

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



KAROLINA KETTNEROVÁ

Sucho, stres a odolnost rostlin

Drought, stress and resistance

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: RNDr. Sylva Zelenková, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze 27. 8. 2012

Podpis

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce RNDr. Sylvě Zelenkové, CSc. za cenné rady, nesmírnou trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala při tvorbě této práce. Také bych ráda poděkovala své rodině, která mě podporovala po celou dobu, kdy tato práce vznikala.

OBSAH

ABSTRAKT	5
ABSTRACT	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	6
1. ÚVOD.....	7
2. SUCHO A STRES	8
2.1 Vodní deficit, jeho příčiny a vliv na produktivitu rostlin.....	9
3. VLIV NEDOSTATKU VODY NA VODNÍ POTENCIÁL	10
3.1 Účinky sníženého vodního potenciálu na fyziologické procesy.....	10
3.1.1 Vliv na růst	11
3.1.2 Vliv na buněčnou ultrastrukturu	11
3.1.3 Vliv na fotosyntézu.....	12
3.1.4 Vliv na temnostní část fotosyntézy – dýchání a metabolismus sacharidů.....	12
3.1.5 Vliv na metabolismus dusíku	13
4. ADAPTACE NA VODNÍ STRES	13
4.1 Mechanismy adaptace na vodní stres.....	13
4.2 Avoidance.....	14
4.3 Tolerance sucha s nízkým vodním potenciálem	15
4.3.1 Elasticita buněčné stěny.....	15
4.3.2 Tolerance k vyschnutí	15
4.4 Tolerance sucha s vysokým vodním potenciálem.....	16
4.4.1 Snížení ztrát vody	17
4.4.2 Zvýšení akumulace vody	17
5. KUTIKULA	18
5.1 Složení a struktura kutikuly	18
5.2 Funkce kutikuly jako bariéry proti ztrátám vody.....	19

6. PRŮDUCHY	20
6.1 Regulace iontových kanálů ve svěracích buňkách kyselinou abscisovou	21
7. OSMOTICKÉ PŘIZPŮSOBENÍ.....	22
7.1 Akumulace kompatibilních solutů	23
7.1.1 Akumulace aminokyselin	23
7.1.2 Akumulace aminů.....	24
7.1.3 Akumulace sacharidů	26
8. SIGNÁLNÍ TRANSDUKCE.....	27
8.1 Percepce sucha	27
8.2 Signální dráhy	28
8.2.1 ABA.....	29
8.2.2 Prolin	30
8.2.3 MAPK kaskáda.....	30
8.2.4 Fosfolipidová signalizace	31
8.2.5 Vápníková signalizace	32
8.3 Transkripční regulace genové exprese	32
8.3.1 ABA-dependentní dráha	32
8.3.2 ABA-independentní dráha.....	33
8.4 Ochranné proteiny a další produkty signalizačních drah indukovaných suchem	33
8.4.1 Dehydriny	33
8.4.2 Heat Shock Proteiny (HSPs).....	34
9. SEKUNDÁRNÍ STRES A JEHO DŮSLEDKY	35
9.1 Oxidativní stres a tvorba ROS	35
10. ZÁVĚR	36
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zaměřuje na vliv nedostatku vody na rostliny. V práci jsou popsány příčiny vzniku vodního deficitu a jejich dopad na růst a vývoj rostlin. Pozornost je věnována průběhu stresové reakce a adaptačním mechanismům, jejichž cílem je navození tolerance ke stresu. Samostatné kapitoly jsou věnovány kutikule a průduchům, dvěma významným regulátorům ztrát vody z rostlinného těla. Práce se dále zaměřuje na fenomén osmotického přizpůsobení a s ním spojenou akumulaci kompatibilních solutů. Nejsou opomenuty signální dráhy indukované nedostatkem vody, změna genové exprese, syntéza speciálních proteinů a důsledky působení sekundárního oxidativního stresu.

Klíčová slova: sucho, vodní deficit, stres, tolerance ke stresu, průduchy, kutikula, osmotické přizpůsobení, kompatibilní soluty, signální transdukce

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on the influence of water deficit on plants. The causes of the origins of water deficit and its impact on growth and development of plants are described. Attention is paid to the process of stress response and to the adaptation mechanisms which aimed to induce stress tolerance. Separate chapters are devoted to the cuticle and stomata, two important regulators of plant water loss. The thesis also focuses on the phenomenon of osmotic adjustment which relates to the accumulation of compatible solutes. Signalling pathways induced water shortages, change in gene expression, synthesis of special proteins and consequences of secondary oxidative stress are all covered.

Key words: drought, water deficit, stress, stress tolerance, stomata, cuticle, osmotic adjustment, compatible solutes, signal transduction

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ABREs	ABA-Responsive Elements
APX	askorbát peroxidáza
bZIP	Basic-region Leucine Zipper Protein
CBF/DREB1	C-Repeat Binding Factors/Dehydration Responsive Element Binding Protein
CBLs	Calcineurin B-Like Proteins
CDPKs	Calcium-Dependent Protein Kinases
CIPKs	CBL Interacting Protein Kinases
DAG	diacylglycerol
DREs	Dehydration Responsive Elements
GABA	kyselina γ -aminobutyrová
HSEs	Heat Shock Elements
HSFs	Heat Shock Factors
HSPs	Heat Shock Proteins
IP3	inositol-1,4,5-trifosfát
LEA	Late Embryogenesis-Abundant
LTPs	Lipid Transfer Proteins
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
PA	kyselina fosfatidová
PEP	fosfoenolpyruvát
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bifosfát
PIP5K	fosfatidylinositol kináza
PS I, II	fotosystém I, II
ROS	Reactive Oxygen Species
SnRK	SNF-related protein kinases
SOD	superoxid dismutáza

1. ÚVOD

Stále závažnějším problémem se stává rostoucí nedostatek potravin pro neustále se zvětšující lidskou populaci. Ta se za posledních 200 let zvětšila téměř o 7 násobek. S narůstajícím počtem lidí se pochopitelně zvyšuje i poptávka po potravě. Na špici celosvětové produkce plodin se jednoznačně vyskytuje cukrová třtina, kukuřice, pšenice a rýže. Jejich pěstování je ovlivněno mnoha faktory, od čistě zemědělských po ekonomické a politické. Když odhlédneme od širšího kontextu produkce potravin (a všeho dalšího, co je s tím spojené) a zaměříme se na biologickou část problému, vyvstane v popředí výrazný vliv abiotických a biotických stresů, které působí na rostliny a ovlivňuje tak jejich produkci.

Globální změny klimatu zvyšují výskyt a prodloužení period sucha. Právě sucho je nejvýznamnějším problémem celosvětového zemědělství, proto je zvýšení výnosu v oblastech jím postiženým hlavním cílem zemědělské kultivace plodin. Spolu se stresem nedostatku vody se často vyskytuje i stres zasolením půd. Vliv těchto dvou abiotických stresů výrazně ovlivňuje růst a vývoj rostlin a následně i jejich produktivitu. Desertifikace a zasolení půd rapidně vzrůstá a v celosvětovém měřítku klesá průměrný výnos o více jak 50% (Wood, 2005). Vzrůstající salinita souvisí s umělým zavlažováním. Přibližně 20% zemědělské půdy světa a téměř polovina zavlažovaných oblastí je ovlivněna salinitou (Rhoades a Loveday, 1990). Stabilizace rostlinné produkce může být navozena několika způsoby: snížením rozdílů ve výnosech plodin pěstovaných v normálních a stresových podmínkách, zamezením úbytku zemědělsky využitelných půd, vylepšením zemědělských praktik a zvýšením tolerance rostlin samotných.

V průběhu evoluce rostliny vyvinuly mechanismy, díky kterým jsou schopné se se stresem vyrovnat a adaptovat se na změny prostředí. Reakce rostlin na stres jsou dynamické a zahrnují kompletní propojení mezi různými úrovněmi regulace.

Cílem práce je popsat širokou škálu rostlinných mechanismů využívaných v adaptacích ke stresu z nedostatku vody na úrovni fyziologické, biochemické a molekulární, a shrnout poznatky, které mohou být využity pro navození vyšší tolerance u zemědělsky využívaných rostlin.

2. SUCHO A STRES

Stresem nazýváme stav rostliny, kterým reaguje na působení zátěžových stresových faktorů (stresorů) aktivací obranných mechanismů. Stres nemusí být vždy pouze škodlivý, ačkoliv tomu tak většinou je. Příkladem může být působení nízkých teplot v podzimním období, které stimuluje u některých rostlin tvorbu květů a plodů nebo indukce klíčení semen působením chladu nebo vysokých teplot (Procházka et al., 1998; Pavlová, 2005).

Sucho patří mezi abiotické stresory, kam dále řadíme extrémní teploty (vysoké i nízké), nadměrnou či nedostatečnou ozáření, nedostatek vody i zaplavení vodou, které vede k nedostatku kyslíku. Dále sem patří nedostatek základních minerálních prvků v půdě, nadbytek iontů v půdním roztoku způsobený zasolením, extrémní hodnoty pH půdy, přítomnost toxických látek atp. (Procházka et al., 1998; Pavlová, 2005). Dále je potřeba brát v potaz, že se většinou nevyskytuje pouze jediný stresor působící na rostlinu. Například při působení nadměrné ozáření se ve většině případů bude objevovat i stres způsobený vysokými teplotami a stres z nedostatku vody neboli sucho.

Schopnost přežít nepříznivé podmínky se označuje jako odolnost neboli rezistence. Rezistenci můžeme rozdělit na avoidanci a toleranci, které tvoří komplex obranných reakcí. Avoidance je strategií, při které se rostlina snaží stresu předcházet, vyhnout se mu (např. zkrácením životního cyklu, vývojem vhodného typů kořenů či listů, složením kutikuly). Jde více méně o pasivní typ ochrany spočívající v anatomickém a morfologickém přizpůsobení. Tolerance je strategií aktivního odolávání stresoru se snahou co nejvíce zmírnit jeho působení. Tolerance bývá postupně získávána v procesu zvaném otužování (aklimace), při kterém jde o ustanovení nového rovnovážného stavu odpovídajícímu změněným podmínkám. Aklimace je nedědičné vyrovnání se s novými podmínkami spočívající ve změně metabolismu a vlastnosti nabyté tímto způsobem jsou reverzibilní (Procházka et al., 1998; Pavlová, 2005).

Průběh stresové reakce vedoucí k toleranci má několik fází. První fáze je poplachová, kdy je rozeznáno působení stresoru a informace je signálními drahami předána dalším kompartmentům buňky, kde poté dochází ke změně exprese určitých genů. Stresová informace se šíří po celé rostlině. Další fází je fáze restituční, ve které rostlina aktivuje obranné mechanismy umožňující přežít působení stresoru, otužuje se a získává tak vyšší odolnost. V následné fázi rezistence rostlina toleruje působení stresoru a přežívá. V případě dlouhodobého stresu může dojít k vyčerpání energetických rezerv a k následnému úhynu rostliny. Nejen doba působení stresu ovlivňuje průběh a výsledek stresové reakce. Záleží také na charakteru stresoru, jeho velikosti a rychlosti jeho nástupu. Ze strany rostliny záleží na jejím genotypu, fyziologickém stavu a vývojovém stadiu (Procházka et al. 1998; Pavlová, 2005).

2.1 Vodní deficit, jeho příčiny a vliv na produktivitu rostlin

Za vodní deficit je považován stav, kdy je obsah vody v rostlině nižší než při maximálním nasycení. Vodní deficit vede ke ztrátě turgoru a projevuje se zastavením růstu a vadnutím. Při nedostatku vody jsou rostliny citlivější k působení dalších stresorů, např. ke zvýšené teplotě okolí, neboť se při vodním deficitu snižuje transpirace, která přispívá k ochlazení rostliny (Pavlová, 2005).

Nedostatečné zásobení rostliny vodou je způsobeno jednak její nedostupností, tak i zasolením půd, které snižuje vodní potenciál půdního roztoku pod hodnotu vodního potenciálu buněk kořene, a zabraňuje tak příjmu vody. Vodní deficit může být zapříčiněn vysokou transpirací, která není kompenzována adekvátním příjmem vody kořeny z půdy (např. v poledne horkého letního dne). Dále může být vodní deficit vyvolán teplotami pod bodem mrazu, které vedou k tvorbě ledu v mezibuněčných prostorech nebo vakuolách a k dehydrataci cytosolu (Pavlová, 2005).

Omezená dostupnost vody pro rostliny může být způsobena jak fyzikálními a klimatickými vlastnostmi prostředí. Samozřejmě v první řadě způsobují nedostatek vody nízké srážky. Množství srážek, spadlých na dané místo, závisí na regionální topografii a klimatických podmínkách. Sezónnost srážek je dalším kritickým faktorem ovlivňujícím vodní bilanci. Mnoho světových ekosystémů se vyznačuje výraznými sezónními výkyvy množství srážek, kterým se rostliny v průběhu evoluce musely přizpůsobit. Například klima mediteránu se vyznačuje relativně vlhkou zimou a výrazným suchem v létě. Důsledkem toho je, že voda je dostupná, když je teplota pod růstovým optimem. A naopak při teplotě optimální pro růst je vody nedostatek. Pravidelné periody sucha vyvolává evoluční adaptace k nedostatku vody, které mohou být velmi odlišné od adaptací vyvolaných náhodnými obdobími sucha (Nilsen a Orcutt, 1996).

