



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra fyziologie rostlin

NENÍ NOUZE JAKO NOUZE:

**Porovnání odpovědi rostlinné buňky na solný stres,
obecný osmotický stres a nedostatek vody**

NOT ALL STRESSES ARE EQUAL:

**comparing the response of plant cells to salt, osmotic
and drought stress**

bakalářská práce

Sylva Přerostová

Školitel: Doc. RNDr. Fatima Cvrčková, Dr. rer. nat.

Praha 2009

Obsah

Obsah	2
Seznam zkratk	3
1. Abstrakt	4
2. Úvod	6
3. Stres	7
3.1. Charakteristiky stresů	7
3.1.1 Solný stres	7
3.1.2 Osmotický stres	8
3.1.3 Nedostatek vody	9
3.1.4 Shrnutí	9
3.2. Rostliny a solný stres	10
4. Projevy na rostlině	11
4.1. Makroskopické projevy	12
4.1.1 Transport Na ⁺ rostlinou	12
4.1.2 Projevy na orgánech	13
4.2. Mikroskopické projevy na buňce	14
4.2.1 Přenos a separace Na ⁺	14
4.2.2 ROS	15
4.2.3 Tvorba osmolytů, osmoprotektantů a polyaminů	15
5. Geny a tolerance	16
5.1. Receptory	17
5.2. Signální molekuly	18
5.2.1 Ca ²⁺	18
5.2.2 ABA a etylén	18
5.2.3 MAPK	19
5.2.4 Další dráhy	19
5.3. Transkripční faktory	19
5.4. Malé RNA	20
5.5. Geny solného stresu	21
5.5.1 Transportéry Na ⁺	21
5.5.2 SOS	22
5.6. Geny osmotického stresu	22
5.7. Geny vodního deficitu	23
6. Závěr	23
7. Použitá literatura	24

Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová (abscisic acid)
ABRE	promotorová oblast reagující na ABA (ABA-responsive element)
CBL	protein příbuzný kalcineurinu B (calcineurin B-like protein)
CDK	cyklin-dependentní kinázy
CDPK	kalcium-dependentní proteinkináza
DCL	komplex s RNázovou aktivitou (Dicer-like)
DRE	promotorová oblast reagující na vysušení (dehydration responsive element)
DREB	faktor vázající se do oblasti DRE (DRE-binding factor)
EIN	etylén insenzitivní proteiny
ERS	senzor etylénové odpovědi (ethylene response sensor)
ETR	gen etylénové odpovědi (ethylene response)
H⁺-ATPáza	protonová pumpa využívající ATP
H⁺-PPáza	protonová pumpa využívající pyrofosfát (PPi)
HKT	vysokoafinní přenašeč K ⁺ (high-affinity K ⁺ transporter)
HSP	proteiny teplotního šoku (heat shock protein)
CHX	nespecifické kation/H ⁺ -přenašeče (cation/H ⁺ exchanger)
KC	K ⁺ -kanál (K ⁺ -channel)
LEA	proteiny hojné při pozdní embryogenezi (late-embryogenesis abundant)
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MAPKK	MAPK kináza
MAPKKK	MAPKK kináza
miRNA	mikroRNA
MYB	transkripční faktory (myeloblastosis oncogene homolog)
MYC	transkripční faktory (myelocytoblastosis oncogene homolog)
NCED	9- <i>cis</i> -epoxykarotenoid dioxygenáza
NHX	Na ⁺ /H ⁺ protisměrný přenašeč (Na ⁺ /H ⁺ exchanger)
RISC	umlčující komplex aktivovaný malými RNA (RNA-induced silencing complex)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
siRNA	krátké interferující RNA (short-interfering RNA)
SnRK2	proteinkináza příbuzná SNF1 (SNF1-related proteinkinase)
SOS	geny citlivé na solný stres (salt overly sensitive)
WRKY	transkripční faktory s konzervovanou aminokyselinovou sekvencí (tryptofan, arginin, lyzin, tyrozin)
ZAT	zinkové prsty z rodiny Cis2/His2 (zinc transporter of <i>Arabidopsis thaliana</i>)

1. Abstrakt

Úkolem této práce je shrnutí poznatků o rozdílech mezi solným stresem, osmotickým stresem a stresem z vodního deficitu. Příčiny těchto stresů jsou různé a odpověď na ně rovněž. Solný stres vzniká působením vysoké koncentrace rozpustných solí (hlavně NaCl). Přebytečné ionty jsou přijímány rostlinou kvůli vodě nebo jiným iontům. Problematický je především příjem sodných iontů, které jsou už v malém množství pro buňky toxické. Rostliny ionty odčerpávají ven nebo je uskladňují ve vakuolách pomocí přenašečů (HKT, NHX). Pokud množství iontů přesáhne určitou mez, může dojít k předčasné senescenci listů, ke sterilitě nebo i k smrti jedince. Osmotický stres je vyvolán poruchou elektrochemického gradientu na membráně, takže voda z buňky začne odcházet, buňka se smrští (plazmolýza) a celá rostlina zvadne. Sucho má na rostlinu podobný vliv. Nedostatek vody se projevuje zavíráním průduchů, zvýšenou tvorbou kyseliny abscisové (ABA) a produkcí osmoticky aktivních látek (kompatibilních solutů).

V další části práce je zmíněno téma signálních drah (SOS, MAPK), které zajišťují koordinaci stresových odpovědí, role Ca^{2+} a ROS (reaktivních forem kyslíku). Kapitola je také věnována regulaci genové exprese probíhající pomocí transkripčních faktorů (zinkové prsty), promotorových oblastí (ABRE, DRE) a malých RNA (miRNA, siRNA).

