

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Radek Vítek

Moderní přístupy využívané ve šlechtění rostlin na odolnost vůči hypoxii

Modern approaches utilized in plant breeding for resistance to hypoxia

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Marie Kočová, CSc.

Praha, 2019

Poděkování:

Nejdříve bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Marii Kočové, CSc. nejen za čas, úsilí, podnětné rady a odbornou pomoc, kterou mi poskytovala při zpracovávání mé bakalářské práce, ale také za podporu v mimostudijních záležitostech. Současně bych chtěl poděkovat také své rodině a všem přátelům, kteří mě při vytváření této práce podpořili, a bez jejichž pomoci by nebylo možné práci dokončit.

Prohlášení:

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

V Praze, 16. 08. 2019

Podpis

Seznam zkratek:

ABA – kyselina abscisová (abscisic acid)

IAA – auxin (indoleacetic acid)

ET – ethylen

ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

ROL – radiální ztráty kyslíku (radial oxygen lost)

PDC – pyruvát dekarboxyláza

ADH – alkohol dehydrogenáza

LDH – laktát dehydrogenáza

MRI – magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)

PET – pozitronová emisní tomografie

CT – počítačová tomografie (computer tomography)

NO^{3-} – dusičný anion

NO^{2-} – dusičnatý anion

Fe^{3+} – železitý kation

Fe^{2+} – železnatý kation

SO^{4-} – sírový anion

H_2S – sulfan

Abstrakt

V současné době dochází v souvislosti s globální změnou klimatu ke značnému nárůstu variability lokálních klimatických podmínek a významným výkyvům počasí. Tyto výkyvy vedou mimo jiné i k nadměrnému zaplavení, které patří k nejvýznamnějším abiotickým stresovým faktorům, s nimiž se rostliny musí umět vypořádat, aby nebyl negativně ovlivněn jejich růst, vývoj, požadavky na kvalitu a produkci. Proto musí být šlechtitelské postupy orientovány na hledání a tvorbu genotypů, které budou odolné i za takovýchto nepříznivých podmínek pěstování a nebudou ovlivněny jejich kvalitativní ani kvantitativní produkční charakteristiky. Současné šlechtitelské programy proto musí být orientovány na využívání nových metodických přístupů, které umožní podstatně zrychlit selekci takovýchto genotypů. Jedná se především o využití poznatků molekulární genetiky a jejich propojení se spolehlivým a komplexním vyhodnocením fenotypů (fenotypizace). Účinná a nepřiliš náročná fenotypizace by pak umožňovala selekci perspektivních, v případě abiotických stresových faktorů, odolných genotypů. Fenotypizace představuje významný nástroj k charakterizaci znaků v závislosti na konkrétních podmínkách a umožňuje hledání nových odrůd s požadovanými vlastnostmi.

Klíčová slova: zaplavení, hypoxie, molekulární šlechtění, fenotypizace,

Abstract

Currently there is a significant increase in variability of local climatic conditions and significant weather fluctuations in the context of global climate change. These fluctuations direct, except other things, to excessive flooding, which is one of the most important abiotic stress factors that plants must be able to cope with in order not to adversely affect their growth, development, quality and production requirements. That is why breeding practices must be directed towards the search and genotyping, that will be resistant even under such unfavorable growing conditions and will not affect their qualitative and quantitative production characteristics. Current breeding programs must be therefore oriented towards the using of new methodological attitudes that will make it possible to significantly accelerate the selection of such genotypes. It is mostly about using knowledge of molecular genetics and their interconnection with reliable and complex evaluation of phenotypes (phenotyping). Effective and not very demanding phenotyping with the help of selection of prospective, in the case of abiotic stress factors, resistant genotypes. Phenotyping is an important tool for characterization of traits depending on specific conditions and enables searching for new varieties with the required characteristics.

Key words: waterlogging, flooding, molecular breeding, phenotyping

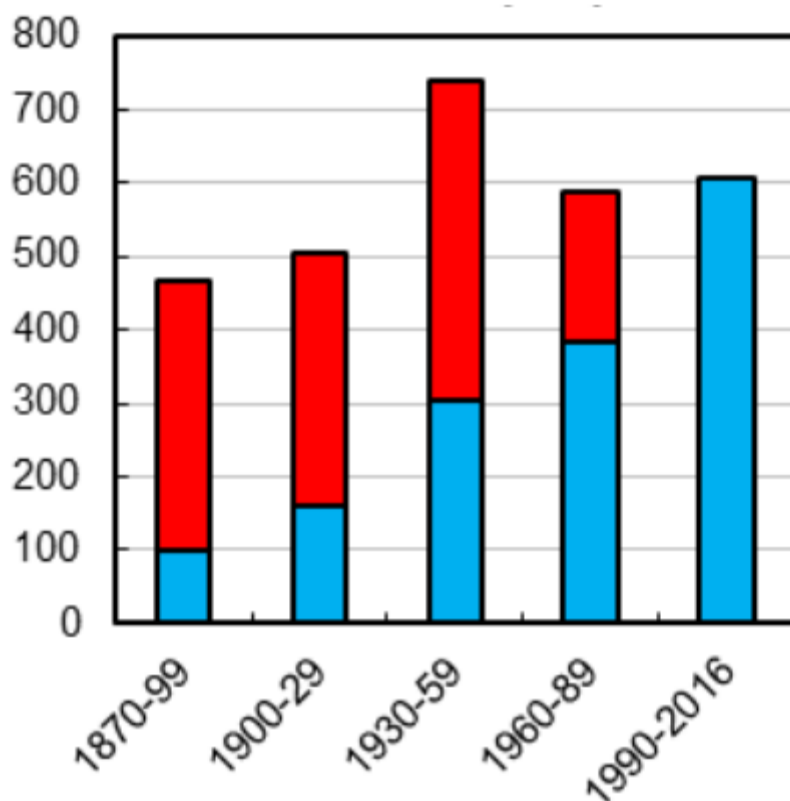
Obsah:

1. Úvod.....	1
2. Vliv nadměrného množství vody na rostliny	3
2.1. Vliv zaplavení na vlastnosti půdy.....	3
2.2. Vliv zaplavení na kořeny.....	4
2.3. Vliv zaplavení na prýt	4
2.4. Význam ethylenu při zaplavení.....	5
2.4.1. Aerenchym.....	6
2.4.2. Změny metabolismu při zaplavení.....	7
3. Molekulární šlechtění rostlin.....	9
3.1. Klasický přístup šlechtění rostlin	9
3.2. Využití moderních metod šlechtění.....	9
3.2.1. Agroinfiltrace.....	10
3.2.2. Biolistika.....	10
3.2.3. Transformace pomocí CRISPR/Cas9 systému	11
3.3. Potenciální cíle molekulárního šlechtění na odolnost vůči zaplavení a hypoxii	12
4. Fenotypizace.....	15
4.1. Destruktivní metody	15
4.2. Nedestruktivní metody	15
4.2.1. Zobrazovací metody.....	16
4.2.2. QTL mapování.....	17
4.3. Potenciál a perspektiva „omik“	18
5. Závěr.....	21
Přehled literárních zdrojů	22

1. Úvod

Mezi nejvýznamnější abiotické stresové faktory, kterým jsou rostliny mnohdy opakovaně vystaveny, patří nadměrné zaplavení. Každoročně je zaplaveno 17 milionů km² zemského povrchu, roste počet záplav (Obr. 1) a způsobené škody představují zhruba 60 miliard eur (cca 1 500 miliard korun) (www.dartmouth.edu/~floods/Archives/2005sum.htm). V důsledku klimatických změn a globálního oteplování se narušuje i globální vodní cyklus. Udává se, že při oteplení o 2-3 °C se cyklus zintenzivní o 16-24 %, což způsobí silnější evaporaci vláh ze zemského povrchu, ale na druhou stranu i větší spad srážek (v závislosti na geografických podmínkách) (Durack *et al.*, 2012). Suché oblasti se tak budou stávat suššími a naopak oblasti s větším množstvím srážek budou více postiženy dešti (Voeselek & Sasidharan, 2013).

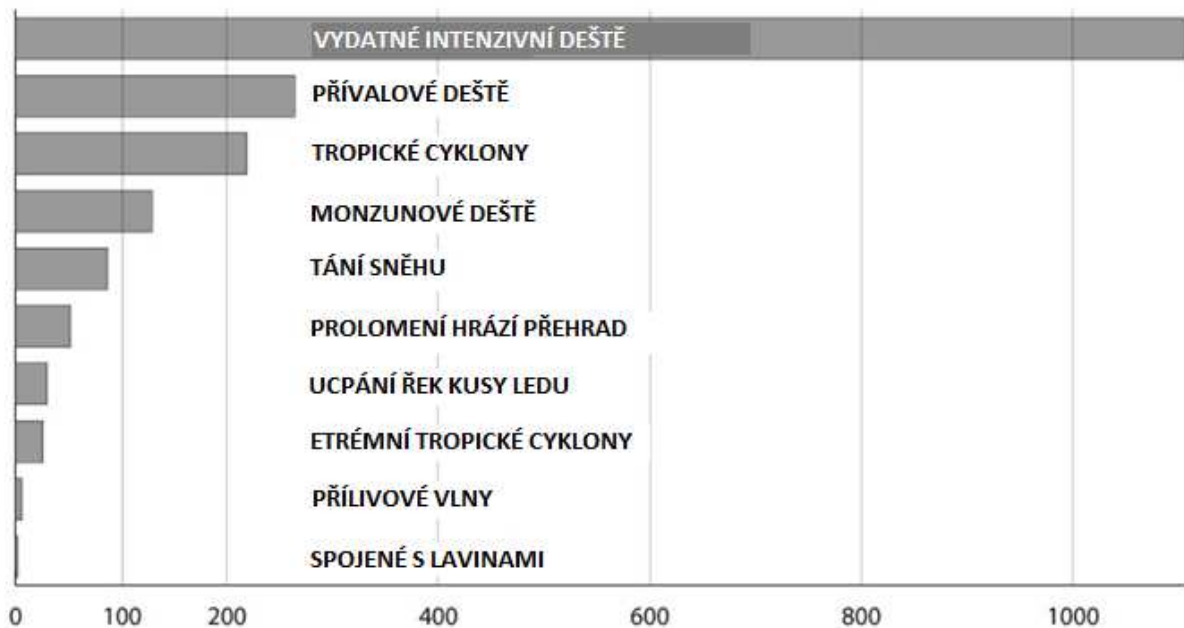
Počet záplav v jednotlivých obdobích



Obr. 1: Celosvětové srovnání počtu záplav mezi lety 1970-2016. Červeně jsou označeny nedostatečně nahlášené události, modře ověřené. Je možné pozorovat trend v narůstajícím počtu událostí. Převzato a upraveno podle Paprotny *et al.*, 2018.