Dostupnost vody je jedním z hlavních omezení produktivity rostlin a je jedním z hlavních faktorů regulujících distribuci rostlinných druhů. Přes 35% zemského povrchu je považováno za aridní nebo semiaridní území, kde jsou neadekvátní srážky pro zemědělské využití. Podle Meigsova systému z roku 1953 lze klasifikovat prostředí podle množství srážek. Jako extrémně aridní jsou považována území prakticky bez srážek. Aridním územím se rozumí oblast s méně jak 250 mm za rok a semiaridním oblast s 250 – 500 mm srážek za rok (Wood, 2005).

Ale i oblasti s dostatečnými srážkami mohou být stále prostředím s nedostatkem vody. Všechny zemědělské oblasti zakouší sucho, některé oblasti ve formě předvídatelných sezón sucha, jiné prostřednictvím nepředvídatelných period sucha. Zemědělské území postižené suchem může ztratit více jak 50% sklizně. Vývoj rostlin k toleranci nedostatku vody a udržení produktivity bude, jak již bylo řečeno v úvodu, kritickým požadavkem pro zvýšení produktivity

zemědělství v 21. století. Porozumění tomu, jak rostlinné buňky mohou tolerovat ztráty vody, je rozhodující prerekvizitou pro vývoj strategií, které mohou mít dopad na zemědělskou a zahradnickou produktivitu plodin a přežití v těchto podmínkách snižující se dostupnosti vody (Wood, 2005).

3. VLIV NEDOSTATKU VODY NA VODNÍ POTENCIÁL

Vodní potenciál se skládá se složek osmotické (Ψ_s), tlakové (Ψ_p), matriční (Ψ_m) a gravitační (Ψ_g):

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_m + \Psi_g$$

Vodní potenciál dospělých buněk závisí prakticky jen na tlakovém a osmotickém potenciálu. Z toho důvodu lze turgorový potenciál (Ψ_p) stanovit jako rozdíl vodního a osmotického potenciálu.

Turgorový tlak je proměnlivý v rozsahu 1,0 – 0,5 MPa mezi druhy během normálních podmínek s dostatkem vody a jak již bylo poznamenáno výše, během slunečného poledne může klesnout z těchto hodnot až na 0. Některé druhy mají téměř nulový turgorový potenciál během světelné fáze dne po celou dobu růstové sezóny bez náznaku fyziologické dysfunkce. V takových případech probíhá buněčná expanze a růst během noci, kdy je turgorový tlak maximální (Nilsen a Orcutt, 1996).

Nejcitlivější na nedostatek vody je růst buňky, syntéza buněčné stěny a proteosyntéza. Vodní poměry vypovídají o dopadu změn (nikoliv absolutní hodnoty) vodního potenciálu na fyziologické procesy a buněčný růst. Přičemž každý rostlinný druh může být odlišně ovlivněn hodnotou vodního potenciálu. U běžných mezofytních druhů rostlin indukují hodnoty vodního potenciálu do -0,5 MPa působení mírného vodního stresu. Od -0,5 do -1,5 jde o středně silný stres a od -1,5 níže se jedná o velmi silný stres, při kterém klesá turgorový tlak v buňkách listů na nulu a listy začínají vadnout (Procházka et al., 1998). Pokles vodního potenciálu o pouhý 0,1 MPa může způsobit pokles rychlosti buněčné proliferace a vést ke snížení velikosti buněk ve stonku a kořeni.

3.1 Účinky sníženého vodního potenciálu na fyziologické procesy

Pokles vodního potenciálu ovlivňuje fyziologii buňky následujícími způsoby: Nízký vodní potenciál snižuje chemickou aktivitu vody, která může způsobit změnu ve struktuře hydratačního obalu kolem proteinů, a tím snížit jejich účinnost. Ztráta turgoru může způsobit

změnu prostorového umístění transportních kanálů a membránových enzymů, stejně tak sevřít plasmodesmy v důsledku smrštění buněčné stěny (Nilsen a Orcutt, 1996).

3.1.1 Vliv na růst

Při velkém vodním deficitu dochází k snížení turgorového tlaku. Buněčná expanze je závislá na vodním potenciálu buňky, a proto bude ovlivněna a poklesne míra růstu a dělení buněk. Následky snížené velikosti buněk závisejí na vývojové fázi rostliny, ve které postihne nedostatek vody rostlinu. Pokud bude zasažena mladá, vyvíjející se rostlina mající ještě ne plně vyvinutou listovou plochu, nebude rostlina schopna vytvořit dostatek asimilátů právě kvůli malé fotosyntetizující ploše. Pokud je rostlina zasažena nedostatkem vody v období zrání plodu, projeví se to následovně. Vývoj květenství bude v normě a veškerá rostlinná hmota bude nezměněna, ale tvorba semene může být inhibována a může docházet k předčasnému opadu plodů. Důležité je poznamenat, že některé rostliny jsou senzitivní k nedostatku vody pouze ve specifických obdobích, jako jsou periody aktivního růstu, ale ne během celého vývoje (Nilsen a Orcutt, 1996).

Kritický vodní potenciál pro inhibici buněčné expanze je rozdílný mezi druhy i mezi rostlinnými orgány (kořeny x listy). Například změna ve vodním potenciálu od -0,2 do -0,4 MPa (Boyer, 1970) způsobí inhibici listové expanze u slunečnice, zatímco podobný efekt se objeví u kukuřice při -0,7 MPa a u sóji při -1,2 MPa (Acevedo et al., 1979).

3.1.2 Vliv na buněčnou ultrastrukturu

Obecné důsledky nedostatku vody na strukturu a funkci membrán jsou pozorovatelné také v buněčné ultrastruktuře. Nedostatek vody může způsobit uvolnění hydrolyzujících enzymů z vezikulů odvozených z endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu do cytoplasmy. Přítomnost těchto lipáz a proteáz dále narušuje normální strukturu všech cytosolických membrán. Pokud dojde k degradaci tonoplastu, vakuolární tekutina, která může obsahovat relativně hodně koncentrované soluty, se uvolní do cytoplasmy, což může zapříčinit degradaci cytosolických proteinů (Fellows a Boyer, 1978). Vysoké teploty vyskytující se často současně se suchem poškozují membrány. Zvyšuje se jejich fluidita a zároveň i propustnost, což ovlivňuje osmotické, transportní a metabolické poměry v buňkách.

Struktura chloroplastů a mitochondrií může být ovlivněna velkým nedostatkem vody. Nárůst alkalických lipáz v chloroplastech během nedostatku vody koreluje s degradací thylakoidů (Silva et al., 1974). Snížený vodní potenciál souvisí u některých druhů se zvýšenou frekvencí a velikostí plastoglobulí odvozených od thylakoidní membrány, ale také se zvýšením přestavby

chromatinu okolo jáderka (Poljakoff-Mayber, 1981).

3.1.3 Vliv na fotosyntézu

Prvním důsledkem nedostatku vody je uzavření průduchů. Signál k uzavření průduchů přichází z kořenů a je zprostředkován fytohormonem kyselinou abscisovou. Dalším signálem k uzavření průduchů je nízký turgorový tlak ve svěracích buňkách. Průduchy se zavírají i při zvýšeném gradientu tlaku vodní páry mezi listem a vzduchem, který jej obklopuje, ačkoliv tento případ se vyskytuje i mimo změn vodního potenciálu (Nilsen a Orcutt, 1996). Kyselině abscisové a průduchům bude věnována větší pozornost v kapitole č. 6.

Uzavření průduchů způsobené nedostatkem vody vede k vyčerpání CO₂ v intercelulárních prostorech. Tento jev se přímo označuje jako stomatální inhibice fotosyntézy. Jakmile je v intercelulárách méně CO₂ než kyslíku, začne být stimulována fotorespirace. Při příliš vysokém ozáření nevyužívá fotorespirace všechny produkty elektron transportního řetězce, které jsou zdrojem energie. Tato situace může vést k fotoinhibici, jejímž důsledkem je nahromadění volných radikálů v chloroplastu. Tvorba ROS je detailněji popsána v kapitole č. 8. Dopad vodního stresu na světlosběrné systémy a elektron transportní řetězec během fáze, kdy jsou průduchy uzavřené a ozářenost je vysoká, je pro průběh fotosyntézy velmi důležitý (Nilsen a Orcutt, 1996).

Nestomatální inhibice fotosyntézy, objevující se při sníženém vodním potenciálu (Ögren a Öquist, 1985), je způsobená poklesem aktivity enzymu Rubisco a fotoinhibicí způsobenou poškozením PS II. Fotosyntetické systémy a enzymy bývají vážně poškozeny vysokou teplotou, která se často vyskytuje společně se suchem. V počátečních fázích nedostatku vody se objevuje zároveň stomatální a nestomatální inhibice fotosyntézy. Existuje důkaz u několika druhů, že nejprve dochází k nestomatální inhibici, která způsobuje zvýšení vyčerpání CO₂ v intercelulárách, což způsobí uzavření průduchů (Briggs et al., 1986). Pro některé taxony je hlavní nestomatální vliv fotoinhibice (Björkman a Powles, 1984), zatímco u ostatních taxonů dominuje aktivita Rubisca (Ögren a Öquist, 1985).

3.1.4 Vliv na temnostní část fotosyntézy – dýchání a metabolismus sacharidů

Se vzrůstajícím vodním stresem dochází k poklesu poměru mezi fotosyntézou a respirací, protože oba procesy probíhají v menší míře. Koncentrace jednoduchých cukrů se může v některých rostlinných pletivech při vodním stresu zvyšovat, protože dochází k mobilizaci škrobu ze zásob v chloroplastech. Ztráta škrobu běžně souvisí s nedostatkem vody, ale nárůst jednoduchých sacharidů ne vždy souvisí s úbytkem škrobu. Jednoduché cukry pocházející

z mobilizovaného škrobu jsou využity v mnoha fyziologických procesech (Nilsen a Orcutt, 1996).

Také translokace sacharidů se snižuje při nedostatku vody během dne. Pokles translokace sacharózy není způsoben specifickými vlivy na floémový systém, který je relativně rezistentní k nedostatku vody. Nízká asimilace CO₂ listy a zvýšená respirace v buňkách listového mezofylu snižuje gradient sacharózy mezi zdrojem (listy) a sinkem fotosyntátů. Tato změna poměrů mezi zdrojem a sinkem je příčinou snížené translokace asimilátů. Způsoby alokace zdrojů se mění během nedostatku vody. U mnoha druhů dochází k růstu spíše v kořenových pletivech, než v pletivech listů. Proto se snižuje poměr nadzemní a podzemní části. Pokud vodní stres sužuje rostlinu v rané fázi vývoje, způsobí výraznou změnu v poměru nadzemní a podzemní části. Oproti tomu působení vodního stresu během reprodukční fáze má malý až žádný vliv na poměr nadzemní a podzemní části. Zato dochází k redukci květů a semen nebo k ztrátě plodů (Nilsen a Orcutt, 1996).

3.1.5 Vliv na metabolismus dusíku

Během nedostatku vody se snižuje akumulace nitrátu a amoniaku z půdy. Akumulace je inhibována nárůstem koncentrace nitrátů a amoniaku v kořenech rostlin stresovaných suchem, který je způsoben zpomalením toku dusíku od kořenů k listům (Nilsen a Orcutt, 1996).

Jak již bylo uvedeno výše, při vodním deficitu dochází k poklesu proteosyntézy a ke zvýšené hydrolýze proteinů. Důsledkem těchto procesů je nárůst množství volných aminokyselin. Speciálním případem jsou neproteinové aminokyseliny, jejichž biosyntéza je při stresu suchem záměrně stimulována, a kterým je věnována větší pozornost v kapitole č. 7.

4. ADAPTACE NA VODNÍ STRES

V předchozích dvou kapitolách byl definován stres a byl popsán vliv, jakým působí na rostliny. Zmíněny byly také důsledky působení stresu a byly naznačeny systémy hrající roli v odpovědi na stres a navození tolerance. Další kapitola se bude zabírat právě odpověďmi na stres, mechanismy, kterými se rostliny se stresem vyrovnávají a druhy adaptací, které vznikají.

4.1 Mechanismy adaptace na vodní stres

Obecně jsou mechanismy kategorizovány na ty, které vedou k vyhnutí se podmínkám sucha (avoidance) a na ty, které vedou k toleranci snížené dostupnosti vody (tolerance). Mechanismy tolerance mohou být rozděleny na ty, které se snaží udržet vysoký vodní potenciál,

a na ty, které vedou k výraznému poklesu vodního potenciálu v pletivu. Žádné z těchto kategorií se vzájemně nevyklučují, neboť většina individuálních mechanismů závisí na dalších mechanismech řešících nedostatky vody.

Jak již bylo řečeno, obecně se v prostředí nedostatkem vody zároveň vyskytuje i vysoká teplota, vysoká ozáření a zasolení. Ačkoliv se dále bude řešit hlavně problém sucha, tedy nedostatku vody, je důležité uznat, že diskutované mechanismy jsou také zúčastněné v kompenzaci nadbytku tepla, ozáření a zasolení.

Podle druhu strategie, jak se vyrovnat se stresem, rostliny lze rozdělit na 2 skupiny podle hlavní strategie vodního hospodářství. Prvním typem je homoiohydrie, při které se rostlina snaží udržet vysoký vodní potenciál. Obrannými mechanismy homoiohydrie je snaha udržet příznivý obsah vody v protoplasmě nebo zmírnit škodlivé vlivy stresu na části buňky. Mezi homoiohydriky řadíme cévnaté rostliny. Druhým typem je poikilohydrie, která označuje neschopnost kontrolovat ztráty vody do okolí. Mezi poikilohydriky se řadí mechrosty (Wood, 2005).

