

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Barbora Skulníková

**Flexibilita metabolismu cyklitolů jako součást efektivní obrany rostlin proti
nedostupnosti vody**

Flexibility of cyclitol metabolism as a component of effective plant defense
against water scarcity

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Hana Konrádová, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Haně Konrádové, Ph.D. a konzultantce doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D za cenné rady a trpělivost při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, zejména babičce a příteli, za podporu nejen při psaní této práce, ale během celého studia.

Čestné 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, 4. 6. 2020

Podpis

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na mechanismy obrany rostlin proti stresu ze sucha a zasolení spojené s produkcí kompatibilních solutů, přičemž pozornost je věnována akumulaci cyklických cukerných alkoholů - *myo*-inositolu a jeho methylovaných derivátů. Je zde popsán výskyt těchto látek, jejich biosyntéza a funkce v rostlinách. Další část této práce se zaměřuje na kosmatec (*Mesembryanthemum crystallinum*), který je významným producentem těchto látek a současně využívaným modelem pro studium stresové odpovědi u rostlin. Popisuje se zde jeho životní cyklus a především mechanismy, díky kterým je odolný vůči stresu ze sucha a zasolení. Poslední kapitola je věnována znalostem získaným pomocí studia transgenních rostlin, které byly vytvořeny pomocí vnesení genů z kosmatce a dalších rostlin tolerantních vůči stresu.

Klíčová slova: Cukerné alkoholy, inositol, *Mesembryanthemum crystallinum*, ononitol, pinitol, stres ze sucha a zasolení

Abstract

This bachelor thesis is focused on plant defence mechanisms against drought stress and salinity stress associated with the production of compatible solutes, while attention is paid to the accumulation of cyclic sugar alcohols, *myo*-inositol and its methylated derivatives. It describes the occurrence of these substances, their biosynthesis and function in plants. Another part of this thesis focuses on the crystalline ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*), which is an important producer of these substances and serves as a model used to study the stress response in plants. It describes its life cycle and especially the mechanisms that makes it resistant to drought stress and salinity. The last chapter is dedicated to the knowledge gained through the study of transgenic plants, which were prepared using genes from crystalline ice plant and other stress tolerant plants.

Key words: Drought and salt stress, inositol, *Mesembryanthemum crystallinum*, ononitol, pinitol, Sugar alcohols

Obsah

1. Úvod	1
2. Kompatibilní soluty.....	2
2.1 Cukerné alkoholy (polyoly).....	2
2.1.1 Lineární cukerné alkoholy	3
2.1.2 Cyklické cukerné alkoholy (cyklitoly).....	3
2.1.2.1 Syntéza myo-inositolu	4
2.1.2.2 Methylované deriváty myo-inositolu	4
2.1.2.3 Funkce myo-inositolu a jeho derivátů	6
2.1.2.4 Rostliny akumulující myo-inositol a jeho deriváty	7
3. Mesembryanthemum crystallinum	9
3.1 Přechod k CAM	10
3.2 Kompatibilní soluty - sacharidy	13
3.3 Další kompatibilní soluty	17
3.4 Měchýřkovité buňky	19
3.5 Vývojově podmíněný nástup ochranných mechanismů	20
4. Transgenní rostliny	22
4.1 Tabák (<i>Nicotiana tabacum</i>)	23
4.2 Rýže (<i>Oryza sativa</i>)	26
4.3 Brukev sítinovitá (<i>Brassica juncea</i>).....	27
4.4 Huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	28
5. Závěr	30
6. Seznam použité literatury	31

Seznam použitých zkratek

ABA	kyselina abscisová
APX	askorbátperoxidáza
CAM	crassulacean acid metabolism, metabolismus kyselin u tučnolistých rostlin
CAT	kataláza
EBC	epidermal bladder cells, měchýřkovité buňky epidermis
GDP1	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
IMP1	<i>myo</i> -inositolmonofosfatáza
IMT1	<i>myo</i> -inositol O-methyltransferáza
INO1/INPS/MIPS	<i>myo</i> -inositol-1-fosfátsyntáza
MI	<i>myo</i> -inositol
OEP1	ononitolepimeráza
PEPC	fosfoenolpyruvátcarboxyláza
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PS II	fotosystém II
P5CS	Δ 1-pyrrolin-5-karboxylátsyntáza
R/FR	poměr červeného/dlouhovlnného červeného světla
SOD	superoxiddismutáza

1. Úvod

Rostliny jsou během svého života vystaveny různorodým podmínkám vnějšího prostředí, které mohou způsobit poškození na všech úrovních a někdy mohou vést i k uhynutí celé rostliny. Takovéto nepříznivé vlivy vnějšího prostředí se označují jako stresové faktory. Dělíme je na abiotické, které se dále dělí na fyzikální (např. vítr, záření, teplota) a chemické (např. voda, kyslík, živiny, toxické látky), a biotické, mezi které patří působení herbivorů, patogenů a vzájemné ovlivňování organismů mezi sebou (např. parazitismus). Stresové faktory však obvykle nepůsobí jednotlivě, ale současně, a vlivem interakcí mezi nimi dochází k modifikaci stresové reakce, což velmi ztěžuje studium stresu u rostlin v přírodních podmínkách (Procházka *et al.*, 1998). K nejvýznamnějším abiotickým faktorům patří nedostatek vody a zasolení, které omezují růst a produktivitu rostlin na celém světě. Ke snižování obsahu vody v rostlinách dochází, když rychlost transpirace překračuje příjem vody. Snižená dostupnost vody je součástí stresu ze sucha, zasolení a nízké teploty, a vysychání je také běžnou součástí některých vývojových procesů, jako je například vývoj semen (Bray, 1997; Negrão *et al.*, 2017). Jednou z adaptací, které využívají rostliny tolerantní vůči suchu a zasolení je CAM (crassulacean acid metabolism, česky též metabolismus kyselin u tučnolistých rostlin, nazvaný podle skupiny rostlin, u kterých byl tento cyklus poprvé pozorován) a C4 fotosyntéza. V prvním případě dochází k časovému, ve druhém případě k prostorovému oddělení příjmu a fixace CO₂ (Hatch, 1987; Ehleringer and Cerling, 2002). Rostliny rostoucí na zasolených stanovištích mají problémy s toxicitou některých iontů (Na⁺, Cl⁻, Mg²⁺ a SO₄²⁻), nedostupností vody způsobenou nepříznivým gradientem vodního potenciálu mezi cytosolem buněk a půdním roztokem a se zhoršením vlastností samotné půdy (Taiz and Zeiger, 2003). Rostliny, které nejsou na takové prostředí adaptované a vyšší množství solí je pro ně toxické, se nazývají glykofyty. Mezi ně patří většina kulturních plodin, například kukuřice (*Zea mays*) a ječmen (*Hordeum vulgare*) (Taiz and Zeiger, 2003), z dalších rostlin například modelová rostlina huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) (Flowers and Colmer, 2008). Oproti tomu jsou některé rostliny na zasolené půdy adaptované a dokáží v takovém prostředí dokončit vývojový cyklus. Takovým rostlinám říkáme halofyty. Jednou z možností, jak se zvýšenému množství solí v prostředí bránit, je uložení solí do solných žlázek, nebo jejich vyloučení na povrch listů, jako je tomu například u tamaryšku (*Tamarix sp.*) a lebedy (*Atriplex sp.*). Tolerance halofytů je tedy závislá na kontrolovaném příjmu a kompartmentaci iontů (Na⁺, K⁺ a Cl⁻). Zvýšený obsah solí v půdním roztoku ovšem také ztěžuje příjem vody rostlinou. Proto je další strategií syntéza kompatibilních solutů (Flowers and Colmer, 2008). K prozkoumání těchto mechanismů se využívají odolné rostliny a informace získané jejich studiem mohou sloužit k vytvoření transgenních kulturních plodin odolnějších vůči stresu. Mnohdy se k tvorbě odolnějších kulturních plodin využívá jim příbuzná, odolná rostlina (např. rýže *Oryza sativa* a halofytní rýže *Porteresia coarctata*) (Mukherjee *et al.*, 2019).

2. Kompatibilní soluty

Kompatibilní soluty patří do odlišných biochemických skupin, ale co se týká ochrany rostlin před stresem, mají podobné funkce. Jsou to nízkomolekulární sloučeniny rozpustné ve vodě (Giri, 2011), které se při stresu hromadí v cytosolu do vysokých koncentrací, ale přesto nezasahují do biochemických reakcí buňky (Bohnert *et al.*, 1995; Giri, 2011; Sharma *et al.*, 2019). Jsou schopné udržet optimální prostředí pro průběh reakcí, interagují s proteiny a udržují jejich hydrataci, ale nenarušují jejich strukturu (Bartels and Sunkar, 2005). Jejich primární rolí je udržení turgoru při osmotickém stresu, ale také stabilizace membrán a proteinů (Bohnert and Jensen, 1996; Bartels and Sunkar, 2005) a inhibice sekundární produkce sekundárních reaktivních forem kyslíku (včetně nejnebezpečnějších hydroxylových radikálů), čímž rostlinu brání před oxidativním poškozením (Sharma *et al.*, 2019).

Když je v půdě nedostatek vody, snižuje se její vodní potenciál půdního roztoku. Aby i přesto mohly rostliny přijímat vodu, udržely si turgor a mohly i při stresu získávat uhlík, musí být jejich vodní potenciál nižší než vodní potenciál půdy. To se děje právě pomocí hromadění kompatibilních solutů (Bartels and Sunkar, 2005). Při zasolení dochází k hromadění iontů, které narušují reakce probíhající v buňkách, rostliny je proto ukládají do vakuol. Aby se v rámci buňky udržel osmotický potenciál, musí se kompatibilní soluty hromadit v cytosolu (Taiz and Zeiger, 2003).

Kompatibilní soluty můžeme rozdělit do tří skupin - první z nich jsou betainy a jim příbuzné sloučeniny (dimethylsulfoniopropionát a cholin-O-sulfát), druhým typem jsou aminokyseliny, mezi které patří prolin, a třetí skupinou jsou cukerné alkoholy a cukry, například sorbitol, manitol, *myo*-inositol, D-ononitol a D-pinitol nebo sacharóza (Chen and Murata, 2002; Ahn *et al.*, 2018). V této práci se budu věnovat poslední zmíněné skupině – a to především cyklickým cukerným alkoholům.

2.1 Cukerné alkoholy (polyoly)

Cukerné alkoholy, jinak také polyoly, polyalkoholy nebo vícesytné alkoholy (Bieleski, 1982), jsou sloučeniny, které řada rostlin produkuje vedle sacharózy jako primární fotosyntetické produkty a patří mezi kompatibilní soluty (Stoop *et al.*, 1996). Vznikají redukcí aldo- nebo ketoskupiny cukru na odpovídající hydroxylovou skupinu. Polyoly mohou být acyklické (s přímým řetězcem, glycitoly) nebo cyklické (cyklitoly). Biologicky, fyzikálně i chemicky se cukerné alkoholy podobají cukrům, některé jsou dokonce sladké, například xylitol, který se používá jako potravinářské sladidlo. Nejjednodušším cukerným alkoholem je glycerol, který je součástí lipidů a fosfolipidů a funguje i jako osmotikum (Bieleski, 1982). V cévnatých rostlinách bylo nalezeno 17 cukerných alkoholů, z nichž 13 se nachází v krytosemenných (Noiraud *et al.*, 2001).

2.1.1 Lineární cukerné alkoholy

Zdaleka nejhojnějším polyolem v přírodě je manitol odvozený od manózy. Syntetizují ho prokaryota, řasy, houby a více než 100 druhů rostlin, včetně několika zemědělských plodin. Rostliny, které jej produkují ve větším množství, jsou tolerantnější vůči osmotickému stresu. Metabolismus manitolu může hrát také důležitou roli při napadení patogeny. Manitol se nachází například v kokosovníku (*Cocos nucifera*), salátu (*Lactuca sativa*), vodním melounu (*Citrullus vulgaris*), kávovníku (*Coffea arabica*), květáku (*Brassica oleracea*) a v několika druzích čeledi olivovníkovité (*Oleaceae*) (Stoop *et al.*, 1996). Manitol je syntetizován především v listech prostřednictvím NADPH-manóza-6-fosfátreduktázy která způsobuje přeměnu manóza-6-fosfátu na manitol-1-fosfát, ten je poté defosforylován fosfatázou za vzniku manitolu (Williamson *et al.*, 2002).

Dalším hojně rozšířeným polyolem je sorbitol odvozený z glukózy, který byl poprvé izolován z jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia*), po kterém byl pojmenován (Bieleski, 1982). Dále se nachází například u jabloně (*Malus domestica*), broskvoně (*Prunus persica*) (Williamson *et al.*, 2002) a jitrocelu (*Plantago major*) (Bieleski, 1982). Syntéza sorbitolu je podobná, jako v případě manitolu. V listech dochází ke vzniku sorbitol-6-fosfátu z glukóza-6-fosfátu pomocí NADP dependentní sorbitol-6-fosfát dehydrogenázy a následně dochází k defosforylaci sorbitol-6-fosfátu za vzniku sorbitolu.

Mezi další časté polyoly patří i galaktitol, nacházející se u rostlin čeledi jesencovité (*Celestraceae*) a krtičníkovité (*Scrophulariaceae*) (Bieleski, 1982; Noiraud *et al.*, 2001).

2.1.2 Cyklické cukerné alkoholy (cyklitoly)

Druhou skupinou cukerných alkoholů jsou cyklické alkoholy, z nichž nejvýznamnější a všudypřítomný je inositol. Inositol je cyklický alkohol se šesti hydroxylovými skupinami, tedy cyklohexan-1,2,3,4,5,6-hexol (Valluru and Van den Ende, 2011). Existuje devět stereoizomerů inositolu, které se liší umístěním hydroxylových skupin nad nebo pod rovinou kruhu (Loewus, 1982), sedm z nich se vyskytuje v přírodě (Valluru and Van den Ende, 2011). Inositoly jsou malé, chemicky velmi stabilní polární molekuly, které získaly v průběhu evoluce různé funkce a nachází se u všech eukaryot (Michell, 2008).

Nejběžněji se vyskytující izomer, *myo*-inositol (MI), je přítomen jako volný cyklitol ve všech rostlinách. Další izomery vznikají z MI epimerací (např. *scyllo*- a *L-chiro*-inositol) nebo methylací (např. D-pinitol, L-quebrachitol) (Loewus, 1982). Informace o metabolismu, struktuře a fyziologii inositolu a inositolových sloučenin máme z několika zástupců archea, několika druhů bakterií, z eukaryot zejména ze savců, dále z kvasinek a zelených rostlin (Michell, 2008, 2011).

Část archeí a eukaryota využívají inositol a jeho deriváty jako kompatibilní soluty, hromadí je v buňkách do vysokých koncentrací, čímž zvyšují odolnost vůči stresu ze sucha, zasolení i chladu. Tento způsob ochrany před stresem nacházíme především u rostlin, které využívají methylované deriváty inositolu (Michell, 2008). Inositol a jeho deriváty mají schopnost zhášet volné radikály. Inhibice reaktivity hydroxylových radikálů pomocí MI byla 55 %, ale pomocí methylovaných derivátů, pinitolu, ononitolu a sekvojitolu, byla aktivita radikálů inhibována až ze 75 % (Negishi *et al.*, 2015).

2.1.2.1 Syntéza myo-inositolu

MI je syntetizován z D-glukózy ve třech enzymatických krocích. Prvním z nich je nevratná cyklizace glukóza-6-fosfátu prostřednictvím *myo*-inositol-1-fosfátsyntázy (MIPS/INO1/INPS) na inositol-1-fosfát. Následuje odštěpení fosfátu pomocí *myo*-inositolmonofosfatázy a uvolnění volného MI (obr. 1). Toto je jediná cesta biosyntézy MI u sinic, řas, hub, rostlin i zvířat. Všechny ostatní zdroje MI zahrnují regeneraci volného MI z metabolických produktů obsahujících MI. Podrobněji se o syntéze MI píše v článku Loewus and Murthy (2000).

INO1 je vysoce konzervovaný enzym (Ishitani *et al.*, 1996), který se vyskytuje v cytoplazmatické formě v celé řadě rostlin, zvířat a hub. INO1 byl také detekován u několika bakterií a řas. Nacházíme ho například v kvasince (*Saccharomyces*), krásnoočku (*Euglena gracilis*), rýži (*Oryza sativa*), kosmatci (*Mesembryanthemum crystallinum*) a javoru (*Acer pseudoplatanus*). U vyšších rostlin byla nalezena i chloroplastová forma (Majumder *et al.*, 1997). Za normálních podmínek je u rostlin INO1 přítomen ve všech buňkách, ale při zasolení docházelo ke zvýšení jeho množství v listech, zatímco v kořenech se jeho množství snižovalo (Nelson *et al.*, 1998). Nadměrná exprese *INO1* při zasolení má za následek 5 až 10krát vyšší množství volného *myo*-inositolu (Ishitani *et al.*, 1996), který je transportován floémem z listů do kořenů a signalizuje aktivitu fotosyntézy. Díky tomu může pokračovat biosyntéza membrán, což je nezbytné pro růst kořenů. Celkové množství inositolu a jeho derivátů koreluje s množstvím sodíku translokovaným xylémem do listů. Prostřednictvím akumulace MI v cytosolu rostlina reaguje na osmotický potenciál snížený hromaděním sodíku ve vakuole (Nelson *et al.*, 1998).