Hlavní příčinou záplav jsou dlouhotrvající intenzivní deště (Obr. 2), kdy se voda nevsakuje, neodtéká a zůstává na povrchu půdy. Její přebytek tak přímo (porosty poléhají, jsou poškozené od tekoucí vody) či nepřímo (následná hypoxie, rozvoj houbových a bakteriálních chorob) poškozuje zemědělské porosty a výnosy. V současné době populačního růstu a omezené expanze zemědělských ploch je tedy nutné vytvářet odolné kultivary a odrůdy nejen k zaplavení, ale i dalším stresovým faktorům. Proto se klade důraz na rozvoj a využití na moderních

technologických postupů, které dovolují rychlou a účinnou produkci nových odolných odrůd kulturních rostlin.



Obr. 2: Shrnutí hlavních příčin záplav/povodní v celosvětovém měřítku. Na ose x množství případů, na ose y typy událostí Převzato a upraveno <http://www.dartmouth.edu/~floods/archiveatlas/cause.htm>

Cílem mé bakalářské práce bylo shrnout změny spojené s nadbytkem vody v okolí rostliny a jejich dopad na vývoj a růst rostlin. Najít potencionální cíle, na které se dá během šlechtění zaměřit a shrnout metody, které umožňují rychlé a cílené šlechtění. Dále shrnout a porovnat metody účinné selekce na odolnost vůči nadměrnému zaplavení pomocí fenotypizace.

2. Vliv nadměrného množství vody na rostliny

V průběhu ontogeneze jsou rostliny vystavovány různým abiotickým, biotickým a antropogenním stresovým faktorům. Abiotické faktory představují změny v rámci neživé složky biosféry, tedy půdy, vody, vzduchu a počasí. Jedná se o stres chladem nebo mrazem, zasolením, suchem, zaplavením, vysokou teplotou či změnou ozáření. Působí obvykle delší dobu a často kombinovaně (například zasolení a nedostatek vody, nebo silná ozáření a vysoká teplota). Biotické faktory představují působení ostatních živých organismů, jako jsou škůdci a houbové, bakteriální a virové rostlinné patogeny. Antropogenní faktory vznikají jako následek působení lidské činnosti a jedná se například o škodliviny v ovzduší a kyselé deště. V dnešní době klimatických změn představuje jeden z nejvýznamnějších stresových faktorů sucho, nebo naopak přemíra srážek a následné zaplavení půdy (v závislosti na geografických podmínkách). Zaplavení však není jen o hypoxii, ale jedná se o množství změn, které dohromady představují výrazný stresový faktor pro rostliny. Na rostlinu při tom působí na více úrovních, kterým se budu dále věnovat.

2.1. Vliv zaplavení na vlastnosti půdy

Za normálních podmínek má půda ideálně drobovitou strukturu, což umožňuje pohyb plynů a vody a rostliny jsou zásobovány optimálním množstvím kyslíku. Tento stav označovaný jako normoxie může být narušený např. utužením půdy z důvodu nevhodných agrotechnických postupů, které vedou k omezení difuze plynů. Hlavní příčinou jsou dlouhotrvající deště, při nichž často dochází k překročení polní kapacity půdy, tedy maximálního množství vody, které je půda schopna vsáknout. Záleží při tom na struktuře (uspořádání půdních částic), geologickém podloží (vrstva hornin pod vrstvou půdy), geografii (konkrétní lokalizaci plochy) a složení půdy (konkrétní podíl jednotlivých složek půdy). V důsledku toho se půdní profil zaplavuje a dochází ke změnám půdní struktury, které vedou k hypoxickým (snížení množství kyslíku), popř. až anoxickým (naprostý nedostatek kyslíku) podmínkám. Podle toho, jak závažné je zaplavení, lze rozlišit tři půdní stavy: zamokření (špatné odvodnění a hromadění vody, voda nepřesahuje rovinu půdy), zaplavení (například vylití vody z břehů řek a nádrží při povodních a dlouhotrvajících deštích, hladina přesahuje rovinu půdy) a zatopení (půda je periodicky nebo dlouhodobě přirozeně pod vodou).

Při zaplavení je rostlina stresovaná, ale podmínky, ve kterých se nacházejí kořeny a prýť nejsou totožné. V půdě dochází ke změně půdního mikrobiomu, kdy z počátku dochází k rapidnímu úbytku kyslíku stávajícími aerobními bakteriemi (při dlouhotrvajícím zaplavení až do stavu anoxie). V půdě pak převládají anaerobní bakterie a prvoci, kteří využívají jako zdroj energie, či finální akceptor elektronů v metabolismu, jiné alternativní zdroje než kyslík. Metabolizují například NO_3^- (na NO_2^-), Fe^{3+} (na Fe^{2+}), SO_4^{4-} (na H_2S) a většina produktů těchto alternativních způsobů metabolismu působí na rostliny toxicky. Mikroorganismy za anaerobních podmínek produkují například kyselinu octovou a máselnou, což vede k inhibici růstu rostlin. Uvolňují se také toxické kovy, jako např. hliník (Ponnamperuma, 1972). Současně se změnou mikrobiomu se snižuje půdní pH, redoxní potenciál a dochází i k omezení příjmu živin (Dat et al., 2004).

Difuze plynů je ve vodním prostředí až 10 000× pomalejší v porovnání se vzduchem (Colmer, 2003). To je příčinou hromadění metabolitů a plynů (CO_2 , ET) v pletivech kořenů, které mají

omezenou difuzi do vodního prostředí a výrazně se tak mění vnitřní obsah plynů. Také dochází k formování ROS, kvůli nerovnováze v organismu (Voeselek & Sasidharan, 2013). Množství kyslíku závisí i na hloubce půdního profilu, kdy v nejsvrchnější vrstvě může probíhat difuze, ale hlouběji už se kyslík nedostává.

Během zaplavení dochází tedy k úbytku kyslíku, hromadění ethylenu a nárůstu reaktivních forem kyslíku. Pokud zaplavení přetrvává a kyslíku stále ubývá, hypoxie se může změnit na anoxii, tedy na naprostý nedostatek kyslíku (Hossain & Uddin, 2011).

2.2. Vliv zaplavení na kořeny

Kořeny rostlin nejsou ve většině případů fotosynteticky aktivní a možnost doplnit v nich kyslík tímto způsobem je tak vyloučena. Jsou tedy závislé na jeho difuzi z okolí a z prýtu (Voeselek & Sasidharan, 2013). Rostlina navíc ztrácí kyslík radiální difuzí do okolí kořenů, kde ho okamžitě využívá půdní mikrobiom. Bariéra proti ROL se nachází hlavně v bazální zóně kořene a je tvořena suberinem. Suberin je organický biopolymer, který je hydrofobní a rostliny jej ukládají do buněčných stěn, čímž mohou pozměnit jejich vlastnosti (hlavně propustnost pro vodu a v ní rozpuštěné látky). Kromě ztráty kyslíku ale brání i příjmu plynů (CO_2 , CH_4 , ET) a potenciálně toxických prvků (redukované ionty kovů), které vznikají v zaplavené půdě ale také vody a živin. Spolu s aerenchymem se pak podílejí na zvýšení množství kyslíku, který je schopen doputovat ke kořenové špičce (Colmer, 2003). Absence bariéry proti ROL v kořenové špičce však umožňuje okysličovat její rhizosféru (nejbližší okolí povrchu kořene) a tím snižovat toxicitu anoxických půd a zároveň zásobuje půdní mikrobiom kyslíkem a redukuje tak kompetici o něj (Brownlee, 1994). Nový kořen má pak větší schopnost pronikat do anaerobního substrátu.

Pokud nepříznivé podmínky přetrvávají, dochází k udušení kořenů. Poškození začíná od kořenových vlásků, nakonec odumírá celá kořenová soustava. Tím se omezuje příjem vody a živin, což ovlivňuje i nadzemní část rostliny, která vadne. Konečným důsledkem je smrt rostliny.

2.3. Vliv zaplavení na prýt

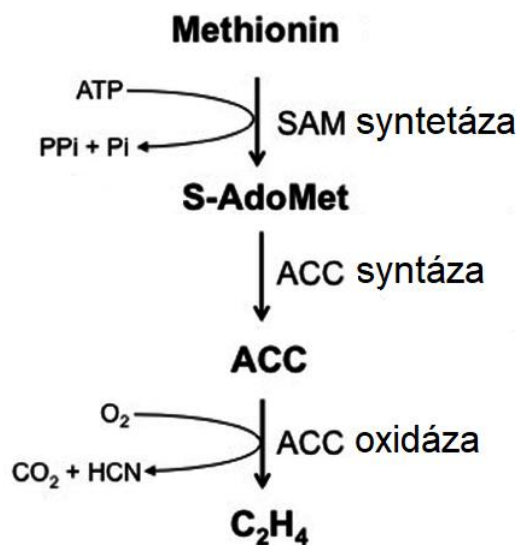
Pokud je množství vody takové, že je zaplaven i prýt rostliny (například v kulturách rýže, nebo v přirozeně se zaplavujících ekosystémech) stresové podmínky nejsou tak silné, jako v případě zaplavení půdy. Oproti kořenům, které jsou po zaplavení v anoxickém bahně, je fotosynteticky aktivní prýt jen ponořen pod vodou, a může tak v omezené míře docházet k výměně plynů. V závislosti na čistotě vody může světlo pronikat k listům a probíhá fotosyntéza. V případě, že je voda bahnitá či jinak znečištěná, částice nečistot brání pronikání světla, pokryjí listy rostlin a fotosyntéza je silně nebo zcela znemožněna. Kyslík je také doplňován difuzí z atmosféry a jeho koncentrace klesá od povrchu do hloubky. Míra fotosyntézy, a tedy množství endogenního kyslíku dále závisí na morfologii listu, dostupnosti CO_2 , poměru respirace a fotosyntézy, přítomnosti vzduchové vrstvy kolem listu a také množství kyslíku v okolní vodě. Prýt se navíc může prodloužit (ať už se prodlouží stávající orgány, nebo přiroste nová část prýtu) a dostat se tak nad vodní hladinu, kde může normálně docházet k výměně plynů a fotosyntéze. Nadzemní část tedy obvykle netrpí primárně anoxií, ale jen mírnou, nebo dokonce žádnou hypoxií (v případě, že voda zaplaví jen kořeny) a může zásobovat kořeny kyslíkem, který difunduje přes pletiva k místu spotřeby (Voeselek & Sasidharan, 2013). U rostlin neexistuje specifický

mechanismus transportu kyslíku, jako například u obratlovců pomocí hemoglobinu, a jsou tak odkázané jen na jeho difuzi.

2.4. Význam ethylenu při zaplavení

Plynné látky mají při zaplavení problém volně difundovat do okolí. Etylen, který vzniká ve všech rostlinných buňkách z prekurzoru ACC, má ještě menší schopnost difuze než kyslík (Stünzi and Kende, 1989). Prvotním signálem pro nárůst množství ethylenu je pokles koncentrace kyslíku v pletivech po zaplavení. V důsledku omezení volné difuze plynů při zaplavení ethylen neuniká snadno do okolí, rychle se hromadí v pletivech kořene a pouze v menší míře se následně dostává do prýtu. Difuzi usnadňuje aerenchym, jehož vznik je indukovaný ethylem. Zároveň vyšší hladina ethylenu autokatalyzuje jeho vlastní produkci (Jackson, 1985). Jedná se tak často o jeden z prvních a hlavních signálů na zaplavení, dalšími signály jsou narušení rovnováhy množství O_2 , CO_2 a nárůst ROS (Voeselek & Sasidharan, 2013).