4.2 Avoidance

Mezi mechanismy úniku z prostředí s nedostatkem vody patří rychlý fenologický vývoj, vývojová plasticita a prodloužená dormance. Je známo mnoho případů rychlého zrání a tvorby semen u pouštních jednoletých rostlin (Mulroy a Rundel, 1977). Některé pouštní jednoleté rostliny produkují jen 1 pár dospělých listů před tvorbou květu a semen. Časový úsek od klíčení semene k vlastní tvorbě semen může být zkrácen na pouhých pár týdnů. Rychlý vývoj jednoletých rostlin je běžný u druhů rostoucích na územích s nízkými srážkami, jakými je třeba oblast mediteránu a další sezónně suchá území světa.

Některé druhy dokážou přečkat nepříznivé období sucha ve formě podzemního přežívajícího orgánu a vyhnout se tak poškození rostlinného těla důsledky sucha. Tyto hlízy a bulvy mají velkou zásobní kapacitu vody (Nilsen a Orcutt, 1996).

Vytrvalé druhy využívají vývojové plasticity, aby se vyhnuly sezóně s nedostatkem vody. Jde o fenomén opadu listů při suchu, které je známé například z mediteránských a pouštních oblastí. Listy se vyvinou v zimě, kdy je relativně vysoká dostupnost vody. Jak dochází k poklesu vodního potenciálu před svítáním ke konci jara a v létě, většina listů odpadne. Druhy opadavé za sucha přežijí periodu vodního stresu v dormantním stádiu (Nilsen a Orcutt, 1996).

4.3 Tolerance sucha s nízkým vodním potenciálem

Díky schopnosti tolerovat nízkou dostupnost vody může rostlina pokračovat v metabolických procesech i během období nedostatku vody. Dochází ke kombinaci technik ke zmírnění poklesu vodního potenciálu v pletivech a udržení metabolické aktivity (Nilsen a Orcutt, 1996). Mezi mechanismy udržení turgoru při nízkém vodním potenciálu patří osmotické přizpůsobení, změna elasticity buněčné stěny, pokles buněčného objemu a snížení podílu vody v symplastu. Jelikož je fenomén osmotického přizpůsobení jednou z nejdůležitějších adaptací, je mu věnována samostatná kapitola č. 7.

Druhý způsob tolerance nízkého vodního potenciálu neudrzuje udržení turgor v buňkách a vede k vyschnutí rostlin.

4.3.1 Elasticita buněčné stěny

Zvýšení i snížení elasticity buněčné stěny lze považovat za mechanismus tolerance k nedostatku vody. Snížení elasticity umožňuje udržování turgorového tlaku při relativně nízkém vodním potenciálu a vysokém vodním deficitu v pletivech. Oproti tomu zvýšení elasticity stabilizuje spíše obsah vody v pletivu než turgorový tlak a vede k minimalizaci změn obsahu vody ve tkáních během vodního deficitu. Vysoká elasticita způsobuje výrazný pokles vodního potenciálu v pletivu při nárůstu vodního deficitu. Ačkoliv mnoho studií podporuje důležitost nízké elasticity pro toleranci k vodnímu stresu, objevilo se několik důkazů na podporu důležitosti vysoké elasticity pro toleranci vodního stresu. Obecně se vyskytuje více důkazů, že snížená elasticita doprovází periody sucha spíše než zvýšená (Nilsen a Orcutt, 1996).

4.3.2 Tolerance k vyschnutí

Několik rostlinných druhů je schopných tolerovat kompletní vyschnutí a po rehydrataci znovu obnovit svou aktivitu. Obecně se tato schopnost týká nižších cévnatých rostlin. Například mechy, lišejníky, některé řasy a kaprad'orosty jsou schopné tolerovat vyschnutí. U těchto rostlin se voda vypařuje z pletiv, cytoplasma smršťuje objem, plasmalema se odtrhává od buněčné stěny, což vede k velmi koncentrované cytoplasmě a vzniku vzduchových prostorů uvnitř buněčné stěny (Nilsen a Orcutt, 1996).

Důležité je poznamenat, že dehydratace a desikace (vyschnutí) nejsou synonyma. V případě dehydratace jde o ztrátu vody z protoplazmy, kdežto desikace představuje ztrátu veškeré vody. Rostliny tolerantní k desikaci mohou přežít těžký vodní deficit, kdy relativní obsah vody v rostlině klesá až pod 25% a znovuobnovit se z vysušeného stavu (Bewley, 1979). Přibližně 330 druhů cévnatých rostlin je považováno za tolerantní k desikaci (Porembski a

Barthlott, 2000). Mezi nejvíce odolné rostliny vzkříšení (resurrection plants) patří mechy, neboť některé druhy jsou schopné tolerovat výraznou desikaci a přežít až několik let ve vysušené formě. Rostliny vzkříšení jsou schopné obývat pouště a semiaridní území světa (Wood, 2005).

Aby byly rostliny schopné přežít vysušení, musí splňovat následující kritéria. Zaprvé je nutné, aby byla zachována fyziologická aktivita, která by mohla být negativně ovlivněna vzniklou vysokou koncentrací uvnitř buňky. Zadruhé je žádoucí, aby počet plasmatických propojení mezi buňkami byl zredukován, protože smršťování buňky by mohlo poničit tyto spoje. Zatřetí, buněčná stěna musí být schopna vydržet výraznou dehydrataci, aniž by ztratila svou strukturu (Nilsen a Orcutt, 1996). A za čtvrté je nutná existence reparačních mechanismů (Bewley, 1979).

Jsou patrné značné rozdíly v toleranci k vyschnutí mezi druhy. Mnoho druhů potřebuje k obnovení maximální fyziologické aktivity po rehydrataci několik dní. Pár druhů, mezi které patří vysýchavá kapradina *Tortula ruralis*, je schopných obnovit maximální metabolickou aktivitu již během 30 minut po rehydrataci. Mechanismus, který zajišťuje životaschopnost dehydrované cytoplasmy a rychlé zotavení po rehydrataci, se nazývá „*glassy cytoplasm*“. Během dehydratace roste koncentrace cytoplasmy, akumulují se sacharidy a cytoplasma stává viskóznější. Vysoká koncentrace sacharidů, zejména rafinózy, ochraňuje buněčné struktury před poškozením (Koster, 1991).

Ačkoliv většina cévnatých rostlin není k vysušení tolerantní, mají přesto zachovanou schopnost produkovat velké množství semen tolerantních k vysušení, a tato schopnost je rozhodující částí životního cyklu krytosemenných. Oliver et al. (2000) hypotetizuje, že se mechanismus tolerance k desikaci u semen vyvinul z primitivnější formy tolerance k vysušení vegetativního těla rostliny, jak je tomu u nižších cévnatých rostlin. A že rostliny s modifikovanou tolerancí k vysušení převzaly toleranci z reprodukčních pletiv do vegetativních spíše pod vlivem enviromentálním než vývojovým.

4.4 Tolerance sucha s vysokým vodním potenciálem

V tomto případě jde o strategii, která se snaží odolávat poškození během nedostatku vody prostřednictvím udržování vysokého vodního potenciálu v pletivech. Udržování vysokého vodního potenciálu v pletivech za současné tolerance sucha vyžaduje striktní hospodaření s vodou. Rostlina musí snížit ztráty vody, čehož lze dosáhnout snížením vodivosti listu, zmenšením listové plochy či snahou zmírnit teplotu listů. Zároveň je potřebné zvýšit akumulaci vody, a to zvýšením hustoty či hloubky kořenů či tvorbou sukulentních orgánů.

4.4.1 Snížení ztrát vody

Aby rostliny omezily ztráty vody, vyvinuly mnoho mechanismů a adaptací. Jednou z nejvýraznějších adaptací je vytvoření silné kutikuly, proto je jí věnována samostatná kapitola č. 5. Snížení ztrát vody je dosaženo při zredukování transpirující plochy. Při nedostatku vody se tvoří listy s menší plochou čepele. Pokud se ale nedostatek vyskytne v době, kdy má již rostlina plně vyvinuté listy, může vodní deficit navodit jejich senescenci a opad. V mediteránu se vyskytuje mnoho druhů, které ztrácí listy na počátku sucha a mají dimorfní populace listů. Příkladem je *Salvia melifera* z čeledi *Lamiaceae* (Gill a Mahall, 1986). Redukcí transpirující plochy, která při správné funkci ochlazuje list, může docházet k nárůstu teploty listu a k ovlivnění fotosyntetických systémů. I z toho důvodu se vyvinulo pokrytí nadzemní části rostliny trichomy, které zvyšuje odraz dopadajícího záření a snaží se tak zabránit přehřátí rostliny. V pouštních habitatech, které jsou extrémním prostředím, pokročila redukce plochy listových čepelí až k transformaci listů v trny, a k fotosyntéze je využíváno stonků (Gibson, 1998). Výhodou této adaptace je, že vertikální orientace stonků snižuje fotoinhibiční potenciál během vysokého ozáření a nízké dostupnosti vody. Stonky mají také nižší vodivost a vyšší účinnost využití vody než listy (Nilsen a Orcutt, 1996).

Nejdynamičtější mechanismus regulace ztrát vody představují průduchy, kterým je věnována kapitola č. 5.

4.4.2 Zvýšení akumulace vody

K dostatečné akumulaci vody v rostlině je nutné vytvoření efektivního kořenového systému. Některá xerofyta (vinná réva, palmy) jsou schopny vyvinout extrémně dlouhé kořeny (až 30 m), které dosahují až úrovně spodních vod. Tyto rostliny jsou vystaveny stresu suchem v době, než kořeny dosáhnou požadované hloubky. Proto se při nedostatku vody mění distribuce asimilátů v rostlině ve prospěch kořenů. Podstatné je také zamezení výdeje vody kořeny zpět do okolí, a to tvorbou suberinizované nebo lignifikované hypodermis.

Jiné rostliny, například kaktusy, mají jinou strategii. Ta spočívá ve vytvoření velmi rozsáhlého, avšak mělkého kořenového systému v nejsvrchnější vrstvě půdy, který umožní získat vodu při krátkých obdobích srážek nebo rosy z velké plochy. Během období dlouhého sucha některé kaktusy přeruší spojení se svými kořeny, aby neměly v suché půdě tendenci odčerpávat z rostliny vodu (Nilsen a Orcutt, 1996). Kaktusy také často vylučují do prostředí látky inhibující klíčení semen jiných rostlin a omezují tak výskyt konkurentů (Pavlová, 2005).

Hemiparazitické druhy jsou schopny využívat vodu z jejich hostitele. Pro vykonávání tohoto procesu musí být u hemiparazita nižší vodní potenciál xylémového toku než u hostitele.

Nejschopnějšími rostlinami v udržování zásob vody v pletivech jsou sukulenty, které mají vysokou schopnost zadržování - v parenchymu roztroušené specializované buňky (idioblasty) vylučující do apoplastu mukózní polysacharidy, které váží vodu (Pavlová, 2005). Voda je uložena do pletiv sukuletního orgánu během období dostatku vody. Během období sucha může transpirace pokračovat, protože voda je čerpána ze zásob do listu (Holbrook a Sinclair, 1992).

5. KUTIKULA

Nadzemní část rostliny pokrývá tenká membrána, takzvaná kutikula, která chrání rostlinu a předchází nekontrolovatelné difuzi vody do atmosféry (podle prvního Fickova zákona o difúzi). Tloušťka kutikuly se pohybuje od 0,05 μm u mezofyt až po 225 μm u xerofyt. Primární reakcí rostlin na pokles vnitřního obsahu vody je uzavření průduchů se snahou zadržet v organismu vodu. Ale i po zavření průduchů rostlina dále ztrácí vodu, ačkoliv v mnohem menší míře. To je způsobeno kutikulární propustností. Modifikace v propustnosti kutikuly hraje roli v adaptaci na rozdílné ekosystémy. Rostliny adaptované na aridní oblasti mají kutikulární membránu o 1 – 2 řády méně propustnou než mezofyta (Goodwin a Jenks, 2005).

Delší působení sucha způsobuje zvýšenou expresi genů podílejících se na syntéze kutikuly. Současný stav výzkumu kutikuly ukazuje, že intrakutikulární vosky jsou, spíše než ty epikutikulární, primárními determinanty kutikulární propustnosti. Důkazy naznačují, že alifatické složky intrakutikulárních vosků utvářejí krystalické oblasti, které jsou nepropustné pro vodu. Krystalické oblasti jsou obklopeny oblastmi amorfními, které jsou méně hustě uspořádané, polární a utvářejí klikaté dráhy skrz kutikulu pro difuzi vody do okolní atmosféry. Základ kutikulární propustnosti závisí na rozmístění a uspořádání jednotlivých molekul vosků (Goodwin a Jenks, 2005).

5.1 Složení a struktura kutikuly

Epikutikulární vosková vrstva, která je viditelná na povrchu mnoha rostlin jako modravě bílý povlak, je složena z *n*-alkanů, mastných kyselin, aldehydů, primárních i sekundárních alkoholů, ketonů a esterů (Goodwin a Jenks, 2005). Použitím skenovací elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že vosky krystalizují do mnoha různých struktur specifických druhově, orgánově i v závislosti na prostředí (Jenks et al., 1992). Rekrystalizační experimenty ukazují, že struktura krystalizace je primárně určena příslušným složením vosku (Rashotte a Feldman, 1998).

Pod epikutikulární vrstvou je vlastní kutikula, která je tvořena trojrozměrnou kutinovou a kutanovou matrix, vosky a významným množstvím polysacharidů vyčnívajících z buněčné stěny.

Zatímco vosky jsou solubilní v organickém rozpouštědle, kutiny a kutany nejsou. Kutan je zbytkem, který zůstane po kompletní depolymerizaci kutinu. Jde o polymer amorfni matrix polymethylových řetězců spojených esterovými vazbami. Vedle esterových vazeb mezi monomery kutinu, mohou být monomery vázané také kovalentně k polysacharidům obsaženým v kutikulární vrstvě (Fang et al. 2001). Zdá se pravděpodobné, že se matrix kutikuly skládá s druhově závislých přesných poměrů kutinu a kutanu (Jeffree, 1996).