Počet obyvatel na Zemi se stále zvyšuje a zajištění obživy lidstva bude i nadále jedním z hlavních úkolů. Pokud by se vyřešil problém se zasolením půd a s ním spojené dehydratace nebo by se našly tolerantní plodiny, rozhodně by to pomohlo, zejména rozvojovým zemím.

Klíčová slova: *Arabidopsis thaliana*, glykofyty, halofyty, salinita.

1. Abstract

The summary of findings about differences between salt, osmotic and drought stresses is the task of this work. The reasons of these stresses are various and responses to them, too. Salt stress rises from a coverage of high concentrations of soluble salts (especially NaCl). Odd ions are received by a plant because of water or other ions. The uptake of sodium ions, which are toxic for a cell already in small amounts, is problematic in particular. Plants exhaust ions out or store them in vacuolars via transporters (HKT, NHX). If the ion quantity exceeds certain limit, it could occur an early senescence of leaves, an impotence or even an individual death. Osmotic stress is developed by a disturbance of the electrochemical gradient on the plasma membrane, so that water begins move away from the cell, the cell will shrink (plasmolysis) and whole plant will fade. Drought stress has a similar influence on plants. The lack of water develops a shutting of stomata, increased an activity of the abscisic acid (ABA) and a production of osmolytes (compatible solutes).

In the next section of this work, there are referenced the theme of signal pathways (SOS, MAPK), which advance the co-ordination of stress responses, the role of Ca^{2+} and ROS (reactive oxygen species). A chapter is devoted to the regulation of the gene expression enabled by transcriptional factors (zinc-fingers), promoters (ABRE, DRE) and small RNAs (miRNA, siRNA).

The number of the population on the Earth is ever growing and the resource of human living remains in existance one of the main imposition. If the problem of soil salinisation and accompanying dehydration solves or some tolerant crop finds, it will help indeed, especially in underdeveloped countries.

Key Words: *Arabidopsis thaliana*, glycophytes, halophytes, salinity

2. Úvod

Problém zasolení půd se v posledních letech začíná dostávat stále více do popředí zájmu. Jednak rychle přibývá lidí na Zemi a je třeba je nějakým způsobem nakrmit a k tomu se musí připočítat fakt, že zasolená území se rok od roku rozšiřují. Podle Organizace OSN pro výživu a zemědělství (FAO, 2005) bylo v roce 2005 zasoleno přes 800 milionů ha, což je přes 6 % pevniny Země. Většinou jde o přirozené zasolení aridních oblastí a pásem podél oceánů, přičemž významnou roli hrají i srážky, které obsahují 6-50 mg chloridu sodného na kilogram. Přesto existují i místa zasolovaná člověkem. Jedná se o pozemky s odstraněnou vegetací, uměle zavlažované, vysoušené i přímo zasolované (např. v zimě 2004/2005 se podle Ředitelství silnic a dálnic ČR (2008) spotřebovalo v ČR na údržbu silnic a dálnic 70 tun soli na kilometr).

Zasolení se nejvíce dotýká rostlin, jež jsou přisedlé a závislé na minerálních látkách z půdy. Problémy může vyvolat vyšší množství jakékoliv z rozpustných minerálních látek (např. ionty vápníku, hořčíku, sírany), ale nejhorší následky má na svědomí chlorid sodný a sodné kationty. Na^+ ionty mají tendenci v půdě vytěšňovat vápenaté a hořečnaté kationty, jež se snáze odplavují, zvyšují zásaditost a mění charakter půdy. Rostlina je pak nucená přijímat s jinými živinami i sodík, jenž je pro rostliny i v nízkých dávkách škodlivý a při vysokých koncentracích může způsobit smrt celé rostliny (Munns and Tester, 2008).

Kromě solného stresu hrozí rostlinám v takovýchto podmínkách ještě další nebezpečí. Bylo již zmíněno, že zasolení je výsledkem vysoušení půd. Sucho je nepřítel většiny organismů, včetně rostlin. Voda je důležitá pro příjem živin, metabolismus i pro růst a vývoj jedince. Podle FAO (2005) je přes 1500 milionů ha obhospodařovaných půd postiženo suchem. Druhým ohrožením pro rostliny je tzv. osmotický stres. Osmotický stres může být způsoben vyšší koncentrací solí nebo nedostatkem vody. Dochází k rychlému narušení elektrochemického gradientu a turgoru (vnitřního tlaku) buněk. Rostliny musí být schopny okamžitě zareagovat a vyrovnat se s tímto stresem, nebo zahynou (Munns and Tester, 2008).

Zasolení je velký problém moderního světa a úkolem zemědělců a vědců je hledat tolerantní druhy a zkoumat procesy odehrávající se v buňkách a tkáních. Tato bakalářská práce se zabývá mechanismem působení solného stresu a obrannými reakcemi rostliny a zároveň se zaměřuje na porovnání účinku soli, sucha a osmotického stresu na rostliny.

3. Stres

Stres je definován jako zátěž organismu, jenž je vystaven nepříznivým podmínkám (stresory). Stres narušuje normální fyziologické funkce jedince, a tím vyvolává v organismu obrannou reakci vedoucí k obnovení homeostáze. Odpověď může být obecná nebo specifická pro dané podmínky. Nový rovnovážný stav se ale může od předchozího lišit. Vzhledem k tomu, že rostliny nemají schopnost přesunu na jiná místa, jsou nuceny podmínkám čelit a pokud možno si vytvořit toleranci, neboli nastolit rovnovážný stav. Pokud rostlina není schopna zvládnout příliš velké množství stresoru nebo dlouhodobé působení nepříznivých podmínek, může to vyvolat odumírání orgánů, sterilitu nebo dokonce i smrt (Buchanan *et al.*, 2000).