2.1.2.2 Methylované deriváty myo-inositolu

K nejčastěji se vyskytujícím derivátům MI patří quebrachitol (1-O-methyl-L-inositol), který byl poprvé izolován z mízy javoru cukrového (*Acer saccharum*). Míza byla odebrána během dormantní fáze (v průběhu zimy a brzy na jaře) a po analýze bylo zjištěno, že obsahovala 4 až 6 % quebrachitolu z celkového množství sušiny. Ve vegetativním období se ale množství quebrachitolu snižovalo, až z mízy téměř zmizel (Stinson *et al.*, 1967). Další rostlinou, která produkuje quebrachitol, je rakytník

řešetlákový (*Hippophae rhamnoides*). Tým Yang *et al.* (2011) se zaměřil na studium poddruhu rakytníku, rostoucího v chladných a suchých oblastech severozápadní Číny. Tento poddruh produkuje ve srovnání s jinými (v této práci porovnáván s finským a ruským poddruhem) více quebrachitolu a MI, přičemž množství quebrachitolu negativně korelovalo s teplotou vzduchu. Na základě výsledků analýz a pozorování tedy autoři studie předpokládají roli quebrachitolu v odolnosti vůči chladu (Yang *et al.*, 2011). Quebrachitol se nachází také v liči (*Litchi chinensis*), kde v listech tvoří až 50 % všech rozpustných cukrů a 40 % všech cukrů transportovaných floémem. V liči ale není syntéza a transport tohoto methylovaného derivátu inositolu spojena s osmotickým stresem, pravděpodobně představuje strategii metabolismu uhlíku a usnadňuje transport vody (snížením osmotického potenciálu floému) a růst, pokud dojde ke snížení množství sacharózy. Navíc jsou rostliny odolnější vůči škůdcům a chorobám, v porovnání s dalšími rostlinami čeledi mýdelníkovité (Sapindaceae), které produkují méně quebrachitolu (Wu *et al.*, 2018). V liči a javoru klen (*Acer pseudoplatanus*) byl nalezen quebrachitol spolu s bornesitolem, dalším methylderivátem, ze kterého vzniká epimerací (Schilling *et al.*, 1972; Wu *et al.*, 2018). V jiných rostlinách je ale prekurzorem quebrachitolu inositol (Schilling *et al.*, 1972).

Další methylovaný derivát MI, sekvojitol (1D-5-O-methyl-*myo*-inositol), je v nahosemenných a některých krytosemenných rostlinách (např. *Trifolium incarnatum*) prekurzorem D-pinitolu (Ruis and Hoffmann-Ostenhof, 1969; Dittrich and Korak, 1984; Dittrich and Brandl, 1987) a nachází se například v jinanu (*Ginkgo biloba*) (Negishi *et al.*, 2015). U krytosemenných rostlin se však jako prekurzor pinitolu vyskytuje D-ononitol (1D-4-O-methyl-*myo*-inositol) (Dittrich and Korak, 1984; Dittrich and Brandl, 1987).

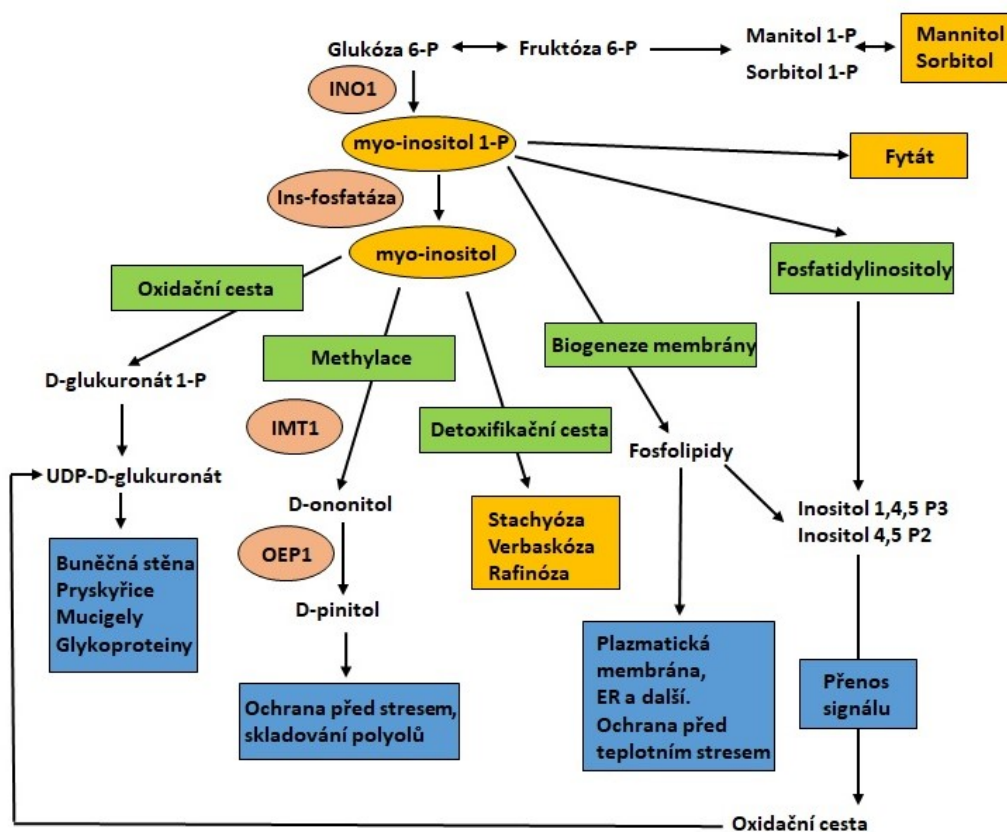
Ononitol vzniká z MI pomocí *myo*-inositol O-methyltransferázy (IMT1), která připojuje methylovou skupinu na čtvrtou hydroxylovou skupinu *myo*-inositolu (Loewus and Loewus, 1983; Loewus and Murthy, 2000; Negishi *et al.*, 2015). Za normálních podmínek byla exprese IMT1 potlačena ve všech buňkách (Nelson *et al.*, 1998) a při osmotickém stresu docházelo k její indukci, což bylo prokázáno u řady krytosemenných rostlin, například kosmatce (*Mesembryanthemum crystallinum*) (Vernon and Bohnert, 1992b) a halofytní rýže *Porteresia coarctata* (Sengupta *et al.*, 2008). Ononitol se ale ve většině případů vyskytoval ve velmi nízkých koncentracích, protože je pouze přechodným meziproduktem metabolismu při syntéze D-pinitolu (Ishitani *et al.*, 1996). K epimeraci ononitolu na pinitol dochází činností D-ononitolepimerázy (OEP1) (Loewus and Loewus, 1983; Loewus and Murthy, 2000). Pinitol je metabolicky inertní a nachází se v cytosolu i chloroplastech (Paul and Cockburn, 1989). Při stresu ze sucha a zasolení dochází k masivnější methylaci, čímž se tvoří více ononitolu (Ahn *et al.*, 2011) a následně pinitolu ve všech typech buněk (v listech více než v kořenech, může tvořit 7 až 9 % suché hmotnosti rostliny (Paul and Cockburn, 1989)) a inositol spolu s ononitolem a pinitolem tvoří hlavní metabolity transportované floémem (Nelson *et al.*, 1998, 1999). Hromadění pinitolu je prospěšné pro přizpůsobení se abiotickému stresu a stabilizaci membrán při osmotických

změnách (Negishi *et al.*, 2015).

Mezi další deriváty inositolu patří kyselina D-glukuronová (D-glukuronát a z něj vzniklý UDP-D-glukuronát), která slouží k syntéze pektinových a necelulózních sloučenin buněčné stěny (Loewus *et al.*, 1962).

2.1.2.3 Funkce myo-inositolu a jeho derivátů

Inositol je v organismech součástí membránových lipidů, fosfatidylinositolů (obr. 1). Z nich má velkou roli fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na cytoplazmatické membráně, který je důležitý pro endocytózu, exocytózu a integritu cytoskeletu (Michell, 2008). Hydrolyzou PIP₂ vnikají signální molekuly, takzvaní druzí poslí, inositol-1,4,5-trisfosfát a 1,2-diacylglycerol (Michell, 2008; Munnik and Vermeer, 2010; Valluru and Van den Ende, 2011). Dále všechna eukaryota využívají fosfatidylinositol-3-fosfát a pravděpodobně také fosfatidylinositol-3,5-bisfosfát v sekrečních a endocytotických drahách.



Obrázek 1: Schéma syntézy myo-inositolu a jeho derivátů a jejich nejdůležitější funkce. INO1 - myo-inositol-1-fosfátsyntáza, IMT1 - O-methyltransferáza, OEP1 - D-ononitolepimeráza. Upraveno podle Bohnert *et al.* (1995).

Kyselina fytová (*myo*-inositolhexakisfosfát) je největší zásobárnou fosfátu v rostlinách (Bohnert and Cushman, 2000). Dalším derivátem inositolu jsou inositol-polyfosfáty (a z nich vzniklé pyrofosfáty) (Michell, 2008) a galaktinol, který funguje jako donor galaktosylové skupiny pro biosyntézu sacharidů rafinóзовé řady (Bohnert and Jensen, 1996; Peterbauer and Richter, 2001). Inositol je také součástí glycerol- a sfingolipidových kotev, kde se účastní externí expozice proteinů. Příkladem využití inositolu u savců je osmoregulace v buňkách ledvin, které využívají Na⁺/inositolové transportéry. Pokud tyto transportéry nefungují, dojde k selhání ledvin (Michell, 2008).

2.1.2.4 Rostliny akumulující *myo*-inositol a jeho deriváty

Jednou z rostlin, které využívají methylované deriváty MI k osmotickému přizpůsobení, je *Porteresia coarctata*. Je to divoká halofytní rýže, vzdáleně příbuzná domestikované rýži *Oryza sativa*, rostoucí v pobřežních mangrovových oblastech Indie, Pákistánu a Bangladéše. Jelikož roste v zasolených oblastech, má řadu mechanismů, jak být vůči tomuto stresu odolnější (Sengupta and Majumder, 2010). Jedním z takových mechanismů je vyloučení soli prostřednictvím strukturně velmi jednoduchých jednobuněčných solných vlásků (Flowers *et al.*, 1990). Pokud je množství solí vysoké, na povrchu listů se tvoří viditelné krystaly (Sengupta and Majumder, 2010). Další možnost souvisí s metabolismem inositolu, což je u této rostliny nejstudovanější aspekt tolerance k zasolení. *P. coarctata* exprimuje gen *PcINO1*, který kóduje enzym, jehož aktivita není inhibována zasolením (*in vitro* až do 500 mM NaCl) a také exprimuje gen indukovaný zasolením, *PcIMT1* (Sengupta and Majumder, 2010). Při zasolení dochází ke koordinované expresi obou genů a následně se zvyšují hladiny obou proteinů, z čehož vyplývá, že syntéza a akumulace MI, ononitolu a následně pinitolu je v této rostlině regulována stresem (Sengupta *et al.*, 2008; Sengupta and Majumder, 2010). Pinitol se při stresu (400 mM NaCl po dobu 10 dní) hromadil v množství 35–40 μmol/g čerstvé hmotnosti, ve srovnání s tím se v *O. sativa* pinitol neakumuluje za normálních podmínek ani při zasolení, protože se v této domestikované rýži nenachází homolog genu *IMT1* (Sengupta *et al.*, 2008). Je tedy možné, že se v průběhu domestikace řada genů z *Oryza sativa* ztratila (Sengupta and Majumder, 2010). V poslední době se řada vědců věnuje vytvoření transgenní rýže tolerantní vůči zasolení pomocí vnesení genů právě z *P. coarctata* (Das-Chatterjee *et al.*, 2006; Goswami *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2019). Podrobněji rozebráno v kapitole Transgenní rostliny.

Pinitol se v přírodě vyskytuje hlavně u luštěnin, například sóji (*Glycine max*) (Morinaga *et al.*, 2006). Kromě pinitolu, který je nejvíce zastoupený (6,6 až 17,7 mg/g sušiny a tvořil 38 až 84 % všech rozpustných uhlovodíků) obsahují sójové boby také menší množství *D-chiro*-inositolu, MI a sekvojitolu. Kořenové hlízký obsahují stejné cyklitoly, ale v jiném zastoupení (pinitolu je zde jen 4 až 14,2 mg/g sušiny) (Phillips *et al.*, 1982). Mezi další luštěniny patří například tropická luštěnina vigna rýžová

(*Vigna umbellata*), která akumuluje ononitol (v listech 33 až 88 $\mu\text{mol/g}$ sušiny) (Wanek and Richter, 1997), hrách setý (*Pisum sativum*), kde ononitol představuje hlavní sacharidovou složku (tvořil 92 až 97 % všech cyklitolů) (Streeter, 1985) a kajan indický (*Cajanus cajan*), který k osmotickému přizpůsobení při stresu ze sucha využívá pinitol (v listech až 85 mg/g sušiny) (Keller and Ludlow, 1993).

Zvýšenou syntézu a akumulaci cyklitolů, konkrétně quercitolu, využívá během stresu ze sucha i několik druhů eukalyptů. Bylo zkoumáno 13 druhů eukalyptů rostoucích ve dvou typech prostředí, suchém (roční srážky nižší než 500 mm) a mírně vlhkém (roční srážky vyšší než 500 mm). Rostliny ze suchého prostředí reagovaly na nedostupnost vody akumulací quercitolu, zatímco rostliny z mírně vlhkého prostředí při stresu z nedostatku vody upravovaly hladinu sacharózy. Akumulace quercitolu při suchu je adaptací na dlouhodobý stres, kterému jsou rostliny v takovém prostředí neustále vystaveny (Merchant *et al.*, 2006). Se stejnými výsledky přišel tým Arndt *et al.* (2008), který se ale zaměřil pouze na jeden druh eukalyptu (*Eucalyptus astringens*) rostoucí v odlišných podmínkách, na plantážích a v lesním porostu. Stromy na plantážích měly větší listy a během léta byly vystaveny většímu stresu ze sucha. Stromy v lese měly naopak méně listů a byly také méně vystaveny suchu. Při suchu došlo k akumulaci quercitolu, u stromů z plantáží tvořil 5 % sušiny, u stromů v lese pouze 2 % (Arndt *et al.*, 2008).

Další rostlinou, která při stresu produkuje pinitol, je borovice přímořská (*Pinus pinaster*). Stromy rostoucí v Maroku jsou adaptované na sucho a při stresu akumuluji pinitol v až 3krát vyšší míře (0,5 až 2 mg/g sušiny v děložních lístcích a primárních jehlicích) v porovnání s rostlinami z Francie, které jsou na sucho citlivé (Nguyen and Lamant, 1988).

V poloparazitickém jmelí (*Viscum album*) se nachází jak látky, které produkuje samo, tak i sloučeniny z hostitelské rostliny, přičemž se obsah a zastoupení jednotlivých cyklitolů mění v závislosti na hostitelské rostlině. Bez ohledu na hostitele se nejvíce cyklitolů (endogenních i odvozených od hostitele) nacházelo vždy v listech jmelí (průměrně 8,3 % sušiny ve dospělých a 8,9 % sušiny v mladých listech), ve stoncích byl obsah cyklitolů nižší (6,5 % sušiny) (Richter and Popp, 1992).

Dále mezi rostliny, které v reakci na stres produkují a akumuluji velké množství inositolu a jeho derivátů, patří například zástupci bobovitých, jetel luční a plazivý (*Trifolium pratense* a *T. repens*), trnovník akát (*Robinia pseudoacacia*), vistárie (*Wisteria floribunda*). Všechny tyto rostliny obsahují pinitol v množství okolo 200-600 mg/100 g čerstvé hmotnosti (Negishi *et al.*, 2015).

Jedním z nejvýznamnějších modelů pro studium stresové odpovědi na sucho a zasolení je kosmatec *Mesembryanthemum crystallinum* (Adams *et al.*, 1998; Bohnert and Cushman, 2000). Tento druh vykazuje široké spektrum reakcí, které pomáhají zvládnout nedostupnost vody, a současně je studovaný po dlouhou dobu. Představuje tedy vhodný příklad pro představení možností modulace metabolismu cyklitolů v širším kontextu.

3. *Mesembryanthemum crystallinum*

Kosmatec třpytivý (*Mesembryanthemum crystallinum*), je halofytní rostlina z čeledi kosmatcovité (Aizoaceae). Tento druh je původní v jižní Africe (v Kapsku a Namibii), později se rozšířil i do Středozeří a Makronésie, ale dnes už se nachází ve všech subtropických oblastech světa (např. Austrálie, USA, Ekvádor, Peru, Chile a další) (www.botany.cz).