Složení intrakutikulárního vosku je rozdílné od složení vosku epikutikulárního. Studie na *Prunus laurocerasus* (Jetter et al., 2000) a rajčeti (Vogg et al., 2004) se shodují v tom, že epikutikulární vosky jsou alifatické, zatímco intrakutikulární obsahují značnou část triterpenoidů.

Není známo, jak jsou hydrofobní vosky transportované skrz vnější buněčnou stěnu a poté lipidickou vrstvou kutikuly. Byly navrženy mikrokanály pro transport vosků, ale jejich přítomnost nebyla elektronovou mikroskopií potvrzena. LTP (Lipid Transfer Proteins) představují hlavní transportní proteiny v epikutikulární vrstvě (Arondel et al., 2000), avšak jejich biologická funkce zůstává neznámá. Recentní studie navrhuje spřažení transportu vosků společně s vodou pronikající kutikulou (Neinhuis et al., 2001).

5.2 Funkce kutikuly jako bariéry proti ztrátám vody

Transpiraci lze rozdělit na dvě hlavní části. Na stomatální transpiraci, při které difunduje vodní pára otevřenými průduchy, a kutikulární fázi, při které voda prochází skrz kutikulu. Konduktance (vodivost) průduchů a permeance (prostupnost) kutikuly popisují velikost ztrát vody. Při dostatku vody se většina vodních ztrát děje přes otevřené průduchy, zato při suchu, které vyvolává uzavření průduchů, se většina vody ztrácí kutikulární transpirací. Tím pádem je míra ztrát vody při stresu suchem determinována primárně permeabilitou kutikuly (Goodwin a Jenks, 2005).

Podle Goodwin a Jenks (2005) hraje permeabilita kutikuly pro vodu hlavní roli v adaptaci na suchu, především pokud je stomatální transpirace po uzavření průduchů zanedbatelná. Kutikula napomáhá lepšímu těsnění uzavřených průduchových štěrbin. U většiny rostlin je substomatální komora lemována kutikulou, což dokazuje, že transport vody z listového mezofylu do podprůduchové komory musí skrz kutikulární membránu (Osborn a Taylor, 1990). U *Cirsium horridulum* je kutikula v podprůduchové komůrce 1 – 3x tenčí než epidermální kutikula (Pesacreta a Hansenstein, 1999). Vnější okraj stomatálního póru je lemován kutikulou tak, že tvoří okraj. Když se průduch uzavře, tyto okraje se semknou a otvor se jimi utěsni (Jenks, 2002). Existence těchto kutikulárních okrajů dokazuje, že kutikula má důležitou roli i v regulaci stomatální transpirace. Nepřímý důkaz, poukazující na roli kutikulárních okrajů v adaptaci na

sucho, pochází z faktu, že xerofyty mají obvykle větší kutikulární okraje (Goodwin a Jenks, 2005).

Kutikulární propustnost pro vodu vzrůstá se zvyšující se teplotou prostředí. Vyšší propustnost kutikuly je způsobena fázovým přechodem lipidů kutikuly při teplotě 30 – 39°C. Ačkoliv teplota okolí v aridních oblastech zdaleka přesahuje teploty fázového přechodu (Goodwin a Jenks, 2005), kutikula dostatečně chrání rostlinu a napomáhá odrazu slunečního záření. Nejvyšší kutikulární propustností pro vodu se vyznačují listnaté rostliny mírného klimatu. Oproti nim mají xeromorfy z mediteránu a vždyzelené epifyty z tropů mnohem nižší propustnost. Rozsah rozdílů v propustnosti mezi nimi byl více než 2,5 řádů a byl těsně spjatý s dostupností vody v prostředí, nutností vodu zadržovat (Riederer a Schreiber, 2001) a tloušťkou kutikuly (Goodwin a Jenks, 2005).

Recentní studie ukazují, že intrakutikulární vosky mají hlavní vliv na rychlost transportu vody skrz kutikulární membránu, protože se po jejich odstranění velmi výrazně zvýšila kutikulární propustnost (Knoche et al., 2000; Vogg et al., 2004). Oproti tomu mechanické odstranění epikutikulárních vosků způsobuje jen mírný nárůst propustnosti kutikuly pro vodu (Goodwin a Jenks, 2005).

Kompletní znalost funkce kutikuly při ztrátách vody a jejího vlivu na přežití rostlin v prostředí s nedostatkem vody, by mohla vést k novým metodám výzkumu genetické modifikace důležitých plodin a zvýšení jejich tolerance k suchu.

6. PRŮDUCHY

Průduchy zprostředkovávají výměnu plynů mezi rostlinou a atmosférou. Zavřením průduchů je snížen výdej vody a zároveň dochází ke snížení rychlosti čisté fotosyntézy, neboť je omezena dostupnost CO₂ a není možný výdej tepla transpirací. Iontové kanály hrají důležitou roli v regulaci turgoru ve svěracích buňkách a jsou významnou složkou signalizace, včetně té stresové (Luan, 2002).

Otevírání průduchů je způsobeno zvýšením koncentrace osmoticky aktivních látek ve svěracích buňkách a následným příjmem vody, které vede k nárůstu objemu a tedy i turgorového tlaku svěracích buněk. Při otevírání průduchu se aktivují H⁺ATPázy v plazmalemě a otevírají se kanály pro příjem K⁺ do cytosolu. Koncentrace K⁺ v protoplastu stoupá 4 – 8x. Změna náboje v cytosolu je vyrovnávána příjmem anorganických aniontů, především Cl⁻, z apoplastu a tvorbou organických aniontů, především kyseliny jablečné, v cytosolu. Malát vzniká karboxylací PEP a redukcí vzniklého oxalacetátu v cytosolu. Disociací malátu vzniká osmoticky aktivní záporně

dvoumocný malátový anion a 2H^+ , které jsou využitelné k transportu do apoplastu a k tvorbě protonmotorické síly. Aktivuje se odbourávání škrobu v chloroplastech a vznikající hexózy a triózy (dále do glykolýzy na PEP a zas malát) také přispívají ke snížení vodního potenciálu v cytosolu. I hladina sacharózy, transportované do svěracích buněk z mezofylu, hraje v regulaci osmotických poměrů svěracích buněk důležitou úlohu (Pavlová, 2005).

Zavírání průduchů je způsobeno snížením hladiny osmoticky aktivních látek ve svěracích buňkách, výdejem vody a snížením turgoru svěracích buněk. Inaktivují se H^+ ATPázy, plasmatická membrána se depolarizuje a aktivují se „pomalé“ kanály pro transport Cl^- , K^+ a malátu²⁻ do apoplastu (po koncentračním spádu). Malát může být také metabolizován v mitochondriích procesy Krebsova cyklu. Ze sacharidů se v chloroplastech tvoří osmoticky neaktivní škrob. Navození těchto procesů je spojeno s přechodným zvýšením hladiny iontů Ca^{2+} v cytosolu. Ionty Ca^{2+} vstupují do cytosolu z apoplastu i z jiných buněčných kompartmentů, především z vakuoly. Inaktivace H^+ ATPáz a otevírání kanálů pro transport K^+ do apoplastu je řízeno také zvýšením pH cytosolu (Pavlová, 2005).

6.1 Regulace iontových kanálů ve svěracích buňkách kyselinou abscisovou

Jak bylo uvedeno v předchozí části, iontové kanály hrají hlavní roli v regulaci pohybů svěracích buněk. V souvislosti s tím poukazuje mnoho studií na regulaci jejich aktivity kyselinou abscisovou. Regulace iontových kanálů může pokračovat dráhami, jak ABA-dependentními, tak ABA-independentními. Obě možnosti indukují uzavření průduchů (Assmann, 1993; Blatt a Grabov, 1997; MacRobbie, 1997). ABA se akumuluje v kořenech za sucha a poté se dostává transpiračním proudem do listů. Nárůst její koncentrace v okolí svěracích buněk způsobuje uzavření průduchů (Luan, 2002; Schachtman a Goodger, 2008).

Vápenaté ionty mohou být sekundárním poslem pro kyselinu abscisovou ve svěracích buňkách. ABA spouští nárůst cytosolického vápníku ve svěracích buňkách, což ovlivňuje iontové kanály, a tím i výtok iontů a uzavírání průduchů (Schroeder a Hagiwara, 1990; Schroeder et al., 2001). Vysoké množství Ca^{2+} iontů iniciuje uzavření stomat, inhibuje kanály pro vtok K^+ ve svěracích buňkách (Schroeder a Hagiwara, 1989) a aktivuje aniontové kanály (Ward et al., 1995). Nárůst koncentrace vápenatých iontů způsobuje také přestavbu cytoskeletu, neboť uzavření průduchů vyžaduje reorganizaci aktinového cytoskeletu ve svěracích buňkách (Eun a Lee, 1997). Bylo zjištěno, že během zavírání průduchů se také mění plocha plasmatické membrány svěracích buněk, která se vchlipuje a dochází k endocytóze váčků z membrány (Pavlová, 2005). Studie ale také ukázaly, že některé části ABA signalizace ve svěracích buňkách jsou Ca^{2+} -independentní, jako například aktivace kanálů pro výtok K^+ (Allan et al., 1994).

Příkladem vápníkových senzorů je kalmodulin a CDPKs vázající Ca^{2+} ionty a regulující aktivitu jejich cílových proteinů (Roberts and Harmon, 1992). Dvě studie potvrzují, že CDPKs hrají roli v regulaci iontových kanálů ve svěracích buňkách (Pei et al., 1996). Další studie poukazují na důležitost protein kináz a fosfatáz regulovaných vápenatými ionty. Příkladem jsou studie o aktivitě CBLs, které mohou zprostředkovat funkce Ca^{2+} iontů ve svěracích buňkách (Luan et al., 1993), a které specificky interagují s protein kinázami (Kim et al., 2000).

Důležitým genem, který má vliv na regulaci zavírání průduchů, je gen *ERAI* kódující β -podjednotku farnesyltransferázy. Delece genu *ERAI* vede k mutaci beta podjednotky, způsobuje hypersenzitivitu iontových kanálů ve svěracích buňkách k ABA a vede k uzavření průduchů (Cutler et al., 1996). *Eral* rostliny mají nižší ztráty vody při transpiraci během dehydratace a méně vadnou, protože jejich průduchy se uzavírají. Tato skutečnost potvrzuje vliv farnesyltransferáz na regulaci otevřenosti průduchů (Pei et al., 1998) a poukazuje na důležitost farnesylace proteinů pro funkci negativní regulace v ABA signalizační dráze (Cutler et al., 1996).

Porozumění signalizačním drahám, které ovlivňují turgor svěracích buněk při suchu, je důležité pro fyziologii rostlin jako vědní obor, i následně pro praktické využití v zemědělství. ABA je považována za hlavní regulátor otevřenosti průduchů, jelikož je významným chemickým signálním poslem při suchu.

7. OSMOTICKÉ PŘIZPŮBENÍ

Na aktuální nedostatek vody buňky reagují zvýšením počtu osmoticky aktivních částic v protoplastu, které vede ke snížení vodního potenciálu, zvýšenému příjmu a zadržování vody. Tento proces se nazývá osmotické přizpůsobení a je součástí stresových reakcí zejména na sucho a zasolení půdy. Současně se zvýšeným množstvím osmoticky aktivních částic se zvyšuje celkové množství a počet otevřených aquaporinů v plazmalemě (Pavlová, 2005), které zvyšují permeabilitu membrány a usnadňují tak osmotické děje. Rostliny *Arabidopsis* se sníženou expresí genu pro aquaporiny mají sníženou hydraulickou vodivost a nižší toleranci k suchu (Siefritz et al., 2002).

Osmotické přizpůsobení je efektivním mechanismem pro udržení turgorového tlaku během vodního stresu. Udržení turgorového tlaku povolí nechat otevřené průduchy a pokračovat v získávání uhlíku při vodním potenciálu, který je nedostatečný pro tyto funkce bez výskytu osmotického přizpůsobení. Avšak pokud nedostatek vody přetrvává po delší období, nebude osmotické přizpůsobení schopné překonat škodlivé vlivy nedostatku vody (Nilsen a Orcutt, 1996).

Osmotické přizpůsobení může také nastat při změně poměru symplastické a apoplastické vody. Symplast obsahuje většinu solutů a pokles symplastického objemu vzhledem k apoplastu může způsobit nárůst efektivní osmotické koncentrace. Tento typ přizpůsobení převládá během růstu rostlin za podmínek, kdy se staví nová pletiva při nedostatku vody. Mechanismus osmotického přizpůsobení se vyskytuje i v pletivech vystavených nízkým teplotám, za cílem zvýšení ochrany před zmrznutím, neboť při zvýšené koncentraci solutů dochází ke snížení bodu mrazu (Nilsen a Orcutt, 1996).

Pro přizpůsobení osmotické koncentrace jsou využity nejvíce Na^+ a K^+ ionty. Vysoká koncentrace iontů v cytosolu může nepříznivě ovlivňovat metabolické i transportní procesy v buňkách, proto jsou ionty transportovány do vakuoly. Osmotické přizpůsobení díky sacharidům rozpustným v cytosolu je energeticky náročnější, ale nevyžaduje transport do vakuoly (Nilsen a Orcutt, 1996).

