tání a účinnosti PCR reakce.

Real-time PCR byla provedena s použitím Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) na přístroji QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) v 96jamkové destičce za podmínek doporučených výrobcem a to ve třech technických opakováních pro každý vzorek. Stanovení relativní exprese genu bylo provedeno podle metody $\Delta\Delta CT$ (Livak a Schmittgen, 2001). Následovalo ověření specifity reakce pomocí analýzy křivky tání. Každá analyzovaná sada vzorků obsahovala i negativní kontrolu, která neobsahovala templátovou cDNA. Jako referenční gen byl použit gen pro aktin.

4 Výsledky

V praktické části této práce bylo mým úkolem sledovat klíčivost jednotlivých odrůd máku při různých úrovních sucha a následně zjistit, zda se v rostlinách nacházejí geny aktivované stresem ze sucha. Následující tabulky a grafy shrnují výsledky první části mé praktické práce.

Tabulka 4.1 zobrazuje výsledek klíčení semen odrůdy Onyx. Řádek Onyx - S značí semena rostlin, které byly stresované už při růstu, a řádek Onyx - H představuje rostliny, které byly pěstovány v hydroponickém roztoku. Můžeme vidět výrazný negativní vliv stresu ze sucha. Při působení sucha na semena stresovaných rostlin nebyla tato semena schopna vyklíčit téměř žádná. Jen 10 % semen vyklíčilo bez působení dalšího sucha. Semena rostlin, které rostly v zavlažovaných podmínkách, vykazovala lepší klíčivost. Ovšem klíčila jen při působení slabšího sucha, při závažnějším stresu, který odpovídal změně osmotického potenciálu $-0,4$ mPa a vyšším hodnotám, už také žádná nevyklíčila.

Tabulka 4.1: Odrůda Onyx

Odrůda	Osmotický potenciál ψ_s [mPa]							
	dH ₂ O	-0,2	-0,3	-0,4	-0,5	-0,6	-0,7	-0,8
Onyx - S	10/100	1/123	0/126	0/123	0/125	0/122	0/126	0/124
Onyx - H	48/49	94/99	25/122	0/125	0/100	0/122	0/125	0/124

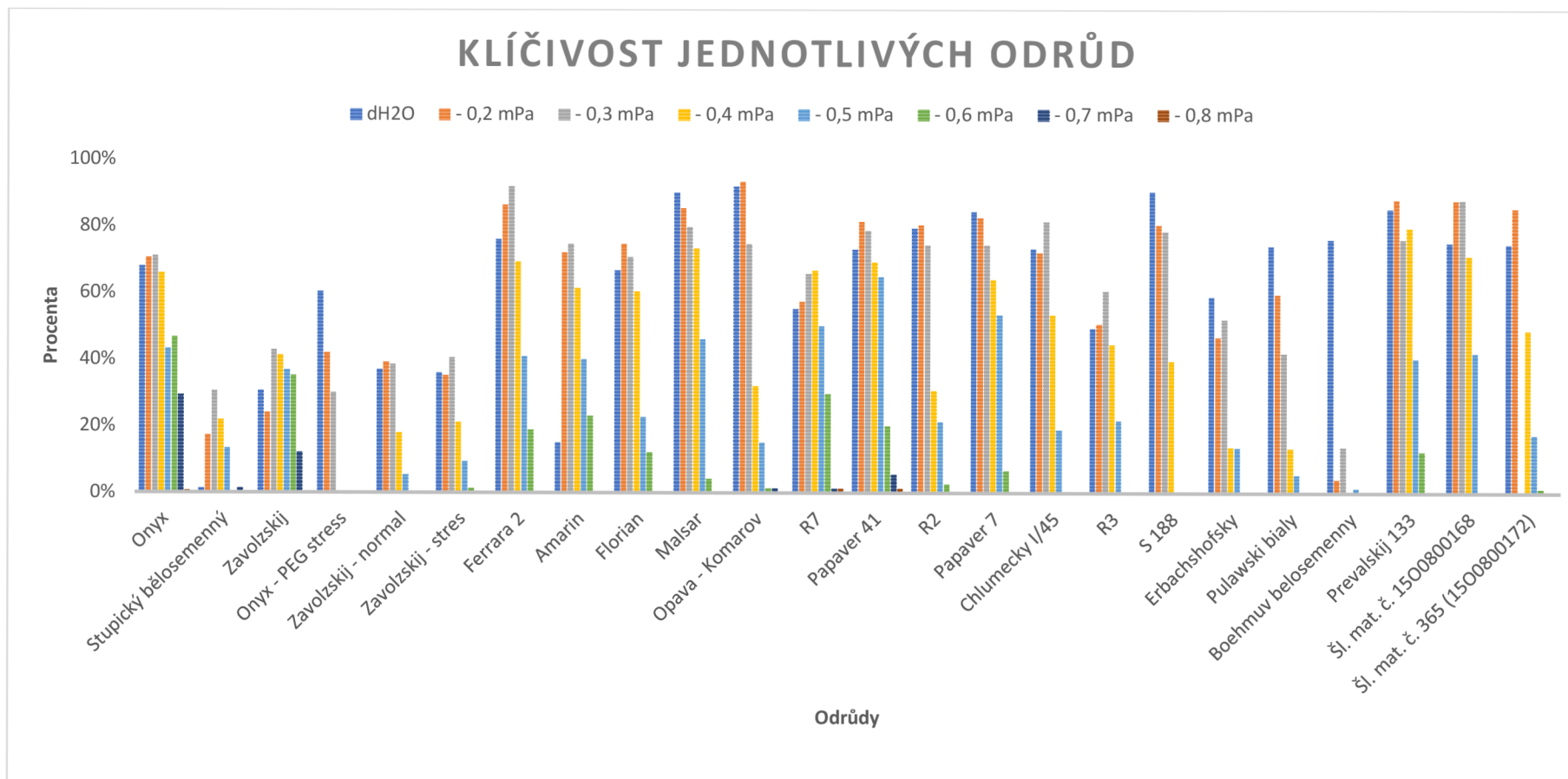
V následující tabulce 4.2 jsem shrnula klíčivost všech odrůd ve všech koncentracích. U všech odrůd vidíme víceméně podobné výsledky. Při nižších koncentracích PEGu, tzn. při menší zátěži suchem, vykazují odrůdy lepší klíčivost oproti vyšším koncentracím. U většiny odrůd se ukázala jako hraniční změna osmotického potenciálu s hodnotou $-0,6$ mPa, kde už většinou semena nevyklíčila. Některé odrůdy se ovšem ukázaly jako odolnější a vyklíčily i ve stresu vyšším než tato hodnota. Jednalo se o odrůdy Onyx, Stupický bělosemenný, Zavolzskij, Opava - Komarov, R7 a Papaver 41.

Pro lepší přehlednost jsem vytvořila graf 4.1, který ukazuje v procentech klíčivost jednotlivých odrůd v jednotlivých koncentracích.