Pozornost se na *M. crystallinum* zaměřila zejména díky jeho vysoké odolnosti vůči abiotickému stresu, především zasolení. Má několik mechanismů, jak se stresu bránit – krátkodobé v podobě akumulace kompatibilních solutů (především prolinu, pinitolu/ononitolu), a dlouhodobé v podobě CAM metabolismu (Thomas and Bohnert, 1993). Je to jeden z významných modelů odolných rostlin, sloužící především ke studiu stresových reakcí na molekulární úrovni a také k porovnávání stresových reakcí s jinými druhy citlivými i tolerantními vůči stresu (Nelson *et al.*, 1999). Druhou výjimečnou vlastností této rostliny je schopnost přechodu z C3 metabolismu na CAM, *M. crystallinum* tak slouží také jako model pro zkoumání regulace CAM fotosyntézy. U této rostliny dochází k environmentálně indukovanému posunu od C3 fotosyntézy k CAM (Nelson *et al.*, 1999; Bohnert and Cushman, 2000), tedy vyvolanému působením například nízké teploty, sucha a především zasolení (Adams *et al.*, 1992). Po odstranění stresových faktorů je rostlina schopná „přepnout“ zpět na C3 metabolismus. *M. crystallinum* se vyznačuje schopností ukládání solí do vegetativních pletiv (Nelson *et al.*, 1999; Bohnert and Cushman, 2000). Kromě solí je ale tato rostlina schopná ukládat, převážně do kořenů, kadmium. Mohla by tedy sloužit k fytoremediaci zasolených oblastí se zvýšeným výskytem kadmia (Nosek *et al.*, 2019). Akumulace iontů způsobuje snížení osmotického potenciálu vakuoly. Aby došlo k vyrovnání osmotického potenciálu, zvyšuje se koncentrace polyolů (*myo*-inositolu, D-ononitolu a D-pinitolu) v cytosolu a rostlina díky tomu může přijímat vodu a udržovat turgor (Nelson *et al.*, 1999). Díky schopnosti akumulace polyolů do vysokých koncentrací je rostlina tolerantní také vůči suchu a chladu (Adams *et al.*, 1992). Naopak nevýhodou využití *M. crystallinum* pro experimenty je extrémní plasticita reakce na změny prostředí a čtyřměsíční životní cyklus za podmínek růstové komory (Bohnert and Cushman, 2000). Autoři studie Agarie *et al.* (2009) přišli s návrhem využití rostliny jako funkční potraviny díky její schopnosti při stresu ze sucha a zasolení akumulovat polyoly, v důsledku čehož se zvyšuje antioxidační aktivita v listech, která umožňuje zachycovat volné radikály. Výhodou *M. crystallinum* jakožto funkční potraviny je obsah látek podporujících zdraví a sloužících k prevenci různých onemocnění. Navíc je možnost rostliny konzumovat zasyrova, tedy bez předchozího zpracování.

3.1 Přechod k CAM

M. crystallinum je fakultativní halofyt, který má schopnost CAM fotosyntézy, ale značnou část svého života ji nemusí využít a asimiluje stejně jako běžné C3 rostliny. Ovšem za podmínek stresu ze sucha a zasolení je schopen přejít z C3 na CAM fotosyntézu a po odeznění stresu se navrátit zpět k C3 (Cushman *et al.*, 1990; Winter and Holtum, 2007, 2014; Nosek *et al.*, 2018). V přírodních podmínkách je celý proces synchronní se sezónními výkyvy v dostupnosti vody, na které se rostliny dokázaly přizpůsobit (Cushman *et al.*, 1990). Dříve se myslelo, že kompetence k zahájení CAM metabolismu je součástí vývojového programu rostliny. To bylo ale vyvráceno výsledky studie Wintera and Holtuma (2007), které prokázaly, že rostliny pěstované v nezasolených a dobře zavlažovaných podmínkách vykazují po celý životní cyklus C3 metabolismus. CAM fotosyntéza představuje účinný způsob, jak podstatně snížit spotřebu vody rostlin, a přitom udržet zisk uhlíku pomocí asimilace za tmy (Winter *et al.*, 1978). Autoři Adams *et al.* (1992) a Vera-Estrella *et al.* (1999) na základě výsledků experimentů říkají, že přechod na CAM fotosyntézu je závislý na existenci organizovaných pletiv a vyžaduje mechanismy nacházející se pouze ve fotosynteticky aktivních buňkách. Pro experimenty využity nefotosyntetizující buněčné suspenzní kultury, které byly vystaveny zasolení. Nedošlo u nich ke změně v aktivitě enzymu PEPC ani v množství proteinu PEPC. Vzhledem k tomu, že byly použity heterotrofní buněčné kultury, které neprovozují žádný typ fotosyntézy, jsou tyto výsledky vzdáleny reálné situaci. Fotoautotrofní buněčné kultury byly využity při experimentech Willenbrinka and Hüsemanna, (1995). Po vystavení zasolení v nich došlo ke zvýšení míry fixace CO₂ v noci a zvýšila se aktivita enzymů souvisejících s CAM (zejména PEPC). Přesto nedošlo k oscilaci akumulace kyseliny jablečné a vyvolání CAM metabolismu. Podle autorů to ale pravděpodobně způsobily nevhodné podmínky prostředí, a pokud by byly buněčné kultury vystaveny správným podmínkám, k přechodu na CAM by došlo (Willenbrink and Hüsemann, 1995). Pro potvrzení indukce CAM fotosyntézy u *M. crystallinum* by bylo vhodnější využít fotoautotrofní a orgánové kultury.

Indukce CAM metabolismu byla prokázána u fotomixotrofních kalusových kultur *Kalanchoe blossfeldiana*. Kultury vykazovaly změny v množství kyseliny jablečné během dne a noci, přičemž v noci docházelo k její akumulaci. Výsledky studie naznačují, že kalusové kultury provozují CAM fotosyntézu, přestože aktivita enzymů souvisejících s CAM byla nižší, ve srovnání s celistvými rostlinami (Kluge *et al.*, 1987).

Genotypově je *M. crystallinum* považován za druh s CAM metabolismem, jelikož obsahuje příslušné geny. Ekologicky a fenotypově se jedná o druh C3-CAM, protože dokáže přecházet z jednoho typu metabolismu na druhý. Fyziologicky je to fakultativní CAM rostlina, protože může, ale nemusí, využít CAM metabolismus pro růst a dokončení životního cyklu (Winter and Holtum, 2007). Kromě *M. crystallinum* patří mezi fakultativní CAM rostliny také *Kalanchoe daigremontiana*, *Kalanchoe pinnata*,

opuncie mexická (*Opuntia ficus-indica*) (Winter *et al.*, 2008), *Calandrinia polyandra*, šrucha zelená (*Portulaca oleracea*), *Talinum triangulare* (Winter and Holtum, 2014) a další. Ke změně na CAM metabolismus je klíčová aktivace exprese genu pro fosfoenolpyruvát karboxylázu (PEPC; Cushman, Michalowski and Bohnert, 1990). Na rozdíl od rostlin s C3 fotosyntézou, které fixují CO₂ ve dne, rostliny s CAM otevírají průduchy v noci, což jim umožňuje šetřit vodu. Vážou CO₂ spolu s fosfoenolpyruvátem, získaným glykolytickým štěpením škrobu, do malátu pomocí PEPC. Během dne se malát štěpí na CO₂, který následně vstupuje do Calvinova cyklu, a na pyruvát, který slouží k syntéze škrobu (Winter *et al.*, 2008). Při experimentech autorů Wintera and Holtuma (2007) byly pozorovány změny v příjmu CO₂ 31 dní starými rostlinami pěstovanými v květináčích a hydroponické kultuře. Rostliny v květináčích byly v průběhu 4 dní ošetřeny roztoky s různým množstvím NaCl a následně byla omezena dostupnost vody. Nejprve rostliny vykazovaly C3 metabolismus a CO₂ fixovaly výhradně ve dne. Postupně se začal snižovat příjem CO₂ ve dne, a naopak se zvýšil příjem CO₂ přes noc, což znamená, že rostlina přešla na CAM fotosyntézu. S tímto typem metabolismu rostliny dokončily životní cyklus. Stejný pokus byl proveden i s rostlinami v hydroponické kultuře. Po vystavení rostlin zasolení došlo k indukci CAM metabolismu rychleji než u rostlin v květináčích, pravděpodobně kvůli tomu, že se roztok NaCl v půdě naředil zbývající vodou. Na konci životního cyklu se opět zvýšil příjem CO₂ za světla. Ačkoliv rostliny přijímaly CO₂ v noci, zisk uhlíku byl po celý životní cyklus vyšší ve dne (Winter and Holtum, 2007). Nevýhodou CAM fotosyntézy je vysoká spotřeba energie na fixaci CO₂ a následné skladování meziproductů (Nosek *et al.*, 2018). Přestože je CAM metabolismus indukován v závislosti na podmínkách prostředí, je schopnost přechodu určena vývojově. Mladší rostliny mají omezenou reakci na stres ze zasolení, protože u nich nedochází ke zvýšení aktivity PEPC, zatímco starší rostliny vykazují daleko větší odezvu. Existuje tedy předem vytvořený vývojový gradient v citlivosti k působení zasolení, který má za následek expresi klíčového enzymu CAM metabolismu (Cushman *et al.*, 1990). Změna na CAM indukovaná salinitou trvá 1 až 2 týdny, což naznačuje, že CAM metabolismus není mechanismus tolerance vysokých koncentrací solí, ale potvrdilo se, že představuje dlouhodobou adaptaci na nedostatek vody spojený se zasolením (Lüttge, 1993).

Aby se potvrdila reverzibilita CAM, byly rostliny při experimentech Noska *et al.* (2018) rozděleny do tří skupin. První skupinu tvořily rostliny s C3 fotosyntézou, zavlažované vodovodní vodou. Další skupina byla zavlažována 400 mM roztokem NaCl, aby u rostlin došlo k indukci CAM fotosyntézy. Tato skupina byla následně rozdělena a polovina rostlin byla vystavena odsolení (odstranění NaCl z půdy proplachováním půdního substrátu vodovodní vodou po dobu 2 hodin). Následně byly pozorovány změny v množství malátu u rostlin s aktivním CAM a odsolených rostlin s CAM a hodnoty byly porovnány s rostlinami s C3 metabolismem. Během prvního dne experimentu se u odsolených CAM rostlin výrazně snížilo množství malátu ve srovnání s rostlinami s CAM fotosyntézou. V dalších dnech se množství malátu odsolených rostlin s CAM vyrovnalo množství v rostlinách s C3. Podobně

tomu bylo i s expresí *PEPC*. U odsolených rostlin s CAM byla zpočátku exprese *PEPC* podobná jako u CAM, ale poté začala klesat, až dosáhla hodnoty rostlin s C3 metabolismem. Z těchto výsledků vyplývá, že změny v množství malátu a expresi *PEPC* jsou paralelní události, což potvrzuje, že odstranění stresového faktoru vede k přeměně CAM na C3 metabolismus. Dokazuje to také, že přeměna C3 na CAM je přechodná reakce na stres, a že rostliny s touto schopností mohou velmi rychle přizpůsobit svůj metabolismus uhlíku a distribuci energie (Nosek *et al.*, 2018). Úplný návrat k C3 ale často není možný, kvůli krátké životnosti listů. Navíc může přenos ze zasoleného do nezasoleného média poškodit kořeny a prodloužit působení stresu (Winter and Holtum, 2014).

Odstanění soli z média mělo také vliv na expresi genů a aktivitu proteinů antioxidantních enzymů katalázy (CAT), superoxidodismutázy (CuZnSOD) a askorbátperoxidázy (APX). Ve dne byla v CAM rostlinách nejnižší exprese *CAT1*, kromě jediného časového úseku (4 hodiny po odstranění soli z média), kdy byla nejvyšší ve srovnání s odsolenými rostlinami s CAM a rostlinami s C3 metabolismem. Maximální aktivita CAT souvisela s tvorbou H₂O₂, zvýšenou fotorespirací a vyčerpáním CO₂. Vyšší exprese *CAT1* a úroveň aktivity jsou charakteristické pro rostliny C3 a jsou preferovány v méně náročných podmínkách prostředí. Denní změny v aktivitě APX v CAM a odsolených CAM rostlinách korelovaly s aktivitou CAT. Při přechodu z CAM na C3 docházelo ke zvýšení aktivity CAT a snížení aktivity APX. To naznačuje kompenzaci účinku mezi působením APX a CAT, protože oba enzymy se podílejí na odstraňování vedlejšího produktu metabolismu kyslíku - H₂O₂. CuZnSOD je intracelulární marker stresu, u kterého došlo po odstranění stresového faktoru a přechodu z CAM na C3 k výraznému snížení aktivity, ale nedošlo ke změně hladiny exprese genu. Tyto výsledky potvrzují rozdíly mezi rostlinami C3 a CAM, které odrážejí rozdílný průběh antioxidantní aktivity během dne (Nosek *et al.*, 2018). Antioxidantní aktivita je důležitá také v obraně proti zvýšeným koncentracím kadmia. Nízká koncentrace kadmia nezpůsobuje u C3 ani CAM rostlin kosmatce žádné morfologické změny a nemá vliv na růst stonku ani kořenů. Po zalití rostlin 1 mM roztokem CdCl₂ došlo k akumulaci kadmia do množství 216,05 mg/kg v kořenech a 19,5 mg/kg ve stoncích CAM rostlin. Dále byla pozorována aktivita tří typů superoxidodismutázy, konkrétně CuZnSOD a v cytosolu, MnSOD v mitochondriích a FeSOD v chloroplastech. CuZnSOD u CAM vykazovala vyšší aktivitu než u C3 rostlin po ošetření kadmíem. U zbylých dvou typů došlo po ošetření kadmíem k výraznému zvýšení aktivity u C3 rostlin, přesto byla ale jejich aktivita u CAM vyšší. Potvrdilo se tedy, že se u *M. crystallinum* s C3 i CAM metabolismem zvýšila odolnost vůči vyšším koncentracím kadmia díky vysoké aktivitě antioxidantních enzymů. Uvažuje se tedy o využití této rostliny k fytoremediaci půd, které jsou zasolené a zároveň obsahují kadmium (Nosek *et al.*, 2019).

Na indukci CAM má vliv, kromě stresu z nedostatku vody a zasolení, i poměr červeného/dlouhovlnného červeného světla (R/FR). Pokud bylo *M. crystallinum* vystaveno světlu s nízkým poměrem R/FR, došlo k indukci aktivity *PEPC* a akumulaci malátového aniontu. Nízký poměr

R/FR působí na stejnou dráhu přenosu signálu jako stres ze zasolení. Oba tyto faktory způsobují indukci PEPC a akumulaci malátového aniontu a pokud působí na rostlinu současně, dochází k akumulaci těchto induktorů CAM do většího množství, než když jsou rostliny vystaveny jen jednomu ze stresových faktorů. Nízký poměr R/FR také způsobil hromadění pinitolu až do pětkrát vyšších koncentrací, než když bylo použito světlo s vysokým poměrem R/FR. Podle autorů (Cockburn *et al.*, 1996) reakce zprostředkované fytochromem a stres ze zasolení působily na stejnou dráhu přenosu signálu a indukovaly CAM metabolismus (Cockburn *et al.*, 1996). Dalším faktorem, který dokáže vyvolat CAM metabolismus je kyselina abscisová (ABA). Chu *et al.* (1990) nahradili stres ze sucha exogenní aplikací ABA na listy a kořeny. Během několika dní došlo k indukci CAM metabolismu a projevilo se to zvýšením aktivity PEP karboxylázy (Chu *et al.*, 1990). Další faktor, který dokáže vyvolat jak CAM metabolismus, tak akumulaci pinitolu a prolinu, je cytokinin, přičemž je v kombinaci s NaCl dokonce účinnější než kyselina abscisová (Thomas and Bohnert, 1993). Cytokiny jsou fytohormony, které byly původně objeveny jako regulátory buněčného dělení. Později se zjistilo, že se podílí na fungování řady procesů v růstu a vývoji rostlin, jako například větvení stonků, kořenů, regulace kvetení, klíčení a mnoho dalších. V poslední době se objevily další funkce cytokininů v reakci na biotické a abiotické stresy. Cytokiny mají roli v reakci na nízkou i vysokou teplotu, sucho, zasolení a nutriční stres, a také se účastní odpovědi na rostlinné patogeny a býložravce. Rostliny reagují na stres snížením hladiny cytokininů (což bylo prokázáno mimo jiné u *Arabidopsis*) a downregulací exprese cytokininových receptorů. Na tomto procesu se podílí i negativní regulátory cytokininové signalizace (Pavlů *et al.*, 2018). V literatuře se objevila zmínka o účasti cytokininů v těchto drahách, ale experimentálně se tomu věnuje omezené množství prací. Podrobnější informace o roli cytokininů v *A. thaliana* při stresu se nachází například ve studiích Pavlů *et al.* (2018) a Cortleven *et al.* (2019).