3.1. Charakteristiky stresů

U rostlin existuje několik typů stresu, jež se odlišují hlavně charakterem stresoru. Lze je rozdělit do dvou velkých skupin: biotické, kam patří napadení patogenem, herbivorie a vzájemná konkurence mezi rostlinami, a abiotické. Do abiotických stresů se řadí mechanické poškození, nedostatek a nadbytek vody, nedostatek kyslíku, vysoké/nízké teploty, nadměrné UV ozáření, solný a osmotický stres, nedostatek a nadbytek světla (Buchanan *et al.*, 2000). Tato práce se zaměřuje na solný, osmotický stres a částečně na stres z nedostatku vody.

3.1.1 Solný stres

Solný stres obecně bývá způsoben přítomností většího množství nějakých iontů v půdě. Může se jednat o Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} a další (tzv. salinita). Nejnepříznivěji však působí Na^+ , který bývá často doprovázen Cl^- . Udává se, že koncentrace rozpuštěných solí v půdě by při salinitě měla přesahovat 40 mM (Munns and Tester, 2008), ale záleží na tom, o jaké soli jde a jaký druh, ba dokonce který jedinec je jim vystaven.

Chloridové ionty nebývají pro rostlinu tak problematické, poněvadž se účastní mnoha buněčných procesů, mají stabilizující funkci v některých komplexech a jsou důležité pro nastolení elektrochemického gradientu. Kromě toho jsou buňky vybavené sadou přenašečů specializovaných přímo na chlór. Chlór se v rostlinné buňce normálně vyskytuje v koncentraci okolo 188 μM (Buchanan *et al.*, 2000). Některé rostliny, jako citrusy a sója, akumulují Cl^- ionty více než Na^+ a jsou na něj více citlivé. Cl^- normálně odchází z buňky ven pasivně přes kanály díky elektrochemickému gradientu a jejich příjem je možný ve větším množství při depolarizaci membrány, případně sekundárně aktivním transportem pomocí $\text{Cl}^-/2\text{H}^+$ symportního přenašeče (Gilliam and Tester, 2005).

Sodné ionty jsou důležité pro některé rostliny (C4, CAM). Pro většinu druhů jsou však toxické díky tomu, že v buňkách nahrazují roli draselných iontů a narušují tak správné fungování proteinů, enzymů a dalších složek a zároveň narušují membránový potenciál (Tester and Davenport, 2003). Další nevýhoda spočívá v interferenci s příjmem živin z půdy. Sodné ionty se hromadí v půdním profilu, vytěsňují jiné ionty, jež jsou odplavovány, a způsobují degradaci půdních částic, které následně ucpávají póry. To vede k pomalému vsakování vody a sníženému provzdušnění půdy. Degradace půdních částic může být zpomalena přítomností dvojmocných kationtů poutajících k sobě záporně nabitě částice. Hraniční koncentrace sodných iontů (sodicita) závisí na množství takových iontů: pro většinu půd je to 150 mM a více, ale např. v Austrálii, kde je nižší obsah dvojmocných kationtů, se hranice pohybuje okolo 60 mM (Rengasamy et al., 2003).

Solný stres bývá důsledkem dlouhodobého působení vysoké koncentrace iontů. Nahromadění solí obvykle probíhá postupně a rostlina je s to se se stresem zpočátku vypořádat. Kritická je hodnota koncentrace uvnitř rostliny a buněk. První příznaky postižení se projevují až později (dny, týdny) na starých listech podléhajících předčasné senescenci z důvodu toxické koncentrace iontů. Při zvýšeném odumírání listů nemusí dojít ani k tvorbě květů kvůli nedostatku energie z fotosyntézy (Munns and Tester, 2008).

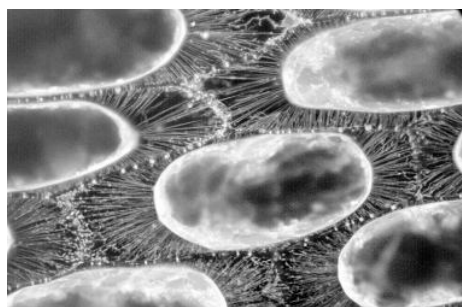
3.1.2. Osmotický stres

V buňkách je obvykle udržován stálý turgor kolem 0,6 MPa (Munns, 2002). Tato hodnota vychází z tlaku cytoplazmatické membrány na buněčnou stěnu a úzce souvisí s vnitřním obsahem vody. Za normálních podmínek je koncentrace látek v buňce vyšší než venku. Po otevření kanálů a dalších transportních systémů dovnitř vstupují různé látky a s nimi do buňky proniká i voda. Voda proudí kanály a difunduje přes membránu a projevuje tendenci vyrovnat koncentrace na obou stranách. Díky tomuto mechanismu je umožněna existence organismů (Buchanan *et al.*, 2000).

Problém nastává, když je koncentrační gradient narušen. V případě osmotického tlaku se jedná o vyšší množství iontů nebo dalších osmoticky aktivních látek samovolně neprocházejících přes cytoplazmatickou membránu, jako je sacharóza a manitol. V tu chvíli začne voda z buňky unikat ven a vnitřní tlak ochabne. Protoplast se začne smršťovat (plazmolyzovat) a vnitřní prostředí se zahustí. Z toho vyplývá, že osmotický stres je velice rychlá událost (minuty, hodiny) a již z počátku se projevuje na rostlině viditelným ochabnutím a uvadáním. Rostlina se musí s nečekanými podmínkami rychle vypořádat.