Syntéza ethylenu je zvýšena již několik minut po zaplavení (Bragina *et al.*, 2003). Reakce vychází z methioninu a přes S-adenosylmethionin vzniká ACC (Obr. 3). Klíčovými enzymy biosyntézy ethylenu jsou ACC syntáza, která je produkována během několika hodin působení hypoxie a ACC oxidáza (He *et al.*, 1996). Při anoxii je ale poslední krok syntézy inhibován, protože pro průběh reakce je potřeba alespoň malé množství kyslíku, díky kterému ACC oxidáza může ACC oxidovat a dát tak vzniku ethylenu (Arc *et al.*, 2013).



Obr. 3: Schéma syntézy ethylenu. Klíčový je poslední krok, kdy je ACC oxidováno ACC oxidázou. Bez přítomnosti kyslíku nemůže dojít k oxidaci a biosyntéza je narušena. Převzato a upraveno podle Arc *et al.*, 2013.

Zvýšené množství ethylenu ovlivňuje strukturu plazmatických membrán, kdy se snižuje jejich integrita, permeabilita, snižuje se množství lipidů (hlavně fosfolipidů), membrána začíná invaginovat a tvoří se vesikuly (Bragina *et al.*, 2003, Voeselek & Sasidharan, 2013). Cytoplasma se pak okyselí, aktivují se protéázy a hydrolytické enzymy (primárně fosfolipázy) a dochází k hydrolyze cytosolu (Voeselek & Sasidharan, 2013). Byly zjištěny změny kondenzace chromatinu, fragmentace DNA a vznik oligonukleosomálních fragmentů a vytváření shluků organel obalených membránami (Gunawardena *et al.*, 2001). Pokles parciálního tlaku

kyslíku a zvýšená produkce ethylenu poté aktivují další hydrolytické enzymy (pektinázu a xylanázu) a po několika dnech i celulózu, které se podílejí na degradaci buněčných stěn. Ta začíná rozložením pektinu, pokračuje hydrolýzou arabinoglukuronoxylanů a končí rozkladem celulózy pomocí specifických celuláz (Bragina *et al.*, 2003). Tyto procesy vedou k programované buněčné smrti některých buněk kortexu a ke vzniku intracelulár v parenchymu a umožňují tak formování aerenchymu (Ni *et al.* 2019).

Zvýšené množství ethylenu ovlivňuje kromě výše uvedených procesů také produkci růstových hormonů, které regulují růst a vývoj rostlin během zaplavení. Inhibuje tvorbu ABA a zvyšuje množství GA a IAA. Tím umožňuje tvorbu adventivních kořenů a také degradaci zásobních škrobů (ABA inhibuje, GA aktivuje degradaci) a zvyšuje tak množství glukózy pro následný růst. GA dále také stimuluje buňky k dlouhivému růstu, což se uplatní hlavně v případě, že je zaplaven prýt. Dlouhivým růstem buněk se stávající orgány prodlouží a rostlina se tak může dostat nad hladinu, kde dochází k snadnější výměně plynů. Naopak ethylen inhibuje dlouhivý růst kořenů. Dále zvyšuje produkci ROS v buňkách epidermis, čímž způsobí jejich smrt a usnadní tak pronikání nových adventivních kořenů. Tyto změny jsou přijímány jako obecně známé a jejich detailnější rozbor není cílem této práce.

2.4.1. Aerenchym

Aerenchym je typ rostlinného pletiva odvozený od parenchymu. Obsahuje velké mezibuněčné prostory, které umožňují výměnu plynů (Brownlee, 1994). U většiny mokřadních rostlin tvoří značnou část objemu kořene a zvyšuje tak porozitu až o 55 %. Tím je umožněna výměna plynů bez odporu prostředí, kdy je kyslíkem zásobován kořenový systém a CO₂, ET jsou přes prýt uvolňovány do atmosféry (Colmer, 2003). Aerenchym navíc umožňuje ventilaci plynů, které vznikají v zaplavené půdě a hromadí se v kořenech a v rhizosféře jako CO₂, CH₄ a ET (Brownlee, 1994). Difuze je v tomto případě hlavní hnací silou pro výměnu plynů, avšak některé mokřadní rostliny s listy plovoucími, či rostoucími nad vodní hladinou dokáží vytvořit ve stoncích a oddencích průtokový tlak (through-flow pressure). Díky tomu dokážou zvýšit zásobení zaplavených orgánů kyslíkem (Colmer, 2003).

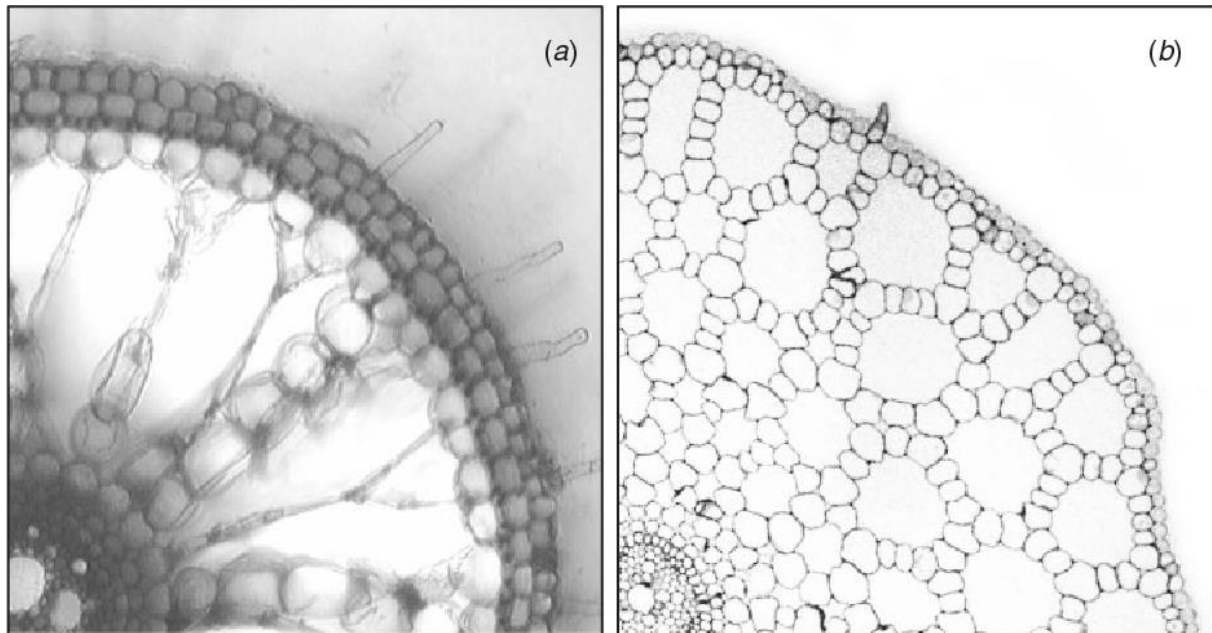
Aerenchym se může formovat při zakládání kořene, či může vznikat už ve stávajících kořenech (Hossain & Uddin, 2011). Formuje se buď přirozeně během vývoje (vodní rostliny), nebo až když je to pro rostlinu výhodné, či dokonce nutné. Podle způsobu vzniku pak rozlišujeme schizogenní a lyzigenní aerenchym (Obr. 4).

Schizogenní aerenchym vzniká tak, že během růstu kořene stávající buňky začnou růst rozdílně a oddělují se jedna od druhé v oblasti střední lamely. Dochází k rozvolnění struktury pletiva a vzniku mezibuněčných prostor, které se dále spojují a zvětšují. Výsledkem je pletivo s organizovanou strukturou. Tento typ aerenchymu se vyskytuje přirozeně u mnoha druhů mokřadních rostlin, jako například u *Rumex sp.* (Brownlee, 1994).

Lyzigenní aerenchym vzniká tak, že buňky kortexu podstoupí programovanou buněčnou smrt, aby mohly vzniknout potřebné mezibuněčné prostory (Brownlee, 1994). Některé buňky však musí zůstat zachovány kvůli rozvodu živin symplastem a apoplastem, ale také kvůli zajištění mechanické integrity kořene. Výsledkem je méně organizovaná struktura pletiva (Drew &

Fourcy, 1986). Lyzigenní aerenchym lze pozorovat u mnoha kulturních rostlin, jako ječmen (Arikado & Adachi, 1955), pšenice (Trought & Drew, 1980), rýže (Justin & Armstrong, 1991) a kukuřice (He *et al.*, 1996a).

Některé druhy rostlin, jako například *Sagittaria lancifolia* tvoří oba typy aerenchymu v závislosti na typu pletiva (Schussler *et al.*, 1997).



Obr. 4: Obrázek ukazuje 2 hlavní typy aerenchymu. Jedná se o příčné řezy kořenem a) rýže s lyzigenním aerenchymem, b) kořenem šťovíku se shizogenním aerenchymem. Převzato z Voesenek *et al.*, 2006.

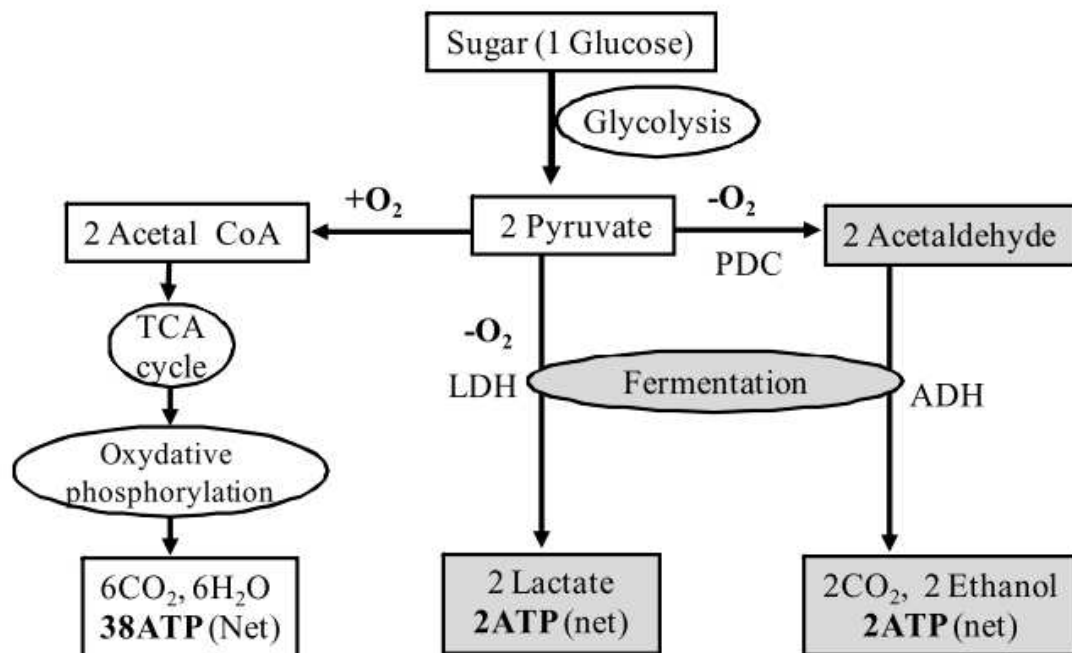
2.4.2. Změny metabolismu při zaplavení

Vyšší rostliny jsou sesilní organismy, nejsou tedy schopné přemístit se ze svého stanoviště v případě vystavení nepříznivým podmínkám. Využívají tak strategii „sit and wait“ kdy se zpomalí růst a vývoj, šetří energii, nasyntetizované zásobní látky a vyčkávají, dokud nepříznivé podmínky nepominou (Bailey-Serres & Voesenek 2008; Colmer & Voesenek 2009).