3.2 Kompatibilní soluty - sacharidy

Při stresu dochází v *M. crystallinum* ke změnám v expresi genů, které vedou ke zvýšené syntéze a následné akumulaci kompatibilních solutů pinitolu a ononitolu (Ishitani *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 1998). Rostlina je ale nedokáže akumulovat bez přítomnosti jejich prekurzoru, *myo*-inositolu, za nestresových podmínek ani po působení stresu. Syntéza MI není specifická pro konkrétní typy buněk – všechny buňky mají schopnost syntetizovat MI z glukóza-6-fosfátu, ale liší se v množství *myo*-inositol-1-fosfátsyntázy (INPS/INO1) (Nelson *et al.*, 1998, 1999). INO1 a *myo*-inositolmonofosfatáza (IMP1) řídí syntézu inositolu (Ishitani *et al.*, 1996) a *myo*-inositol O-methyltransferáza (IMT1) a D-ononitolepimeráza (OEP1) katalyzují hromadění methylovaných derivátů inositolu (Adams *et al.*, 1992; Vernon and Bohnert, 1992b; Nelson *et al.*, 1998).

V *M. crystallinum* je transkript *INO1* hojný i v nepřítomnosti stresu a stres jeho hladinu ještě zvyšuje (Ishitani *et al.*, 1996; Nelson *et al.*, 1998). Při stresu ze zasolení se nezávislost na konkrétních buňkách ztrácí, hladina exprese *INO1* se zvyšuje zejména v mezofylových buňkách listů (Nelson *et al.*, 1999), až 10krát stoupá koncentrace volného *myo*-inositolu (Ishitani *et al.*, 1996), a naopak hladina exprese *INO1* klesá v kořenech. Při stresu ze zasolení dochází k indukci *IMT1* ve všech typech buněk, ale v různé míře (Nelson *et al.*, 1998). Pokud byly mladé rostliny (semenáče) *M. crystallinum* vystaveny stresu ze zasolení a ošetřeny MI, teprve potom dokázaly akumulovat polyoly, což způsobilo, že na stres reagovaly stejně jako dospělé rostliny (Nelson *et al.*, 1999).

Protože bylo navrženo, že stresová reakce *M. crystallinum* je řízena vývojovým programem, zaměřil se tým Vernon and Bohnert (1992) na expresi dvou transkriptů indukovaných solným stresem v různě starých rostlinách *M. crystallinum*, *GPD1* (gen kódující glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu) související s fotosyntézou, a *IMT1*. U všech věkových skupin rostlin došlo po vystavení stresu ze zasolení k akumulaci *IMT1* (Vernon and Bohnert, 1992b; Ishitani *et al.*, 1996) a následnému hromadění pinitolu (Paul and Cockburn, 1989), naopak akumulace *GPD1* je vázána na věk rostliny a došlo k ní u starších rostlin až v 3krát větší míře než u mladších. *GPD1* se s rostoucím věkem akumuluje i u nestresovaných rostlin, u *IMT1* tento jev nepozorujeme. Vyplývá z toho tedy, že akumulace *IMT1* a následně pinitolu v *M. crystallinum* není závislá na stáří rostlin, jako je exprese genů souvisejících s CAM (Vernon and Bohnert, 1992b). Na podobné téma navázala studie Vernon, Ostrem and Bohnert (1993), která se zaměřila na expresi genů *IMT1*, *GPD1*, *PPC1* (jeden z genů pro PEPC) a *B5* (kóduje thiolovou proteázu). Všechny tyto transkripty se hromadí v listech *M. crystallinum* při stresu ze zasolení, a předpokládala se tedy koordinovaná indukce těchto genů. Autoři ovšem zjistili, že ačkoliv na stres ze zasolení reagují všechny geny podobně (jsou indukovány), odpověď na stres z chladu a nedostatku vody byla odlišná. Při stresu z nedostatku vody byl indukován pouze gen *PPC1*, jehož množství se sice zvýšilo, ale stále bylo menší než při stresu ze zasolení. U ostatních genů nedošlo k žádné změně. Pokud vystavili rostliny nízké teplotě, zvýšila se indukce *IMT1*, hladiny ostatních genů zůstaly na stejné úrovni nebo se ještě snížily. Z těchto výsledků vyplývá, že *M. crystallinum* může rozlišovat mezi stresem ze zasolení a stresem z nedostatku vody pomocí různé míry exprese jednotlivých genů. Reakce na stres je vyvolána více signály a existuje složitá síť reakčních drah a mechanismů, které umožňují rostlině zvýšit hladinu transkriptů konkrétních genů, díky kterým tak může vhodně reagovat na stresové podmínky (Vernon *et al.*, 1993a).

V reakci na stres je tedy důležitá především syntéza *myo*-inositolu, ale dochází také ke změnám v podílech jednotlivých sacharidů v listech a kořenech. U nestresované kontroly převládaly v listech cukry glukóza, fruktóza a sacharóza a rostliny obsahovaly také menší množství (méně než 1 % všech rozpustných sacharidů) MI. Při zasolení došlo v listech ke zvýšení koncentrace sacharózy (nebo alespoň k udržení na stejné hladině), množství glukózy a fruktózy se značně snížilo. Zvýšil se obsah MI, který

s delším působením stresu postupně rostl, až dosáhl maximální hladiny a začal opět klesat, zatímco množství pinitolu a ononitolu se stále zvyšovalo (Adams *et al.*, 1992). Přítomnost MI zrychluje příjem a transport sodíku. Při stresu dochází ke zvýšení množství MI ve floému a spolu s tím se zvyšují také hladiny sodíku a inositolu v xylému, kterým se transportují do listů (Nelson *et al.*, 1999). Jedním z klíčových mechanismů, které se podílí na toleranci solí v rostlinách, je výměna Na^+ za H^+ na tonoplastu vakuoly (Barkla *et al.*, 2002). Dochází k ní na tonoplastu vakuol v listech a stoncích rostlin (Chauhan *et al.*, 2000), zabraňuje toxicitě sodíku v cytosolu a při zasolení dochází k jejímu posílení. Expres genu, který kóduje příslušný antiporter, je pletivově specifická - v listech rozděluje sodík do jednotlivých vakuol, kde se následně skladuje (Chauhan *et al.*, 2000). Antiporter vykazuje nejvyšší aktivitu na tonoplastu vakuol měchýřkovitých buněk, kde dochází k nejmasivnější výměně Na^+ za H^+ (Barkla *et al.*, 2002). Potvrzení důležitosti MI v příjmu sodíku se věnoval tým vědců Nelson, Koukoumanos and Bohnert (1999). Pokud byly semenáče ošetřeny pouze MI, nedošlo k téměř žádnému zvýšení koncentrace Na^+ v listech. Pokud byly rostliny ošetřeny pouze NaCl, množství sodíku v listech se zvýšilo, ale k největšímu zvýšení koncentrace sodíku došlo, když byl k rostlinám přidán MI v kombinaci s NaCl. Semenáče díky tomu reagovaly na zasolení stejně jako dospělé rostliny (Nelson *et al.*, 1999). Úměrně množství NaCl se zvyšovala i koncentrace pinitolu/ononitolu s tím, že nejvyšší koncentrace byla naměřena v mladších částech rostliny – v horní části stonku, v postranních výhoncích a v malých listech (Agarie *et al.*, 2009). Na množství draslíku neměla žádná z přidaných látek vliv, což znamená, že byl tento účinek specifický pouze pro sodík (Nelson *et al.*, 1999). Tyto závěry jsou ale částečně v rozporu s výsledky studie Tran *et al.* (2020). Při jejich experimentech bylo zjištěno, že pokud byly buněčné kultury *M. crystallinum* vystaveny stresu ze zasolení, došlo k akumulaci Na^+ , Cl^- , K^+ a NO_3^- , a také vzrostla exprese genů pro transportéry těchto iontů. Při koncentracích NaCl v médiu nad 200 mM došlo k zastavení akumulace K^+ a NO_3^- , hladiny Cl^- a Na^+ se nadále zvyšovaly a pozitivně korelovaly s růstem. Vyplývá z toho tedy, že pro zvýšení růstu byla vyžadována zvýšená akumulace soli, a také, že určité koncentrace NaCl podporovaly hromadění K^+ a NO_3^- (Tran *et al.*, 2020). Je ale možné, že buněčné suspenzní kultury nesdílí všechny mechanismy s celistvými rostlinami.

U kořenů je ve srovnání s listy situace odlišná. V kořenech nestresované kontroly byl celkový obsah sacharidů podobný jako u listů, ale v největším množství tam byla zastoupena sacharóza. MI se v kořenech vyskytoval v množství 0,1 $\mu\text{mol/g}$ čerstvé hmotnosti (Adams *et al.*, 1992). Při stresu nedocházelo v kořenech k syntéze *myo*-inositolu a kořenový systém byl závislý na MI a ononitolu transportovaných floémem (Nelson *et al.*, 1998). Ke snížení množství sodíku v kořenech slouží další typ transportéru na tonoplastu vakuol, konkrétně Na^+/myo -inositolové symportery, které jsou aktivované stresem ze zasolení. Spolu s aktivací symportéru dochází ke zvýšení transportu MI z listů do kořenů a také se zvyšuje transport sodíku xylémem. V glykofytní *Arabidopsis* je exprimován gen homologní k tomuto symportéru, ale jeho exprese není ovlivněna zasolením tolik jako v *M. crystallinum* (Chauhan

et al., 2000). Další odlišností je, že u *Arabidopsis* nedochází při stresu ke zvýšení exprese *INO1* ani obsahu MI, což jsou hlavní rozdíly mezi glykofyty a halofyty v toleranci zasolení (Ishitani *et al.*, 1996). Nelson, Koukoumanos and Bohnert (1999) vyslovili hypotézu, že primární příjem sodíku do kořenů byl ve všech rostlinách podobný, ale to, co odlišovalo glykofyty a halofyty, byl transport sodíku xylémem v závislosti na přítomnosti a transportu MI, přičemž se vyskytovaly rozdíly v jeho syntéze mezi kořeny a nadzemní částí. MI byl při zasolení hlavní sloučeninou transportovanou floémem (Nelson *et al.*, 1999) a signalizoval do kořenů stav fotosyntézy listů - dostatek *myo*-inositolu indikoval zdravé listy, a tedy dostatek prostoru, kam mohl být sodík rozdělen (Ishitani *et al.*, 1996). Díky koordinované indukci Na^+/myo -inositolových symporterů a Na^+/H^+ antiporterů se přenáší sodík z vakuol kořenů do cytosolu, a následně xylémem do mezofylu listů, čímž se snižuje osmotický potenciál v listech (Chauhan *et al.*, 2000). Pravděpodobně existuje vzájemná závislost změn v distribuci *myo*-inositolu a příjmu sodíku. MI tedy může sloužit nejen jako substrát pro produkci kompatibilních solutů, ale také jako signál mezi kořeny a listy, který podporuje absorpci sodíku (Nelson *et al.*, 1999).

Adams *et al.* (1992) srovnávali účinky zasolení na celistvé rostliny a na buněčné suspenzní kultury *M. crystallinum* (vytvořili 3 linie buněčných kultur z hypokotylu, listů a kořenů) a zjistili, že, množství cukrů a cukerných alkoholů v kontrolní a experimentální variantě suspenzních kultur se značně liší. Kontrolní buňky obsahovaly nejvíce sacharózy, dále fruktózu a nejméně glukózy. Při stresu ze zasolení (400 mM NaCl) se množství sacharózy nijak výrazně nezměnilo, zatímco koncentrace fruktózy a glukózy poklesly. Nejdůležitějším zjištěním ale je, že ani po 7 dnech stresu ze zasolení nedošlo k nárůstu koncentrací inositolu, ononitolu ani pinitolu. Původ buněčné linie neměl na výsledky žádný vliv (Adams *et al.*, 1992). Naopak se ale zvyšovalo množství prolinu (tvořil až 40 % všech volných aminokyselin), při zasolení se růst suspenzních buněk zpomaloval, přesto stále zůstávaly životaschopné (Thomas *et al.*, 1992a). Na stejné téma navázala další studie týmu (Adams *et al.*, 1998), která potvrdila předchozí výsledky, že u suspenzních kultur vystavených stresu nedochází k akumulaci pinitolu. Závěrem práce tedy je, že tyto suspenze buněk vykazují některé znaky typické spíše pro glykofytické systémy a *M. crystallinum* je halofytní pouze pokud jsou přítomna organizovaná pletiva (Adams *et al.*, 1998). K potvrzení takových závěrů je ale třeba provést další experimenty s kulturami v různých fázích organizovanosti. Z obou studií tedy vyplývá, že vnímání stresu vede k několika signálům a k jejich přeměnám, a že různé signály musí být integrovány, aby vyvolaly reakci celé rostliny (Adams *et al.*, 1992, 1998). Toto zjištění také částečně vysvětluje předchozí pozorování, tedy že semenáče a juvenilní rostliny nejsou vůči zasolení tolerantní tolik, jako dospělé rostliny (Adams *et al.*, 1998). Částečně odlišné výsledky byly publikovány ve studii Tran *et al.* (2020). K vytvoření buněčné suspenze byl použit kalus z hypokotylů 7denních semenáčů. V buňkách vystavených zasolení došlo ve srovnání s kontrolou ke zvýšení obsahu V-ATPázy (c-podjednotky), H^+ -ATPázy na tonoplastu a *MclMT1*. Pro udržení nízkých koncentrací Na^+ a Cl^- v cytosolu dochází při zasolení k jejich sekvestraci do vakuoly, což je umožněno

gradientem H^+ , který se tvoří H^+ -ATPázou na tonoplastu vakuoly. Po ošetření buněk roztokem NaCl o koncentraci 100 mM došlo po 48 hodinách ke dvojnásobnému zvýšení exprese *IMT1* ve srovnání s kontrolou, podobně došlo i ke zvýšení aktivity genu, který je zapojený v syntéze prolinu. Z těchto výsledků vyplývá, že pro indukci mechanismů tolerance v buněčných suspenzních kulturách v přítomnosti NaCl bylo vyžadováno snížení osmotického potenciálu v cytosolu (Tran *et al.*, 2020). Buněčným suspenzním kulturám se věnoval i tým Vera-Estrella *et al.* (1999), na rozdíl od předchozích experimentů ale pro vytvoření buněčné kultury použil kalus odvozený z listů 6týdenních rostlin. Při 200 mM NaCl v médiu byl pozorován nejintenzivnější růst kultury a buňky byly schopny akumulovat Na^+ do koncentrací převyšujících množství v médiu. Po 40 týdnech s 200 mM NaCl byla koncentrace Na^+ až 300 mM. Na^+ je transportován do vakuol prostřednictvím tonoplastové V-ATPázy a Na^+/H^+ antiporteru stejně, jako se tomu děje u celistvé rostliny. S nárůstem koncentrace NaCl v médiu (do 200 mM) se zvyšovala aktivita těchto dvou transportérů oproti stavu bez soli. Zároveň došlo k hromadění pinitolu a proteinu IMT. Při 50 – 150 mM NaCl se zvýšilo množství pinitolu na dvojnásobek kontrolní hodnoty a při této koncentraci NaCl se také zvyšovalo množství IMT. Z těchto výsledků vyplývá, že akumulace pinitolu a IMT jsou mechanismy zvýšené tolerance vůči zasolení srovnatelné s reakcí celistvé rostliny, a nejsou tedy závislé na organizovaných pletivech rostlin. Jedním z možných odůvodnění proč se tyto výsledky liší od předchozích je, že byly v této studii použity buňky z listů starších rostlin, které mají na rozdíl od mladých rostlin mechanismy tolerance stresu plně aktivní (Vera-Estrella *et al.*, 1999).

3.3 Další kompatibilní soluty

Další sloučeninou, která v *M. crystallinum* funguje při stresu jako kompatibilní solut, je aminokyselina prolin. Hromadí se v cytosolu (Demmig and Winter, 1986; Tran *et al.*, 2020) prostřednictvím zvýšené aktivity Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátsyntázy (P5CS) (Oh *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2020). V největším množství se ale prolin vyskytuje ve vakuolách (Demmig and Winter, 1986). Akumulace prolinu je častou, a také jednou z nejčasnějších (Sanada *et al.*, 1995) odpovědí na stres u citlivých i tolerantních druhů vůči zasolení (Thomas *et al.*, 1992a). Osm týdnů staré rostliny *M. crystallinum* byly zalévány roztokem NaCl o koncentraci 400 mM na začátku světelné periody a bylo měřeno množství prolinu v listech. Obsah prolinu byl ve stresovaných rostlinách mírně vyšší než v nestresovaných rostlinách, postupně se zvyšoval a během 10 dní při zasolení dosáhl 10 $\mu\text{mol/g}$ čerstvé hmotnosti (Sanada *et al.*, 1995). Přesto se v chloroplastech při stejné koncentraci NaCl nacházel prolin v méně než 50 mM koncentraci, což naznačuje, že prolin nemá v chloroplastech hlavní osmoregulační roli (Demmig and Winter, 1986). Při zasolení dochází u *M. crystallinum* k výrazné akumulaci prolinu pouze za světla před přechodem k CAM metabolismu (Thomas *et al.*, 1992b; Sanada *et al.*, 1995). Stálá

hladina prolinu je v *M. crystallinum* okolo 0,4 $\mu\text{mol/g}$ čerstvé hmotnosti, po přidání 300 mM roztoku NaCl do média ale dochází k až desetinásobnému nárůstu jeho množství (Shevyakova *et al.*, 2013). Prolin má roli v přizpůsobení se zasolení, ve dne se vyskytuje v nejvyšším množství (5-10 $\mu\text{mol/g}$ čerstvé hmotnosti) a má osmoregulační funkci, v noci se jeho množství snižuje a slouží k dodávání energie pro rozdělování iontů do vakuol (Sanada *et al.*, 1995).