Tabulka 4.2: Klíčivost jednotlivých odrůd

Odrůda	Změna osmotického potenciálu ψ_s [mPa]							
	dH ₂ O	-0,2	-0,3	-0,4	-0,5	-0,6	-0,7	-0,8
Onyx	83/122	103/146	88/124	83/126	65/150	69/148	44/150	1/139
Stupický bělosemenný	1/75	13/75	22/72	16/73	10/75	0/75	1/72	0/74
Zavolzskij	23/75	18/75	21/49	31/75	28/76	26/74	9/74	0/74
Onyx - PEG stress	29/48	21/50	15/50	0/50	0/49	0/46	0/49	0/49
Zavolzskij - normal	27/73	29/74	27/70	9/50	4/75	0/75	0/74	0/75
Zavolzskij - stres	18/50	25/71	30/74	15/71	7/75	1/76	0/72	0/74
Ferrara 2	54/71	63/73	67/73	52/75	29/71	14/74	0/74	0/73
Amarin	11/73	54/75	56/75	46/75	30/75	20/87	0/77	0/87
Florian	48/72	56/75	53/75	44/73	17/75	9/74	0/75	0/75
Malsar	64/71	64/75	59/74	55/75	34/74	3/72	0/75	0/75
Opava - Komarov	68/74	70/75	56/75	24/75	11/73	1/73	1/72	0/75
R7	37/67	39/68	48/73	50/75	37/74	22/74	1/75	1/74
Papaver 41	54/74	61/75	59/75	54/78	48/74	15/75	4/72	1/75
R2	54/68	61/76	55/74	23/75	16/75	2/75	0/75	0/75
Papaver 7	54/64	61/74	55/74	48/75	40/75	5/75	0/75	0/75
Chlumecký I/45	55/75	54/75	61/75	40/75	14/74	0/75	0/74	0/75
R3	36/73	38/75	46/76	33/74	16/74	0/75	0/74	0/75
S 188	65/72	57/71	54/69	28/71	0/74	0/73	0/84	0/85
Erbachshofsky	43/73	35/75	39/75	10/73	10/74	0/74	0/74	0/83
Pulawski bialy	37/50	44/74	31/74	10/75	4/74	0/75	0/74	0/74
Boehmuv belosemenny	57/75	3/75	10/73	0/75	1/73	0/74	0/74	0/73
Prevalskij 133	63/74	66/75	57/75	58/73	35/87	11/89	-	-
Šlechtitelský materiál č. 15O0800168	54/72	64/73	65/74	54/76	42/100	0/87	-	-
Šlechtitelský materiál č. 365 (15O0800172)	56/75	64/75	56/74	36/74	16/92	1/89	-	-

Graf 4.1: Klíčivost jednotlivých odrůd

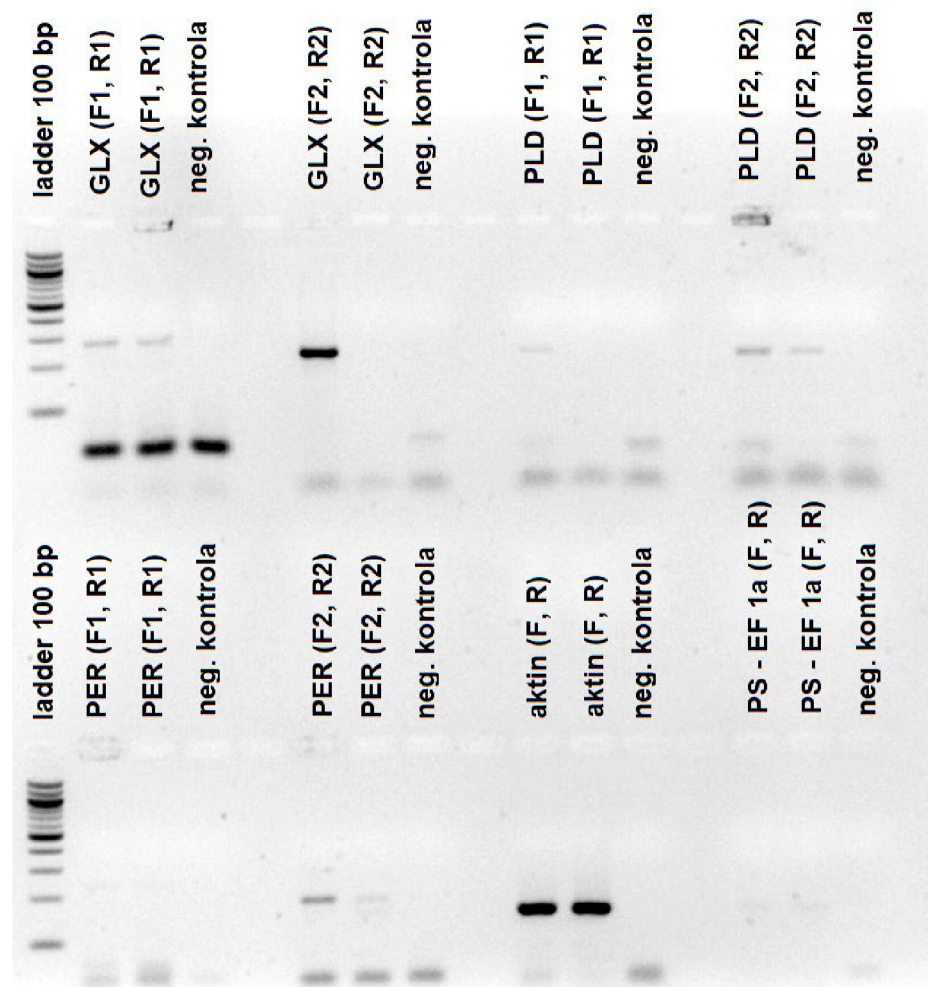


Na tři vytipované geny jsem pomocí programu Primer 3 (Primer3web, online) navrhla primery. Jejich požadované vlastnosti byly: délka 18 – 24 nukleotidů, teplota tání 55 - 75 °C a obsah G a C v primerech 45 – 75 %. Specifita navržených primerových párů byla ověřena pomocí nástroje BLAST a genomové sekvence máku (NCBI, online). Dále jsem prostřednictvím nástroje OligoAnalyzer™ Tool (Integrated DNA technologies, online) ověřila, zda primery netvoří sekundární struktury a zda u primerového páru nedochází k vzájemné interakci. Od každého genu jsem navrhla dva forward (F) a dva reverse (R) primery. Navržené primery shrnuje tabulka 4.3.

Tabulka 4.3: Navržené primery

Název	Sekvence primerů (5' -> 3')
GLX_F1	GTGTGGGTGATGTTGAACGT
GLX_R1	GCGAGTGATCTTTCCTCCCA
GLX_F2	AGCCTGGTCCAGTTAAAGGT
GLX_R2	TCTGCATAGCCCATCATTGC
PLD_F1	TGGACACTGCTCACCATGAT
PLD_R1	CCTGTTTCCTCCACCTCTGT
PLD_F2	TGTGTCTTGTGTCCCCGTAA
PLD_R2	ATCATGGTGAGCAGTGTCCA
PER_F1	TGGCTGCATACTCTGGTGAA
PER_R1	AATGTGCAGTGCCCTTGATG
PER_F2	GACTTCACACCTGTCTGCAC
PER_R2	GGGTCGGCTATGATTGGGTA

Všechny primery jsem vyzkoušela na směsném vzorku nasyntetizované cDNA. Provedla jsem PCR reakci a následně elektroforézu pro ověření správného nasedání primerů. Výsledek elektroforézy je znázorněn na obrázku 4.1. Pro každý gen byl poté vybrán nejvhodnější pár primerů, který byl následně použit na vlastní real-time PCR detekci.