Nejenže hrozí odvodnění, ale bez vody správně nefungují enzymy, nesestavují se proteiny do potřebných konformací, znesnadňuje se transport a některé metabolické dráhy nemohou probíhat (Munns and Tester, 2008).

Osmotický stres vyvolává sucho, kontaminace těžkými kovy, ale také solný stres, pokud dojde k převrácení koncentračního gradientu, například těsně po hnojení anorganickými hnojivy (hlavně při nedostatečném zalití) nebo po posolení vozovek. Pro výzkum samotného osmotického stresu se často používá manitol, aby nedocházelo ke zkreslení reakcí na solný stres.



Obr. 1: Plazmolýza pokožkových buněk cibule v roztoku manitolu (750 mM). Hechtova vlákna spojují protoplast s buněčnou stěnou. (Převzato z Munns (2002))

3.1.3. Nedostatek vody

Vodní stres je obecně problémem pro všechny organizmy, protože kde není voda, není ani život. K nedostatku vody může docházet z několika příčin: suché klima, horko s nedostatkem srážek, mraz, zasolená půda, špatný půdní profil atd. Nedostatek vody vyvolává stejné problémy, jaké byly popsány v předchozí kapitole. Vliv na metabolismus a stavbu těla často vede při dlouhodobějším působení ke smrti jedince.

Rostlina odpaří asi 50krát více vody, než si uchová v listech (Munns, 2005). Proto je nezbytné, aby měla rostlina stálý přísun vody, případně musí tento poměr snížit. Existuje mnoho rostlin, jež se přizpůsobily suchu (sukulenty a jiné xerofyty). Ale co mají dělat rostliny, které takovým podmínkám přizpůsobeny nejsou? Obvyklou strategií je zavřít průduchy, snížit odpar vody impregnací při dlouhodobějším působení, nasyntetizovat osmoticky aktivní látky a osmoprotektivní látky (LEA) a snížit odparovou plochu opadem listů (Buchanan *et al.*, 2000).

3.1.4. Shrnutí

Stres je sám o sobě velice komplexní záležitost a ve většině případů se nejedná pouze o jeden typ stresu, ale o celou řadu faktorů, kterým musí rostlina čelit. Názorným příkladem

jsou tři stresy, jež jsou popsány výše. Osmotický stres je charakteristický vysokou koncentrací iontů a dalších rozpustných látek v půdě, které vyvolávají odčerpávání vody z buněk, přičemž snahou rostliny je vodu udržet v sobě. Solný stres je specifický hromaděním iontů uvnitř buněk a jedince do takové míry, až se ionty stávají toxickými. Rostlina však ionty přijímá dál, aby získala živiny a vodu. Stres z nedostatku vody je dán nepřítomností použitelné vody v okolí. Jedinec reaguje tak, že se snaží vodu udržet v těle a zároveň využívá energii k růstu kořenů, aby našel nový vodní zdroj.

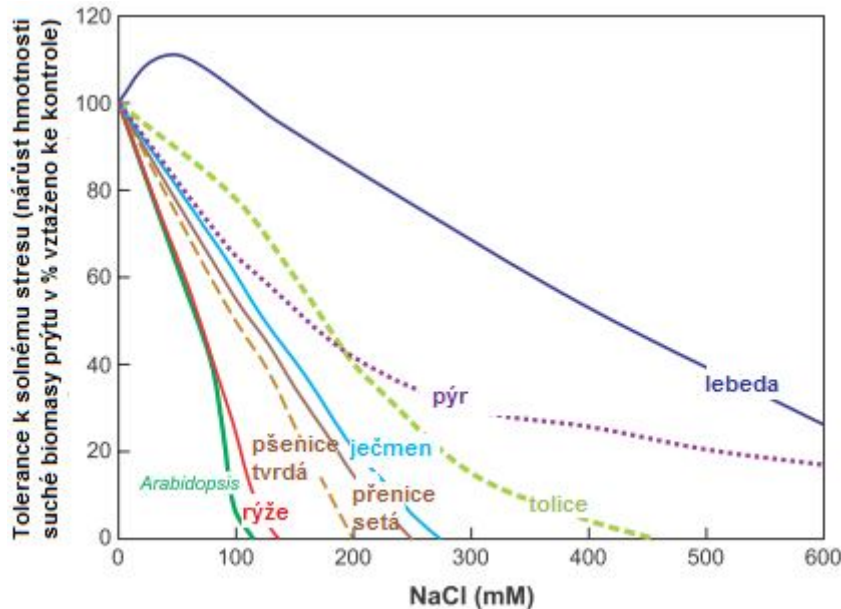
3.2. Rostliny a solný stres

Zvýšená koncentrace solí v půdě bývá různými rostlinami přijímána různě. Záleží nejen na druhu, ale i na samotné rostlině: na jejím stáří, velikosti, lokalitě atp. Obecně lze druhy rozdělit do dvou hlavních kategorií: halofyty a glykofyty.