Ke zjištění dalších funkcí prolinu byly listy juvenilních (4týdenních) a dospělých (9týdenních) rostlin ošetřeny paraquatem (0,1 μM) a paraquatem kombinovaným se 100 mM NaCl nebo 5 mM prolinem (Shevyakova *et al.*, 2009). Paraquat přijímá elektrony z PSII a přenáší je na kyslík. Tím dochází k redukci kyslíku na superoxidy, což jsou volné radikály, které ovlivňují aktivitu chloroplastů (Takahashi and Asada, 1988). Po ošetření paraquatem byla hladina prolinu v listech juvenilních rostlin až 5krát vyšší než v listech dospělých rostlin. Nejvíce endogenního prolinu se akumulovalo po ošetření samotným NaCl u juvenilních i dospělých rostlin. Exogenní přidání 5 mM prolinu mělo největší účinek v kombinaci s paraquatem, kdy došlo ke snížení množství superoxidových radikálů, peroxidace lipidů, až 5krát se snížila aktivita SOD a zvýšil se obsah chlorofylu v listech. Z výsledků vyplývá, že prolin má funkci jak osmoprotektivní, tak i antioxidantní (Shevyakova *et al.*, 2009).

Byl také zkoumán vliv ABA na akumulaci prolinu. Během stresu ze zasolení vzrůstala koncentrace ABA v listech 8 až 10krát (Thomas *et al.*, 1992b). Pokud byl při zasolení (300 mM NaCl) přidána do média ABA v 1 μM koncentraci, zvýšila se životaschopnost rostlin, akumulace biomasy, snížila se intenzita oxidačního stresu a akumulace prolinu až o 40 %. Snížení množství prolinu po přidání ABA může být způsobeno zeslabením oxidačního stresu nebo zvýšeným obsahem vody v listech kvůli inhibici transpirace. ABA tedy nemá roli ve zvýšení akumulace prolinu (Shevyakova *et al.*, 2013), na rozdíl od cytokininu (6-BAP), který vyvolává reakce podobně jako přidání NaCl a způsobuje mimo jiné právě hromadění prolinu. Kontrolní rostliny obsahovaly prolin v množství 40 $\mu\text{g/g}$ čerstvé hmotnosti, zatímco rostliny s přidaným cytokininem obsahovaly 268 $\mu\text{g/g}$ čerstvé hmotnosti prolinu (Thomas *et al.*, 1992b).

I v případě prolinu byly pro studium využity buněčné suspenzní kultury odvozené z kořenů, hypokotylu a listů 2týdenních semenáčků, ale původ buněčných kultur neměl na výsledky vliv (Thomas *et al.*, 1992a). V buněčných kulturách vystavených zasolení se výrazně zvýšila aktivita McP5CS ve srovnání s neošetřenými buňkami (Tran *et al.*, 2020). Podrobnější analýze rozpustných aminokyselin byly podrobeny pouze kultury vytvořené z listů a kořenů. Prolin tvořil jen 5 % ze všech rozpustných aminokyselin. Po ošetření 400 mM roztokem NaCl došlo ke zpomalení růstu a množství prolinu se zvýšilo na 40 % všech rozpustných aminokyselin (Thomas *et al.*, 1992a). Hromadění prolinu může být reakcí dostatečnou pro přežití při mírné intenzitě stresu ze zasolení. Při silnějším a dlouhodobějším stresu má ale *M. crystallinum* jiné efektivnější mechanismy, jak nepříznivé podmínky překonat (například akumulace pinitolu a změna na CAM fotosyntézu) (Adams *et al.*, 1992).

3.4 Měchýřkovité buňky

Výraznou strukturou *Mesembryanthemum crystallinum* jsou měchýřkovité buňky epidermis (z angl. epidermal bladder cells, EBC, viz obr. 2b) (Steudle *et al.*, 1975; Adams *et al.*, 1992), které významně přispívají k extrémní odolnosti rostliny vůči zasolení (Oh *et al.*, 2015). Jsou to nežláznaté, neseekretující, jednobuněčné trichomy pokrývající nadzemní část rostliny (Steudle *et al.*, 1975), jejichž povrch je tvořený kutikulou, která zabraňuje ztrátám vody (Lüttge *et al.*, 1978). Diferencují se během raného vývoje nestresované rostliny (Adams *et al.*, 1992; Jou *et al.*, 2007), ale zůstávají nenápadné, nevystupující nad rovinu pokožky listu nebo stonku (Steudle *et al.*, 1975; Adams *et al.*, 1992; Oh *et al.*, 2015). V bazální části EBC byly nalezeny chloroplasty, což naznačuje, že tyto buňky mají alespoň omezenou fotosyntetickou aktivitu (Kramer, 1979). Hlavní proteiny, které se v EBC hromadí, se podílejí na fotosyntéze (malá a velká podjednotka Rubisca, enoláza), sekvestraci sodíku (E podjednotka V-ATPázy) a obraně rostliny před stresem (kyselá i zásaditá forma cystein proteázy PR5 a PR10 (pathogenesis related proteins) (Jou, Wang and Yen, 2007). Sodík dokáže hromadit i mezofylové buňky listů (Adams *et al.*, 1998), ale místem nejvyšší akumulace jsou právě měchýřkovité buňky epidermis (Barkla *et al.*, 2002), které mohou hromadit sodík až do koncentrace 1 M (Adams *et al.*, 1998).

Membrány EBC mají jedinečné transportní vlastnosti pro sůl a vodu a mají tak zásadní funkci ve vodním provozu rostliny. Voda se může v EBC pohybovat několika cestami. První z nich je výměna vody mezi EBC a subepidermálními vrstvami přes bazální oblast EBC symplastem. Druhou možností je pohyb vody přes buněčnou stěnu do subepidermálních oblastí. Poslední, ale nejméně pravděpodobnou cestou, je pohyb vody z EBC přes kutikulu. EBC tvoří rezervoár pro soli a při stresu fungují jako pufrovací systém, který slouží k ochraně fotosyntetického aparátu před osmotickým poškozením (Steudle *et al.*, 1975). Pokud je ale stres dlouhodobý, měchýřkovité buňky snižují metabolickou aktivitu a stávají se zásobárnou vody a iontů (Jou *et al.*, 2007). Aby se potvrdilo, že měchýřkovité buňky přispívají k sukulenci tím, že slouží jako zásobárna vody a umožňují toleranci zasolení prostřednictvím sekvestrace iontů, vytvořili ve své studii Agarie *et al.* (2007) pomocí ozařování rychlými neutrony mutanta bez měchýřkovitých buněk. Mutantní rostliny bez EBC byly ve všech sledovaných ohledech podobné jako kontrola, kromě toho, že se na jejich listech a stoncích nevyskytovaly EBC, měly méně sukulentní listy a byly vzrůstově menší než kontrola, zejména po stresu ze zasolení. Po 3 týdnech při 400 mM NaCl v médiu byla hmotnost sušiny kontrolních rostlin téměř dvojnásobná oproti suché hmotnosti mutantů. Při zasolení (400 a 800 mM NaCl) docházelo u mutantů k až 2krát nižší akumulaci Na⁺ a Cl⁻ ve srovnání s kontrolou při stejné koncentraci NaCl. Přesto měly mutantní rostliny v listech vyšší koncentraci iontů než kontrolní rostliny a výsledkem bylo vyšší zatížení fotosynteticky aktivních pletiv. Kontrolní rostliny měly totiž možnost sekvestrovat ionty do EBC, a tím se vyhnuly poškození fotosynteticky aktivních pletiv listů. U mutantů bez EBC také došlo při zasolení

k výraznému zhoršení produktivity oproti kontrole (vyhodnoceno podle počtu semen a jejich hmotnosti) (Agarie *et al.*, 2007).

Měchýřkovité buňky epidermis jsou metabolicky aktivní a mají i jiné vlastnosti důležité pro ochranu před stresem, než jen ukládání sodíku (Barkla and Vera-Estrella, 2015; Oh *et al.*, 2015). Aby rostlina přežila období sucha a stále mohla odebírat vodu z půdy, musí být její vodní potenciál nižší než vodní potenciál půdy, což se děje prostřednictvím akumulace kompatibilních solutů. Více než 50 % metabolitů (byly porovnány extrakty EBC z rostlin ošetřených a neošetřených solí), v jejichž množství dochází v EBC při zasolení k výrazným změnám, jsou kompatibilní soluty, tedy cukry, cukerné alkoholy (Barkla and Vera-Estrella, 2015) (zejména pinitol/ononitol; Agarie *et al.*, 2007), bílkoviny, organické kyseliny a neproteinové aminokyseliny, které snižují osmotický potenciál cytosolu a tím vyvažují rozdíl osmotických potenciálů mezi cytolem a vakuolou, ve které se hromadí Na^+ a Cl^- ionty (Barkla and Vera-Estrella, 2015). Centrální vakuola je obklopena velkým množstvím cisteren hrubého endoplazmatického retikula, které pravděpodobně slouží k transportu těchto látek nezbytných k vytvoření gradientu (Kramer, 1979). Jedna buňka díky tomu může obsahovat až 5 μl roztoku, objem všech EBC může tvořit až 25 % objemu nadzemní části rostliny (Lüttge *et al.*, 1978) a při dlouhodobém vystavení stresu může dojít k akumulaci vakuolárních pigmentů (Oh *et al.*, 2015). Při zasolení dochází ke změnám v transportu iontů, metabolismu souvisejícím s tvorbou energie a akumulací kompatibilních solutů, v signalizaci stresu a ve fungování organel. V cytosolu měchýřkovitých buněk se nachází aktivní transkripty, které kódují INO1 a IMT1 (Ishitani *et al.*, 1996; Oh *et al.*, 2015) a při zasolení dochází k dalšímu navýšování jejich množství (Adams *et al.*, 1992; Barkla *et al.*, 2002). EBC dále obsahují nízkou koncentraci sacharózy (méně než 0,1 mM), glukózu a fruktózu o koncentracích 3 až 4 mM a při stresu ze zasolení navíc obsahují Na^+ (až 800 mM) a Cl^- (až 700 mM) (Barkla and Vera-Estrella, 2015). Po izolaci protoplastů, vakuol a chloroplastů se zjistilo, že se pinitol vyskytoval v nejvyšší koncentraci v chloroplastech (230 mM), dále v protoplastech (100 mM) a žádný nebyl detekován ve vakuolách. Pinitol tedy může fungovat jako kompatibilní solut v cytosolu a především také v chloroplastech, aby vyrovnal osmotický potenciál, který je ve vakuole snížen vysokou koncentrací Na^+ a Cl^- (Paul and Cockburn, 1989).

3.5 Vývojově podmíněný nástup ochranných mechanismů

Všechny tyto výše zmíněné mechanismy reakcí na stres jsou podmíněny vývojovým stavem rostliny, ale i délkou a intenzitou stresu. *Mesembryanthemum crystallinum* roste nejčastěji na útesech a písčínách v dosahu mořského příboje, a také na místech zasažených činností člověka (zasolené půdy). Je také využíván na zahradách jako okrasná letnička. V oblastech, kde se tato rostlina vyskytuje, se na

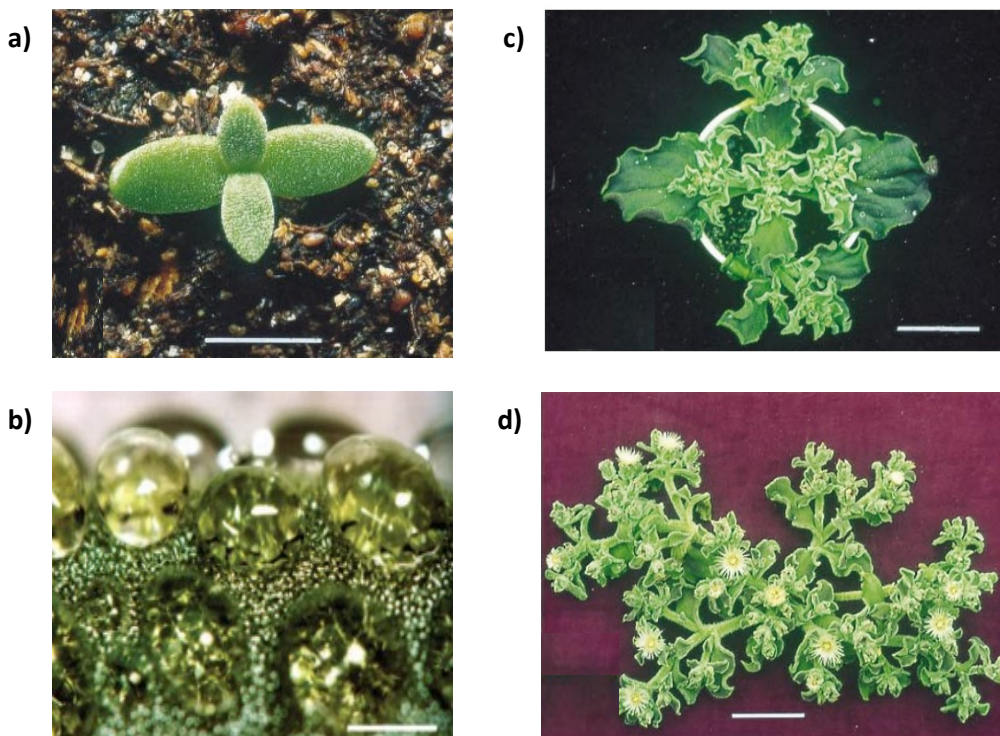
severní polokouli střídají vlhká (leden až duben) a suchá (od začátku května) období (Winter *et al.*, 1978) a můžeme rozlišit 5 fází vývoje: klíčící rostlina (semenáč), juvenilní stádium, dospělá rostlina ve vegetativním stádiu, stádium kvetení a stádium produkce semen (Adams *et al.*, 1998). Rostliny začínají klíčit v lednu a vykazují vysokou rychlost růstu (Winter *et al.*, 1978). Zpočátku má rostlina pouze děložní lístky (viz obr. 2a), C3 metabolismus, nedochází k akumulaci NaCl (Bohnert and Cushman, 2000) a produkce kompatibilních solutů je indukovatelná v děložních lístcích pouze působením stresu ze sucha, nikoliv stresu ze zasolení (Adams *et al.*, 1998). V epidermis děložních lístků se zatím nevyskytují měchýřkovité buňky, ty se objevují až u pravých listů 3týdenních rostlin, ale nevystupují nad povrch listů (Jou *et al.*, 2007). Když byla klíčící rostlina ošetřena 200 mM roztokem NaCl, došlo ke zpomalení vývoje, ale byla stále životaschopná. Za těchto podmínek se měchýřkovité buňky epidermis zvětšily a sloužily jako orgány pro ukládání především sodných iontů, které jsou pro metabolismus buňky ve vyšší koncentraci toxické. Právě sekvestrace NaCl umožňuje rostlinám pokračovat v normálním vývoji (Adams *et al.*, 1998). Také akumulace důležitých kompatibilních solutů - inositolu a jeho derivátů - začíná až v juvenilním stádiu (3 týdny stará rostlina), kdy má rostlina obvykle 7 párů velkých listů uspořádaných okolo primární osy, netvoří postranní výhony a stále má C3 metabolismus (Adams *et al.*, 1998; Bohnert and Cushman, 2000). Na začátku období sucha se rychlost růstu snižuje, stonky se začínají větvit, listy jsou malé a sukulentního charakteru, v tomto období také dochází ke změně typu metabolismu (Winter *et al.*, 1978). Jakmile začne rostlina tvořit postranní výhony, dojde v nich vlivem ukládání solí ke změně turgoru a zrychlí se vznik nových buněk, které slouží k další akumulaci solí (Lüttge, 1993).

U dospělé (6 týdnů staré, obr. 2c) rostliny pokrývají měchýřkovité buňky téměř celý povrch listů a na některých z nich můžeme vidět špičku papily (Jou *et al.*, 2007). U rostlin, které byly ošetřeny roztokem NaCl o koncentraci 500 mM, začal přechod od C3 k CAM fotosyntéze, rostlina akumulovala NaCl i inositol a jeho deriváty (Adams *et al.*, 1998; Bohnert and Cushman, 2000). Pokud byly rostliny ošetřeny 400 mM roztokem NaCl po dobu 35 dní, docházelo v měchýřkovitých buňkách k akumulaci Na⁺ do koncentrace více než 1M. Za stejných podmínek byla koncentrace Cl⁻ 0,96 M.