7.1 Akumulace kompatibilních solutů

Kompatibilní soluty jsou vysoce rozpustné a osmoticky aktivní, avšak dále nevyužívané látky. Neinterferují s normálním metabolismem a akumulují se v cytoplasmě do vysoké koncentrace při osmotickém stresu (Chen a Murata, 2002). Nemají iontový charakter, ale mohou být polární. Kompatibilní soluty interagují s proteiny, udržují jejich hydrataci, ale nemění jejich strukturu. Ke kompatibilním solutům patří některé aminokyseliny, sacharidy i aminy. Tyto molekuly mají primární roli v udržení turgoru a mohou se podílet na stabilizaci proteinů a buněčných struktur (Bartels a Sunkar, 2005).

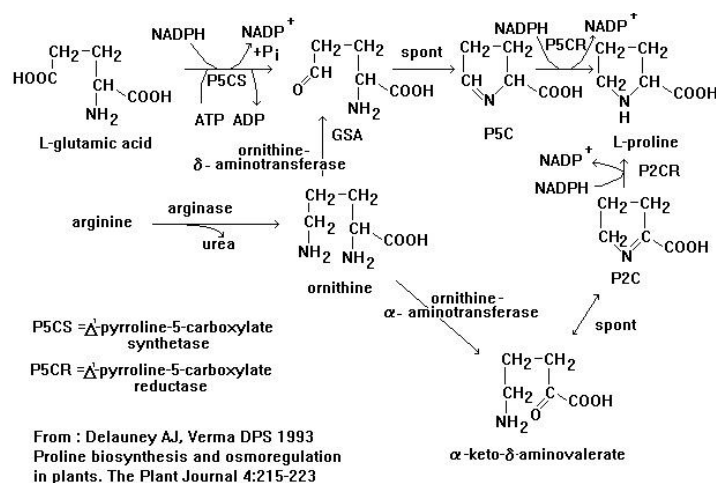
7.1.1 Akumulace aminokyselin

7.1.1.1 Prolin

Schopnost akumulovat prolin je výrazně spojená s tolerancí ke stresu. Rostliny akumulují prolin v reakci na rozdílné environmentální stresy, jakými je sucho, vysoká salinita a přítomnost těžkých kovů. Zajímavé je, že rostliny *Nicotiana* a *Arabidopsis* s naakumulovaným prolinem jsou následně citlivější k vysokým teplotám (Rhizski et al., 2004). Prolin je považován jednak za osmolyt hrající roli v osmotickém přizpůsobení, tak i za zhášec ROS a molekulární chaperon stabilizující strukturu proteinů, čímž ochraňuje buňku před poškozením způsobeným stresem (Szabados a Savoure, 2010). Prolin se uplatňuje v ochraně integrity plasmatické membrány, jako sink energie nebo redukující síly, jako zdroj C a N (Bartels a Sunkar, 2005).

Syntéza prolinu probíhá dvěma biosyntetickými dráhami (viz. obr. č. 1), a to ornithin-dependentní, která se vyskytuje hlavně u mladých rostlin, a glutamát-dependentní, která se

vyskytuje hlavně při stresu a je predominantní (Bartels a Sunkar, 2005 podle Delauney et al., 1993). Prolin vzniká v cytosolu nebo v chloroplastech z glutamátu a degradován v mitochondriích zpět na glutamát. Stresové podmínky stimulují syntézu prolinu, zatímco jeho katabolismus je zvýšen během obnovy po stresu. Rovnováhou mezi těmito procesy je determinována úroveň prolinu (Szabados a Savoure, 2010). Over-exprese P5CS (δ -1-pyrrolin-5-karboxylátsyntetázy) vede k zvýšené akumulaci prolinu a rozšířené toleranci k suchu a zasolení (Krasensky a Jonak, 2011).



Obr. č. 1 – Alternativní dráha syntézy prolinu u vyšších rostlin. Podle Delauney et al., 1993.

7.1.1.2 GABA

Neproteinová aminokyselina γ -aminobutyrová se také velmi rychle akumuluje v nepříznivých podmínkách (Shelp et al., 1999; Kaplan a Guy, 2004; Renault et al., 2010). GABA se syntetizuje z glutamátu v cytosolu působením glutamátdekarboxylázy a poté je transportována do mitochondrií. Metabolismus GABA je spojován s odstraňováním ROS (Krasensky and Jonak, 2012). Salinitní stres zvyšuje aktivitu enzymů GABA metabolismu (Renault et al., 2010). Hladina GABA při teplotním stresu a osmotickém šoku u rostlin stoupá až 6x (Pavlová, 2005).

7.1.2 Akumulace aminů

7.1.2.1 Polyaminy

Polyaminy jsou malé alifatické molekuly, pozitivně nabitě v buněčném pH, které jsou ovlivněné mnoha stresy, jako je sucho a vysoká salinita. Vysoká úroveň polyaminů v buňce pozitivně koreluje s vyšší tolerancí ke stresu. Nejběžnějšími polyaminy u vyšších rostlin je putrescin, spermidin a spermin. Ty jsou zapojeny do ochrany membrán a zmírňování

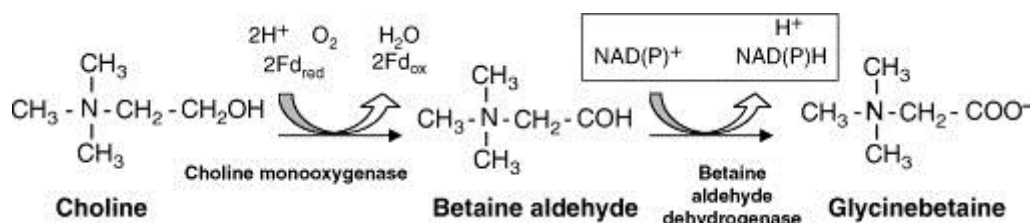
oxidativního stresu (Groppa a Benavides, 2008).

Podstatné je ale zdůraznit, že akumulace polyaminů je pro rostliny toxická v normálních podmínkách, a proto konstitutivní over-exprese polyaminů nebude ideální cestou jako navodit toleranci ke stresu (Bartels a Sunkar, 2005).

7.1.2.2 Glycin betain (*N,N,N*-trimethylglycin)

Glycin betain se vyskytuje u mnoha rostlin, ale například *Arabidopsis* jej neakumuluje. U rostlin, které jej přirozeně akumulují, dochází ke zvýšení koncentrace glycin betainu při působení abiotického stresu (Rhodes a Hanson, 1993; Chen a Murata, 2011). U druhů tolerantních k zasolení se glycin betain může akumulovat do významné úrovně (Rhodes a Hanson, 1993). Introdukce genů z biosyntetické dráhy glycin betainu do rostlin, které jej neakumulují, zlepšuje jejich schopnost tolerance k abiotickému stresu (Krasensky a Jonak, 2011).

Rostliny syntetizují glycin betain cestou dvoukrokové oxidace cholinu přes betain aldehyd (viz. obr. č. 2) (Rhodes a Hanson, 1993; Chen a Murata, 2011).



Obr. č. 2 – Biosyntetická dráha Glycin betainu u vyšších rostlin. Podle Ashraf a Foolad, 1993.

Hlavním faktorem limitujícím akumulaci glycin betainu je dostupnost cholinu jako substrátu pro syntézu a jeho transport z chloroplastu do cytosolu (Chen and Murata, 2002). Zacílení produkce glycin betainu v chloroplastech vede k vyšší toleranci stresu než při syntéze v cytosolu (Krasensky a Jonak, 2011).

Předpokládá se, že glycin betain chrání PS II, stabilizuje membrány a zmírňuje oxidativní poškození indukci exprese genů kódujících enzymy účastníci se zhášení ROS (Chen a Murata, 2011).

7.1.3 Akumulace sacharidů

Významná souvislost mezi akumulací cukrů a tolerancí k osmotickému stresu byla několikrát zkoumána a potvrzena (Streeter et al., 2001). Nárůst koncentrace cukrů je způsoben zvýšením hydrolýzy škrobu, což vyžaduje aktivitu hydrolytických enzymů. Rostliny vzkříšení a semena vyšších rostlin jsou dobrým příkladem akumulace cukrů a zvýšení tolerance se stresu (Phillips et al., 2002). Cukry interagují s polárními hlavičkami fosfolipidů v membránách, čímž je ochraňují před fúzí.

7.1.3.1 Fruktany

Stejně jako škrob, který je hlavním zásobním sacharidem většiny rostlin, některé krytosemenné rostliny akumulují fruktany. Ty jsou výhodné zejména díky své vyšší rozpustnosti ve vodě, rezistenci ke krystalizaci při teplotách mrazu a díky funkční syntéze i při nízkých teplotách (Vijn a Smeekens, 1999). Kromě toho mohou fruktany stabilizovat membránu a nepřímo přispět k osmotickému přizpůsobení proti mrznutí a dehydrataci uvolněním hexóz (Bartels a Sunkar, 2005; Krasensky a Jonak, 2011). Fruktany, větvené polymery fruktózy, jsou syntetizovány ve vakuole fruktosyltransferázami (Vijn a Smeekens, 1999). Introdukci fruktosyltransferáz do tabáku neakumulujícího fruktany se podařilo stimulovat jejich produkci a zvýšit tak toleranci k suchu a chladu (Pilonismitis et al., 1995).

7.1.3.2 Škrob, monosacharidy a disacharidy

Škrob je hlavním zásobním polysacharidem, jehož metabolismus je velmi citlivý ke změnám prostředí. Salinita a stres suchem vedou k vyčerpání zásob škrobu a k akumulaci solubilních cukrů v listech. Cukry, které se akumulují v reakci na stres, mohou fungovat jako osmolyty k udržení buněčného turgoru a mít schopnost ochránit membrány a proteiny od poškození způsobeném stresem (Kaplan a Guy, 2004).

7.1.3.3 Trehalóza

Trehalóza, neredukující disacharid, se akumuluje ve velkém množství v některých rostlinách tolerantních k vysušení. Příkladem jsou rostliny vzkříšení *Myrothamnus flabelifolius* a *Sporobolus stapfianus* bylo (Phillips et al., 2002). Při dostatečném množství může trehalóza fungovat jako osmolyt a může stabilizovat proteiny a membrány (Krasensky and Jonak, 2012). U většiny krytosemenných je trehalóza přítomna ve stopovém množství a při abiotickém stresu se pouze mírně zvyšuje (Kaplan et al., 2004; Rizhsky et al., 2004).

Transgenní exprese genů pro biosyntézu trehalózy ukázala, že zvýšení jejího

metabolismu může pozitivně regulovat toleranci k abiotickému stresu. Over-exprese rozdílných izoform trehalóza-6-fosfátsyntázy z rýže navozuje vyšší rezistenci k salinitě, chladu a suchu. Rostliny *Arabidopsis* konstitutivně over-exprimující *AtTPS1* vykazují malý nárůst množství trehalóza-6-fosfátu a vyšší toleranci k suchu (Krasensky a Jonak, 2012).

7.1.3.4 Cyklické polyoly

Mezi nejznámější polyoly patří pinitol, manitol a ononitol. Pinitol lze nalézt například u rostlin čeledi *Pinaceae*, *Fabaceae*, *Caryophyllaceae*. Akumulace D-pinitolu a D-ononitolu je spojená s odpovědí na stres suchem a salinitou (Streeter et al., 2001). Pinitol se akumuluje v chloroplastech, což je v souladu s pozitivní korelací mezi akumulací cyklických polyolů a asimilací CO₂ při suchu (Sheveleva et al., 1997). Přímý důkaz vlivu cyklických polyolů byl proveden u transgenních tabáků, které akumulují ononitol a u kterých bylo v souvislosti s tím pozorováno zvýšení tolerance k suchu a salinitě (Sheveleva et al., 1997).

8. SIGNÁLNÍ TRANSDUKCE

V předchozích kapitolách byly probrány všechny aspekty týkající se stresu suchem. Byly popsány rostlinné adaptace na stresové podmínky, vlastnosti kutikuly a průduchů, také fenomén osmotického přizpůsobení s akumulací kompatibilních solutů. Následující kapitola se zabývá signálními drahami, které zprostředkovávají buněčnou odpověď. Signální dráhy vedou od prvního momentu rozpoznání stresoru až po změnu metabolismu a vyrovnání se se změnami podmínek na molekulární úrovni.

8.1 Percepce sucha

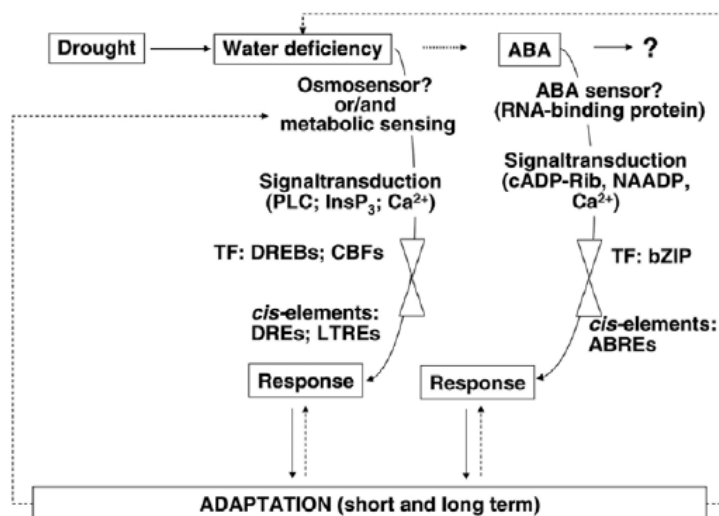
Vodní stres je vnímán dvoukomponentovou histidin kinázou vázanou na membránu a aktivovanou vysokou osmolaritou. Nárůst osmolarity při nedostatku vody tak spouští řetězec signální odpovědi. Aktivní signální receptor aktivuje fosfolipidovou signální dráhu. (Beck et al., 2007).