Halofyty jsou rostliny, jež snášejí zasolení. Patří sem například tollice setá (*Medicago sativa*), ječmen přímořský (*Hordeum marinum*), lebeda (*Atriplex* sp.), ječmen obecný (*Hordeum vulgare*) nebo kosmatec krystalový (*Mesembryanthemum crystallinum*). (Bartels and Sunkar, 2005; Munns and Tester, 2008) Rostlin tolerantních k soli je hodně. Mnohdy odolávají koncentracím přesahujícím 400 mM. Rostliny přímořského pásma někdy bývají dokonce závislé na NaCl (100 – 200 mM) (Flowers et al., 1977). Uzpůsobení rostlin bývá různorodé. Může jít o hromadění soli ve starých listech, o vylučování soli specializovanými žlázami nebo o nadměrnou produkci určitých metabolitů (hlavně osmoprotektantů).

Glykofyty jsou naproti tomu citlivé i k malým výkyvům nízké koncentrace solí. Jejich obranný systém je omezený a při vyšších koncentracích nebo při dlouhodobějším působení postupně umírají. Mezi glykofyty patří např. rýže (*Oryza sativa*), pšenice tvrdá (*Triticum durum*) a většina zeleniny (Munns and Tester, 2008). Do této skupiny se řadí i huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Přestože je tato rostlinka velice náchylná k solnému stresu, bývá pro vědecké účely využívána především kvůli krátkému životnímu cyklu, malému genomu, jenž byl přečten a z větší části objasněna funkce genů, a největším plusem je snadná transformovatelnost dědičné výbavy (Zhang et al., 2004). Výzkum *Arabidopsis* v dnešní době směřuje k představě o vytvoření virtuální rostliny, o níž se bude vědět vše a jež bude sloužit jako předloha pro další druhy (Somerville and Dangl, 2000). Již v dnešní době probíhá mnoho výzkumů, při kterých jsou aplikovány poznatky z *Arabidopsis thaliana* na jiné druhy. Na internetu jsou přístupné různé databáze shromažďující informace o souborech genů a proteinů uplatňujících se za různých podmínek, včetně stresových (TAIR <http://www.arabidopsis.org>;

Arabidopsis eFP Browser <http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; GENEVESTIGATOR <https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>). Co se týče solného stresu, zaujala vědce ještě příbuzná rostlina z čeledi *Brassicaceae* *Thellungiella halophila*, jež patří mezi halofyty (Munns and Tester, 2008).



Obr. 2: Rozdíly v toleranci k solnému stresu. Graf znázorňuje vzrůst hmotnosti suché biomasy prýtu v závislosti na koncentraci NaCl v půdním roztoku po dobu 3 týdnů. Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), rýže setá (*Oryza sativa*), pšenice tvrdá (*Triticum durum*), pšenice setá (*Triticum aestivum*), ječmen obecný (*Hordeum vulgare*), pýr *Agropyron elongatum*, tolice setá (*Medicago sativa*), lebeda (*Atriplex sp.*). (Upraveno podle Munns and Tester (2008))

Práce ze sedmdesátých let se zabývají halofyty (Flowers *et al.*, 1977) i glykofyty (Greenway and Munns, 1980) detailněji. Z novějších prací lze uvést např. rešerši o halofytech Flowers and Colmer (2008). Dvacetiletý odstup spočívá ve využití nových metod z oblasti molekulární biologie a genetiky.

V této bakalářské práci se všechny zmiňované geny, proteiny a mutace vztahují přímo na *Arabidopsis thaliana* jako na modelovou rostlinu.

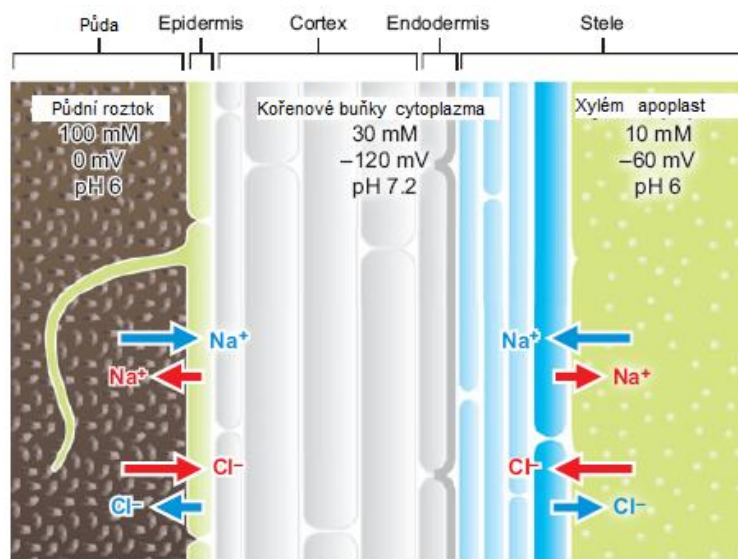
4. Projevy na rostlině

Všechny tři typy stresu se vyznačují viditelnými změnami na rostlině i skrytými procesy v buňkách a tkáních. Změny jsou úzce provázané a vytvářejí komplexní odpověď na nepříznivé podmínky okolí. Je obtížné tyto procesy analyzovat odděleně, ale abychom pochopili celek, musíme znát jeho části.