Rostliny za normálních podmínek využívají aerobní dráhu pro produkci energie, která zahrnuje Krebsův cyklus a oxidativní fosforylaci a vychází z glykolýzy. Při nedostatku kyslíku se ale Krebsův cyklus a oxidativní fosforylace zablokuje a rostlina musí přejít na anaerobní získávání energie (Davies, 1980). Jednou z prvních reakcí je snížení potřeby kyslíku, utlumením metabolismu a zpomalením až zastavením růstu. Omezuje se respirace, a klesá produkce ATP oxidativní fosforylací. Utlumení aerobního metabolismu vede k aktivaci anaerobního metabolismu a potřebné ATP vzniká substrátovou fosforylací (Fukao & Bailey-Serres, 2004). Například u pšenice se aktivují enzymy spojené s fermentačními drahami a glykolýzou, zvyšuje se množství rozpustných sacharidů a zapojují se i antioxidační mechanismy, které chrání rostlinu před oxidativním poškozením (Hossain & Uddin, 2011). Významné jsou tedy fermentační dráhy (Obr. 5), které dokážou poskytnout zdroje energie bez potřeby kyslíku. U rostlin jsou to hlavně ethanolová a laktátová. Dále ještě jedna specifická dráha, která produkuje alanin z glutaminu a pyruvátu. Aktivací těchto procesů dochází k okyselování cytosolu kyselinou

mléčnou, což má spolu s hromaděním ethanolu negativní vliv buněčné procesy a na růst a vývoj rostlin (Dennis *et al.*, 2000).

Glykolýza je proces, který je aktivní jak při aerobních, tak anaerobních podmínkách. Avšak při nedostatku kyslíku se zvyšuje množství spotřebované glukózy na úkor produkovaného ATP (Mocquot *et al.*, 1981). Je také nutno zajistit recyklaci NADH. Za normálních podmínek k tomu dochází v mitochondriích, ale při hypoxii musí buňka přejít na alternativní způsob pomocí laktátové a ethanolové fermentace.



Obr. 5: Tři hlavní dráhy získávání energie: glykolýza, která poskytuje pyruvát pro aerobní (Krebsův cyklus a oxidativní fosforylace) i anaerobní dráhy (laktátová a ethanolová fermentace). Převzato z Hossain & Uddin, 2011.

Nízký poměr ATP/ADP má vliv i na další biosyntetické dráhy spojené se spotřebou ATP, jakými jsou například tvorba aminokyselin, sacharózy, lipidů, proteinů a škrobu (Geigenberger, 2003, Hossain & Uddin, 2011).

3. Molekulární šlechtění rostlin

Šlechtění rostlin dnes představuje soubor metod a technik, které umožňují cílevědomě vytvářet nové odrůdy rostlin s vhodnějšími vlastnostmi, popřípadě zlepšovat ty stávající. Uplatňuje se nejen u hospodářsky významných i okrasných rostlin. Hlavní pozornost je v tomto směru soustředěna zejména na zvýšení odolnosti rostlin vůči stresovým faktorům, zvýšení výnosu, zlepšení stávajících vlastností či vznik nových požadovaných vlastností.

3.1. Klasický přístup šlechtění rostlin

Domestikace rostlin započala zhruba před 5000–10000 lety a během tohoto procesu se z divoce rostoucích předchůdců postupně stávaly dnes známé kulturní rostliny. Z počátku člověk jen vybíral z populace rostliny s vhodnějšími znaky (nerozpadavý klas, větší semena, lepší růst), jejichž semena opět vysel a vzešlé rostliny dále kultivoval. Uplatňovaly se tak spontánní mutace, které tyto nové vlastnosti podmiňovaly, ale chyběly znalosti přesné genetické determinace a zákonitostí přenosu znaků ve sledu generací. Klasické metody byly založeny na výběru, kdy se z populace cíleně vybraly rostliny s novou, či lepší vlastností a jejich křížení bylo cíleno na kombinování vhodných znaků. Základem bylo křížení vnitrodruhové, ale je možné křížit i mezidruhově (triticale, druh vzniklý křížením pšenice a žita). Intenzivní rozvoj vnitrodruhové a mezidruhové hybridizace a následné šlechtění vedlo k vytvoření mnoha nových kultivarů (odrůd) i nových druhů s kombinací požadovaných znaků. Spontánní, či indukovaná mutagenese spočívá ve změně genotypu, která se dědí dále na potomstvo. Spontánní mutace jsou náhodné, indukované jsou cílené s využitím různých mutagenů. Výběr mutantních rostlin po spontánní nebo cílené mutagenезi je opět následován křížením a dalším výběrem a šlechtěním. Také polyploidizace jak spontánní, tak indukovaná se řadí k významným klasickým přístupům šlechtění rostlin. Zvýšení počtu chromozomových sad v buňce mohlo vést ke zvětšení objemu buňky a následně celé rostliny.

Vytvořit novou stabilní odrůdu s požadovanými vlastnostmi trvá konvenčními metodami 10–20 let, v závislosti na druhu rostlin. Proto v dnešní době vážných klimatických změn a populačního růstu je využívání klasických metod nedostatečné. Roste tak význam moderního šlechtění, které představuje soubor technik a metod umožňující cíleně manipulovat s genetickým materiálem a pracovat s rostlinami na buněčné úrovni.

3.2. Využití moderních metod šlechtění

Jak bylo již uvedeno výše, konvenční metody šlechtění rostlin nejsou v současné době optimální a dostačující jak z časového hlediska dosažení šlechtitelských cílů, tak i z hlediska současných požadavků na nové kultivary/odrůdy. V posledních dvou desetiletích se ve větší míře začaly využívat metody a postupy souhrnně označované jako netradiční, nekonvenční nebo také moderní šlechtění. Jedná se o komplex biotechnologických a molekulárně biologických technik, mezi které patří mikropropagace in vitro, techniky s využitím haploidních rostlin, fúze protoplastů, selekce na buněčné úrovni, produkce umělých semen, vnášení cizorodých genů do genomu kulturních rostlin, genetické mapování a selekce na úrovni molekulárních markerů. Mezi metody umožňující přímou manipulaci s genetickým materiálem, kterým se budu dále

detailněji věnovat, se řadí transformace pomocí agroinfiltrace a biolistiky. Jedná se také o nejčastěji používané metody využití při tomto způsobu šlechtění (Walker, 2014). V současné době se ve šlechtění rostlin začíná využívat perspektivní metoda editace genomu pomocí CRISPR/Cas9.

3.2.1. Agroinfiltrace

Metoda je založena na využití životní strategie bakterie druhu *Agrobacterium tumefaciens*. Jedná se o gramnegativní bakterii, která parazituje v pletivech mnoha druhů rostlin. Po infekci bakterie přeneše do buněk Ti-plazmid, který je poté začleněn do genomu hostitelské rostliny. Vnesená část zahrnuje geny, z nichž nejdůležitější kódují enzymy spjaté se syntézou rostlinných hormonů (auxiny a cytokininy) a opinů (typ aminokyselin). Nadprodukcí hormonů vznikají nádory, kde jsou také syntetizovány opiny, které bakterie využívají pro svůj metabolismus (Hoeckema *et al.*, 1983; Zupan & Zambryski 1995).

Samotný Ti-plazmid má několik částí; ORI, virulentní oblast, T-DNA kódující oblast (zajišťuje syntézu fytohormonů a opinů), hraniční oblasti kolem T-DNA oblasti, oblast pro konjugativní transfer a oblast pro katabolismus opinů. Nejdůležitější je virulentní oblast, která zajišťuje vyšetření, přenos a integraci T-DNA do genomu rostlinné buňky (Christie 1997; Păcurar *et al.*, 2011). V T-DNA pak lze vyřadit geny zodpovědné za růst nádorů a místo nich vložit kazetu obsahující požadovaný gen za vzniku rekombinantního Ti-plazmidu, který lze využít pro transformaci rostlin a selekci transgenní rostliny. I přesto, že příprava rekombinantního plazmidu, jeho vnesení a začlenění do genomu hostitelské rostliny představuje mnohastupňový proces, jsou vypracovány a úspěšně využívány základní standardizované postupy, které jsou dále modifikovány v závislosti na rozvoji technik, vytčeném cíli i rostlinném druhu. Jednou z možností je injekční agroinfiltrace, kdy se pomocí malých jehel rozruší vrstva epidermis. Následně je pak jehlami vstříknuto médium do mezofylu listu, kde pak dochází k agroinfiltraci. Vakuová agroinfiltrace je založena na inkubaci rostlinné tkáně v mediu za sníženého tlaku, čímž dochází k pronikání bakterií do pletiv rostliny (Chen *et al.*, 2014). Další metodou, která je využívána hlavně u *A. thaliana*, je namáčení pupat (floral dip) na pár minut do media s bakteriemi, což vede k modifikaci samičích gamet, a ke změnám v germinální linii (Zhang *et al.*, 2014).

Pomocí agroinfiltrace bylo připraveno například transgenní rajče (*Solanum lycopersicon*) s bakteriální ACC-deaminázou, které také vykazovaly lepší schopnost zvládat zaplavení a následnou hypoxii kořenů v porovnání s kontrolou (Grichko & Glick, 2001). Také transgenní rýže s askorbát peroxidázou z lilku (*Solanum melongena*, Sm) jejíž semenáčky poté projevily silnou odolnost k zaplavení, oxidativnímu poškození rostly rychleji než nemodifikované rostliny (Chiang & Chen, 2014).

3.2.2. Biolistika

Metoda zvaná také „Gene gun“ je založena na nastrelování buněk biologicky inertními partikulami s vázanou DNA, která se uvolní a začlení do genomu hostitelské buňky. Jedná se o perspektivní, v současné době poměrně rozšířenou metodu transformace rostlin. Partikule jsou ze zlata, wolframu, popř. jiných těžkých kovů (nebo jejich oxidů), uhlíkové či magnetické (Nair *et al.*, 2010). Využívají se i křemičité nanoparticule (silica nanoparticle), které mají velký

povrch, tvoří malé póry v membránách, ale u rostlinných buněk mají problém s pronikáním buněčnou stěnou (Torney *et al.*, 2007). Nejprve jsou zvolené částice obaleny DNA našeho zájmu a pod tlakem helia nastřelovány do buněk. V malém procentu případů dojde k zasažení jádra a začlenění DNA do genomu (Iwasaki, 2018). Metodu je možné využít také ke genetické modifikaci mimojaderné DNA (plastidové, či mitochondriální).