Předpokládá se, že gen *NtC7*, který byl původně identifikován jako gen pro odpověď při zranění, by mohl hrát roli v rozpoznávání osmotického stresu u rostlin. Transkripty *NtC7* se akumulují i při stresu osmotickém a salinitním. *NtC7* kóduje membránový receptorový protein a jeho over-exprese navozuje toleranci k osmotickému stresu způsobenému manitolem. Tyto výsledky potvrzují, že by *NtC7* mohl hrát roli ve specifickém vnímání osmotického stresu (Tamura et al., 2003).

8.2 Signální dráhy

Rostliny reagují na vnější stimuly iniciací signálních kaskád, které aktivují expresi odpovídajících reakcí za cílem dosažení nové homeostázy a rovnováhy metabolických drah. Hormony, sekundární posli, fosfatázy a proteinkinázy jsou stěžejními složkami signalizačních drah indukovaných stresem, které regulují biochemické a fyziologické procesy. Díky posttranskripčním a posttranslačním modifikacím, kompartmentalizaci, metabolické stabilitě a dostupnosti substrátu nejsou změny v nadbytku transkriptů nutně hned translatovány do změn množství metabolitů. Důležitým mechanismem je reverzibilní fosforylace, která reguluje buněčné procesy v odpovědi na prostředí. Jak bylo již výše zmíněno, přizpůsobení metabolismu je životně důležité pro získání tolerance ke stresu.

Jak je znázorněno na obrázku č. 3, působení vodního stresu spouští 2 signální dráhy. Jednu ABA-dependentní a druhou ABA-independentní. Výsledkem obou je navození adaptace ke stresu, odlišují se však komponenty dráhy. Stresem indukovaná akumulace citrátu, malátu, sukcinátu a GABA je ABA-independentní. Oproti tomu akumulace osmotických stresem indukovaných proteinogenních aminokyselin, jako je prolin, je závislá na indukci kyselinou abscisovou (Kempa et al., 2008).



Obr. č. 3 – Signální dráha působení stresu suchem vedoucí k adaptaci.

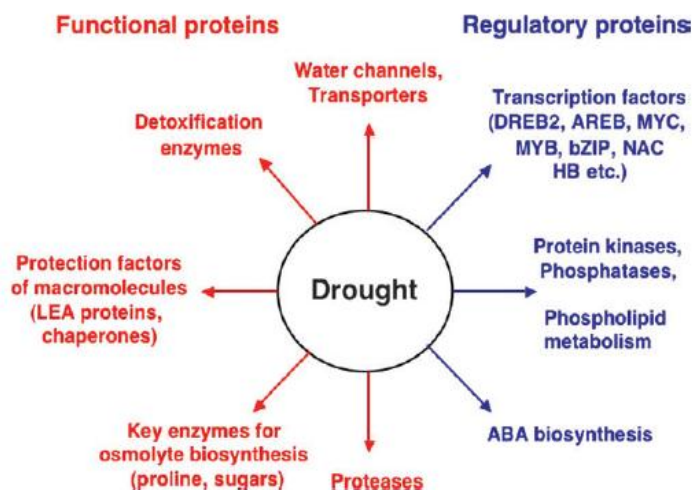
Podle Beck et al., 2007.

S použitím microarray analýz lze rozdělit produkty genů indukovaných suchem do dvou skupin. Viz. obr. č. 4. Microarray studie ukázaly, že několik set genů je zahrnuto v odpovědi na stres suchem nebo salinitou u rostlin. Analýzy transkripčních profilů mohou odhalit nejen individuální stresem aktivované geny, ale i dráhy (Shinozaki a Yamaguchi-Shinozaki, 2006).

První skupina zahrnuje proteiny hrající roli v toleranci k abiotickému stresu. Těmi jsou: chaperony, LEA proteiny, osmotiny, antifreeze proteiny, mRNA binding proteiny, enzymy pro

syntézu osmolytů, proteiny vodních kanálů, transportéry prolinu a cukrů, detoxifikační enzymy a různé protézy (Shinozaki a Yamaguchi-Shinozaki, 2006).

Druhá skupina obsahuje regulační proteiny, účastníci se exprese faktorů regulace signální transdukce a genů spojených se stresem, fytohormony, transkripční faktory, protein kinázy, protein fosfatázy, enzymy metabolismu fosfolipidů (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006).



Obr. č. 4 – Působení genů indukovaných suchem v odpovědi na stres a toleranci

Podle Shinozaki a Yamaguchi-Shinozaki, 2006.

8.2.1 ABA

Kyselině abscisové jsme se již věnovali v kapitole o průduších a jejich regulaci. Avšak ABA je hlavním regulátorem signalizace abiotického stresu a rychle se akumuluje při odpovědi na různé stresové podmínky prostředí. Stejně tak hraje roli ve vývoji semene, dormanci a klíčení. Zatímco v odpovědi na stres chladem hraje ABA minoritní roli, v reakci na stres suchem spouští hlavní signální dráhu (Beck et al., 2007). Nedávná identifikace intracelulárního ABA receptoru typu PYR/PYL/RCAR je velkým posunem v porozumění ABA regulaci (Santiago et al., 2009).

Hlavní biosyntetická dráha ABA začíná karotenoidy, ve které je klíčový enzym NCED (9-cis-epoxykarotenoid dioxygenáza), který katalyzuje jejich štěpení a následnou produkci xanthoxinu lokalizovaného v plastidech. U několika rostlin byla zaznamenána indukce NCED genů suchem. Exprese genu pro NCED způsobuje nárůst množství ABA, což bylo potvrzeno u transgenních rostlin *Arabidopsis*. Rostliny over-exprimující geny *NCED* vykazují sníženou míru transpirace a navození tolerance k suchu, zatímco rostliny s nefunkčními *NCED* geny jsou k suchu citlivější (Iuchi et al., 2000). Tento experiment poskytuje uspokojující důkaz, že modulace endogenní úrovně ABA a následné tolerance k suchu, je možné dosáhnout zvýšenou expresí NCED.

Aktivace ABREs transkripčními faktory, jako jsou bZIP-proteiny, vede k expresi efektorů tolerance ke stresu suchem, jako jsou dehydriny nebo enzymy katalyzující nízkomolekulární osmolyty. Dráha signální transdukce ABA zahrnuje cADPribózu, NAADP a Ca^{2+} jako sekundární posly (Quatrano et al., 1997). Více informací o elementech a transkripčních faktorech je uvedeno v závěru této kapitoly.

8.2.2 *Prolin*

V předcházející kapitole byla popsána stručná charakteristika prolinu jako jednoho z nejvýznamnějších kompatibilních solutů v osmotickém přizpůsobení. Nyní je na místě se zaměřit na signalizační dráhu vedoucí k jeho akumulaci.

Několik proteinkináz, důležitých pro toleranci k suchu, chladu nebo salinitě, reguluje akumulaci prolinu (viz. obr. č. 5). SnRK2 jsou aktivované osmotickým stresem. CDPK6 pozitivně reguluje obsah prolinu u *Arabidopsis* (Krasensky a Jonak, 2011). SnRK3, známé také jako CIPKs, se účastní modulace úrovně prolinu. Over-exprese OsCIPK03 a OsCIPK12 zvyšuje toleranci k chladu a suchu, respektive zvyšuje úroveň prolinu při stresových podmínkách (Krasensky a Jonak, 2011).



Obr. č. 5 - Proteinkinázová regulace při stresu. Podle Krasensky a Jonak, 2011.

Zatímco ABA a některé protein kinázy mohou stimulovat akumulaci prolinu, pšeničná protein fosfatáza typu 2C negativně reguluje stresem indukovanou akumulaci prolinu a toleranci k hyperosmotickému stresu. PP2Cs jsou zapojeny v regulačních procesech včetně vývoje a odpovědi na enviromentální stres. Ukazuje se, že negativně regulují stresem indukované MAPK a SnRK2 protein kinázy (Krasensky a Jonak, 2011).

8.2.3 *MAPK kaskáda*

MAPK kaskáda využívá k regulaci buněčných funkcí při odpovědi na externí podněty fosforylaci proteinů. Aktivace kaskády vyžaduje fosforylaci THR a TYR zbytků v takzvaném TEY (THR, GLU, TYR) aktivačním loopu specifickou MAPKK. MAPK kaskáda může indukci

exprese signálních složek a substrátů v cílových buňkách zprostředkovat signalizaci extracelulárních stimulů a vyvolat specifické odpovědi. MAPK kaskáda integruje celou řadu upstream signálů prostřednictvím interakce s dalšími kinázami nebo G-proteiny (Robinson a Cobb, 1997). G-proteiny často slouží přímo jako spojovací prostředek mezi receptory na plasmatické membráně, které přijímají extracelulární stimuly a cytoplasmou.

Geny *AtMEKK1* a *AtMPK3* jsou aktivovány dehydratací a chladem. *AtMPK4* a *AtMPK6* jsou posttranslačně modifikovány chladem, osmotickým stresem a poraněním (Bartels a Sunkar, 2005).

8.2.4 Fosfolipidová signalizace

Osmotický stres vede ke změnám membránové fluidity, a tedy k vlivu na fosfolipidy (Munnik a Meijer, 2001). Fosfolipidy jsou štěpeny fosfolipázami, čímž dochází k produkci sekundárních poslů. Rozlišujeme 4 hlavní třídy fosfolipáz, a to PLC, PLD, PLA1, PLA2. Hlavními signálními molekulami fosfolipidové signalizace jsou IP₃, DAG a PA. Fosfolipidová signalizace může být regulována G-proteiny a také může být propojena s vápníkovou signalizací.

PLC štěpí fosfolipid PIP₂ na solubilní IP₃ a membránově vázaný DAG. IP₃ uvolňuje Ca²⁺ ionty z vnitřních zásob (Schroeder et al., 2001), zatímco DAG se může konvertovat na PA. U *Arabidopsis* bylo prokázáno, že osmotický stres výrazně zvyšuje syntézu PIP₂, protože dochází k nárůstu transkriptů PIP5K, která syntetizuje PIP₂. Za mechanismus adaptace k suchu je považována suchem indukovaná aktivace PI-PLC, která vede přes IP₃ k nárůstu cytosolického Ca²⁺ ve svěracích buňkách průduchů a následnému zavření průduchů. Gen *AtPLC1* je indukován při dehydrataci, salinitě a nízkých teplotách (Bartels a Sunkar, 2005).

PA je sekundárním poslem, který v živočišných buňkách aktivuje PLC a PKC (Munnik a Meijer, 2001). Kyselina fosfatidová je syntetizována rozštěpením PLD. Rostlinné PLD se od živočišných odlišují přítomností nejen konzervovaných katalytických motivů, ale i Ca²⁺ vazebné domény. To ukazuje na přímou regulaci PLD kalcium (Bartels a Sunkar, 2005). Zvýšená aktivita PLD se shoduje s nárůstem množství PA při reakci na dehydrataci a koreluje se stresem ze sucha u *Vigna unguiculata* (El-Maarouf et al., 1999). Podobně jako PLC, má PLD vliv na regulaci stomatální apertury během osmotického stresu. Uzavírání průduchů je zprostředkováno aktivitou PLD ve svěracích buňkách v rámci odpovědi na vodní stres. Gen *CpPLD1*, je konstitutivně exprimován a je začleněn spíše do časných reakcí při dehydrataci. Gen *CpPLD2* se účastní přestavby membrán v pozdějších fázích dehydratace (Bartels a Sunkar, 2005).

8.2.5 *Vápníková signalizace*

V rostlinných buňkách funguje vápník jako sekundární posel propojující extracelulární stimuly s intracelulárními odpověďmi (Snedden a Fromm, 2001). Zapojení Ca^{2+} signalizace do odpovědi na osmotický stres je dobře zdokumentováno. V případě zasolení způsobuje NaCl rapidní nárůst cytosolického Ca^{2+} , což vyvolává aktivaci signální transdukční dráhy, která vede k regulaci enzymatické aktivity, aktivity iontových kanálů a genové exprese, dává tak vzniknout rozdílným buněčným odpovědím (Snedden a Fromm, 2001), které vedou k adaptaci k salinitě. Byly pozorovány buněčně specifické změny v množství cytosolického vápníku v kořenových buňkách *Arabidopsis* v odpovědi na sucho, salinitu a nízké teploty (Bartels a Sunkar, 2005).

Rozpoznáváme 3 hlavní třídy Ca^{2+} senzorů, kalmodulin, CDPKs a CBLs. Existuje řada důkazů, že tyto 3 třídy senzorů jsou zahrnuty v signální stresové transdukci (Snedden a Fromm, 2001). CDPKs, které jsou indukované osmotickým stresem, byly zaznamenány u několika rostlinných druhů. Vápník vazebné proteiny částečně regulují intracelulární množství vápníku a také následně indukují specifické kinázy. Rodina kalmodulin vázajících aktivátorů transkripce byla poprvé objevena u suchem stresované *Brassica napus*. Sucho, zasolení, chlad a poranění indukují transkripty *AtCBL1*. Rostliny over-exprimující CBL1 vykazují toleranci k suchu (Bartels a Sunkar, 2005).

8.3 Transkripční regulace genové exprese

Transkripční regulace genové exprese závisí na interakci transkripčních faktorů s cis-regulační sekvencí. Fosforylace regulačních proteinů je hlavní způsob kontroly genové exprese. Existují dvě třídy DNA cis elementů reagujících na sucho, a to ABREs a DREs.

ABRE a DRE elementy jsou součástí odlišných signálních drah, které jsou obě vyvolány stresem sucha. Jedna z nich ale využívá signalizaci kyseliny abscisové (Bartels a Sunkar, 2005).