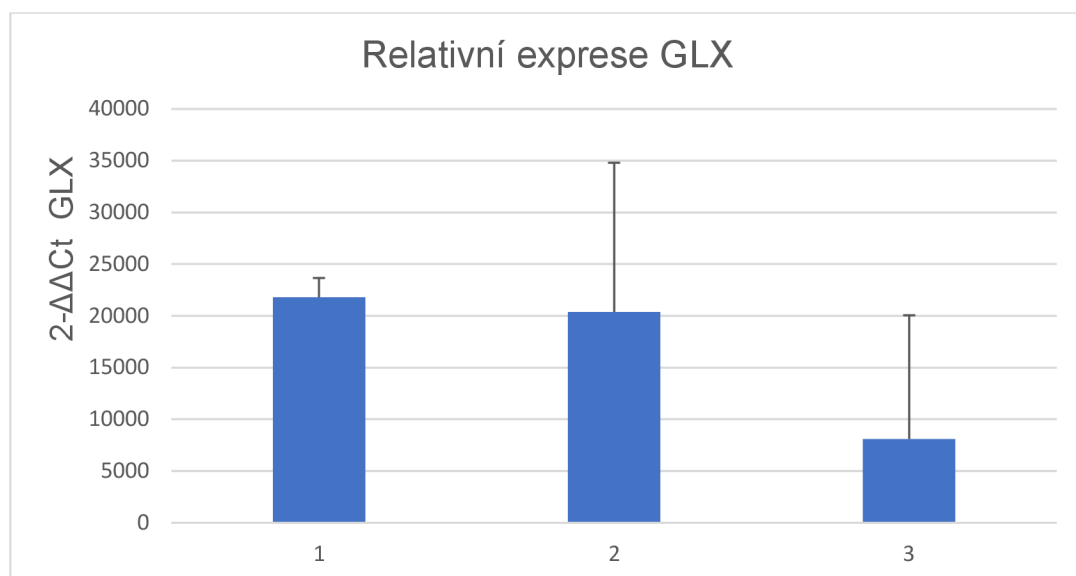


Obrázek 4.1: Výsledek elektroforézy s navrženými primery. Neg. kontrola = negativní kontrola.

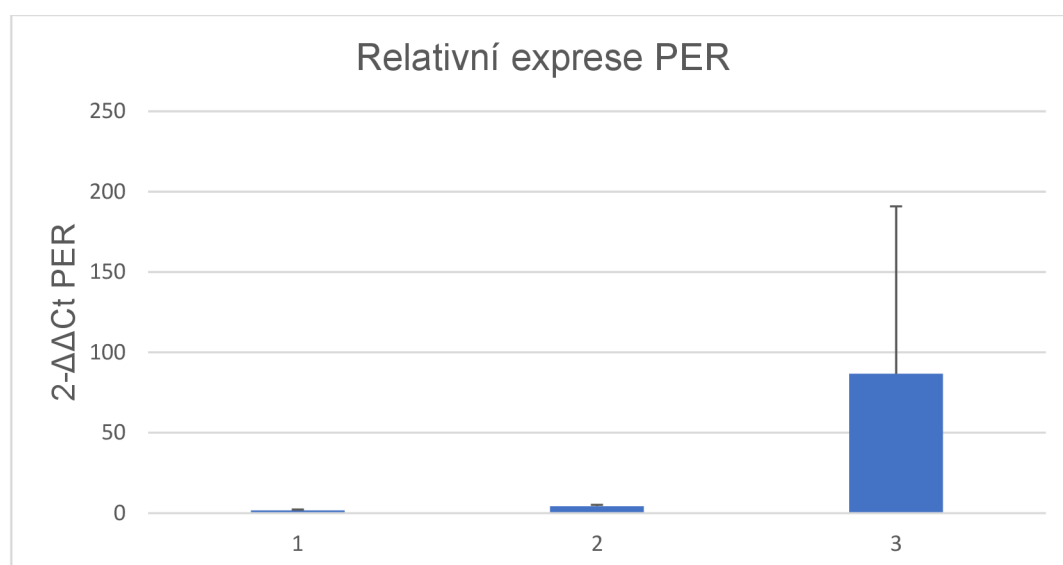
Výsledky reakce real-time PCR pro tři vytipované geny shrnují následující grafy. Graf 4.2 zobrazuje relativní expresi genu GLX, graf 4.3 relativní expresi genu PER a graf 4.4 relativní expresi genu PLD. Jednotlivé sloupce vždy představují průměrné hodnoty z rostlin pěstovaných ve stejných podmínkách. To znamená, že první sloupce v grafech představují průměry z rostlin rostoucích jen ve vodě a sloužících jako kontrola, druhé sloupce představují rostliny rostoucí při působení PEGu o změně osmotického potenciálu -0,2 mPa a třetí sloupce představují rostliny rostoucí při změně osmotického potenciálu -0,4 mPa. U všech rostlin byl také detekován gen pro aktin jako referenční gen a jelikož se jedná o zobrazení relativní exprese, jako referenční rostlina s hodnotou 1 byla vybrána rostlina rostoucí ve vodě a se sledovaným genem PER. Je vidět, že

exprese genů GLX a PLD se zvyšujícím se stresem klesala, naopak exprese genu PER stoupala při zvyšujícím se stresu.

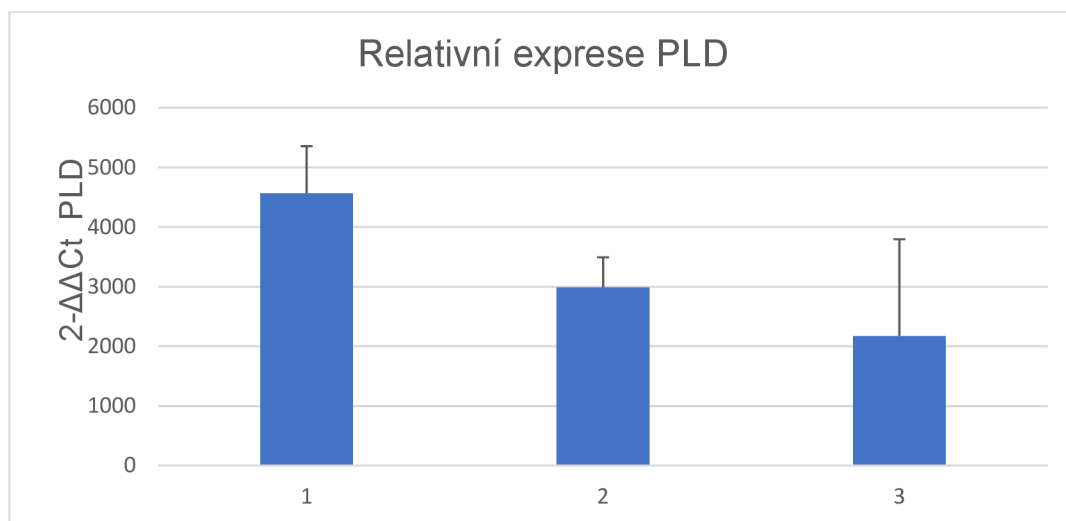
Graf 4.2: Relativní exprese genu GLX. Jednotlivé sloupce vyjadřují průměrné hodnoty z rostlin pěstovaných ve stejných podmínkách, úsečky představují směrodatné odchylky výběrového souboru.



Graf 4.3: Relativní exprese genu PER. Jednotlivé sloupce vyjadřují průměrné hodnoty z rostlin pěstovaných ve stejných podmínkách, úsečky představují směrodatné odchylky výběrového souboru.



Graf 4.4: Relativní exprese genu PLD. Jednotlivé sloupce vyjadřují průměrné hodnoty z rostlin pěstovaných ve stejných podmínkách, úsečky představují směrodatné odchylky výběrového souboru.