Biolistikou se podařilo připravit transgenní kukuřice s genem pro bakteriální hemoglobin (z gram-negativní aerobní bakterie rodu *Vitreoscilla*). Díky hemoglobinu vykazovaly rostliny lepší růst při indukovaném zaplavení, ale byla zjištěna i vyšší aktivita alkohol dehydrogenázy a peroxidázy (Du *et al.*, 2016). Lepší odolnost k zaplavení vykazovala i pšenice, u které byl modifikován gen pro ethylene responsive faktor (*TaERFVII.1*) tak, aby byl nepřetržitě expri-mován. Funkce tohoto genu je známá u modelových organismů jako *A. thaliana*, ale konkrétní vliv u pšenice nebyl dlouho znám (Wei & Zhang, 2019). Navíc konstantní exprese u jiných rostlin se projevila negativně na růstu či výnosu (Xu *et al.*, 2006, Licausi *et al.*, 2011). U pšenice však navodila lepší odolnost k zaplavení bez negativních dopadů na výnos (Wei & Zhang, 2019).

3.2.3. Transformace pomocí CRISPR/Cas9 systému

CRISPR/Cas9 je nejnovější metodika zaváděná v molekulárním šlechtění, která je založena na adaptivní imunitě bakterií a archeí vůči invazivní virové, či plazmidové DNA. Jedná se o komplex enzymu s endonukleázovou aktivitou a RNA. CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) je různorodá genová rodina, která obsahuje krátké repetitivní palindromy (20-50 bází dlouhé). V lokusu pro CRISPR je pak mezi repeticemi tzv. spacer DNA, kterou bakterie začlenila do své genetické informace po dřívějším kontaktu s cizorodým vektorem. Následně je CRISPR DNA transkribována na CRISPR RNA (crRNA), která se začlení do příslušné nukleázy, například do komplexu Cas9 (CRISPER associated protein). Vzniklá crRNA je kompatibilní s DNA cizorodého vektoru a pokud se v buňce znovu objeví cizorodá DNA, spáruje se s příslušnou crRNA v Cas9, a ten díky endonukleázové aktivitě cizorodou DNA rozštěpí a inaktivuje (Sorek *et al.* 2013).

Pro správný vznik crRNA jsou důležité trans-activating crRNA (tracrRNA), které párují s prvními páry finální crRNA. Nejprve je dlouhý transkript pre-crRNA nesoucí několik verzí crRNA rozpoznán příslušnými tracrRNA. Vzniklý duplex je poté naštěpen RNázou III a vzniklé hybridní crRNA;tracrRNA jsou začleněny do příslušného Cas9 (Deltcheva *et al.*, 2011, Jinek *et al.*, 2012, Sorek *et al.*, 2013.). Na cílové DNA je rozpoznáváno PAM (protospacer adjacent motifs) místo, které je následně štěpeno příslušnou Cas endonukleázou. U *S. pyrogenes* rozeznává Cas9 v PAM místě jen dva nukleotidy, respektive sekvenci 5'-NGG-3', kdy N je libovolný nukleotid (Hu *et al.*, 2018). To vzhledem k jejich běžnému výskytu umožňuje vytvořit mnoho typů crRNA, která navede Cas9 nukleázu na konkrétní místo v genomu a zajišťuje tak univerzálnost zacílení této metody (Jiang *et al.* 2013).

Dnes se už tedy cíleně vytváří hybridní molekula grRNA (guide RNA). Ta vzniká spojením konkrétní crRNA (nesoucí spacer kompatibilní s cílovou DNA) a tracrRNA (vytvářející smyčku, kterou váže Cas9). Systém je pak často do rostlinné buňky vnášen pomocí *A. tumefaciens*, jak bylo uvedeno výše. DNA je cíleně štěpena ve zvolené oblasti. Po štěpení dochází k opravě

zlomu, čehož se dá následně využít. pro vnesení a začlenění kazety s novým, či opravený genem. Systém může být využit i k inaktivaci genů či indukci mutací (Jiang et al. 2013).

V současné době se mi v dostupné literatuře nepodařilo dohledat publikace, v nichž by byly popsány transgenní rostliny vykazující zvýšenou odolnost k nadměrnému zaplavení či hypoxii s využitím CRISPR/Cas9. Úspěšně však bylo vytvořeno mnoho transgenních rostlin, které vykazovaly odolnost k jiným abiotickým, či biotickým stresovým faktorům, které jsou detailně popsány ve zcela aktuální přehledné publikaci (Debbarma *et al.*, 2019).

3.3. Potenciální cíle molekulárního šlechtění na odolnost vůči zaplavení a hypoxii

Transkriptomické, proteomické a metabolomické studie a z nich vyplývající poznatky jsou zásadní pro dosažení současných šlechtitelských cílů s uplatněním molekulárního šlechtění. Mnoho úspěšných pokusů bylo provedeno u sóji a bylo zjištěno mnoho proteinů, jejichž syntéza je indukována při zaplavení (tab. 1) (Komatsu *et al.*, 2009). Tyto výsledky byly potvrzeny i v dalších pracích (Nanjo *et al.*, 2012 u sóji,). Byly také popsány proteiny, jejichž syntéza byla po zaplavení snížena (Komatsu *et al.*, 2009). U mnoha proteinů není jejich funkce známá, a je nezbytné je blíže identifikovat (Komatsu *et al.* 2009).

*Tab. 1: Výsledky analýzy genové exprese z kořenů a hypokotylu zaplavených rostlin sóji. Proteiny jsou seřazeny sestupně podle poměru míry exprese ve stresovaných rostlinách a v kontrole. Převzato a upraveno podle Komatsu *et al.*, 2009*

Protein	Funkce
alkohol dehydrogenáza	energetický metabolismus
alkohol dehydrogenáza	energetický metabolismus
patogenen-inducible trypsin-inhibitor	obrana vůči chorobám
ERF-like protein	transkripční faktor
alkohol dehydrogenáza adh-1	energetický metabolismus
nepojmenovaný proteinový produkt	neznámá
patogenen-inducible trypsin-inhibitor	obrana
expansin-like B1	buněčná struktura
inhibitor polygalaktouronázy	obrana
aminotransferáza (putativní)	primární metabolismus
agglurin-1 (prekurzor)	obrana
stearoyl-ACP destruktáza	primární metabolismus
matrixová metaloproteináza MMP2	obrana
nepojmenovaný proteinový produkt	neznámá
transkripční faktor ap2-erebp	transkripční faktor
hypotetický protein	neznámá
nepojmenovaný proteinový produkt	neznámá
hypotetický protein	neznámá
hypotetický protein	neznámá
hpch/hpai aldoláza	neznámá
matrixová metaloproteináza mmp2	obrana
acyl-aktivující enzym 7	primární metabolismus
fumarylacetoacetáza	primární metabolismus

auxin-responsivní GH3 produkt	obrana
ATPDR3/PDR3 ATPáza	transportér
transkripční faktor AP2-EREBP	transkripční faktor
nepojmenovaný proteinový produkt	neznámá
ACC oxidáza	sekundární metabolismus
nepojmenovaný proteinový produkt	neznámá
agglutin-1 prekurzor	obrana
nepojmenovaný proteinový produkt	neznámá
3-fosfoglycerát dehydrogenáza	energetický metabolismus
receptor-like proteinová kináza	signalizační
matrixová metaloproteináza MMP2	obrana
matrixová metaloproteináza MMP2	obrana
nesymbiotický hemoglobin	primární metabolismus
pathogenesis-related protein třídy 10	obrana
vláknitý protein Fb19	buněčná struktura
cytochrom p450, rodina 96	obrana
matrixová metaloproteináza MMP2	obrana
expansine-like B1	buněčná struktura
patogenen-inducible trypsin-inhibitor	obrana
patogenen-inducible trypsin-inhibitor	obrana
RAP2-like protein	transkripční faktor
ZTP2-11	transkripční faktor
VHS and GAT domain protein	převod signálu
homeodomain-like	transkripční faktor
pyruvát dekarboxyláza	energetický metabolismus
nesymbiotický hemoglobin	primární metabolismus
hypotetický protein	neznámá
nepojmenovaný proteinový produkt	neznámá
pyruvát dekarboxyláza	energetický metabolismus
vakuolární H ⁺ -pyrofosfatáza	transportér
transkripční faktor AP2-EREBP	transkripční faktor
putative senescence-associated rhodanese protein	primární metabolismus
alkohol dehydrogenáza	primární metabolismus
serine acetyltransferáza	primární metabolismus
matrixová metaloproteináza MMP2	obrana
hypotetický protein	neznámá
hypotetický protein	neznámá
hypotetický protein	neznámá
hypotetický protein	neznámá
MTD2	neznámá
inhibitor polygalaktouronázy	obrana
CDPK (putativní)	signální
putative senescence-associated rhodanese protein	primární metabolismus
matrixová metaloproteináza MMP2	obrana
matrixová metaloproteináza MMP2	obrana
cys3his zinc finger protein	transkripční faktor
nepojmenovaný proteinový produkt	neznámá
calcium-binding EF hand family protein	signální
cupin, RMLC-type	neznámá

multidrug resistance-associated protein 3	obrana
nepojmenovaný proteinový produkt	neznámá
glukóza-6-fosfát isomeráza	energetický metabolismus
oxidáza respiračního vzplanutí	energetický metabolismus
nepojmenovaný proteinový produkt	neznámá

Hlavním cílem výzkumu a následným šlechtitelským cílem jsou fermentační dráhy, které za anaerobních podmínek nahrazují získávání energie oxidativní fosforylací. U rostlin jsou to alkoholová, laktátová a specifická dráha, při které vzniká alanin z glutamátu a pyruvátu. Tyto procesy jsou u rostlin aktivovány za stresových podmínek a příslušné enzymy se rychle syntetizují *de novo*. Ukazuje se však, že spíše, než zajištění energie je důležité udržet pH cytosolu ve vhodném rozpětí. Laktátovou fermentací vzniká totiž kyselina mléčná, která cytosol okyseluje, zatímco při ethanolové vzniká ethanol, který se nepodílí na změně pH. Genetické modifikace jsou v tomto ohledu cílené tak, že rostliny produkují enzymy ve větší míře nebo nepřetržitě. Ovšem k překonání hypoxického stavu bez negativních důsledků pro rostlinu pouhá transformace fermentačních procesů není sama o sobě postačující (Dennis et al., 2000).

Také transkripční faktory spojené se zaplavením a hypoxií se jeví jako slibný cíl šlechtění (Dennis et al., 2000). Bylo zjištěno, že například u *A. thaliana* je během hypoxie nepřetržitě exprimována celá řada transkripčních faktorů (MYB, NAC, ERF a jiné) (Hoeren et al., 1998, Geon et al., 2007, Geigenberger & Dongen, 2011). Např. transkripční faktor AtMYB2 u *A. thaliana* se váže na GT motiv DNA v genu pro *ADHI*, ale také k dalším GT motivům všech známých genů aktivovaných při hypoxii a spouští tak jejich expresi (Hoeren et al., 1998). Také TaMyb1 (transkripční faktor z MYB rodiny) se u pšenice exprimuje ve větší míře při hypoxii (Geon et al., 2007).