4.1. Makroskopické projevy

4.1.1. Transport Na^+ rostlinou

Příjem iontů a vody z půdy závisí na elektrochemickém gradientu cytoplazmatické membrány. Na^+ ionty bývají z půdy přijímány pasivním transportem (na rozdíl od Cl^-) nespecifickými kanály a některými kanály pro K^+ . Díky záporné hodnotě elektrického potenciálu na membráně proniká dovnitř i malé množství iontů (např. při -180 mV vstupují Na^+ pasivně i při koncentraci $0,03$ mM v apoplastu). Hranice toxického množství Na^+ v cytoplazmě kořenů se pohybuje okolo 30 mM (Tester and Davenport, 2003), avšak s pomocí zpětného aktivního transportu přenašeči a prostřednictvím separace do vakuol (Davenport et al., 2005) klesá koncentrace Na^+ na 1 – 10 mM. Zpětný transport může vykompenzovat příliv Na^+ již během prvních 10 minut. Hladina K^+ nebývá postižená a dosahuje hodnot 100 – 200 mM (Apse and Blumwald, 2007). Rostliny tolerantní k zasolení přijímají ionty více selektivně a jejich přenašeče Na^+ fungují efektivněji (Munns, 2005).



Obr. 3: Transport Na^+ a Cl^- v kořeni. Modré šipky – pasivní transport; červené šipky – aktivní transport. (Převzato z Munns and Tester (2008))

Transport Na^+ z kořenových buněk do xylému je silně potlačen díky tomu, že mrtvé buňky xylému nemají plazmatické membrány ani negativní elektrochemický potenciál, zatímco okolní parenchymatické buňky ano. Pokud by při zasolení bylo napětí na membráně okolních buněk -180 mV (bráno jako standardní hodnota polarizace rostlinné buňky), musela by být koncentrace Na^+ v xylému velice nízká ($0,03$ mM), aby transport iontů do xylému mohl vůbec proběhnout. Během solného stresu je ale v xylému udržovaná hodnota Na^+ stokrát vyšší (1 – 4

mM), což brání pasivnímu transportu. Když však dojde k depolarizaci okolních buněk (např. na -60 mV), může koncentrace Na^+ v xylému dosahovat klidně až 3 mM, a ionty budou stále samovolně pronikat do vodivého pletiva. K depolarizaci dochází třeba při transportu dalších iontů, jako je K^+ (Munns, 2005).

Rozvod xylémem do dalších buněk je opět usnadněn pasivním přenosem přes elektrochemický spád (Tester and Davenport, 2003). Ionty Na^+ bývají častěji uskladňovány v listech než v kořenech díky transpiraci a nízké návratnosti sodných iontů z prýtu zpět do kořenů floémem (Munns, 2002). Hranice toxické koncentrace Na^+ v cytoplazmě listů bývá asi 100 mM (Bartels and Sunkar, 2005).

4.1.2. Projevy na orgánech

Kořeny jsou přizpůsobeny případným problémům s příjmem solí přítomností: rhizodermis a primární kůry s vyvinutými vakuolami, Caspariho proužků blokujících apoplastický transport, buněk středního válce rovněž s vakuolami (Apse and Blumwald, 2007). Zpočátku se na kořenech projevuje osmotický efekt. Následně jsou vlivem transpirace a nedostatečného vodního zásobení zasaženy i listy. Účinky stresu jsou přechodné a rostlina se přizpůsobuje (např. *Arabidopsis* do hodiny od začátku působení stresoru), avšak zpomalení rychlosti růstu zůstává (Cramer, 2002). Růst kořenů bývá méně ovlivněný než růst prýtu (Munns, 2002). Citlivější než prýt jsou pouze kořenové vlásky, jejichž délka a hustota se radikálně zmenšuje už v přítomnosti 25 mM. Podle všeho jde o projev solného stresu, jelikož v roztoku manitolu kořenové vlásky postižené nejsou (naopak bývají delší) (Wang et al., 2008b).

Listy rostlin vystavených vysokým koncentracím soli nejprve uvádají v důsledku osmotického stresu, takže průduchy se v obraně zavírají. Po několika dnech se objevují i příznaky zasolení v podobě předčasně opadávajících starších listů, jež kumulují škodlivé ionty. Svým opadem v podstatě přispívají k dalšímu zasolování okolní půdy. Mladé listy se vyznačují zvýšenou fotosyntézou vzhledem k ploše (vlivem buněčné dehydratace), čímž se kompenzují ztráty vody (větší efektivita přeměny CO_2 vzhledem k H_2O) (Munns, 2005).

Po několika týdnech solný stres tlumí tvorbu postranních větví a může redukovat i počet květů, případně i jejich samotnou tvorbu. Tvorba květů závisí na velikosti zelené listové plochy, jež tvoří energii. Když přírůstek listů kompenzuje předčasný opad, reprodukce rostliny není narušena. Podobný efekt lze pozorovat při dehydrataci (Munns and Tester, 2008).

Podle všeho se na signalizaci solného stresu podílejí fytohormony, jež působí na dlouhou vzdálenost a buňky na ně velice rychle reagují. Neví se však, jaké látky by to přesně měly být a zda jsou to jen fytohormony. Rozhodně nelze popřít, že svoji roli hraje kyselina abscisová (ABA), jež reguluje zavírání průduchů (rovněž stimulací přestavby aktinového cytoskeletu v průvodních buňkách (Eun and Lee, 1997)) a zpomaluje růst buněk (Davies et al., 2005).

4.2. Mikroskopické projevy na buňce

Sodné ionty jsou toxické pro buňky. V cytoplazmě nahrazují K^+ , inhibují enzymy a narušují elektrostatické síly. Citlivost cytosolických enzymů je srovnatelná u glykofytů i halofytů (Flowers *et al.*, 1977), ale enzymy v buněčné stěně halofytů dokážou odolávat koncentracím vyšším než 500 mM NaCl (Thiyagarajah et al., 1996). Je nutné ionty čerpat ven z rostliny, uschovávat je ve vakuolách, kde neškodí, případně je vylučovat do buněčné stěny, což vede k rychlému odčerpávání vody a ke smršťování buňky jako při dehydrataci. Pokud to ale nestačí, Na^+ se začne rychle kumulovat v cytoplazmě, jejíž objem je vzhledem k vakuolárnímu malý, a buňka umře (Munns, 2002).