5 Diskuse

Výsledkem mé práce bylo potvrzení, že jednotlivé odrůdy se chovají odlišně v reakci na sucho. Byl pozorován rozdíl jak mezi jednotlivými odrůdami, tak také mezi jednotlivými úrovněmi sucha. Podle mého pozorování se k tolerantnějším odrůdám zařadila například odrůda Onyx. Tento výsledek jsem očekávala, protože Onyx patří mezi kvalitní české odrůdy. Také jsem očekávala špatný výsledek u klíčení semen z rostlin stresovaných suchem už při růstu. Tato semena neměla téměř žádnou klíčivost. Podle mě se v tomto případě jedná o moc vysoký stres, který semena nejsou schopna překonat, aby se mohla správně vyvíjet ve zdravé rostliny. Při sledování relativní exprese vytipovaných genů jsem čekala rozdílné výsledky, jelikož u některých genů může vlivem sucha docházet ke zvýšení exprese a u některých ke snížení exprese v závislosti na jejich funkci. Podle očekávání došlo při zvyšujícím se suchu ke zvýšení relativní exprese genu 1-Cys peroxiredoxin-like. Výsledek tedy podpořil myšlenku, že se jedná o gen, který má ochrannou funkci za stresových podmínek. Naopak opačného výsledku jsem dosáhla u genu lactoylglutathione lyase GLX1-like, kde jsem také očekávala zvýšení, protože by měl opět spadat do kategorie genů zodpovědných za obranné reakce. Předpokládám proto, že se může jednat o gen, který je odlišně exprimován u různých plodin.

Sucho je v současné době významným faktorem, který je zodpovědný za snížený výnos plodin. Nejrůznější studie se proto snaží porozumět mechanismům odolnosti rostlin vůči suchu, aby se mohla zlepšovat produktivita plodin i ve stresových podmínkách (Singh a Laxmi, 2015). Ve studii Kundrátové et al. (2021) byly rostliny máku pro zjištění vlivu sucha vystaveny v prvních fázích klíčení také sedmidennímu stresu pro provedení následné transkriptomické a proteomické analýzy. V této studii byly sledovány dvě odlišné odrůdy, které měly různou klíčivost při působení sucha. U odrůdy Extaz, která byla určena jako odolná odrůda, byla průměrná klíčivost 88 %. Naopak odrůda Prevalskij 133 definovaná jako citlivá na sucho měla průměrnou klíčivost 12 % (Kundrátová et al., 2021). V mém případě jsem při pozorování rozdílné klíčivosti vlivem sucha nechala rostliny klíčit také sedm dní. Rozdíl byl ovšem v navození stresu suchem, kdy jsem nepoužívala sníženou závlaku, ale měnila jsem osmotický potenciál ošetřením semen PEGem. Nemůžeme tedy přesně porovnat úroveň stresu. Pracovala jsem také s odrůdou Prevalskij 133, která se ovšem v mém případě v porovnání s ostatními odrůdami řadila k těm odolnějším. Odrůda měla oproti ostatním vyšší klíčivost

při změně osmotického potenciálu -0,6 mPa a její průměrná klíčivost při působení pěti úrovní stresu byla 59 %. Výsledky bohužel nemůžu porovnat s odrůdou Extaz, kterou jsem neměla k dispozici.

Ve studii (Vallejo et al., 2010) prováděné na *Arabidopsis thaliana* byl k navození podmínek sucha použit také PEG. Výsledky klíčení byly podobné jako v mém pokusu s mákem. Při ošetření vodou dosahovala klíčivost téměř 100 % a při vyšších úrovních stresu méně než 25 %. K největší variabilitě v klíčení mezi genotypy docházelo při změně osmotického na -0,6 mPa (Vallejo et al., 2010). S tímto závěrem se shodují i výsledky mých pozorování. Mák dosahoval největší klíčivosti při ošetření vodou, se zvyšující se úrovní stresu suchem se klíčivost snižovala. Největší variace v klíčení byla pozorována za podmínek změn osmotických potenciálů -0,5 mPa a -0,6 mPa. Podobné výsledky vykazoval i experiment provedený na rostlinách kukuřice (Khodarahmpour, 2011). PEGem navozený stres suchem měl negativní vliv na klíčivost u všech pozorovaných hybridů ve všech úrovních sucha. Jednotlivé hybridy však i přes to mezi sebou vykazovaly významné rozdíly v klíčivosti při vysokých úrovních sucha (Khodarahmpour, 2011), což opět koresponduje s výsledky mého pokusu provedeném na máku. Při závažnějším suchu se objevovala větší variabilita mezi odrůdami.

Rychlost vzcházení je důležitým faktorem pro výběr vhodných rostlin pro další šlechtění na rezistenci vůči suchu. Rostliny schopné vzcházet rychleji mají větší šanci na přežití, protože si mohou zabrat více místa, tím pádem mají větší možnost přísunu živin a dostatek světla. Lépe a rychleji tedy prospívají a díky tomu mají i větší výnosy. Tyto rychle vzcházející genotypy je tedy žádoucí vybírat pro další šlechtění rostlin vůči rezistenci (Khodarahmpour, 2011).

V druhé části mého experimentu jsem sledovala expresi tří vybraných genů v reakci na stres suchem. Prvním genem byl gen lactoylglutathione lyase GLX1-like (GLX). Tento gen byl sledován v rámci proteomické analýzy klíčících semen u rýže. Zde docházelo k jeho nahromadění a byl zařazen do kategorie genů, které jsou zodpovědné za obranné reakce rostlin (Xu et al., 2008). Při vystavení rostlin máku suchu se také ukázaly diferencially exprimované proteiny spadající do kategorie obranných reakcí, konkrétně odstraňování superoxidových radikálů (Kundrátová et al., 2021). Podobných výsledků bylo dosaženo i u semen *Arabidopsis*. Ta při ošetření PEGem také vykazovala zvýšené transkripty genů souvisejících s antioxidační aktivitou (Maia et al., 2011). Vzhledem k těmto předchozím analýzám a znalostem jsem ve svém experimentu očekávala podobné výsledky, tedy zvýšenou expresi při zvyšujícím se stresu

suchem. Výsledek byl ovšem v mém případě opačný. Expresce genu GLX s vyšší úrovní stresu klesala. Při slabém stresu suchem byla jeho relativní exprese jen o trochu menší oproti kontrolním rostlinám, naopak při závažnější úrovni stresu klesla relativní exprese téměř 2,7násobně.