Dalším cílem pro genetické modifikace mohou být enzymy spojené se štěpením sacharidů a glykolýzou, díky kterým se zvýší množství substrátu pro fermentační dráhy a tím i množství potřebného ATP (Dennis et al., 2000). Další možností je cílení na lepší formování aerenchymu, či zvýšení tolerance proti toxickým formám živin (H_2S , Fe^{2+}), či zlepšení bariéry proti ROL (Setter & Waters, 2003, Mano et al., 2005).

Stále diskutovanou otázkou zůstává integrace dat získaných molekulárně genetickými studiemi, jejichž množství se zvyšuje s vývojem vysoce účinných a spolehlivých metod, které poskytují analýzy genomu, transkriptomu, proteomu, metabolomu (Zivy et al., 2015). S tím souvisí otázka, jak tyto poznatky pomohou objasnit mechanismy odolnosti rostlin k abiotickým stresovým faktorům, což by následně umožnilo účinnou selekci požadovaných genotypů (Zhou, 2010). Cílem je najít a objasnit vazby „omics“ dat ke konečnému fenotypu čili vztah buněčného fenotypování k rostlinnému fenotypování (Zivy et al., 2015).

4. Fenotypizace

Fenotypizace rostlin je intenzivně se rozvíjející metodologie, která umožňuje porozumět vztahu mezi genotypem a prostředím. Každý organismus si nese soubor genů, které vytváří konkrétní genotyp a následná interakce genotypu s vnějším prostředím vytváří výsledný fenotyp. Pokud sledujeme komplexní znak, který je determinován více geny, je nezbytná kvantitativní analýza strukturních a funkčních vlastností rostlin, tedy právě fenotypizace rostlin (Rajsnerová & Klem, 2012). Ta dlouho byla nejslabším článkem šlechtitelských metod. Tyto vztahy lze analýzou velkého množství dat transformovat do podoby kvantitativních či kvalitativních informací, které mohou být dále využity ve šlechtitelské praxi. Jedná se o posouzení komplexních znaků mezi které patří i odolnost k abiotickým stresovým faktorům tak, aby byly získány spolehlivé charakteristiky využitelné ve šlechtění pro selekci vhodných genotypů (Rajsnerová & Klem, 2012).

I přesto, že primárně je pozornost zaměřena hlavně na výnosové parametry hospodářsky významných rostlin, neměla by být fenotypizace cílena primárně na ně. Musí být zaměřena na procesy a vlastnosti, které výnosu předchází. Ty jsou zásadní v pochopení odolnosti rostlin vůči stresovým podmínkám či škůdcům.

4.1. Destruktivní metody

Pro fenotypizaci je možné využít jednak destruktivní metody, které vyžadují destrukci celé rostliny, popřípadě její části a jednak nedestruktivní metody, kdy je možné získat požadované charakteristiky bez zničení rostliny, opakovaně na téže rostlině nebo v porostu. Kromě toho se v případě destruktivních metod se často jedná o časově a finančně náročné metody, které už není možno zcela přesně reprodukovat, protože konkrétní analyzovaná část už je zpracována nebo zničena. Tyto metody jsou rovněž náročné na počet analyzovaných rostlin, které jsou zničeny a nemohou být použity opakovaně nebo pro jiná paralelní měření. I přesto tyto metody poskytují množství významných charakteristik vypovídajících o aktuálním stavu rostliny za daných podmínek.

Jedná se například o měření obsahu malondialdehydu (MDA) indukujícího poškození membrán, měření celkové hmotnosti biomasy, stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů indukující míru fotosyntézy, stanovení množství prolinu, jakožto osmoprotektantu a další. Vzhledem k výše uvedeným nevýhodám je v současné době věnována maximální pozornost testování a vyhodnocování parametrů rostlin s využitím nedestruktivních metod, kterým se budu dále detailněji věnovat.

4.2. Nedestruktivní metody

Využití zhodnocení fenotypu bez destruktivního zásahu přináší řadu výhod. Opakovaná měření během vývoje umožňují zhodnotit míru stresu a zdravotní stav jednotlivých rostlin. Při využití nedestruktivních metod se podstatně zvýší možnost charakterizovat velké počty rostlin a celé porosty, což poskytuje spolehlivá data pro následné analýzy (Fahlgren *et al.*, 2015). Jedná se zejména o metody, které využívají zobrazovacích technik a dovolují opakovaná měření i v polních podmínkách.

4.2.1. Zobrazovací metody

Každá složka rostlinných buněk má svou vlnově specifickou absorbanci, reflektanci a transmittanci, kterou je možné pomocí senzorů zaznamenat. Můžeme použít více typů senzorů, kdy každý je citlivý na jinou vlnovou délku světla a tím je schopný podat informace o jiných aspektech fenotypizace rostlin (tab. 2). Nejedná se samozřejmě jen o prosté zobrazení rostlin, získané fotografie je se zpracovávají v příslušném programu pro získání výsledných dat (Obr. 6). Tyto metody dovolují vyhodnotit minimálně stovky rostlin za den. To umožňuje rychlou analýzu např. mutantních rostlin v populaci pro detekci QTL a následné vyhodnocení genů, které interagují s vnějším prostředím a podílejí se tak na výsledném fenotypu (Li *et al.*, 2014).

V současné době se běžně provádí zobrazování pomocí infračerveného světla, viditelného světla, fluorescenční zobrazování a zobrazovací spektroskopie. Dále je možné využít i MRI, PET a CT zobrazování, 3D skenování a řada dalších. Zobrazování pomocí viditelného světla se primárně používá pro porovnání biomasy, plochy listů, barvy, růstové dynamiky... Fluorescenční zobrazování lze použít pro stanovení aktivity fotosyntézy, detekci nemocí, aj. Infračervené zobrazování podává informace o teplotě rostlin a jejich okolí. Z obrazové spektroskopie je možné získat informace o množství vody v rostlině (Li *et al.*, 2014). Vyhodnocení experimentu je díky nenáročnosti měřících a zobrazovacích metod velmi snadné už v průběhu experimentu. Například genotypy rostlin odolné vůči suchu je možné rozeznat už po několika dnech stresu s využitím fluorescenčního zobrazování. Rostliny napadené padlím byly detekované třetí den po infekci, rezistentní genotypy pak čtvrtý až pátý den díky termálnímu zobrazování (Klem a kol. 2018).

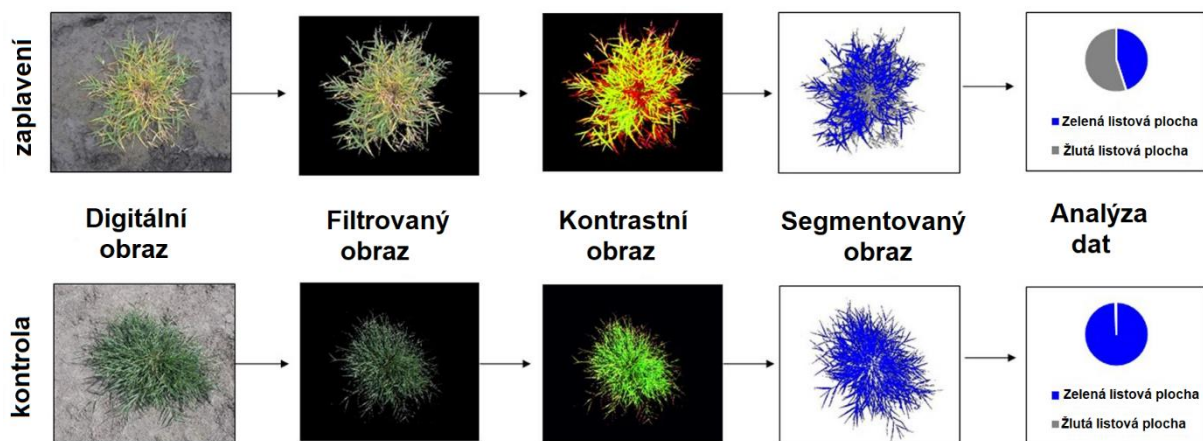
Tab. č. 2: Přehled zobrazovacích metod a jejich využití při fenotypizaci. Převzato a upraveno podle Li *et al.*, 2014.

Zobrazovací metoda	Fenotypické parametry
Zobrazování viditelným světlem	Zobrazovaná plocha, růstová dynamika, biomasa prýtu, výnosové znaky květenství, architektura kořenového systému, rychlost a míra klíčení semen, raný růst embryonální osy, výška, morfologie, velikost, doba kvetení
Fluorescenční zobrazování	Fotosyntetické parametry, zdravotní status listů, architektura prýtu
Termální zobrazování	Teplota korunového patra a listů, zamoření obilovin škůdci
Zobrazování pomocí blízkého infračerveného spektra	Obsah vody, index listové plochy
Hyperspektrální zobrazování	Vodní status listů a korunového patra, zdravotní stav korunového patra, listů a květenství, růst listů, hustota pokrytí
3D zobrazování	Struktura prýtu, fylotaxe, struktura korunového patra, architektura kořenového systému, výška
Laserové zobrazování	Struktura a biomasa prýtu, fylotaxe, struktura korunového patra, architektura kořenového systému, výška

MRI	Morfometrické parametry ve 3D, množství vody
PET	Distribuci látek a rychlost transportu, sekrece,
CT	Morfometrické parametry ve 3D, kvalita zrna

Kamery se senzory je možné umístit například na drony/vzducholodě, což umožní efektivní fenotypizaci a vyhodnocení stavu porostu na velkých externích plochách (Liebisch *et al.*, 2015). Je rovněž možné sestavit fenotypizační komoru, v níž je proces fenotypizace maximálně automatizován. Rostliny jsou přiváděny na pásech k jednotlivým sensorům, snímány a vzniklé obrazy jsou následně vyhodnoceny. Tak může být zhodnoceno za zcela stejných podmínek velké množství rostlin (Klukas *et al.*, 2015).

Pomocí zobrazování viditelným světlem v kombinaci s měřením biomasy byly fenotypizovány hybridní linie rodu *Brachiaria* (tropické trávy využívané jako krmivo). Bylo porovnáno 19 hybridů a 3 komerční linie z nichž několik projevilo odolnost k zaplavení (De *et al.*, 2017).



Obr. 6: Výsledky obrazové analýzy při fenotypizacitrav rodu *Brachiaria* pomocí viditelného světla. Převzato a upraveno z De *et al.*, 2017.

4.2.2. QTL mapování

Mnoho významných znaků rostlin jako je výška, kvalita a složení semen, či rezistence vůči různým vnějším stresovým faktorům jsou polygenní, tedy determinovány větším počtem genů menších účinků (quantitative trait locus, QTL). Mapování QTL je založeno na analýze úseků DNA spojených s výsledným fenotypickým znakem. Hlavním cílem mapování je identifikace oblasti genomu (konkrétní oblast chromosomu), která je zodpovědná za daný znak a analýza efektu konkrétního QTL. Pro konstrukci mapy je třeba dostatečně velká mapovací populace, lišící se ve sledovaném znaku a vhodné molekulární markery.