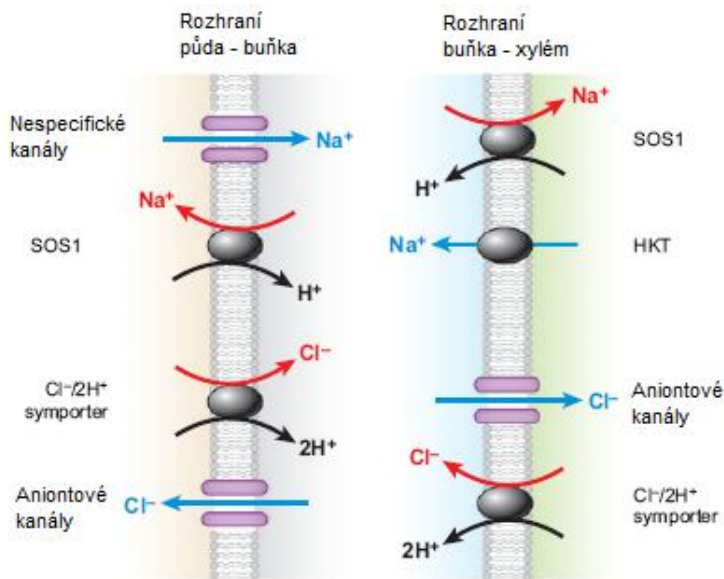
4.2.1. Přenos a separace Na^+

Přenos Na^+ sestává z příjmu iontů, výdeje a separace do vakuol.

Příjem je zprostředkován hlavně nespecifickými kanály pro ionty a vysokoafinními přenašeči K^+ (HKT). Proto rostliny po vystavení zasolení syntetizují spíše transportéry jedinečné pro dané ionty. Přímá souvislost s Na^+ byla objevena u přenašečů z rodiny HKT transportujících sodík do buňky. Mutantní rostliny s chybějícími HKT přenašeči se staly tolerantnějšími k zasolení (Haro et al., 2005).

Transport do vakuol i ven z buněk umožňují Na^+/H^+ protisměrné přenašeče (anglicky *antiporters*), tzv. NHX (Apse et al., 1999). Hnací silou jsou protony nashromážděné pomocí aktivních přenašečů (H^+ -ATPáza, H^+ -PPáza) (Munns, 2005).

Při regulaci hospodaření s vodou se uplatňují aquaporiny, kanály urychlující přesun vody přes membrány. Při stresových podmínkách je syntéza aquaporinových stavebních proteinů silně potlačena, ale může být i stimulována. Z pokusů vyplývá, že by syntéza aquaporinových proteinů měla být zvýšená během dehydratace a snížena při solném stresu (Smith-Espinoza et al., 2003).



Obr. 4: Transport Na^+ a Cl^- v kořeni. Modré šipky – pasivní transport; červené šipky – aktivní transport. (Upraveno podle Munns and Tester (2008))

4.2.2. ROS

Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species; ROS) vznikají během fotosyntézy v chloroplastech a při buněčném dýchání v mitochondriích. Jsou to nebezpečné látky poškozující DNA a další struktury buňky, avšak jsou také důležité při regulaci apikálního růstu (Potocky et al., 2007) a při přenosu signálu, především během oxidačního a vodního stresu a při nadměrném ozáření. Reaktivních forem kyslíku je několik typů, většinou se jedná o radikály: $^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2 a HO^\cdot (Mittler et al., 2004).

Asi nejdůležitějšími v otázce tolerance ROS budou enzymy superoxiddismutáza, askorbát peroxidáza, kataláza a glutathion reduktáza. Svoji roli má i vitamin C a E (Bartels and Sunkar, 2005). Při odstraňování ROS se uplatňují také osmolyty a osmoprotektanty (viz níže).

4.2.3. Tvorba osmolytů, osmoprotektantů a polyaminů

Osmoticky aktivní látky (osmolyty, kompatibilní soluty) jsou netoxické malé molekuly produkované v buňce za účelem vyrovnávání osmotického tlaku, především během solného, osmotického a vodního stresu. Neinteragují se základními metabolickými drahami a akumulují se hlavně v cytoplazmě ve vysokém množství. Osmolyty vyrovnávají tlak způsobený zvýšenou koncentrací iontů mimo buňku nebo ve vakuole nebo kompenzují poruchy turgoru při nedostatku vody. Mnohdy se podílejí na odstraňování ROS. V nižších koncentracích také mívají schopnost stabilizovat terciární strukturu bílkovin, tedy fungují i jako osmoprotektivní molekuly. Syntéza osmolytů je energeticky náročná. Kompatibilní

soluty jsou důležité při adaptaci. U halofytů je jejich množství v buňkách několikrát vyšší (Munns and Tester, 2008).

Osmoticky aktivní látky mohou být různé povahy. Ze sacharidů to může být rafinóza, stachyóza, trehalóza, sacharóza, fruktany, cukerné alkoholy, jako je galaktinol (Yokoi *et al.*, 2002), nebo u některých halofytů i oktulóza (Bianchi *et al.*, 1991). Dále to mohou být alkoholy (pinitol, ononitol, glycerol, manitol), aminokyseliny (prolin, asparagin), glycin betain (zajímavé je, že se nesyntetizuje v modelových rostlinách *Arabidopsis*, rýži a tabáku) a spousta dalších (Munns, 2005).