8.3.1 *ABA-dependentní dráha*

ABA-dependentní dráha využívá k signalizaci cADPR, NAADP a Ca^{2+} . Jako transkripční faktory se v ní uplatňují bZIPs, které obsahují DNA vazebnou doménu bohatou na bazické zbytky. bZIP transkripční faktory ovlivňují již výše zmíněné ABRE cis elementy a hrají roli v odpovědi na dehydrataci a salinitu na transkripční a posttranskripční úrovni (Bartels a Sunkar, 2005).

Příkladem transkripčních faktorů patřících do bZIP jsou: AREB1/ABF2, AREB2/ABF4, ABF3 ovlivňující *rd29b* geny. Over-exprese ABF3 a ABF4 u transgenní *Arabidopsis* vede ke zvýšení tolerance k suchu díky zprostředkované indukci uzavření průduchů (Kang et al., 2002). Promotory obou transkripčních faktorů byly nalezeny nejaktivnější v kořeni a ve svěřacích buňkách, což potvrzuje jejich roli v regulaci průduchů a v odpovědi na vodní stres (Bartels a Sunkar, 2005).

8.3.2 *ABA-independentní dráha*

ABA-independentní dráha využívá k signalizaci také ionty Ca^{2+} , ale kromě nich i PLC a IP3. Jako transkripční faktory se zde vyskytují DREBs/CBFs, které interagují s DRE cis elementy.

CBF/DREB1 proteiny patří do rodiny AP2/EREBP transkripčních faktorů. CBF1/DREB1B, CBF2/DREB1C, CBF3/DREB1A hrají důležitou roli v transkripčních reakcích na osmotický stres (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2006). Over-exprese těchto transkripčních faktorů u *Arabidopsis* zvyšuje toleranci k mrazu, suchu a salinitě. Rostliny over-exprimující CBF/DREB1 akumulují vysoké množství prolinu a solubilních cukrů i při růstu v normálních růstových podmínkách a během aklimace k chladu (Gilmour et al., 2000). CBF4/DREB1D aktivuje genovou expresi genů odpovídajících na stres dehydratací a navozuje toleranci ke stresu (Bartels a Sunkar, 2005).

DRE je základním cis elementem pro regulaci indukce genu *rd29A*, který je také znám jako *COR 78* a je indukován při suchu, salinitě, chladu či působení ABA) v odpovědi na dehydrataci u *Arabidopsis thaliana*. Dalšími stresem indukovanými geny jsou: *Cor 15a*, *Kin1* (Bartels a Sunkar, 2005).

8.4 Ochranné proteiny a další produkty signálních drah indukovaných suchem

U *Arabidopsis* i rýže bylo nalezeno mnoho podobností, co se týče produktů genů indukovaných stresem, což ukazuje, že ačkoliv jsou to rozdílné rostlinné druhy, evolučně oddělené více jak milion let, sdílejí podobné geny pro odpovědi ke stresu (Shinozaki a Yamaguchi-Shinozaki, 2006).

8.4.1 *Dehydriny*

Dehydriny jsou extrémně hydrofilní proteiny, které chrání biomembrány u zrajících semen, ale také se akumulují v prýtu a kořeni během adaptace k suchu i chladu. Akumulace dehydrinů může být indukována suchem, chladem, salinitou, kys. abscisovou i methyl

jasmonátem.

Dehydriny se pohybují ve velikosti v rozmezí 9 – 200 kDa, jsou termostabilní a obsahují velké množství glycinových a leucinových zbytků. Dále chrání lipidové agregáty a hydrofobické domény proteinů. Dehydriny se vyskytují v cévnatých rostlinách, mechu, kaprad'orostech, lišejnících a řasách. Z nejodolnější rostliny vůči suchu *Cicer pinnatifidum* byl izolován jeden dehydrinový gen *DHNI*. Exprese *DHNI* je indukována suchem, salinitou, kyselinou abscisovou a během vývoje semene (Beck, 2007).

LEA geny kódují ochranné proteiny proti stresu exprimované během klíčení embrya u všech krytosemenných rostlin. Akumulace *LEA* proteinů během embryogeneze je nezbytná pro přežití protoplasmatického vyčerpání vody a koreluje s nárůstem *ABA* a nabytím tolerance k vysušení. *LEA* proteiny se dělí do několika podskupin podle aminokyselinového složení a funkce. Některé hrají roli ve vazbě vody, další přispívají k udržování proteinů a membránových struktur. *LEA* proteiny nejsou normálně exprimovány ve vegetativních pletivech, ale jsou indukovány osmotickým stresem nebo exogenní aplikací *ABA* (Ingram a Bartels, 1996).

8.4.2 *Heat Shock Proteiny (HSPs)*

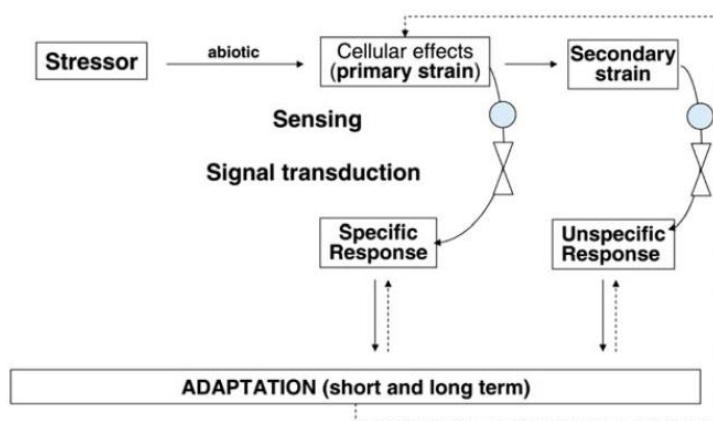
HSPs působí jako chaperony. Zajišťují zaujetí správné konformace při sestavování proteinových komplexů, umožňují renaturaci proteinu, avšak neovlivňují rychlost skládání proteinu. Molekulová hmotnost *HSP* se pohybuje od 15 do 104 kDa. V cytosolu, jádře, mitochondriích, plastidech a endoplasmatickém retikulu se vyskytují různé druhy *HSP*. Náhlý i postupný vzestup teploty vyvolá zvýšení hladiny přítomných *HSPs* i syntézu nových typů. Syntézu některých z nich mohou navodit i jiné nepříznivé podmínky než je vysoká teplota, např. nedostatek vody, nízká teplota, vysoký obsah iontů, poranění. Akumulace *HSPs* se shoduje s nabytím tolerance ke stresu (Pavlová, 2005). Transgenní rostliny *Arabidopsis* over-exprimující *AtHSP17.7* akumulují větší množství *HSP* proteinů a vykazují vyšší toleranci k salinitě a suchu (Bartels a Sunkar, 2005).

Geny kódující *HSPs* mají v oblasti promotoru regulační sekvence (*cis* elementy) označované jako *HSEs*. Na tyto oblasti se vážou trimery transkripčních faktorů, jejichž monomery se označují jako *HSFs*. *HSFs* jsou centrálními regulátory genů reagujících na teplotní šok. Over-exprese *HSFA2* vede ke konstitutivní akumulaci galaktinolu a rafinózy a zvýšení tolerance k environmentálním stresům u rostlin *Arabidopsis*. Podobně over-exprese *HSF3/HsfA1b* zvyšuje toleranci k vysokým teplotám (Krasensky a Jonak, 2011).

9. SEKUNDÁRNÍ STRES A JEHO DŮSLEDKY

Sekundární stres vyplývá z důsledků primárního stresu. Oba typy odpovědi vedou k adaptaci a toleranci k enviromentálním stresům.

Stresory indukují specifické a nespecifické odpovědi. Produkty genové exprese zmírňují primární i sekundární vlivy stresu, a tím rostlinu otužují. Následkem je zvýšení tolerance ke stresu a tedy adaptace nebo aklimace k odpovídajícímu stresu (Beck et al., 2007).



Obr. č. 6 – Hlavní koncept stresové reakce. Podle Beck et al., 2007.

9.1 Oxidativní stres a tvorba ROS

Tvorba kyslíkových radikálů, mezi které patří singletový kyslík, superoxidový radikál, hydroxylový radikál a hydrogen peroxid, je sekundárním efektem dehydratace a stresu salinitou. ROS jsou generovány převážně v chloroplastech, kde singletový kyslík vzniká přímým přenosem excitační energie z chlorofylu nebo univalentní redukcí O_2 v PSI (Mehlerova reakce) (Allen, 1995). Některé vznikají i v mitochondriích. Zvýšená koncentrace ROS inhibuje schopnost opravit poškození PSII a také inhibuje syntézu D1 proteinu. Fotorespirace zvýšená stresem a NADPH aktivitou také přispívá k vyšší akumulaci H_2O_2 , což může inaktivovat enzymy oxidací jejich thiolových skupin. H_2O_2 může vznikat vysoce reaktivní hydroxylový radikál, který reaguje se všemi biologickými molekulami (Bartels a Sunkar, 2005).

Zmírnění oxidativního poškození a navození vyšší rezistence ke stresu souvisí s efektivním antioxidačním systémem. Nadprodukce SOD, APX a katalázy navozuje toleranci k oxidativnímu stresu u transgenních rostlin (Allen, 1995). Důležitost antioxidačního systému byla potvrzena experimenty s rostlinami vzkršíšení *Myrothamnus flabellifolia*, které se již nedokázaly obnovit po rehydrataci, pokud byl jejich antioxidační mechanismus při vysušení poškozen. Schopnost obnovy po vysušení souvisí se schopností udržet či resyntetizovat antioxidanty, jako je askorbát, glutathion či alfa-tokoferol. Detoxifikační mechanismy lze

rozdělit podle charakteru antioxidantů. Rozlišujeme neenzymatické antioxidanty, mezi které patří askorbát, glutathion, tokoferol (vit. E), flavonoidy, alkaloidy a karotenoidy. Dále pak enzymatické mechanismy, mezi které řadíme SOD, peroxidázu a katalázu (Bartels a Sunkar, 2005).

Dále jsou v buňce potřebné enzymy detoxifikující aldehydy, neboť ty vznikají peroxidací lipidů působením radikálů, a je potřeba je redukovat na alkoholy. V neposlední řadě také peroxiredoxiny, redukující peroxid na odpovídající alkohol, čímž ochraňují DNA, membrány a enzymy (Bartels a Sunkar, 2005).

10. ZÁVĚR

Tolerance ke stresu je velmi komplexní proces zahrnující řadu metabolitů a signálních drah. I přes vysokou komplexitu mechanismů vzniku odolnosti k suchu, a s tím spojenou náročnost výzkumu, byly v posledních letech zaznamenány výrazné pokroky. Analýzy přizpůsobení metabolismu rostlin s rozdílnými úrovněmi tolerance ke stresu a transgenní výzkumy poskytly poznatky umožňující lépe porozumět roli nejdůležitějších metabolitů v adaptaci na nepříznivé podmínky prostředí. Tyto pohledy na toleranci k suchu přinášejí šlechtitelům poznatky a metody pro tvorbu odolných kultivarů zemědělských plodin. Díky tomu byly získány rostliny se zvýšenou tolerancí jak klasickými, tak i experimentálními přístupy, které zahrnují introdukci vlastností planých druhů odolných ke stresu. Nejnovější slibnou strategií se ukázala over-exprese transkripčních faktorů, jejichž působení přímo nebo nepřímo ovlivňuje celou řadu následných biosyntetických drah nezbytných pro vyšší toleranci ke stresu sucha.

I přes velké množství nových informací jsme stále vzdáleni pochopení kompletního cyklu stresových reakcí. Nutné je se dále zaměřit na molekuly propojující dráhy nebo klíčové komponenty drah, stejně tak lépe zmapovat vlastnosti individuálních genů a jejich příspěvek k toleranci. Kombinace genů rozdílných drah, posílení reparačních a detoxifikačních mechanismů představuje strategii, která umožní získat rostliny s vysokou tolerancí ke stresu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ACEVEDO, E., FERERES, E., HSIAO, T. C., HENDERSON, D. W.. Diurnal growth trends, water potential, and osmotic adjustment of maize and sorghum leaves in the field (1979). *Plant Physiology*, 64, (3), 476-480.
- ALLAN, A. C., FRICKER, M. D., WARD, J. L., BEALE, M. H., TREWAVAS, A. J.. Two Transduction Pathways Mediate Rapid Effects of Abscisic Acid in Commelina Guard Cells (1994). *Plant Cell*, 6, (9), 1319-1328.
- ALLEN, R.. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants (1995). *Plant Physiology*, 107, (4), 1049-1054.
- ARONDEL, V., VERGNOLLE, C., CANTREL, C., KADER, J. K.. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in Arabidopsis thaliana (2000). *Plant Science*, 157, (1), 1-12.
- ASHRAF, M., FOOLAD, M. R.. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance (1993). *The Plant Journal*, 4, (2), 215-223.
- ASSMANN, S. M.. Signal Transduction in Guard Cells (1993). *Annual Review of Cell Biology*, 9, (1), 345-375.
- BARTELS, D., SUNKAR, R.. Drought and Salt Tolerance in Plants (2005). *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, (1), 23-58.
- BECK, E. H., FETTIG, S., KNAKE, C., HARTIG, K., BHATTARAI, T.. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress (2007). *Journal of Biosciences*, 32, (3), 501-510.
- BEWLEY, J. D.. Physiological Aspects of Desiccation Tolerance (1979). *Annual Review of Plant Physiology*, 30, (1), 195-238.
- BJÖRKMAN, O., POWLES, S. B., GATES, D. M.. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level (1984). *Planta*, 161, (6), 490-504.
- BLATT, M. R., GRABOV, A.. Signalling gates in abscisic acid-mediated control of guard cell ion channels (1997). *Physiologia Plantarum*, 100, (3), 481-490.
- BOYER, J. S.. Plant Productivity and Environment (1982). *Science*, 218, (4571), 443-448.
- BRIGGS, G. M., JURIK, T. W., GATES, D. M.. Non-stomatal limitation of CO₂ assimilation in three tree species during natural drought conditions (1986). *Physiologia Plantarum*, 66, (3), 521-526.
- CUTLER, S., GHASSEMIAN, M., BONETTA, D., COONEY, S., MCCOURT, P.. A Protein Farnesyl Transferase Involved in Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis (1996). *Science*, 273, (5279), 1239-1241.
- DELAUNEY, A. J., VERMA, D. P. S.. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants (1993). *The Plant Journal*, 4, (2), 215-223.
- EL-MAAROUF, H., ZUILY-FODIL, Y., GAREIL, M., D'ARCY-LAMETA, A., PHAM-THI, A. T.. Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of Vigna unguiculata L. Walp. differing in drought tolerance (1999). *Plant Molecular Biology*, 39, 6, 1257-1265.
- EUN, S. O., LEE, Y.. Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid (1997). *Plant Physiology*, 115, (4), 1491-1498.
- FANG, X., QUI, F., YAN, B., WANG, H., MORT, A. J., STARK, R. E.. NMR studies of molecular structure in fruit cuticle polyesters (2001). *Phytochemistry*, 57, (6), 1035-1042.
- FELLOWS, R. J., BOYER, J. S.. Altered ultrastructure of cells of sunflower leaves having low water potentials (1978). *Protoplasma*, 93, (4), 381-395.
- GIBSON, A. C.. Photosynthetic organs of desert plants (1998). *Bioscience*, 48, (11), 911-920.
- GILL, D. S., MAHALL, B. E.. Quantitative phenology and water relations of an evergreen and a deciduous chaparral shrub (1986). *Ecological monographs*, 56, (2), 127-143.