Na konci května rostliny začínají kvést (viz obr. 2d) a vegetativní fáze je ukončena (Winter *et al.*, 1978). Kvetoucí rostliny mají květy na konci primárního stonku a v úžlabí sekundárních listů, měchýřkovité buňky epidermis jsou viditelné (Adams *et al.*, 1998).

V době produkce semen mají rostliny největší měchýřkovité buňky za celý životní cyklus (Adams *et al.*, 1998), Pokud byla taková rostlina zalévána roztokem NaCl o koncentraci 500 mM a vyšší,

došlo v ní k největší akumulaci Na⁺, inositolu a jeho derivátů (Bohnert and Cushman, 2000). Takové rostliny již nepřijímaly vodu a životaschopné zůstávaly jen tobolky se semeny (Adams *et al.*, 1998).



Obrázek 2: Vývojová stádia *M. crystallinum*: a) Klíčící rostlina (semenáč) s primárními listy, měřítko 5mm; b) Měchýřkovité buňky na stonku 6 týdnů staré rostliny, měřítko 500 μ m; c) Dospělá (8 týdnů stará) rostlina vystavená zasolení po dobu 2 týdnů, měřítko 5 cm; d) Kvetoucí (12 týdnů stará) rostlina, měřítko 5 cm. Převzato z Adams *et al.* (1998) a Agarie *et al.* (2007).

4. Transgenní rostliny

Halofytní rostliny jsou po celý životní cyklus vystaveny abiotickým stresovým faktorům, v reakci na něž si vyvinuly účinnější obranné mechanismy. Snažíme se tyto rostliny co nejvíce prostudovat, abychom mohli znalosti o nich využít například při šlechtění rostlin, zejména zemědělských plodin. Geny z odolných rostlin se využívají k tvorbě transgenních rostlin, které nám mohou pomoci v prokázání funkcí jednotlivých genů ve zvýšení tolerance vůči některému ze stresů. Ke zvýšení odolnosti transgenní rostliny ale mnohdy nestačí vnést jen jeden gen, ale více genů, nebo dokonce celou metabolickou dráhu (Rammesmayer *et al.*, 1995; Ishitani *et al.*, 1996). V závěrečné kapitole své bakalářské práce se proto budu věnovat shrnutí dostupných informací o transformaci modelových rostlin prostřednictvím transformace s cílem modulovat metabolické dráhy inositolu a jeho derivátů.

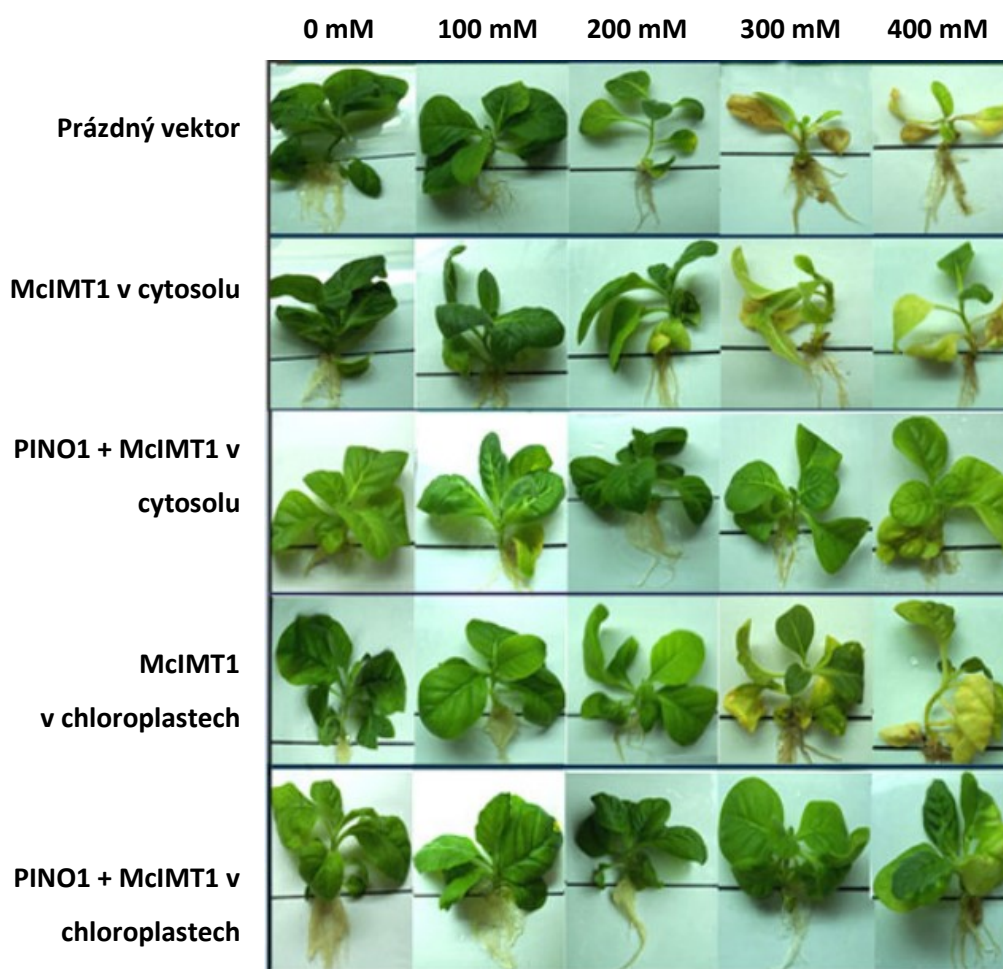
4.1 Tabák (*Nicotiana tabacum*)

Několik studií se zabývalo transformací tabáku (*Nicotiana tabacum*) pomocí vnesení genu *IMT1* (pod promotorem CAMV 35S) z *Mesembryanthemum crystallinum* (Vernon *et al.*, 1993b; Sheveleva *et al.*, 1997). Kontrolní i transgenní rostliny při stresu syntetizovaly více *myo*-inositolu, který je substrátem pro *IMT1*. Transformované rostliny tabáku vykazovaly enzymatickou aktivitu *IMT1* a při stresu ze sucha a zasolení akumulovaly metabolit, který nebyl detekován v kontrolních rostlinách. Tato látka byla identifikována jako ononitol a představovala hlavní nestrukturní sacharidovou složku v listech transgenních rostlin (Vernon *et al.*, 1993b; Sheveleva *et al.*, 1997). Hladiny ononitolu byly výrazně vyšší v listech dospělých rostlin než v semenáčích, a to pravděpodobně kvůli neschopnosti tabáku katabolizovat novou sloučeninu, která se postupně hromadila. V *M. crystallinum* se ononitol dále přeměňuje na pinitol pomocí epimerázy. V tabáku však pinitol nebyl detekovatelný, což naznačuje, že v tabáku příslušná epimerázová aktivita chybí (Vernon *et al.*, 1993b).

Další analýzy stejných transformovaných rostlin potvrdily předchozí výsledky, tedy že se při stresu ze sucha a zasolení akumuloval ononitol, docházelo k menší inhibici fotosyntetické fixace CO₂ a transgenní rostliny se po stresu regenerovaly rychleji než netransformované (kontrola). Při stresu ze zasolení došlo k nárůstu koncentrace *myo*-inositolu u transgenních i kontrolních rostlin, protože tabák přirozeně toleruje nízké koncentrace NaCl (okolo 50 mM). Pokud se ale množství NaCl v médiu zvýšilo na 150 mM, došlo ke ztrátě turgoru u obou typů rostlin, což se projevilo vadnutím listů. Transgenní rostliny však dokázaly poměrně rychle turgor obnovit a dále pokračovat v normálním růstu, naopak u většiny kontrolních rostlin došlo k poškození listů. Se vzrůstající délkou a intenzitou stresu narůstala u transgenních rostlin koncentrace MI a ononitolu, které sloužily k ochraně. Mimo to rostliny syntetizovaly i prolin, sacharózu, glukózu a fruktózu (v menší míře než kontrolní rostliny), jejichž koncentrace ale v průběhu dne kolísaly (Sheveleva *et al.*, 1997). Oproti tomu byly hladiny ononitolu stabilní, což poskytovalo lepší, a především účinnější, ochranu před stresem než sloučeniny, které jsou v rostlině přítomny neustále, ale jejich množství kolísala (například sacharóza). Transgenní tabák byl díky zvýšené produkci ononitolu odolnější vůči stresu, než netransformované rostliny (Vernon *et al.*, 1993b; Sheveleva *et al.*, 1997). Množství ononitolu ale neovlivnilo absorpci iontů. Na⁺ se akumuloval v kontrolní i transgenní linii stejně, přičemž nejnižší koncentrace byla naměřena v nejmladších listech. Ononitol nevstupoval do vakuoly a fungoval tedy jako osmolyt v cytosolu pro vyrovnání osmotického tlaku způsobeného hromaděním Na⁺ ve vakuole. Stres ze sucha vyvolal podobné reakce jako zasolení, ale způsobil větší akumulaci ononitolu (až 35 μmol/g čerstvé hmotnosti) (Sheveleva *et al.*, 1997).

V následujících studiích zaměřených na transformaci tabáku byly využity dva geny. V první studii autorů Patra *et al.* (2010) byly do tabáku vneseny geny pro *IMT1* z *M. crystallinum* (McIMT1), gen pro *INO1* z *Porteresia coarctata* (PcINO1) a jejich kombinace pod 35s CAMV promotory, a jejich

produkty byly lokalizovány v cytosolu a chloroplastech (kódující sekvence fúzována s cDNA kódující transitní peptid pro malou podjednotku Rubisca). Množství MI a methylovaných derivátů bylo nejvyšší v chloroplastech i v cytosolu u dvojitě transgenních rostlin v porovnání s rostlinami transformovanými prázdným vektorem a rostlinami s jedním z genů (mezi kterými nebyly výrazné rozdíly). V chloroplastech rostlin s oběma geny se nacházelo při 0 i 300 mM NaCl více MI a méně methylovaných derivátů oproti cytosolu. Jedinou výjimkou byla koncentrace 400 mM NaCl, při které bylo v chloroplastech více inositolu i jeho derivátů. Rostliny s oběma transgeny vykazovaly při zasolení lepší růst, účinnost využití energie ve fotosyntéze, byly méně náchylné vůči oxidačnímu stresu a celkově byly odolnější než rostliny s jedním z genů a rostliny transformované prázdným vektorem (obr. 3).



Obrázek 3: Transgenní rostliny tabáku pěstované v MS médiu, vystavené různým koncentracím NaCl v médiu (100-400 mM) po dobu 21 dní. Upraveno podle Patra et al. (2010).

Po dlouhodobém stresu (21 dní při 200 a více mM NaCl) došlo u rostlin transformovaných prázdným vektorem k zežloutnutí listů. Rostliny s oběma a jedním z genů přežily koncentrace NaCl až do 300 mM. Při 400 mM došlo u rostlin s McIMT1 k zežloutnutí listů a snížení růstu, ale i tak byly

schopné udržet až 60 % účinnosti využití energie ve fotosystému II (PSII). Při tak vysoké koncentraci se však zastavila přeměna *myo*-inositolu na methylované deriváty. Rostliny s oběma geny překonaly koncentraci 400 mM NaCl pouze s mírně sníženým růstem a jejich listy zůstaly zelené. Podobně tomu bylo i u míry účinnosti využití energie, dvojitě transgenní rostliny byly schopné udržet až 88 % účinnosti využití energie v PSII. Exprese *PcINO1* a *McIMT1* u dvojitě transgenních rostlin způsobila při stresu ze zasolení zvýšenou syntézu *myo*-inositolu a ononitolu, jejichž syntéza mohla být detekovaná až do 400 mM NaCl, i když klesala se zvyšující se koncentrací soli. Snížený obsah volného inositolu při stresu pravděpodobně odrážel jeho následnou přeměnu na methylované deriváty (Patra *et al.*, 2010).

Ve druhé z prací týmu Majee *et al.* (2004) byl tabák transformován pomocí *PcINO1* a jeho homologu z *Oryza sativa* (*RINO1*, v jiných studiích označovaný jako *OsINO1*), jehož produkt je citlivý na zasolení. Mezi produkty genů *PcINO1* a *OsINO1* byl zjištěn rozdíl v sekvenci aminokyselin. V úseku 37 aminokyselin došlo u *PcINO1* k několika adicím a delecím a výsledkem je, že *PcINO1* obsahuje o 2 aminokyseliny více než *OsINO1*. Tento pozměněný úsek aminokyselin má za následek toleranci vůči zasolení u proteinu *PcINO1*. Pokud se z *PcINO1* tato sekvence odstranila, protein ztratil odolnost vůči soli. Díky vnesení genu *PcINO1* byly transgenní tabákové rostliny schopny růstu v 200-300 mM NaCl, udržely si účinnost fotosyntézy na 40 až 80 %, a také se zvýšila produkce inositolu ve srovnání s nestresovanou kontrolou. Při 300 mM NaCl vykazovaly rostliny s *PcINO1* více než 2krát vyšší rychlost fotosyntézy a produkovaly 2 až 7krát více inositolu než rostliny s *OsINO1* a kontrola. U proteinu *PcINO1* nedocházelo k inhibici enzymatické aktivity až do koncentrace 500 mM NaCl. Ve srovnání s tím se u rostlin s vneseným genem *OsINO1* při zvyšující se koncentraci NaCl snižovala aktivita *OsINO1* vlivem oligomerizace, přičemž při 500 mM byla jeho aktivita umlčena úplně. Pokud ale do média přidali 2 nebo 5 mM inositol, nedošlo k výraznému snížení účinnosti fotosyntézy při rostoucích koncentracích NaCl ani u jednoho typu rostlin (Majee *et al.*, 2004).

Tým Goswami *et al.* (2013) byla provedena transformace tabáku pomocí *OsINO1* a *PcINO1* (pod promotorem specifickým pro semena), která způsobila navýšení obsahu inositolu pouze v semenech a měla tak vliv na jejich klíčení. Během klíčení se *L*-*myo*-inositol-1-fosfát převádí na inositol hexafosfát (kyselina fytová), který se poté hydrolyzuje na fosfát a MI. Specifická nadprodukce inositolu v semenech během klíčení může podle autorů zvýšit klíčivost a přežití semen za podmínek stresu. Semena kontroly a transformovaná *OsINO1* vykazovala nízkou frekvenci klíčení a malou velikost semenáčků už od 50 mM NaCl. Semena s *PcINO1* klíčila v podmínkách zasolení nejvíce a vykazovala také nejvyšší růst semenáčků. V kombinaci stresu ze sucha a zasolení opět nejlépe přežila a vyklíčila semena s *PcINO1* (Goswami *et al.*, 2013).

Z výsledků těchto studií vyplývá, že vnesené geny *PcINO1* a *McIMT1* udělily transgenním tabákovým rostlinám zvýšenou odolnost vůči stresu prostřednictvím akumulace inositolu a jeho derivátů a značné ochrany fotosyntetického aparátu, přičemž růst transgenních rostlin byl srovnatelný

s kontrolou (Majee *et al.*, 2004; Patra *et al.*, 2010). Důležitým závěrem také je, že dvojitě transgenní rostliny jsou vůči stresu ještě odolnější a akumulují více MI a jeho methylovaných derivátů v porovnání s rostlinami s jedním z vnesených cizorodých genů. Tento jev je navíc prokazatelný bez ohledu na to, zda jsou oba geny exprimovány společně v cytosolu nebo v chloroplastech. Rostliny s oběma geny obsahovaly až dvojnásobné množství methylovaných inositolů oproti rostlinám s *McIMT1*, což naznačuje, že *PcINO1* je aktivnější a vůči soli tolerantnější (Patra *et al.*, 2010). Zároveň tyto výsledky ukazují, že se rostliny dokáží přizpůsobit modulaci biochemických cest, které produkují nové produkty uhlíkatého metabolismu. V metabolismu rostlin tedy existuje určitý stupeň flexibility, a tedy i prostor pro genetickou manipulaci (Vernon *et al.*, 1993b).

4.2 Rýže (*Oryza sativa*)

Rýže je dalším druhem, kde byl porovnán vliv transformace geny *PcINO1* a *OsINO1* (transformace vlastním genem, aby došlo k jeho overexpresi) (Das-Chatterjee *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2019). Zvýšení koncentrace NaCl v médiu způsobilo výraznou inhibici klíčení v netransformovaných kontrolních rostlinách a rostlinách transformovaných genem *OsINO1*, zatímco rostliny transformované genem *PcINO1* vykazovaly jen mírné snížení klíčivosti a byly schopné klíčit až do koncentrace 400 mM NaCl v médiu (Mukherjee *et al.*, 2019). Základní růstové parametry, jako je délka prýtu a kořenů, byly negativně ovlivněny v přítomnosti vyšší koncentrace soli v kontrolních rostlinách a rostlinách s *OsINO1*, zatímco většina rostlin s *PcINO1* vykazovala lepší odolnost. Na základě měření fluorescence chlorofylu bylo zjištěno, že u rostlin s *PcINO1* dochází k lepší ochraně fotosystémů, zejména PSII, ve srovnání s netransformovanou kontrolou a rostlinami s *OsINO1*. Je možné, že inositol sám působí jako prostředek ke zmírnění stresu nebo jako modulátor pro řadu dalších drah důležitých pro udělení tolerance vůči soli (Mukherjee *et al.*, 2019).