Dalším sledovaným genem byl v mém případě gen phospholipase D alpha1-like (PLD). Jeho exprese je aktivována působením ABA. Fan et al. (1997) ve své studii sledovali funkci tohoto genu na listech *Arabidopsis*. Byla zkoumána reakce na potlačení exprese PLD α u listů oddělených od rostlin. Listy oddělené od kontrolních rostlin začaly žloutnout už za jeden den po ošetření ABA a po třech dnech byly žluté téměř úplně. Naopak většina částí listů s potlačenou PLD α byla po třech dnech od ošetření ABA stále zelená. Než listy dosáhly do stejného stavu jako kontrolní rostliny, uběhlo téměř deset dní. Ukázalo se, že u těchto genotypů dochází k pomalejší degradaci fosfolipidů a tím pomalejšímu poškozování membrány. Gen pro PLD α tedy přímo nepodporuje senescenci, ale je důležitým hráčem v dráze podporující senescenci prostřednictvím fytohormonů (Fan et al., 1997). Jelikož při podmínkách sucha dochází v rostlinách k akumulaci ABA, může tedy docházet k expresi PLD. V případě mého pokusu na máku ovšem exprese tohoto genu se zvyšující se mírou sucha výrazně klesala. Oproti kontrolní rostlině při nejvyšší zátěži suchem klesla relativní exprese genu PLD o více než polovinu. Ve studii Distéfano et al. (2015) provedené s PLD δ na *Arabidopsis* bylo zjištěno, že mutantní rostliny v tomto genu jsou oproti rostlinám divokého typu tolerantnější k silné úrovni sucha. Po vystavení silnému suchu byly kontrolní rostliny zcela zvadlé, zatímco mutantní rostliny pld δ byly zelené (Distéfano et al., 2015). Výsledky této studie můžeme dát do souvislosti se závěry z mých pozorování. V mém experimentu byla použita odrůda Onyx, která se řadí mezi odolnější odrůdy máku. Aby mohla přežít i vysoké úrovně sucha, musí být schopna se nějak adaptovat. Jedním z mechanismů by mohla být právě snížená exprese genu PLD, díky čemuž dochází k pomalejší degradaci fosfolipidů a tím pádem k pomalejšímu poškození membrán. Rostliny díky tomu tedy mohou tolerovat vyšší úrovně sucha. Tento fakt podporuje také pokus, který provedli Distéfano et al. (2015). V rámci tohoto pokusu nechali v rostlinách *Nicotiana benthamiana* přechodně exprimovat gen z *Arabidopsis* AtPLD δ . Tyto transgenní rostliny exprimující gen AtPLD δ byly vystaveny suchu a už po čtyřech dnech vykazovaly výrazné známky vadnutí. Autoři se také domnívají, že zvýšená odolnost mutantních fenotypů by mohla být způsobena zvýšenou stabilitou membrány a předpokládají také další PLD gen PLD α 1 jako další mající vliv na tvarování

membrán a metabolismus lipidů (Distéfano et al., 2015). U kukuřice navodilo ošetření PEGem zvýšení PLD a výsledky naznačují, že PLD zde hraje důležitou roli při zavírání průduchů, což je jedna z adaptivních reakcí na sucho (An et al., 2012).

Poslední mnou sledovaný gen byl 1-Cys peroxiredoxin-like (PER). V rámci mého pokusu se jedná o jediný gen, jehož relativní exprese se zvyšující se úrovní stresu stoupala. Při nejzávažnější úrovni sucha se relativní exprese zvýšila 86krát oproti kontrolním rostlinám. Pro zjištění biologických funkcí tohoto genu byl ve studii provedené Kim et al. (2011) klonován v rostlinách čínské zelí a označen jako C1C-Prx. Ukázalo se, že má nízkou peroxidázovou aktivitu, která je ovšem důležitá za normálních podmínek pro regulaci genové exprese správného vývoje a klíčení semen. Může ale také mít chaperonovou aktivitu, která je důležitá za stresových podmínek, kdy má ochrannou funkci, jelikož je schopna ochránit velké spektrum proteinů před denaturací (Kim et al., 2011). Funkce genu byla zkoumána také na rostlinách *Arabidopsis*, kdy byly vytvořeny rostliny, které nadměrně exprimovaly gen 1-Cys Prx PER1 z ječmene, a zároveň také rostliny se sníženou expresí tohoto genu. Ukázalo se, že za nepříznivých podmínek gen přispívá k inhibici klíčení. Z výzkumu také vyplynulo, že není pravděpodobné, že by gen přispíval k udržení dormance (Haslekås et al., 2003). Gen byl také identifikován u rostliny *Xerophyta viscosa*, kde byl označen jako XvPer1. Ukázalo se, že se jedná o stresem indukovaný gen, jelikož při působení abiotických stresů včetně sucha docházelo k výraznému zvýšení hladiny transkriptu tohoto genu. Jeho lokalizace byla detekována zejména v jádře buněk dehydratovaných listů, kde může fungovat jako ochrana nukleových kyselin před působením stresů (Mowla et al., 2002). Tyto výsledky odpovídají mým pozorováním, kdy se zvýšenou úrovní sucha také docházelo ke zvýšení relativní exprese genu PER. Díky studii Lee et al. (2000) se také ukázalo, že gen 1 Cys-peroxiredoxin může mít také antioxidační aktivitu. Lee et al. (2000) vytvořili transgenní rostliny tabáku, které nadměrně exprimovaly gen R1C-Prx z rýže. Jasně se potvrdilo, že transgenní rostliny měly zvýšenou odolnost vůči oxidativnímu stresu oproti divokým rostlinám. Divoké rostliny totiž vykazovaly vážné léze na listech, zatímco transgenní rostliny měly poškozeny výrazně menší počet listů. Také se ukázalo, že gen R1C-Prx nejspíše nemá vliv na dormanci (Lee et al., 2000).

Tyto víceméně jednoznačné výsledky, viditelné rozdíly a změny v relativních expresích genů mohou být dány také tím, že jsem pracovala na odrůdě máku Onyx. Jedná se totiž o kvalitní odrůdu máku (*Papaver somniferum L.*), která byla oceněna Zlatým

klasem. Ačkoli se jedná o poměrně novou odrůdu, která byla v České republice registrována v roce 2016, dosahuje skvělých výsledků. Má výbornou odolnost vůči poléhání, vysoký výnos a malý sklon k tvorbě otevřených tobolek, což není žádoucí vlastnost (Proseeds, online). Navíc z pozorování v rámci mého experimentu vyplývá, že tato odrůda má významný potenciál i v odolnosti na sucho.

Závěr

V rámci této diplomové práce byla optimalizována metoda pro laboratorní testování stresu sucha u máku. Pomocí ní poté byla testována odrůdová odlišnost v reakci na stres suchem. Vytipování vhodných genotypů s větší odolností vůči suchu má význam pro další výzkum. Šlechtění odolných plodin bude přínosné zejména pro oblasti, ve kterých jsou častá období sucha. Stres suchem se může objevit v jakékoli fázi vývoje rostliny a podle různé doby trvání a intenzity může ovlivňovat produktivitu rostlin. Jelikož se jedná o aktuální téma, byl v poslední době učiněn velký pokrok v objevování nových genů souvisejících se stresem ze sucha. V souladu s předchozími studii (Vallejo et al., 2010) i můj experiment potvrzuje, že se zvyšující se úrovní sucha, klesá schopnost rostlin vyklíčit.

Pokud je rostlina ovlivněna působením sucha a chce přežít, snaží se proti němu nějak bránit. U většiny rostlin dochází při působení sucha k výrazným fenotypovým změnám. Dochází však také ke změnám ve fyziologii a metabolismu. Na molekulární úrovni se jedná o poměrně složité reakce. Proto se v současné době čím dál častěji objevují nejrůznější studie (Kundrátová et al., 2021) analyzující proteomy a transkriptomu při působení sucha. Dochází k odhalování nejrůznějších genů a proteinů, u kterých dochází k odlišné expresi za stresových podmínek. Ve své práci jsem se také zaměřila na změny některých genů v reakci na sucho. Ukázalo se, že při působení zvyšující se úrovně sucha může docházet buď ke zvýšení, nebo snížení jejich relativní exprese v závislosti na jejich funkci.

Seznam použité literatury

Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., Shinozaki, K. (1997). Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell*, 9(10):1859-1868.