- GILMOUR, S. J., SEBOLT, A.M., SALAZAR, M. P., EVERARD, J. D., THOMASHOW, M. F. Overexpression of the Arabidopsis CBF3 Transcriptional Activator Mimics Multiple Biochemical Changes Associated with Cold Acclimation (2000). *Plant Physiology*, 124, 4, 1854-1865.
- GOODWIN, S. M., JENKS, M. A.. Plant cuticle fiction as a barrier to water loss. *In: Plant Abiotic Stress*. Jenks, M. A., Hasegawa, P. M., eds.. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 14-36, vyd. 1., ISBN 14-051-2238-2.
- GROPPA, M. D., BENAVIDES, M. P.. Polyamines and abiotic stress: recent advances (2008). *Amino Acids*, 34, (1), 35-45.
- HOLBROOK, N. M., SINCLAIR, T. R.. Water balance in the arborescent palm, Sabal palmetto. II. Transpiration and stem water storage (1992). *Plant, Cell and Environment*, 15, (4), 401-409.
- CHEN, T. H. H., MURATA, N.. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes (2002). *Current Opinion in Plant Biology*, 5, (3), 250-257.
- CHEN, T. H. H., MURATA, N.. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications (2011). *Plant*, 34, (1), 1-20.
- INGRAM, J., BARTELS, D.. The molecular basis of dehydration tolerance in plants (1996). *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, (1), 377-403.
- IUCHI, S. A Stress-Inducible Gene for 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Involved in Abscisic Acid Biosynthesis under Water Stress in Drought-Tolerant Cowpea (2000). *Plant Physiology*, 123, (2), 553-562.
- JEFFREE, C. E.. Structure and ontogeny of plant cuticles (1996). *In: Plant cuticles: an integrated functional approach*. Kerstiens, G., ed.. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 1996, 33-82, ISBN 18-599-6130-4.
- JENKS, M. A., EIGENBRODE, S. D., LEMIEUX, B.. Cuticular Waxes of Arabidopsis (2002). *The Arabidopsis Book*, 29, (1), 1-.
- JENKS, M. A., RICH, P. J., PETERS, P. J., AXTELL, J. D., ASHWORTH, E. N.. Epicuticular wax morphology of bloomless (bm) mutants in Sorghum bicolor (1992). *International Journal of Plant Sciences*, 153, (3), 311-319.
- JETTER, R., SCHAFFER, S., RIEDERER, M.. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from Prunus laurocerasus L. (2000). *Plant, Cell and Environment*, 23, (6), 619-628.
- KANG, J., CHOI, H., IM, M., KIM, S. Y.. Arabidopsis Basic Leucine Zipper Proteins That Mediate Stress-Responsive Abscisic Acid Signaling (2002). *Plant Cell*, 14, (2), 343-357.
- KAPLAN, F., GUY, C. L.. β -Amylase Induction and the Protective Role of Maltose during Temperature Shock (2004). *Plant Physiology*, 135, (3), 1674-1684.
- KEMPA, S., KRASENSKY, J., DAL SANTO, S., KOPKA, J., JONAK, C.. A Central Role of Abscisic Acid in Stress-Regulated Carbohydrate Metabolism (2008). *PLoS One*, 3, (12), 3935-.
- KIM, K.-N., CHEONG, Y. H., GUPTA, R., LUAN, S.. Interaction Specificity of Arabidopsis Calcineurin B-Like Calcium Sensors and Their Target Kinases (2000). *Plant Physiology*, 124, (4), 1844-1853.
- KNOCH, M., PESCHEL, S., HINZ, M., BUKOVAC, M. J.. Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface: characterizing conductance of the cuticular membrane using pericarp segments (2000). *Planta*, 212, (1), 127-135.
- KOSTER, K. L.. Glassformation and desiccation tolerance in seeds (1991). *Plant Physiology*, 96, (1), 302-304.
- KRASENSKY, J., JONAK, C.. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory network (2012). *Journal of Experimental Botany*, 63, (4), 1593-1608.
- LUAN, S.. Immunosuppressants Implicate Protein Phosphatase Regulation of K Channels in Guard Cells (1993). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, (6), 2202-2206.
- LUAN, S.. Signalling drought in guard cells (2002). *Plant, Cell and Environment*, 25, (2), 229-237.
- MACROBBIE, E. A. C.. Signalling in guard cells and regulation of ion channel activity (1997). *Journal of Experimental Botany*, 48, 515-528.

- MULROY, T. W., RUNDEL, P. W.. Annual plants. Adaptions to desert environments (1977). *Bio Science*, 27, (2), 109-114.
- MUNNIK, T., MEIJER, H. J. G.. Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants (2001). *FEBS Letters*, 498, (2), 172-178.
- NEINHUIS, C., KOCH, K., BARTHLOTT, W., KADER, J. K.. Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles (2001). *Planta*, 213, (3), 427-434.
- NILSEN, E. T., ORCUTT, D. M.. *The physiology of plants under stress*. Wiley, New York, 1996, vyd.2, ISBN 0-471-03512-6.
- ÖGREN, E., ÖQUIST, G.. Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves (1985). *Planta*, 166, (3), 380-388.
- OLIVER, M. J., TUBA, Z., MISHLER, B. D.. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants (2000). *Plant Ecology*, 151, (1), 85-100.
- OSBORN, J. M., TAYLOR, T.N.. Morphological and Ultrastructural Studies of Plant Cuticular Membranes. I. Sun and Shade Leaves of *Quercus velutina* (Fagaceae) (1990). *Botanical Gazette*. 151, (4), 465-476.
- PAVLOVÁ, Libuše. *Fyziologie rostlin*. Karolinum, Praha, 2005, ISBN 80-246-0985-1.
- PEI, Z. M., GHASSEMIAN, M., KWAK, C. M., MCCOURT, P., SCHROEDER, J. I.. Role of Farnesyltransferase in ABA Regulation of Guard Cell Anion Channels and Plant Water Loss (1998). *Science*, 282, (5387), 287-290.
- PESACRETA, T. C., HASENSTEIN, K.H.. The internal cuticle of *Cirsium horridulum* (Asteraceae) leaves (1999). *American Journal of Botany*, 86, (7), 923-938.
- PHILLIPS, J. R., OLIVER, M. J., BARTELS, D.. Molecular genetics of desiccation and tolerant systems. In: *Desiccation and Survival in Plants*. Black, M., and Pritchard, H., eds.. CAB International, New York, 2002, vyd. 1., ISBN 0-85199-534-9.
- PILON-SMITS, E. A. H., EBSKAMP, M. J. M., PAUL, M. J., JEUKEN, M. J. W., WEISBEEK, P. J., SMEEKENS, S. C. M.. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress (1995). *Plant physiology*, 107, (1), 125-130.
- POLJAKOFF-MAYBER, A.. Ultrastructural consequence of drought. In: *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Paleg, L. G., Aspinall, D., eds.. Academic Press, New York, 1981, 389-403, ISBN 01-254-4380-3.
- POREMBSKI, S., BARTHLOTT, W.. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants (2000). *Plant Ecology*, 151, (1), 19-28.
- PROCHÁZKA, Stanislav. *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha, 1998, vyd. 1., ISBN 80-200-0586-2.
- QUATRANO, R. S., BARTELS, D., HO, T. H. D., PAGES, M.. New insights into ABA-mediated processes (1997). *Plant cell*, 9, (4), 470-475.
- RASHOTTE, A. M., FELDMANN, K. A.. Correlations between epicuticular wax structures and chemical composition in *Arabidopsis thaliana* (1998). *International Journal of Plant Sciences*, 159, (5), 773-779.
- RENAULT, H., ROUSSEL, V., EL AMRANI, A., ARZEL, M., RENAULT, D., BOUCHEREAU A., DELEU, C.. The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance (2010). *BMC Plant Biology*, 10, (1), s. 20-.
- RHOADES, J. D., LOVEDAY, J.. Salinity in irrigated agriculture. In: *Irrigation of agricultural crop*. Steward, B., Nielsen, D. R., eds. American Society of Agronomy, Madison, 1990, 1089-1142, ISBN 08-911-8102-4.
- RHODES, D., HANSON, A. D.. Quaternary Ammonium and Tertiary Sulfonium Compounds in Higher Plants: mechanisms and biotechnological applications (1993). *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44, (1), 357-384.
- RIEDERER, M., SCHREIBER, L.. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles

(2001). *Journal of Experimental Botany*, 52, (363), 2023-2032.

RIZHSKY, L., LIANG, H. J., SHUMAN, J., SHULAEY, V., DAVLETOVA, S.. When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress (2004). *Plant Physiology*, 134, (4), 1683-1696.

ROBERTS, D. M., HARMON, A. C.. Calcium-Modulated Proteins: Targets of Intracellular Calcium Signals in Higher Plants (1992). *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, (1), 375-414.

ROBINSON, M. J., COBB, M. H.. Mitogen-activated protein kinase pathways (1997). *Current Opinion in Cell Biology*, 9, (2), 180-186.

SANTIAGO, J., DUPEUX, F., ROUND, A., ANTONI, R., PARK, S.-Y., JAMIN, M., CUTLER, S. R., RODRIGUEZ P. L., MÁRQUEZ, J. A.. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid (2009). *Nature*, 462, (7273), 665-668.

SHELP, B. J., BOWN, A. W., MCLEAN, M. D.. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid (1999). *Trends in Plant Science*, 4, (11), 446-452.

SHEVELEVA, E., CHMARA, W., BOHNERT, H. J., JENSEN, R. G.. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L (1997). *Plant physiology*, 115, (3), 1211-1219.

SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.. Gene networks involved in drought stress response and tolerance (2006). *Journal of Experimental Botany*, 58, (2), 221-227.

SCHACHTMAN, D. P., GOODGER, J. Q. D.. Chemical root to shoot signaling under drought (2008). *Trends in Plant Science*, 13, (6), 281-287.

SCHROEDER, J. I., HAGIWARA, S.. Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells (1989). *Nature*, 338, (6214), 427-430.

SCHROEDER, J. I., KWAK, J. M., ALLEN, G. J.. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants (2001). *Nature*, 410, (6826), 327-330.

SIEFRITZ, F., TYREE, M. T., LOVISOLO, C., SCHUBERT, A., KALDENHOFF, R.. PIP1 Plasma Membrane Aquaporins in Tobacco: From Cellular Effects to Function in Plants (2002). *Plant Cell*, 14, (4), 869-876.

SILVA, J. V. D.. Some Ultrastructural and Enzymatic Effects of Water Stress in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Leaves (1974). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71, (8), 3243-3247.

SNEDDEN, W. A., FROMM, H.. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants (2001). *New Phytologist*, 151, 1, 35-66.

STREETER, J. G., LOHNES, D. G., FIORITTO, R. J.. Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance (2001). *Plant, Cell and Environment*, 24, (4), 429-438.

SZABADOS, L., SAVOURÉ, A.. Proline: a multifunctional amino acid (2010). *Trends in Plant Science*, 15, 89-97.

TAMURA, T., HARA, K., YAMAGUCHI, Y., KOIZUMI, N., SANO, H.. Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants (2003). *Plant Physiology*, 131, (2), 454-462.

VIJN, I., SMEEKENS, S.. Fructan: More than a reserve carbohydrate? (1999). *Plant Physiology*, 120, (2), 351-360.

VOGG, G., FISCHER, S., LEIDE, J., EMMANUEL, E., JETTER, R., LEVY, A. A., RIEDERER, M.. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase (2004). *Journal of Experimental Botany*, 55, (401), 1401-1410.

WARD, J. M., PEI, Z. M., SCHROEDER, J. I.. Roles of Ion Channels in Initiation of signal transduction in higher plants (1995). *Plant Cell*, 7, (7), 833-844.

WOOD, A. J.. Eco-physiological Adaptations to Limited Water Environments. In: *Plant Abiotic Stress*. Jenks, M. A., Hasegawa, P. M., eds.. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2005, 1-13, vyd. 1., ISBN 14-051-2238-2.