Kromě *PcINO1* a *OsINO1* se autoři ve stejné studii zaměřili i na vnesení genu pro *PcIMT1*. Geny *PcINO1* a *PcIMT1* byly do rýže vneseny buď samostatně, nebo v kombinaci a byl sledován jejich vliv na udělení tolerance vůči zasolení. Všechny tři linie transformovaných rostlin dokázaly přežít v médiu obsahujícím 300 mM NaCl po dobu 15 dní, pouze s malým poklesem v množství chlorofylu, přičemž nejmenší pokles byl u rostlin s *PcINO1*. Transgenní rýže s *PcINO1* tolerovala koncentrace NaCl vyšší než 200 mM se zanedbatelným snížením růstu ve srovnání s netransformovanou kontrolou bez stresu. Linie s *PcIMT1* a dvojitě transgenní linie nebyly tak odolné. U netransformovaných kontrolních linií a linií s *PcIMT1* došlo při zasolení k poklesu množství inositolu v porovnání se stavem bez soli, zatímco u dvojitě transgenních linií nedošlo k žádné změně v hladinách inositolu, pinitol byl detekován pouze v liniích s *PcIMT1* a u dvojitě transgenních rostlin. Tři typy transgenních linií rýže tolerantních k zasolení

s *PcINO1*, *PcIMT1* a jejich kombinace vykazovaly toleranci vůči soli bez znatelného kompromisu růstu, což svědčí o potenciálu pro manipulace metabolické dráhy inositolu (Mukherjee *et al.*, 2019).

Geny *PcINO1* a *OsINO1* využil při experimentech i tým Das-Chatterjee *et al.* (2006). Při 100 mM NaCl došlo u kontrolních rostlin rýže ke snížení obsahu inositolu na 40 % a u rostlin s *OsINO1* na 65 %, při 200 mM se množství inositolu snížilo u kontrol na 10 % a u *OsINO1* na 25 %, ve srovnání se stavem bez soli. Zvýšení koncentrace NaCl způsobilo u netransformovaných kontrol a rostlin s *OsINO1* inhibici růstu a ztrátu chlorofylu, zatímco rostliny s *PcINO1* byly schopné přežít a pokračovat v růstu i po dlouhodobém (21 dní) zalévání roztokem NaCl o koncentraci 200 mM. Při 100 a 200 mM NaCl si tyto rostliny udržely 95 a 80 % obsahu inositolu ve srovnání s podmínkami bez zasolení. Rostliny s *PcINO1* překonaly i působení 300 mM NaCl po dobu 10 dní, a po návratu do média bez soli byly schopné obnovit růst. Rostliny s *PcINO1* vykazovaly 2 až 3krát vyšší fotosyntetickou účinnost než linie s *OsINO1* a kontrola, dle autorů studie tedy existuje korelace mezi množstvím inositolu a účinností fotosyntézy při zasolení (Das-Chatterjee *et al.*, 2006).

4.3 Brukev sítinovitá (*Brassica juncea*)

Rostliny jsou často vystaveny měnícím se podmínkám prostředí, musí být proto schopné se po odeznění stresu rychle navrátit do původního stavu. Právě na fázi zotavení se zaměřila studie Goswami *et al.* (2013). Transformované rostliny brukve s *PcINO1*, *OsINO1* a kontrolní rostliny byly zalévány 100 mM roztokem NaCl po dobu 10 dní. Všechny tři linie se dokázaly rychle zotavit a pokračovat v normálním růstu. Při 300 mM NaCl a opětovném zalití (vodovodní vodou po dobu jednoho měsíce) u kontrol a *OsINO1* nedošlo k obnovení růstu. Rostliny s *OsINO1* dokázaly přežít i 300 mM NaCl, ale byly zakrslé a nebyly schopny vstoupit do generativní fáze. Naopak rostliny transformované *PcINO1* rostly za stejných podmínek mnohem lépe, po ošetření 300 mM roztokem NaCl dokázaly obnovit normální růst, vykazovaly zvýšenou toleranci vůči zasolení a oxidačnímu stresu se zvýšenou hladinou inositolu v kořenech i prýtech (Goswami *et al.*, 2013). Bylo pozorováno, že při nižších koncentracích NaCl (100 mM), mohly kontrolní rostliny udržet až 66 % celkového obsahu *myo*-inositolu a rostliny transformované *OsINO1* udržely 85 % zásoby inositolu oproti stavu bez soli. Rostliny s *PcINO1* (vneseno pod promotorem CAMV 35S) akumulovaly při 100 mM až 135 % inositolu ve srovnání se stavem bez stresu (Das-Chatterjee *et al.*, 2006). Potvrdily se tedy předchozí výsledky, že existuje přímá korelace mezi obsahem volného inositolu a tolerancí k zasolení v transgenních rostlinách s *PcINO1* (Majee *et al.*, 2004; Das-Chatterjee *et al.*, 2006; Goswami *et al.*, 2013). Navíc, se zvýšením hladiny inositolu v kořenech došlo ke snížení jeho množství v nadzemní části. Se zvyšující se koncentrací NaCl se výrazně zvyšoval obsah inositolu v rostlinách s *PcINO1* ve srovnání s kontrolou a rostlinami s *OsINO1*, přičemž nejvyšší

koncentrace inositolu byla naměřena v kořenech při 300 mM NaCl (Goswami *et al.*, 2013).

Během stresu ze sucha a zasolení dochází ke snížení účinnosti fotosyntézy vlivem produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Po 10 dnech zasolení poklesl výtěžek fotosyntézy u kontroly a rostlin s *OsINO1* na 60 % a 50 %. U linie s *PcINO1* byl pokles výrazně nižší (o 8 %). Aby se určilo, zda nadprodukce inositolu vede k efektivnějšímu vylučování ROS akumulovaných při stresu, byly linie s *PcINO1* ošetřeny paraquatem (Methylviologen), silným herbicidem. Se zvyšující se koncentrací paraquatu došlo ke snížení rychlosti fotosyntézy u kontroly a rostlin transformovaných *OsINO1*, zatímco u rostlin s *PcINO1* se udržovaly vysoké hodnoty i při vysokých koncentracích herbicidu. Je tedy možné, že inositol nebo některé z derivátů inositolu při jejich navýšené produkci chrání fotosyntetický aparát před oxidačním stresem, což vede k lepšímu přežití rostlin při stresu (Goswami *et al.*, 2013).

Lze tedy uzavřít, že stejně jako v předchozích příkladech transformace rostlin pomocí genu *PcINO1*, i v těchto studiích prokázaly zvýšenou odolnost takto transformovaných rostlin *Brassica juncea* vůči stresu ze zasolení díky zvýšené produkci a akumulaci inositolu (Goswami *et al.*, 2013). Jak už bylo naznačeno výše, inositol ale nemusí fungovat výhradně jako osmolyt. Stálé množství inositolu a jeho derivátů během stresu pomáhá udržovat normální růst rostlin, umožňuje rostlině chránit fotosyntetický aparát před poškozením volnými kyslíkovými radikály a aktivuje další signální dráhy, které se účastní stresové odpovědi (Das-Chatterjee *et al.*, 2006; Goswami *et al.*, 2013). Transformace rostlin měla také prospěšný vliv na složení látek v semenech, kdy v oleji z těchto semen nedošlo k akumulaci žádných škodlivých metabolitů, a naopak zvýšené množství inositolu zlepšilo kvalitu hořčice jako potraviny (Goswami *et al.*, 2013). Všechny experimenty byly ale prováděny *in vitro*, bude tedy třeba dalších studií, které tyto výsledky ověří v podmínkách na poli.

4.4 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

V dalších studiích týmu Ahn, Park and Park (2011) a Ahn *et al.* (2018) zaměřených na objasnění sfunkce inositolu a jeho derivátů pomocí transformace rostlin, byly využity geny pro *myo*-inositol methyltransferázu (GmIMT) a D-ononitol epimerázu (GmOEP) izolované ze sóji (*Glycine max*), která při stresu ze sucha a zasolení akumuluje ononitol v listech. Aby se potvrdilo, že jsou transkripty *GmIMT* indukované stresem ze sucha a zasolení, byla nejprve detailně charakterizována míra exprese obou genů v 4týdenních semenáčích sóji, vystavených suchu a zasolení (300 mM NaCl) a až následně byly geny vneseny do *Arabidopsis* (Ahn *et al.*, 2011, 2018). Byly porovnány aminokyselinové sekvence GmIMT se známými IMT z *M. crystallinum* a *P. coarctata* a zjistilo se, že jsou totožné pouze z 40-41 %, oproti tomu aminokyselinové sekvence McIMT a PcIMT jsou shodné z 99 % (Ahn *et al.*, 2011). K určení míry exprese *GmIMT* a *GmOEP* v jednotlivých částech rostliny sóji, byly čtyřtýdenní rostliny vystaveny

stresu ze sucha a zasolení (300 mM NaCl). Při zasolení se transkripty *GmIMT* v kořenech nenacházely vůbec (Ahn *et al.*, 2011), což je v souladu s dřívější studií v *M. crystallinum*, u kterého se transkripty *MclMT* také nenachází v kořenech (Vernon and Bohnert, 1992a). V listech začaly hladiny *GmIMT* stoupat už po 2 hodinách a maxima dosáhly za 4 hodiny, poté množství postupně klesalo. V případě stresu ze sucha se *GmIMT* začal hromadit po 2 hodinách stresu a maxima dosáhl po 8 hodinách (Ahn *et al.*, 2011). Ve srovnání s tím, se při zasolení *GmOEP* objevil v listech po 4 hodinách a jeho množství se zvyšovalo až do 24 hodin. V kořenech objevil po 1 hodině, maxima dosáhl po 4 hodinách a poté jeho hladina pomalu klesala. Po vystavení suchu se *GmOEP* objevil v listech až po 4 hodinách stresu a maxima dosáhl po 24 hodinách. V kořenech se také objevil po 4 hodinách, ale maxima dosáhl už za 8 hodin. Těmto pozorovaným vzorcům exprese odpovídají naměřené hladiny ononitolu. Z výsledků vyplývá, že po vystavení sóji suchu a zasolení dochází ke zvýšené syntéze D-ononitolu v listech, a ten se následně transportuje do kořenů, kde působí při syntéze D-pinitolu (Ahn *et al.*, 2018).

K určení, zda geny ze sóji udělí toleranci vůči stresu i jiným rostlinám, vytvořili dále autoři studie transgenní *Arabidopsis* (pomocí konstitutivního promotoru CaMV35S), které exprimovaly *GmIMT* nebo *GmOEP* (Ahn *et al.*, 2011, 2018). U kontrolních rostlin se působením zasolení (100 mM NaCl) snížila klíčivost na 15 %, působením sucha na 25 % a při chladu (4 °C) na 52 %. Poměr klíčení transgenních *Arabidopsis* byl však tímto ošetřením abiotickými stresy mnohem méně ovlivněn (20 % po 100 mM NaCl, 46 % při suchu a 71 % při 4 °C) (Ahn *et al.*, 2011). Při 300 mM NaCl přežilo pouze 3,6 % rostlin divokého typu, transgenní rostliny byly odolnější a míra přežití byla 17,2 % (Ahn *et al.*, 2018). Po vystavení suchu začaly kontrolní rostliny vadnout a po opětovném zavlažení se už nevrátily do původního stavu a většina nakonec uhynula. Za stejných podmínek přežilo 50 % transgenních rostlin s *GmIMT* a po opětovném zavlažení dále pokračovaly v normálním růstu (Ahn *et al.*, 2011). V případě rostlin s *GmOEP* po opětovném zalití přežilo 67,4 %, oproti 33,3 % kontrolních rostlin (Ahn *et al.*, 2018). Tyto výsledky naznačují, že rostliny *Arabidopsis* s nadměrnou expresí *GmOEP* nebo *GmIMT* byly tolerantnější vůči suchu a v menší míře i vůči zasolení než rostliny divokého typu (Ahn *et al.*, 2011, 2018).

Přesto, že mezi akumulací cyklických alkoholů a tolerancí stresu v transgenních rostlinách existuje pozitivní korelace, nedosahuje koncentrace cyklitolů takové úrovně, aby mohly fungovat jako kompatibilní soluty (Patra *et al.*, 2010). Tyto sloučeniny by ale pravděpodobně mohly sloužit i v nižších koncentracích jako látky chránící strukturu makromolekul (Vernon *et al.*, 1993b). Zvýšená produkce cyklitolů uděluje glykofytickým druhům zvýšenou toleranci vůči stresu (Vernon *et al.*, 1993b), což se využívá zejména při tvorbě odolných zemědělských plodin.

5. Závěr

Rostliny se během svého života setkávají s řadou stresových faktorů, biotických i abiotických, se kterými se musí vyrovnávat. Mezi nejzávažnější stresové faktory patří ty, které jsou spojené s nedostatkem či nedostupností vody, tedy zejména sucho a zasolení. I vůči těmto stresům jsou některé rostliny tolerantnější než jiné, což je mimo jiné umožněno akumulací kompatibilních solutů, kam řadíme i inositol a jeho deriváty. Jedním z nejvýznamnějších rostlinných modelů pro studium akumulace těchto látek a jejich vlivu na toleranci vůči stresu je kosmatec (*Mesembryanthemum crystallinum*). Díky podrobnému prozkoumání této rostliny byla odhalena řada mechanismů a biochemických reakcí, které udělují zvýšenou odolnost vůči stresu. Znalosti získané studiem kosmatce a dalších tolerantních rostlin jsou důležité zejména ve šlechtitelství, jelikož se mohou využít k tvorbě odolnějších transgenních rostlin. Kromě vnesení cizorodých genů by se tolerance rostlin mohla pravděpodobně zvýšit manipulací univerzálně přítomné dráhy syntézy inositolu, jelikož inositol může sám zmírňovat působení stresu, ale také působí jako signál pro řadu dalších drah, které jsou důležité ve zvýšení tolerance vůči stresu. Stresová odpověď rostlin je ale velmi komplexní proces, kterému zatím nejsme schopni plně porozumět. Regulace exprese genů, které jsou zapojeny do stresové odpovědi rostlin, může zahrnovat více signálů nebo souhru několika kontrolních mechanismů současně. Přes všechny dosud získané poznatky je v této oblasti výzkumu stále mnoho neznámých, které poskytují prostor pro další studium.

6. Seznam použité literatury

- Adams, P, Nelson, DE, Yamada, S, Wendy, C, Jensen, RG, Bohnert, HJ, and Griffiths, H (1998). Growth and Development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *New Phytol* 97, 171–190.
- Adams, P, Thomas, JC, Vernon, DM, Bohnert, HJ, and Jensen, RG (1992). Distinct Cellular and Organismic Responses to Salt Stress. *Plant Cell Physiol* 33, 1215–1223.
- Agarie, S, Kawaguchi, A, Kodera, A, Sunagawa, H, Kojima, H, Nose, A, and Nakahara, T (2009). Potential of the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* as a new high-functional food as evaluated by polyol accumulation. *Plant Prod Sci* 12, 37–46.
- Agarie, S, Shimoda, T, Shimizu, Y, Baumann, K, Sunagawa, H, Kondo, A, Ueno, O, Nakahara, T, Nose, A, and Cushman, JC (2007). Salt tolerance, salt accumulation, and ionic homeostasis in an epidermal bladder-cell-less mutant of the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *J Exp Bot* 58, 1957–1967.
- Ahn, C, Park, U, and Park, PB (2011). Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 415, 669–674.
- Ahn, CH, Hossain, MA, Lee, E, Kanth, BK, and Park, PB (2018). Increased salt and drought tolerance by D-pinitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 504, 315–320.
- Arndt, SK, Livesley, SJ, Merchant, A, Bleby, TM, and Grierson, PF (2008). Quercitol and osmotic adaptation of field-grown *Eucalyptus* under seasonal drought stress. *Plant, Cell Environ* 31, 915–924.
- Barkla, BJ, and Vera-Estrella, R (2015). Single cell-type comparative metabolomics of epidermal bladder cells from the halophyte *mesembryanthemum crystallinum*. *Front Plant Sci* 6, 1–10.
- Barkla, BJ, Vera-Estrella, R, Camacho-Emiterio, J, and Pantoja, O (2002). Na⁺/H⁺ exchange in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* is associated with cellular sites of Na⁺ storage. *Funct Plant Biol* 29, 1017–1024.
- Bartels, D, and Sunkar, R (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 24, 23–58.
- Bialeski, R L. Sugar alcohols (1982). In: Loewus F A, Tanner, W. *Plant Carbohydrates I. Intracellular Carbohydrates*. Springer Berlin Heidelberg, p. 193-216.
- Bohnert, HJ, and Cushman, JC (2000). The ice plant cometh: Lessons in abiotic stress tolerance. *J Plant Growth Regul* 19, 334–346.
- Bohnert, HJ, and Jensen, RG (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol* 14, 89–97.
- Bohnert, HJ, Nelson, DE, and Jensen, RG (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099–1111.
- Bray, EA (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2, 48–54.
- Chauhan, S, Forsthoefel, N, Ran, Y, Quigley, F, Nelson, DE, and Bohnert, HJ (2000). Na⁺ / myo -inositol symporters and Na⁺ / H⁺ -antiport in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J* 24, 511–522.
- Chen, THH, and Murata, N (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol* 5, 250–257.
- Chu, C, Dai, Z, Ku, MSB, and Edwards, GE (1990). Induction of crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by abscisic acid. *Plant Physiol* 93, 1253–1260.
- Cockburn, W, Whitelam, GC, Broad, A, and Smith, J (1996). The participation of phytochrome in the signal transduction pathway of salt stress responses in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *J Exp Bot* 47, 647–653.