Afzal, Z., Howton, T. C., Sun, Y., Mukhtar, M. S. (2016). The roles of aquaporins in plant stress responses. *Journal of developmental biology*, 4(1):9.

Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M. K., Sopory, S. K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant cell reports*, 25:1263-1274.

Aharoni, A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., Van Arkel, G., Pereira, A. (2004). The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(9):2463-2480.

Al-Kaisi, M. M., Elmore, R. W., Guzman, J. G., Hanna, H. M., Hart, C. E., Helmers, M. J., Hodgson, E. W., Lenssen, A. W., Mallarino, A. P., Robertson, A. E., Sawyer, J. E. (2013). Drought impact on crop production and the soil environment: 2012 experiences from Iowa. *Journal of Soil and Water Conservation*, 68(1):19A-24A.

An, Z. F., Li, C. Y., Zhang, L. X., Alva, A. K. (2012). Role of polyamines and phospholipase D in maize (*Zea mays L.*) response to drought stress. *South African Journal of Botany*, 83:145-150.

Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African journal of agricultural research*, 6(9):2026-2032.

Armstrong, F., Leung, J., Grabov, A., Brearley, J., Giraudat, J., Blatt, M. R. (1995). Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K⁺ channels is suppressed by *abi 1-1*, a mutant

Arabidopsis gene encoding a putative protein phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(21):9520-9524.

Aydinalp, C. a Cresser, M. S. (2008). The effects of global climate change on agriculture. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 3(5):672-676.

Basal, O., Szabó, A., Veres, S. (2020). Physiology of soybean as affected by PEG-induced drought stress. *Current Plant Biology*, 22:100135.

Bláha, L., Bocková, R., Hnilička, F. (2003). *Rostlina a stres*. 1. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha. ISBN 80-86555-32-1

Boyer, J. S., James, R. A., Munns, R., Condon, T. A., Passioura, J. B. (2008). Osmotic adjustment leads to anomalously low estimates of relative water content in wheat and barley. *Functional Plant Biology*, 35(11):1172-1182.

Broin, M., Cuiiné, S., Peltier, G., Rey, P. (2000). Involvement of CDSP 32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. *FEBS letters*, 467(2-3):245-248.

Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, S. L., Tonelli, C. (2005). A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Current biology*, 15(13):1196-1200.

Corpas, F. J., Barroso, J. B., Del Río, L. A. (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in plant science*, 6(4):145-150.

Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, 3(3):156-165.

Czso.cz, (2023). *Vývoj ploch, hektarových výnosů a sklizní zemědělských plodin*. [online] [cit. 31. 3. 2023]. Dostupné z: https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt&pvo=ZEM02G&z=T&f=TABULKA&skupId=386&katalog=30840&pvo=ZEM02G&evo=v1442_!_ZEM02G-celek_1

Demirevska, K., Z Asheva, D., Dimitrov, R., Simova-Stoilova, L., Stamenova, M., Feller, U. (2009). Drought stress effects on Rubisco in wheat: changes in the Rubisco large subunit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31:1129-1138.

Distéfano, A. M., Valiñas, M. A., Scuffi, D., Lamattina, L., Ten Have, A., García-Mata, C., Laxalt, A. M. (2015). Phospholipase D δ knock-out mutants are tolerant to severe drought stress. *Plant Signaling & Behavior*, 10(11):e1089371.

Ergen, N. Z., Thimmapuram, J., Bohnert, H. J., Budak, H. (2009). Transcriptome pathways unique to dehydration tolerant relatives of modern wheat. *Functional & integrative genomics*, 9:377-396.

Estrada-Melo, A. C., Chao, C., Reid, M. S., Jiang, C. Z. (2015). Overexpression of an ABA biosynthesis gene using a stress-inducible promoter enhances drought resistance in petunia. *Horticulture Research*, 2.

Eu.idtdna.com, (2022). *OligoAnalyzer™ Tool*. [online] [cit. 23. 11. 2022]. Dostupné z: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?returnurl=%2Fcalc%2Falyzer>

Fan, L., Zheng, S., Wang, X. (1997). Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid-and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *The Plant Cell*, 9(12):2183-2196.

Fang, Y., a Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and molecular life sciences*, 72:673-689.

Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., Siddique, K. H. M. (2012). Drought Stress in Plants: An Overview. *Plant Responses to Drought Stress*, 1.

Fathi, A., a Tari, D. B. (2016). Effect of drought stress and its mechanism in plants. *International Journal of Life Sciences*, 10(1): 1-6.

Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(12):3470-3488.

Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of plant research*, 124:509-525.

Ghotbi-Ravandi, A. A., Shahbazi, M., Shariati, M., Mulo, P. (2014). Effects of mild and severe drought stress on photosynthetic efficiency in tolerant and susceptible barley (*Hordeum vulgare L.*) genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(6):403-415.

Gong, D. S., Xiong, Y. C., Ma, B. L., Wang, T. M., Ge, J. P., Qin, X. L., Li, P. F., Kong, H. Y., Li, F. M. (2010). Early activation of plasma membrane H⁺-ATPase and its relation to drought adaptation in two contrasting oat (*Avena sativa L.*) genotypes. *Environmental and experimental botany*, 69(1):1-8.

Haslekas, C., Viken, M. K., Grini, P. E., Nygaard, V., Nordgard, S. H., Meza, T. J., Aalen, R. B. (2003). Seed 1-cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress. *Plant physiology*, 133(3):1148-1157.

Hazen, S. P., Pathan, M. S., Sanchez, A., Baxter, I., Dunn, M., Estes, B., Chang, H. S., Zhu, T., Kreps, J. A., Nguyen, H. T. (2005). Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Functional & Integrative Genomics*, 5:104-116.

Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G., Sorger, A., Grill, D. (2002). Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8):691-696.

Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., Munné-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. *Trends in plant science*, 14(3):125-132.

Hernández, I., Cela, J., Alegre, L., Munné-Bosch, S. (2012). Antioxidant defenses against drought stress. *Plant responses to drought stress: from morphological to molecular features*, 231-258.

Hong-Bo, S., Zong-Suo, L., Ming-An, S. (2005). LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 45(3-4):131-135.

Hu, H., a Xiong, L. (2014). Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annual review of plant biology*, 65:715-741.

Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., Xiong, L. (2006). Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35):12987-12992.

Huang, X. Y., Chao, D. Y., Gao, J. P., Zhu, M. Z., Shi, M., Lin, H. X. (2009). A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes & development*, 23(15):1805-1817.

Huerta-Ocampo, J. A., León-Galván, M. F., Ortega-Cruz, L. B., Barrera-Pacheco, A., De León-Rodríguez, A., Mendoza-Hernández, G., Barba de la Rosa, A. P. (2011). Water stress induces up-regulation of DOF1 and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in amaranth roots (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Plant Biology*, 13(3):472-482.

Chen, H., a Xiong, L. (2012). Genome-wide transcriptional reprogramming under drought stress. *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features*, 273-289.

Ishimaru, K., Shirota, K., Higa, M., Kawamitsu, Y. (2001). Identification of quantitative trait loci for adaxial and abaxial stomatal frequencies in *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(2):173-177.

Jeong, J. S., Kim, Y. S., Baek, K. H., Jung, H., Ha, S. H., Do Choi, Y., Kim, M., Reuzeau, Ch., Kim, J. K. (2010). Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant physiology*, 153(1):185-197.

Kang, Y., a Udvardi, M. (2012). Global regulation of reactive oxygen species scavenging genes in alfalfa root and shoot under gradual drought stress and recovery. *Plant signaling & behavior*, 7(5):539-543.