DNA markery jsou úseky nukleotidů kompatibilní s cílovou DNA v genomu. Markery se můžou využívat buď v metodách založených na hybridizaci: DNA čipy, ISH (in situ hybridization), RFLP (restriction fragment length polymorphism). Nebo v metodách využívající PCR: AFLP (amplified fragment length polymorphism), DAF (DNA amplification fingerprinting), IRAP 17

(interretrotransposon amplified polymorphism), ISBP (insertion site based polymorphism), RAMP (randomly amplified microsatellite polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), SCAR (sequence characterized amplified region), SNP (single nucleotide polymorphism), S-SAP (sequencespecific amplification polymorphism), SSCP (single strand conformation polymorphism), SSR (simple sequence repeats), STS (sequence tagged site) a mnohé další.

Úspěšnost cíleného získávání genotypů odolných k nadměrnému zaplavení je časově náročný proces, který je ovlivněný značnou variabilitou podmínek zaplavení i okolního prostředí (Zhang *et al.* 2015b). Mapování QTL bylo využito ke studiu genetické determinace odolnosti vůči zaplavení u rýže, sóji, ječmene, pšenice, kukuřice a mnoha dalších rostlin (Yu *et al.*, 2019)

Jak bylo již uvedeno výše, základem úspěšného šlechtění na vyšší odolnost a podstatou urychlení celého šlechtitelského procesu je detekce spolehlivých markerů pro přesnou fenotypizaci. V případě zaplavení patří mezi takové znaky zejména masivnější formování aerenchymu. Zhang *et al.* (2017) testovali rozsáhlou populaci dihaploidních linií vzniklých křížením mezi kulturním a planým ječmenem lišícím se výškou, výnosem, počtem klasů, formováním aerenchymu a odolností vůči nadměrnému zaplavení. U těchto linií detekovali mnoho odlišných QTL za kontrolních podmínek i za nadměrného zaplavení a provedli jejich detailní analýzu. Identifikovali alelu pocházející z planého kultivaru, která odpovídá za lepší schopnost formování aerenchymu a zvýšenou toleranci vůči nadměrnému zaplavení. Závěrem uvádějí, že takovýto marker je ideálním kandidátním genem pro šlechtitelské programy. Podobné práce byly publikovány i u dalších druhů rostlin (rýže, *A. thaliana*, aj.) včetně okrasných. Z rozsáhlé detailní studie zaměřené na mapování a analýzu QTL u *Chrysanthemum morifolium* Ramat. pro vybrané znaky související s tolerancí k zaplavení vyplynulo, že QTL kontrolující toleranci jsou silně ovlivněny vnějšími podmínkami, jsou selektivně exprimovány a v dědičnosti tolerance se uplatňují jak aditivní, tak epistatické vztahy. Autoři detekovali unikátní QTL pro vybrané znaky, ale doporučili na základě provedené analýzy klastrů QTL i několik vhodných kombinací pro molekulární šlechtění u tohoto druhu (Su *et al.* 2018). Výsledky mapovacích studií QTL u kukuřice v souvislosti s odolností vůči zaplavení vedly rovněž k detekci klíčového genu pro toleranci, který by podle autorů mohl být využíván v MAS (marker-assisted selection) na vyšší toleranci k tomuto stresovému faktoru (Yu *et al.* 2019).

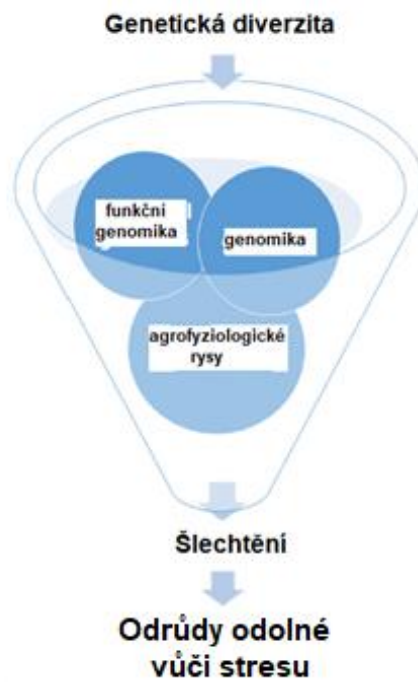
4.3. Potenciál a perspektiva „omik“

U mnoha plodin je stále ještě šlechtění k odolnosti vůči stresovým faktorům poměrně omezené a kultivary a odrůdy byly šlechtěny hlavně s ohledem na kvalitní výnos o velkém množství. Menším důraz byl pak kladen na jiné vlastnosti (odolnost k suchu, využití živin, odolnost ke škůdcům a chorobám a další). K překonání těchto nedostatků byly v minulosti používány prostředky jako hnojení, zavlažování a pesticidy apod. a nevěnovala se patřičná pozornost studiu genetické podstaty konkrétních znaků a možnostem využití získaných poznatků pro vylepšování stávajících genotypů. V souvislosti s tím se opět využívají původní odrůdy, nebo dokonce planě rostoucím druhy dnes již domestikovaných rostlin, které mohou nést geny odpovídající např. za rezistenci vůči stresovým faktorům (Zivy *et al.*, 2015). Trend ve ztrátě genetické diverzity u kulturních rostlin během šlechtění (Obr. 7) je obecně známý a k jeho překonání je

možno využít například hybridizaci (mezidruhovou, kulturní x nedomestikované formy) nebo transgenezi (Rauf *et al.*, 2010).

V mnoha státech se proto dnes iniciuje zakládání genových bank (Germplasm collection). Ty pak mohou poskytnout velmi početné soubory genotypů, které jsou využitelné ve šlechtitelských programech. V souvislosti s odolností vůči stresovým faktorům je identifikace odolných fenotypů a využití jejich genetické diverzity zásadní pro následné využití ve šlechtění. Neznalost v této oblasti je tak výraznou hnací silou pro generování nových poznatků (výzkumných i aplikovaných) a poskytuje tak vědcům možnost využití jiných experimentálních přístupů. Tradičně se k tomu využívají DNA markery, ale k pochopení funkce genů a molekulárních interakcí můžeme využít několik metod, jako je genomika, transkriptomika (studie různých typů RNA), proteomika (studie peptidů, proteinů a jejich postranskripčních modifikací) a metabolomika (studie primárních a sekundárních metabolitů). Následná identifikace funkce genu v konkrétní odrůdě je jen počátečním krokem. K získání úplného pochopení výsledného fenotypu, potenciálu pro zemědělství a biodiverzitu je možno využít funkční genomiky. Ta je zaměřena na dynamické rysy, které odrážejí přizpůsobení prostředí a umožňuje popis funkcí genů i interakcí mezi jejich produkty. S rychlým vylepšováním a rozvojem těchto technologií klesá jejich cena a časová náročnost, které byly jistě významnými limitujícími faktory pro jejich zavádění a v budoucnu lze počítat s jejich masivním využíváním ve šlechtitelských programech (Zivy *et al.*, 2015).

Rovněž v případě stresu zaplavením existují práce zaměřené na analýzy transkriptomu a zejména proteomu. Analýza proteomu v hypokotylu citlivých a odolných kultivarů okurky (*Cucumis sativus* L.) vůči nadměrnému zaplavení prokázala u odolného kultivaru větší zastoupení proteinů souvisejících s odolností k zaplavení. Obdobně byl analyzován proteom listů a kořenů u dvou kultivarů ječmene (*Hordeum vulgare* L.) a bylo rovněž zjištěno zvýšené množství určitých proteinů v odolném kultivaru (Luan *et al.*, 2018). Jorge *et al.*, (2016) shrnují perspektivy metabolomiky s využitím hmotnostní spektrometrie, nejen pro analýzu rostlin v souvislosti se zaplavením a hypoxií, ale i pro další abiotické stresové faktory.



Obr. 7: Vliv šlechtění a šlechtitelských technik na genetickou diverzitu plodin. Po zvolení vhodných technik získáme fenotypická data pro následné šlechtění. Převzato a upraveno podle (Zivy et al., 2015)

5. Závěr

Zaplavení představuje pro rostliny významný stresový faktor. Nadbytek vody v půdě způsobuje řadu změn, které se negativně podílí na fungování kořenového systému, a to následně ovlivňuje fungování celé rostliny. Největší negativní vliv má následná hypoxie, tedy snížené množství kyslíku v okolí kořenů. Se stupňujícími se klimatickými změnami dochází k stále většímu množství událostí vedoucích k zaplavení, a to nejen přírodních lokalit, ale také lokalit spojených s kultivací plodin. To následně vede, k již zmíněnému poškození rostlin a nemalým škodám na úrodě. V předložené práci jsem uvedl hlavní principy, kterými se rostliny přirozeně snaží vyhnout poškození spojenému s nadbytkem vody a následnou hypoxií. Ty jsou využívány jako cíle při hledání a konstrukci vhodných genotypů a pro šlechtění odolných kultivarů a odrůd, a to díky klasickým i moderním metodám. Molekulární šlechtění nabízí účinné a v současné době dostupné technologie pro zvýšení odolnosti ekonomicky významných rostlin sice ještě s určitými limitacemi, ale s již praktickými výstupy. Ke šlechtění je možno využít i různé fenotypizační metody, které jsem ve své práci také nastínil. Ty umožňují nejen ověření úspěšného procesu šlechtění, ale také poznání vztahů, které se uplatňují mezi genotypem a fenotypem.