- Cortleven, A, Leuendorf, JE, Frank, M, Pezzetta, D, Bolt, S, and Schmülling, T (2019). Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants. *Plant Cell Environ* 42, 998–1018.
- Cushman, JC, Michalowski, CB, and Bohnert, HJ (1990). Developmental control of crassulacean acid metabolism inducibility by salt stress in the common ice plant. *Plant Physiol* 94, 1137–1142.
- Das-Chatterjee, A, Goswami, L, Maitra, S, Dastidar, KG, Ray, S, and Majumder, AL (2006). Introgression of a novel salt-tolerant L-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka (PcINO1) confers salt tolerance to evolutionary diverse organisms. *FEBS Lett* 580, 3980–3988.
- Demmig, B, and Winter, K (1986). Sodium, potassium, chloride and proline concentrations of chloroplasts isolated from a halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* 168, 421–426.
- Dittrich, P, and Brandl, A (1987). Revision of the pathway of D-pinitol formation in leguminosae. *Phytochemistry* 26, 1925–1926.
- Dittrich, P, and Korak, A (1984). Novel biosynthesis of D-pinitol in *Simmondsia chinensis*. *Phytochemistry* 23, 65–66.
- Ehleringer, JR, and Cerling, TE (2002). C3 and C4 photosynthesis. *Encycl Glob Environ Chang Earth Syst Biol Ecol Dimens Glob Environ Chang* 2, 186–190.
- Flowers, TJ, and Colmer, TD (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol* 179, 945–963.
- Flowers, TJ, Flowers, SA, Hajibagheri, MA, and Yeo, AR (1990). Salt tolerance in the halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Tateoka. *New Phytol* 114, 675–684.
- Giri, J (2011). Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav* 6, 1746–1751.
- Goswami, L, Sengupta, S, Mukherjee, S, Ray, S, Mukherjee, R, and Lahiri Majumder, A (2013). Targeted expression of L-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka confers multiple stress tolerance in transgenic crop plants. *J Plant Biochem Biotechnol* 23, 316–330.
- Hatch, MD (1987). C4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *BBA Rev Bioenerg* 895, 81–106.
- Ishitani, M, Majumder, AL, Bornhouser, A, Michalowski, CB, Jensen, RG, and Bohnert, HJ (1996). Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *Plant J* 9, 537–548.
- Jou, Y, Wang, YL, and Yen, HE (2007). Vacuolar acidity, protein profile, and crystal composition of epidermal bladder cells of the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Funct Plant Biol* 34, 353–359.
- Keller, F, and Ludlow, MM (1993). Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *J Exp Bot* 44, 1351–1359.
- Kluge, M, Hell, R, Pfeffer, A, and Kramer, D (1987). Structural and metabolic properties of green tissue cultures from a CAM plant, *Kalanchoë blossfeldiana* hybr. *Montezuma*. *Plant Cell Environ* 10, 451–462.
- Kramer, DUO on DLBC of *M crystallinum* L 1)1)Dedicate. to the 90th birthday of POS (1979). Ultrastructural Observations on Developing Leaf Bladder Cells of *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Flora* 168, 193–204.
- Loewus, F A. Cyclitols (1982). In: Loewus F A, Tanner, W. *Plant Carbohydrates I. Intracellular Carbohydrates*. Springer Berlin Heidelberg, p. 193-216.
- Loewus, FA, Kelly, S, and Neufeld, EF (1962). Metabolism of Myo-Inositol in Plants: Conversion To Pectin, Hemicellulose, D-Xylose, and Sugar Acids. *Proc Natl Acad Sci* 48, 421–425.
- Loewus, FA, and Loewus, MW (1983). myo-Inositol: Its Biosynthesis and Metabolism. *Plant Physiol* 34, 137–161.
- Loewus, FA, and Murthy, PPN (2000). myo-Inositol metabolism in plants. 150, 1–19.

- Lüttge, U (1993). The role of crassulacean acid metabolism (CAM) in the adaptation of plants to salinity. *New Phytol* 125, 59–71.
- Lüttge, U, Fischer, E, and Steudle, E (1978). Membrane potentials and salt distribution in epidermal bladders and photosynthetic tissue of *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Environ* 1, 121–129.
- Majee, M, Maitra, S, Dastidar, KG, Pattnaik, S, Chatterjee, A, Hait, NC, Das, KP, and Majumder, AL (2004). A Novel Salt-Tolerant L-myo-Inositol-1-phosphate Synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a Halophytic Wild Rice. Molecular cloning, bacterial overexpression, characterization, and functional introgression into tobacco-conferring salt tolerance. *J Biol Chem* 279, 28539–28552.
- Majumder, AL, Johnson, MD, and Henry, SA (1997). 1L-myo-Inositol-1-phosphate synthase. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab* 1348, 245–256.
- Merchant, A, Tausz, M, Arndt, SK, and Adams, MA (2006). Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 *Eucalyptus* species suggest contrasting physiological responses to water deficit. *Plant, Cell Environ* 29, 2017–2029.
- Michell, RH (2008). Inositol derivatives: Evolution and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 151–161.
- Michell, RH (2011). Inositol and its derivatives: Their evolution and functions. *Adv Enzyme Regul* 51, 84–90.
- Morinaga, T, Yamaguchi, M, Makino, Y, Nanamiya, H, Takahashi, K, Yoshikawa, H, Kawamura, F, Ashida, H, and Yoshida, K (2006). Functional myo-Inositol Catabolic Genes of *Bacillus Subtilis* Natto Are Involved in Depletion of Pinitol in Natto (Fermented Soybean). *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 1913–1920.
- Mukherjee, R, Mukherjee, A, Bandyopadhyay, S, Mukherjee, S, Sengupta, S, Ray, S, and Majumder, AL (2019). Selective manipulation of the inositol metabolic pathway for induction of salt-tolerance in indica rice variety. *Sci Rep* 9.
- Munnik, T, and Vermeer, JEM (2010). Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant, Cell Environ* 33, 655–669.
- Negishi, O, Mun'Im, A, and Negishi, Y (2015). Content of methylated inositols in familiar edible plants. *J Agric Food Chem* 63, 2683–2688.
- Negrão, S, Schmöckel, SM, and Tester, M (2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Ann Bot* 119, 1–11.
- Nelson, DE, Koukoumanos, M, and Bohnert, HJ (1999). Myo-inositol-dependent sodium uptake in ice plant. *Plant Physiol* 119, 165–172.
- Nelson, DE, Rammesmyer, G, and Bohnert, HJ (1998). Regulation of Cell-Specific Inositol Metabolism and Transport in Plant Salinity Tolerance. *Plant Cell* 10, 753–764.
- Nguyen, A, and Lamant, A (1988). Pinitol and myo-inositol accumulation in water-stressed seedlings of maritime pine. *Phytochemistry* 27, 3423–3427.
- Noiraud, N, Maurousset, L, and Lemoine, R (2001). Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiol Biochem* 39, 717–728.
- Nosek, M, Gawrońska, K, Rozpądek, P, Szechyńska-Hebda, M, Kornaś, A, and Miszalski, Z (2018). Withdrawal from functional Crassulacean acid metabolism (CAM) is accompanied by changes in both gene expression and activity of antioxidative enzymes. *J Plant Physiol* 229, 151–157.
- Nosek, M, Kaczmarczyk, A, Śliwa, M, Jędrzejczyk, R, Kornaś, A, Supel, P, Kaszycki, P, and Miszalski, Z (2019). The response of a model C3/CAM intermediate semi-halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. to elevated cadmium concentrations. *J Plant Physiol* 240.
- Oh, DH, Barkla, BJ, Vera-Estrella, R, Pantoja, O, Lee, SY, Bohnert, HJ, and Dassanayake, M (2015). Cell type-

specific responses to salinity - the epidermal bladder cell transcriptome of *Mesembryanthemum crystallinum*. *New Phytol* 207, 627–644.

Patra, B, Ray, S, Richter, A, and Majumder, AL (2010). Enhanced salt tolerance of transgenic tobacco plants by co-expression of PclNO1 and McIMT1 is accompanied by increased level of myo-inositol and methylated inositol. *Protoplasma* 245, 143–152.

Paul, MJ, and Cockburn, W (1989). Pinitol, a compatible solute in *Mesembryanthemum crystallinum* L.? *J Exp Bot* 40, 1093–1098.

Pavlů, J, Novák, J, Koukalová, V, Luklová, M, Brzobohatý, B, and Černý, M (2018). Cytokinin at the crossroads of abiotic stress signalling pathways. *Int J Mol Sci* 19, 1–36.

Peterbauer, T, and Richter, A (2001). Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Sci Res* 11, 185–197.

Phillips, D V., Dougherty, DE, and Smith, AE (1982). Cyclitols in Soybean. *J Agric Food Chem* 30, 456–458.

Procházka, S, Macháčková, I, Krekule, J, and Šebánek, J (1998). *Fyziologie rostlin*, Praha: Academia Praha.

Rammesmayr, G, Pichorner, H, Adams, P, Jensen, RG, and Bohnert, HJ (1995). Characterization of IMT1, myo-Inositol O-methyltransferase, from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Arch Biochem Biophys* 322, 183–188.

Richter, A, and Popp, M (1992). The physiological importance of accumulation of cyclitols in *Viscum album* L. *New Phytol* 121, 431–438.

Ruis, H, and Hoffmann-Ostenhof, O (1969). Enzymic Epimerization of Sequoyitol to D-Pinitol in *Trifolium incarnatum*. *Eur J Biochem* 7, 442–448.

Sanada, Y, Ueda, H, Kuribayashi, K, Andoh, T, Hayashi, F, Tamai, N, and Wada, K (1995). Novel light-dark change of proline levels in halophyte (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) and glycophytes (*Hordeum vulgare* L. and *Triticum aestivum* L.) leaves and roots under salt stress. *Plant Cell Physiol* 36, 965–970.

Schilling, N, Dittrich, P, and Kandler, O (1972). Formation of L-Quebrachitol from D-Bornesitol in Leaves of *Acer Pseudoplatanus*. *Phytochemistry* 11, 1401–1404.

Sengupta, S, and Majumder, AL (2010). *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a wild rice: A potential model for studying salt-stress biology in rice. *Plant, Cell Environ* 33, 526–542.

Sengupta, S, Patra, B, Ray, S, and Majumder, AL (2008). Inositol methyl transferase from a halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Roxb. (Tateoka): Regulation of pinitol synthesis under abiotic stress. *Plant, Cell Environ* 31, 1442–1459.

Sharma, A, Shahzad, B, Kumar, V, Kohli, SK, Sidhu, GPS, Bali, AS, Handa, N, Kapoor, D, Bhardwaj, R, and Zheng, B (2019). Phytohormones Regulate Accumulation of Osmolytes Under Abiotic Stress. *Biomolecules* 9, 285.

Sheveleva, E, Chmara, W, Bohnert, HJ, and Jensen, RG (1997). Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol* 115, 1211–1219.

Shevyakova, NI, Bakulina, EA, and Kuznetsov, V V. (2009). Proline antioxidant role in the common ice plant subjected to salinity and paraquat treatment inducing oxidative stress. *Russ J Plant Physiol* 56, 663–669.

Shevyakova, NI, Musatenko, LI, Stetsenko, LA, Rakitin, VY, Vedenicheva, NP, and Kuznetsov, V V. (2013). Effect of ABA on the contents of proline, polyamines, and cytokinins in the common ice plants under salt stress. *Russ J Plant Physiol* 60, 741–748.

Steudle, E, Lüttge, U, and Zimmermann, U (1975). Water relations of the epidermal bladder cells of the halophytic species *Mesembryanthemum crystallinum*: Direct measurements of hydrostatic pressure and hydraulic conductivity. *Planta* 126, 229–246.

- Stinson, EE, Dooley, CJ, Purcell, JM, and Ard, JS (1967). Quebrachitol—A New Component of Maple Sap and Sirup. *J Agric Food Chem* 15, 394–397.
- Stoop, JMH, Williamson, JD, and Pharr, DM (1996). Mannitol metabolism in plants: A method for coping with stress. *Trends Plant Sci* 1, 139–144.
- Streeter, JG (1985). Identification and distribution of ononitol in nodules of *pisum sativum* and *glycine max*. *Phytochemistry* 24, 174–176.
- Taiz, L, and Zeiger, E (2003). *Plant Physiology*.
- Takahashi, M, and Asada, K (1988). Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids. *Arch Biochem Biophys* 267, 714–722.
- Thomas, JC, De Armond, RL, and Bohnert, HJ (1992a). Influence of NaCl on growth, proline, and phosphoenolpyruvate carboxylase levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. *Plant Physiol* 98, 626–631.
- Thomas, JC, and Bohnert, HJ (1993). Salt stress perception and plant growth regulators in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol* 103, 1299–1304.
- Thomas, JC, McElwain, EF, and Bohnert, HJ (1992b). Convergent induction of osmotic stress-responses: Abscisic acid, cytokinin, and the effects of NaCl. *Plant Physiol* 100, 416–423.
- Tran, DQ, Konishi, A, Cushman, JC, Morokuma, M, Toyota, M, and Agarie, S (2020). Ion accumulation and expression of ion homeostasis-related genes associated with halophilism, NaCl-promoted growth in a halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Prod Sci* 23, 91–102.
- Valluru, R, and Van den Ende, W (2011). Myo-inositol and beyond - Emerging networks under stress. *Plant Sci* 181, 387–400.
- Vera-Estrella, R, Barkla, BJ, Bohnert, HJ, and Pantoja, O (1999). Salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum* L. cell suspensions activates adaptive mechanisms similar to those observed in the whole plant. *Planta* 207, 426–435.
- Vernon, DM, and Bohnert, HJ (1992a). A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J* 11, 2077–2085.
- Vernon, DM, and Bohnert, HJ (1992b). Increased expression of a myo-inositol methyl transferase in *Mesembryanthemum crystallinum* is part of a stress response distinct from crassulacean acid metabolism induction. *Plant Physiol* 99, 1695–1698.
- Vernon, DM, Ostrem, JA, and Bohnert, HJ (1993a). Stress perception and response in a facultative halophyte: the regulation of salinity-induced genes in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Environ* 16, 437–444.
- Vernon, DM, Tarczynski, MC, Jensen, RG, and Bohnert, HJ (1993b). Cyclitol production in transgenic tobacco. *Plant J* 4, 199–205.
- Wanek, W, and Richter, A (1997). Biosynthesis and accumulation of D-ononitol in *Vigna umbellata* in response to drought stress. *Physiol Plant* 101, 416–424.
- Willenbrink, ME, and Hüsemann, W (1995). Photoautotrophic Cell Suspension Cultures from *Mesembryanthemum crystallinum* and their Response to Salt Stress. *Bot Acta* 108, 497–504.
- Williamson, JD, Jennings, DB, Guo, WW, Pharr, DM, and Ehrenschaft, M (2002). Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: Polyols - Multifunctional plant protection? *J Am Soc Hortic Sci* 127, 467–473.
- Winter, K, Garcia, M, and Holtum, JAM (2008). On the nature of facultative and constitutive CAM: Environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoë*, and *Opuntia*. *J Exp Bot* 59, 1829–1840.

Winter, K, and Holtum, JAM (2007). Environment or development? Lifetime net CO₂ exchange and control of the expression of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol* 143, 98–107.

Winter, K, and Holtum, JAM (2014). Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) plants: Powerful tools for unravelling the functional elements of CAM photosynthesis. *J Exp Bot* 65, 3425–3441.

Winter, K, Lüttge, U, and Winter, E (1978). Seasonal Shift from C₃ Photosynthesis to Crassulacean Acid Metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* Growing in Its Natural Environment. *Oecologia* 34, 225–237.

Wu, ZC, Zhang, JQ, Zhao, JT, Li, JG, Huang, XM, and Wang, HC (2018). Biosynthesis of quebrachitol, a transportable photosynthate, in *Litchi chinensis*. *J Exp Bot* 69, 1649–1661.

Yang, B, Zheng, J, and Kallio, H (2011). Influence of origin, harvesting time and weather conditions on content of inositols and methylinositols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. *Food Chem* 125, 388–396.

Internetové zdroje

Hoskovec, Ladislav, 2007. MESEMBRYANTHEMUM CRYSTALLINUM L. – kosmatec třpytivý/poludňovka trblietavá. In: *Botany.cz* [online]. 1. 8. [cit. 07.03.2020]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/mesembryanthemum-crystallinum/>.