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology*, 17(3):287-291.

Kaur, G., a Asthir, B. (2017). Molecular responses to drought stress in plants. *Biologia Plantarum*, 61:201-209.

Kavar, T., Maras, M., Kidrič, M., Šuštar-Vozlič, J., Meglič, V. (2008). Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding*, 21:159-172.

Khodarahmpour, Z. (2011). Effect of drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) on germination indices in corn (*Zea mays L.*) hybrids. *African Journal of Biotechnology*, 10(79):18222-18227.

Khorobrykh, S., Havurinne, V., Mattila, H., Tyystjärvi, E. (2020). Oxygen and ROS in photosynthesis. *Plants*, 9(1):91.

Kim, S. G., Kim, S. Y., Park, C. M. (2007). A membrane-associated NAC transcription factor regulates salt-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. *Planta*, 226:647-654.

Kim, S. Y., Paeng, S. K., Nawkar, G. M., Maibam, P., Lee, E. S., Kim, K. S., Lee, D. H., Park, D. J., Kang, S. B., Kim, M. R., Lee, J. H., Kim, Y. H., Kim, W. Y., Kang, C. H. (2011). The 1-Cys peroxiredoxin, a regulator of seed dormancy, functions as a molecular chaperone under oxidative stress conditions. *Plant science*, 181(2):119-124.

Kim, T. H. (2014). Mechanism of ABA signal transduction: agricultural highlights for improving drought tolerance. *Journal of Plant Biology*, 57:1-8.

Kim, Y. S., Kim, S. G., Park, J. E., Park, H. Y., Lim, M. H., Chua, N. H., Park, C. M. (2006). A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18(11):3132-3144.

Kishor, P. K., Hong, Z., Miao, G. H., Hu, C. A. A., Verma, D. P. S. (1995). Overexpression of [δ]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant physiology*, 108(4):1387-1394.

Klein, M., Geisler, M., Suh, S. J., Kolukisaoglu, H. Ü., Azevedo, L., Plaza, S., Curtis, M. D., Richter, A., Weder, B., Schulz, B., Martinoia, E. (2004). Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *The Plant Journal*, 39(2):219-236.

Klein, M., Perfus-Barbeoch, L., Frelet, A., Gaedeke, N., Reinhardt, D., Mueller-Roeber, B., Martinoia, E., Forestier, C. (2003). The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use. *The Plant Journal*, 33(1):119-129.

Kozłowski, T. T., Pallardy, S. G. (2002). Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *The botanical review*, 68(2):270-334.

Kundrářová, K., Bartas, M., Peřinka, P., Hejna, O., Rychlá, A., Āurn, V., & Āerveň, J. (2021). Transcriptomic and proteomic analysis of drought stress response in opium poppy plants during the first week of germination. *Plants*, *10*(9):1878.

Lee, K. O., Jang, H. H., Jung, B. G., Chi, Y. H., Lee, J. Y., Choi, Y. O., Lee, J. R., Lim, C. O., Cho, M. J., Lee, S. Y. (2000). Rice 1Cys-peroxiredoxin over-expressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity. *FEBS letters*, *486*(2):103-106.

Lee, S., a Park, C. M. (2012). Regulation of reactive oxygen species generation under drought conditions in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior*, *7*(6):599-601.

Lee, S., Seo, P. J., Lee, H. J., Park, C. M. (2012). A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *70*(5):831-844.

Leyman, B., Geelen, D., Quintero, F. J., Blatt, M. R. (1999). A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels. *Science*, *283*(5401):537-540.

Lian, H. L., Yu, X., Ye, Q., Ding, X. S., Kitagawa, Y., Kwak, S. S., Su, W. A., Tang, Z. C. (2004). The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant and Cell Physiology*, *45*(4):481-489.

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *10*(8):1391-1406.

Liu, S., Lv, Z., Liu, Y., Li, L., Zhang, L. (2018). Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics and molecular biology*, *41*:624-637.

Livak, K. J. a Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4):402-408.

MacRobbie, E. A. C. (1998). Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 353(1374):1475-1488.

Maia, J., Dekkers, B. J., Provart, N. J., Ligterink, W., Hilhorst, H. W. (2011). The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. *PLoS one*, 6(12):e29123.

McNeil, S. D., Nuccio, M. L., Hanson, A. D. (1999). Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant physiology*, 120(4):945-949.

Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., Giraudat, J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *The Plant Journal*, 25(3):295-303.

Meyer, K., Leube, M. P., Grill, E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 264(5164):1452-1455.

Mikšík, V. a Lohr, V. (2020). *THE CZECH REPUBLIC THE LARGEST PRODUCER OF BREADSEED POPPY*. Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Prague. ISBN 978-80-7434-584-5.

Mittler, R., a Blumwald, E. (2015). The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *The Plant Cell*, 27(1):64-70.

Møller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual review of plant biology*, 52(1):561-591.

Møller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58:459-481.

Mowla, S. B., Thomson, J. A., Farrant, J. M., Mundree, S. G. (2002). A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. *Planta*, 215:716-726.

Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2014). The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in plant science*, 5:170.

Narsai, R., Castleden, I., Whelan, J. (2010). Common and distinct organ and stress responsive transcriptomic patterns in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 10(1):1-25.

Ncbi.nlm.nih.gov, (2022). *Standard Nucleotide BLAST*. [online] [cit. 23. 11. 2022]. Dostupné z: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Ng, C. K. Y., Carr, K., McAinsh, M. R., Powell, B., Hetherington, A. M. (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 410(6828):596-599.

Noormohammadi, G., Ghodsi, M., Kafi, M. (2009). Effects of water deficit and spraying of dessicant on yield, yield components and water use efficiency of wheat genotypes. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 12(21):1399-1407.

Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Suzuki, K., Kojima, K., Takahara, Y., Yamamoto, K., Kikuchi, S. (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA research*, 10(6):239-247.

Patel, J. A., a Vora, A. B. (1985). Free proline accumulation in drought-stressed plants. *Plant and soil*, 84:427-429.

Peng, Y., Lin, W., Cai, W., Arora, R. (2007). Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta*, 226:729-740.

Pennisi, E. (2008). The blue revolution, drop by drop, gene by gene. *Science*, 320(5873):171-173.

Phuong, N. D., Tuteja, N., Nghia, P. T., Hoi, P. X. (2015). Identification and characterization of a stress-inducible gene OsNLI-IF enhancing drought tolerance in transgenic tobacco. *Current Science*, 541-551.

Primer3.ut.ee, (2022). *Pick primers from a DNA sequence*. [online] [cit. 23. 11. 2022]. Dostupné z: <https://primer3.ut.ee/>

Proseeds.cz, (2023). *Mák setý – ONYX*. [online] [cit. 6. 4. 2023]. Dostupné z: <https://www.proseeds.cz/onyx/>

Robertson, J. M., Pharis, R. P., Huang, Y. Y., Reid, D. M., Yeung, E. C. (1985). Drought-induced increases in abscisic acid levels in the root apex of sunflower. *Plant Physiology*, 79(4):1086-1089.

Roche, J., Hewezi, T., Bouniols, A., Gentzbittel, L. (2007). Transcriptional profiles of primary metabolism and signal transduction-related genes in response to water stress in field-grown sunflower genotypes using a thematic cDNA microarray. *Planta*, 226(3):601-617.

Rollins, J. A., Habte, E., Templer, S. E., Colby, T., Schmidt, J., Von Korff, M. (2013). Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Journal of experimental botany*, 64(11):3201-3212.