Přehled literárních zdrojů:

- Arikado, H. Anatomical and ecological responses of barley and some forage crops to the flooding treatment. *Bull. Fac. Agric. Mie Univ.* 11 (1955): 1-29.
- Arc, Erwann, et al. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in plant science* 4 (2013): 63.
- Bailey-Serres, J., and L. A. C. J. Voesenek. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (2008): 313-339.
- Bragina, T. V., N. A. Rodionova, and G. M. Grinjeva. Ethylene production and activation of hydrolytic enzymes during acclimation of maize seedlings to partial flooding. *Russian journal of plant physiology* 50.6 (2003): 794-798.
- Brownlee, C.. Aerenchyma Formation. *New Phytologist*, 266(3), 22954–423 (1994).
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb03960.x>
- Carpentier, S.. The quest for tolerant varieties : the importance of integrating “ omics ” techniques to phenotyping, 6(July), 1–11 (2015). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00448>
- Chen, Q., Lai, H., Hurtado, J., Stahnke, J., Leuzinger, K., & Dent, M.. Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins, 1(1), 1–21 (2014).
<https://doi.org/10.4172/atbm.1000103>.Agroinfiltration
- Chiang, C. M., & Chen, L. F. O.. Expression of eggplant ascorbate peroxidase increases the tolerance of transgenic rice plants to flooding stress (2014).
<https://doi.org/10.1007/s13562-014-0265-7>
- Christie, Peter J. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *Journal of bacteriology* 179.10 (1997): 3085.
- Colmer, T. D. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell & Environment* 26.1 (2003): 17-36.
- Colmer, T. D., and L. A. C. J. Voesenek. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology* 36.8 (2009): 665-681.
- Dat, J. F., Capelli, N., Folzer, H., Bourgeade, P., & Badot, P. M.. Sensing and signalling during plant flooding. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(4), 273–282 (2004).
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.02.003>
- Davies, David D. Anaerobic metabolism and the production of organic acids. *Metabolism and Respiration*. Academic press, (1980). 581-611.
- De, J., Jiménez, C., Cardoso, J. A., Leiva, L. F., Gil, J., Forero, M. G., Rao, I. M.. Non-destructive Phenotyping to Identify Brachiaria Hybrids Tolerant to Waterlogging Stress under Field Conditions, 8(February), 1–10 (2017).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00167>
- Debbarma, J., Sarki, Y. N., Saikia, B., Prasanna, H., & Boruah, D.. Ethylene Response Factor (ERF) Family Proteins in Abiotic Stresses and CRISPR – Cas9 Genome Editing of ERFs for Multiple Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants : A Review. *Molecular*

Biotechnology, 0 (0), 0 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0144-x>

- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., & Gonzales, K.. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts CRISPR RNA maturation by trans -encoded small RNA and host factor RNase III, *471(7340)*, 602–607 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature09886>.CRISPR
- Dennis, E. S., Dolferus, R., Ellis, M., Rahman, M., Wu, Y., Hoeren, F. U., Peacock, W. J.. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *Journal of Experimental Botany*, *51(342)*, 89–97 (2000). <https://doi.org/10.1093/jxb/51.342.89>
- Du, H., Shen, X., Huang, Y., Huang, M., & Zhang, Z.. Overexpression of *Vitreoscilla* hemoglobin increases waterlogging tolerance in *Arabidopsis* and maize. *BMC Plant Biology*, 1–11 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0728-1>
- Durack, P. J., Wijffels, S. E., & Matear, R. J. Ocean salinities reveal strong global water cycle intensification during 1950 to 2000. *science*, *336(6080)*, 455-458 (2012).
- Drew, M. C., and A. Fourcy. Radial movement of cations across aerenchymatous roots of *Zea mays* measured by electron probe X-ray microanalysis. *Journal of Experimental Botany* *37.6*: 823-831(1986).
- Fahlgren, N., Gehan, M. A., & Baxter, I. (n.d.). ScienceDirect Lights , camera , action : high-throughput plant phenotyping is ready for a close-up. *Current Opinion in Plant Biology*, *24*, 93–99 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.02.006>
- Fukao, T., & Bailey-Serres, J. Plant responses to hypoxia - Is survival a balancing act? *Trends in Plant Science*, *9(9)*, 449–456 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.005>
- Geigenberger, P. Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology*, *6(3)*, 247–256 (2003). [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00038-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00038-4)
- Geigenberger, P., & Dongen, J. T. Van. Hypoxia responsive gene expression is mediated by various subsets of transcription factors and miRNAs that are determined by the actual oxygen availability, 442–456 (2011).
- Gene, D., Oxygen, L., Hoeren, F. U., Dolferus, R., Wu, Y., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. Evidence for a Role for AtMYB2 in the Induction of the *Arabidopsis* Alcohol, (1998).
- Geon, T., Seong, C., Yoon, J., Sub, D., & Han, J. A Myb transcription factor (TaMyb1) from wheat roots is expressed during hypoxia : roles in response to the oxygen concentration in root environment and abiotic stresses, 375–385 (2007). <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00828.x>
- Grichko, V. P., & Glick, B. R. Flooding tolerance of transgenic tomato plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase controlled by the 35 S , rolD or PRB-1 b promoter, *39*, 19–25 (2001).
- Gunawardena, A. H. L. A. N., et al. Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localized form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L.) promoted by ethylene. *Plant, Cell & Environment* *24.12*: 1369-1375. (2001)
- He, C. J., et al. Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of maize

- subjected to mechanical impedance and hypoxia. *Plant Physiology* 112.4: 1679-1685 (1996).
- Hoekema, André, et al. A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303.5913: 179 (1983).
- Hossain, A., & Uddin, S. N. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: Morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. *Australian Journal of Crop Science*, 5(9 SPEC. ISSUE), 1094–1101 (2011).
- Iwasaki, A.. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA, (2018).
- Jackson, Michael B. Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. *Annual review of plant Physiology* 36.1: 145-174 (1985).
- Jiang, Wenyan, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology* 31.3: 233(2013).
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., & Jennifer, A. HHMI Author Manuscript A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, 337(6096), 816–821 (2012).
- Jorge, Tiago F., et al. Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spectrometry Reviews* 35.5: 620-649 (2016).
- Justin, S. H. F. W., and W. Armstrong. Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* 118.1: 49-62 (1991).
- Klem a kol: http://www.rostlinolekari.cz/sites/default/files/2018-04/Klem_Metody%20fenotypizace_Dunajovice_2018.pdf (2018)
- Klukas, C., Melchinger, A. E., Meyer, R. C., Riewe, D., & Altmann, T. Optimizing experimental procedures for quantitative evaluation of crop plant performance in high throughput phenotyping systems, 5(January), 1–21 (2015). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00770>
- Komatsu, S., Yamamoto, R., Nanjo, Y., Mikami, Y., Yunokawa, H., & Sakata, K. A Comprehensive Analysis of the Soybean Genes and Proteins Expressed under Flooding Stress using Transcriptome and Proteome Techniques research articles, 4766–4778 (2009).
- Li, L., Zhang, Q., & Huang, D.. A Review of Imaging Techniques for Plant Phenotyping, 20078–20111 (2014). <https://doi.org/10.3390/s141120078>
- Licausi, Francesco, et al. Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* 479.7373: 419 (2011).
- Liebisch, F., Kirchgessner, N., Schneider, D., Walter, A., & Hund, A.. Remote , aerial phenotyping of maize traits with a mobile multi-sensor approach Remote , aerial phenotyping of maize traits with a mobile multi-sensor approach (2015) <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0048-8>

- Luan, Haiye, et al. Elucidating the hypoxic stress response in barley (*Hordeum vulgare* L.) during waterlogging: A proteomics approach. *Scientific reports* 8.1: 9655 (2018).
- Mano, Y., Omori, F., Muraki, M., & Takamizo, T. QTL Mapping of Adventitious Root Formation under Flooding Conditions in Tropical Maize (*Zea mays* L.) Seedlings, *347*, 343–347 (2005).
- Mocquot, Bernard, et al. Effect of anoxia on energy charge and protein synthesis in rice embryo." *Plant Physiology* 68.3: 636-640 (1981).
- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., & Kumar, D. S. Plant Science Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*, *179*(3), 154–163 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.012>
- Nanjo, Y., Skultety, L., Hajduch, M., & Komatsu, S. Mass Spectrometry-Based Analysis of Proteomic Changes in the Root Tips of Flooded Soybean Seedlings (2012).
- Ni, X., Gui, M., Tan, L., Zhu, Q., & Liu, W. Programmed Cell Death and Aerenchyma Formation in Water-Logged Sunflower Stems and Its Promotion by Ethylene and ROS, *9*(January), 1–16 (2019). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01928>
- Păcurar, Daniel I., et al. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and molecular plant pathology* 76.2: 76-81 (2011).
- Paprotny, D., Sebastian, A., Morales-nápoles, O., & Jonkman, S. N. Trends in European flood risk over the past 150 years, 1–26 (1870).
- Ponnamperuma, F. N. The Chemistry of Submerged Soils. *Advances in Agronomy*, *24*(C), 29–96 (1972). [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60633-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60633-1)
- Rauf, S., Teixeira, J. A., Ali, A., & Abdul, K. (2010). Consequences of Plant Breeding on Genetic Diversity Consequences of Plant Breeding on Genetic Diversity, (November 2015).
- Schussler, E. E., O. N. Borkhsenius, and D. J. Longstreth. Formation of root aerenchyma involves programmed cell death in *Sagittaria lancifolia*. *Plant.Physiol.*: 114(3 Suppl) 1997.
- Sciences, A. Long-distance transport of gases in plants : a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots, 17–36 (2003).
- Setter, T. L., & Waters, I. Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat , barley and oats, 1–34(2003).
- Sorek, R., Lawrence, C. M., & Wiedenheft, B.. CRISPR-Mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea (2013). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072911-172315>
- Stünzi, Jürg T., and Hans Kende. Gas composition in the internal air spaces of deepwater rice in relation to growth induced by submergence." *Plant and Cell Physiology* 30.1: 49-56 (1989).
- Su, Jiangshuo, et al. Dynamic and epistatic QTL mapping reveals the complex genetic architecture of waterlogging tolerance in chrysanthemum. *Planta* 247.4: 899-924 (2018).
- Torney, F. J., Trewyn, B. G., & Wang, K. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and

- chemicals into plants, (2007). <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.108>
- Trought, M. C. T., and M. C. Drew. The development of waterlogging damage in young wheat plants in anaerobic solution cultures. *Journal of Experimental Botany* 31.6: 1573-1585 (1980).
- Voesenek, L. A. C. J., et al. How plants cope with complete submergence. *New phytologist* 170.2: 213-226 (2006).
- Voesenek, L. A. C. J., & Sasidharan, R.. Ethylene - and oxygen signalling - drive plant survival during flooding. *Plant Biology*, 15(3), 426–435 (2013). <https://doi.org/10.1111/plb.12014>
- Walker, J. M. *Comparison Between Agrobacterium-Mediated and Direct Gene Transfer Using the Gene Gun IN MOLECULAR BIOLOGY™ Series Editor* (2014). <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-110-3>
- Wei, X., & Zhang, Z. Constitutive expression of a stabilized transcription factor group VII ethylene response factor enhances waterlogging tolerance in wheat without penalizing grain yield, (December 2018), 1471–1485 (2019). <https://doi.org/10.1111/pce.13505>
- Xu, Kenong, et al. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442.7103: 705 (2006).
- Xu, Xuewen, et al. Comparative proteomic analysis provides insight into the key proteins involved in cucumber (*Cucumis sativus* L.) adventitious root emergence under waterlogging stress. *Frontiers in plant science* 7: 1515 (2016).
- Yu, Feng, et al. Major natural genetic variation contributes to waterlogging tolerance in maize seedlings. *Molecular Breeding* 39.7: 97 (2019).
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S., Niu, Q., & Chua, N.. *Agrobacterium* -mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method, (February 2006), 641–646 (2014). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>
- Zhang, Xuechen, et al. Waterlogging tolerance in barley is associated with faster aerenchyma formation in adventitious roots. *Plant and Soil* 394.1-2: 355-372 (2015).
- Zhang, Xuechen, et al. Meta-analysis of major QTL for abiotic stress tolerance in barley and implications for barley breeding. *Planta* 245.2: 283-295 (2017).
- Zhou, M. Accurate phenotyping reveals better QTL for waterlogging tolerance in barley. *Plant breeding* 130.2: 203-208 (2011).
- Zivy, Michel, et al. The quest for tolerant varieties: the importance of integrating “omics” techniques to phenotyping. *Frontiers in plant science* 6: 448 (2015).
- Zupan, John R., and Patricia Zambryski. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology* 107.4: 1041(1995).