Samarah, N. H. (2005). Effects of drought stress on growth and yield of barley. *Agronomy for sustainable development*, 25(1):145-149.

Sanders, G. J., a Arndt, S. K. (2012). Osmotic adjustment under drought conditions. *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features*, 199-229.

Sgherri, C. L. M., Pinzino, C., Navari-Izzo, F. (1993). Chemical changes and O₂⁻ production in thylakoid membranes under water stress. *Physiologia Plantarum*, 87(2):211-216.

Singh, D., a Laxmi, A. (2015). Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. *Frontiers in plant science*, 6:895.

Slovníky.cz (2022). *Polyethylenglykol (zkr. PEG)*. [online] [cit. 10. 2. 2023]. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/polyethylenglykol-zkr-peg>

Su, L. T., Li, J. W., Liu, D. Q., Zhai, Y., Zhang, H. J., Li, X. W., Zhang, Q. L., Wang, Y., Wang, Q. Y. (2014). A novel MYB transcription factor, GmMYBJ1, from soybean confers drought and cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 538(1):46-55.

Sugano, S., Kaminaka, H., Rybka, Z., Catala, R., Salinas, J., Matsui, K., Ohme-Takagi, M., Takatsuji, H. (2003). Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. *The Plant Journal*, 36(6):830-841.

Takahashi, F., Hanada, K., Kondo, T., Shinozaki, K. (2019). Hormone-like peptides and small coding genes in plant stress signaling and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 51:88-95.

Ueb.cas.cz, (2023). *FYTOHORMONY, JAK S ROSTLINAMI CVIČÍ HORMONY*. [online] [cit. 8. 4. 2023]. Dostupné z: http://www.ueb.cas.cz/cs/system/files/users/public/kolar_27/PDF_soubory/200808_V532-533_Seidlova.pdf

Umezawa, T., Yoshida, R., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2004). SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(49):17306-17311.

Un.org (2022). *World Population Prospects 2022*. [online] [cit. 22. 1. 2023.]. Dostupné z: <https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/POP/TOT/900>

Vallejo, A. J., Yanovsky, M. J., Botto, J. F. (2010). Germination variation in *Arabidopsis thaliana* accessions under moderate osmotic and salt stresses. *Annals of botany*, 106(5):833-842.

Wang, D., Pan, Y., Zhao, X., Zhu, L., Fu, B., Li, Z. (2011a). Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice. *BMC genomics*, 12(1):1-15.

Wang, W. S., Pan, Y. J., Zhao, X. Q., Dwivedi, D., Zhu, L. H., Ali, J., Fu, B. Y., Li, Z. K. (2011b). Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of experimental botany*, 62(6):1951-1960.

Xiang, Y., Tang, N., Du, H., Ye, H., Xiong, L. (2008). Characterization of OsbZIP23 as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant physiology*, 148(4):1938-1952.

Xiao, B., Huang, Y., Tang, N., Xiong, L. (2007). Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 115:35-46.

Xu, S. B., Li, T., Deng, Z. Y., Chong, K., Xue, Y., Wang, T. (2008). Dynamic proteomic analysis reveals a switch between central carbon metabolism and alcoholic fermentation in rice filling grains. *Plant physiology*, 148(2):908-925.

Yamaguchi-Shinozaki, K., a Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 6(2):251-264.

Yasar, F., Uzal, O., Ozpay, T. (2010). Changes of the lipid peroxidation and chlorophyll amount of green bean genotypes under drought stress. *Afr. J. Agric. Res*, 5(19):2705-2709.

Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J. R., Shinozaki, K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 43(12):1473-1483.

Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal*, 61(4):672-685.

You, J., Hu, H., Xiong, L. (2012). An ornithine δ -aminotransferase gene OsOAT confers drought and oxidative stress tolerance in rice. *Plant Science*, 197:59-69.

Zhang, J., a Kirkham, M. B. (1996). Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New phytologist*, 132(3):361-373.

Zhang, N., Si, H. J., Wen, G., Du, H. H., Liu, B. L., Wang, D. (2011). Enhanced drought and salinity tolerance in transgenic potato plants with a BADH gene from spinach. *Plant Biotechnology Reports*, 5:71-77.

Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 6(2):66-71.

Zhu, X., a Xiong, L. (2013). Putative megaenzyme DWA1 plays essential roles in drought resistance by regulating stress-induced wax deposition in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(44):17790-17795.

Zou, J. J., Wei, F. J., Wang, C., Wu, J. J., Ratnasekera, D., Liu, W. X., Wu, W. H. (2010). *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid-and Ca²⁺-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant physiology*, 154(3):1232-1243.

Seznam obrázků

Obrázek 4.1: Výsledek elektroforézy s navrženými primery..... 42

Seznam tabulek

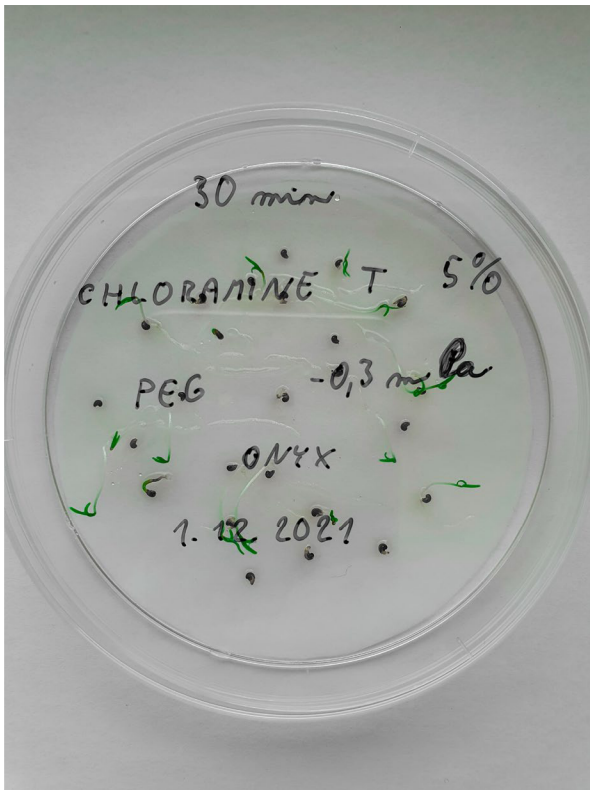
Tabulka 3.1: PEG koncentrace.....	34
Tabulka 4.1: Odrůda Onyx.....	38
Tabulka 4.2: Klíčivost jednotlivých odrůd.....	39
Tabulka 4.3: Navržené primery.....	41

Seznam použitých zkratk

- ABA - kyselina abscisová
APX - askorbát peroxidáza
DEG - diferenciálně exprimované geny
DEP - diferenciálně exprimované proteiny
GB - glycin betain
GLO - glykolát oxidáza
IWMI - International Water Management Institute
OA - osmotická úprava (z anglického osmotic adjustment)
OSN - Organizace spojených národů
PEG - polyethylenglykol
PUFA - polynenasycené mastné kyseliny (z anglického polyunsaturated fatty acids)
QTL - lokusy kvantitativních vlastností (z anglického quantitative trait loci)
ROS - reaktivní formy kyslíku (z anglického reactive oxygen species)
RWC - relativní obsah vody (z anglického relative water content)
-

Přílohy

Příloha 1: Semena odrůdy Onyx pěstovaná na Petriho miskách.



Příloha 2: Vykličená semena po sedmi dnech kultivace.