Mezi tzv. osmoprotektivní látky patří LEA proteiny (late-embryogenesis abundant). Bývají produkovány během dehydratace (takže i při osmotickém stresu) a při embryogenezi. Stabilizují proteinové struktury a membrány. Při solném stresu se většinou netvoří, protože v podstatě nedochází k vysoušení. Při nadměrné koncentraci např. Na^+ v cytoplazmě však mohou chránit proteiny před toxickými účinky iontů (Munns, 2005). Podobnou strukturu jako LEA proteiny mají i chaperony z rodiny heat shock proteinů (HSP). Chaperony se starají o správné složení proteinů. Ze zmiňovaných stresů se uplatňují především při dehydrataci (Bartels and Sunkar, 2005).

Polyaminy jsou malé molekuly, jež ochraňují buňku během stresových podmínek. Pravděpodobně se podílejí na odstraňování ROS. Ve větším množství jsou pro buňku škodlivé. Nejčastěji se uplatňují spermin, spermidin a putrescin (Bartels and Sunkar, 2005).

5. Geny a tolerance

V poslední době se do popředí zájmu dostává genové inženýrství a mapování genetické výbavy organismů. Jedná se o relativně mladá odvětví výzkumu. Genové inženýrství může poskytnout prostředky nahrazující cílené křížení jedinců s různými vlastnostmi. Nabízí poměrně rychlé a předem zvolené vytvoření mutantního organismu, přičemž někdy se tak dají přenést vlastnosti mezi různými druhy, nebo dokonce i mezi říšemi. Samotný postup ale není úplně jednoduchý a úspěšnost genové manipulace závisí na mnoha okolnostech. Rovněž mapování genomu má svá úskalí.

Při výzkumu stresů se těchto metod využívá například pro zjištění množství nebo typu genů, jejichž regulace je nějakým způsobem vychýlena od kontroly (rostlina nevystavená stresu, ale jinak pěstovaná za stejných podmínek). Znamená to, že se analyzuje množství RNA příslušného genu. Je zřejmé, že množství RNA nemusí být vždy směrodatné (ne vždy a ne stejně efektivně musí docházet k translaci atp.) a také málo vypovídá o provázanosti

buněčných drah a proteinových interakcích. Přesto lze výsledky použít třeba při srovnávání genové regulace mezi různými druhy rostlin mezi různými typy stresu. O rozmanitosti genové regulace při stresových odpovědích vypovídá tabulka 1.

	kořen							prýt						
	0.25 h	0.5 h	1.0 h	3.0 h	6.0 h	12 h	24 h	0.25 h	0.5 h	1.0 h	3.0 h	6.0 h	12 h	24 h
Sucho - zvýšená regulace	110	325	309	32	131	42	6	44	141	218	217	122	129	60
Sucho - snížená regulace	12	42	161	16	58	23	12	59	93	21	39	22	8	14
Solný stres - zvýšená regulace	ND	132	575	1263	1692	793	1310	ND	6	11	361	448	326	735
Solný stres - snížená regulace	ND	14	240	421	1291	577	666	ND	27	22	218	187	177	494
Osmotický stres - zvýšená regulace	ND	189	347	429	597	908	788	ND	34	214	797	934	1214	1553
Osmotický stres - snížená regulace	ND	24	199	367	525	906	590	ND	23	30	325	760	1345	1832

Tab. 1: Rozdíly v regulaci exprese genů během solného, osmotického a vodního stresu u *Arabidopsis thaliana* v závislosti na čase (v hodinách) a na rostlinné části. Hodnoty udávají počet genů, jejichž transkripce je zvýšená/snížená během stresu vzhledem ke kontrolní rostlině v nestresových podmínkách. Již za půl hodiny po aplikaci stresových podmínek rostlina reaguje na úrovni genomu. ND – nedefinováno. (Převzato z Kilian et al. (2007))

Mnohem účinnější se v těchto případech zdá být analýza proteomu. Z množství a typu proteinů se už dá vyvodit mnohé. Nevýhodou metody na odhalování proteomu je její složitost a vysoká nákladnost příslušných přístrojů. Metoda je náročná i časově, nehledě na obtížnost následného zhodnocování výsledků.

Zpracování zjištěných informací bývá nejtěžší. V případě stresových odpovědí jsou signalizace, regulace genové exprese a vzájemná provázanost drah samy o sobě dost komplikované (jakož i v rostlině stresu nevystavené) a často se odpověď na jeden stres překrývá s odpovědí na jiný. Vědci se v tomto „chaosu“ pokoušejí nalézt nějaký systém, který by další studium značně ulehčil. Zajímavou alternativu navrhuje Weston et. al. (2008), který se vypořádává s komplexitou a s překryvem stresových odpovědí zformováním genových bloků, přičemž každý blok zahrnuje geny (a tedy i proteiny) s podobnými vlastnostmi.

5.1. Receptory

Stresové receptory obecně patří mezi velké záhady. Nelze jednoznačně říci, že „tato molekula za všechno může“. Dá se předpokládat, že jak jsou komplexní samotné stresové projevy a odpovědi, tak složité bude i vnímání. Nebylo by tedy překvapením, že stresových receptorů se najde více a že budou obecné i specifické pro daný typ stresu. Nelze také vyloučit, že by receptorem solného stresu nemohl být samotný toxický efekt (např. Na⁺) na

proteinech a membránách; v podmínkách vodního deficitu by to mohla být ztráta stabilizujících vodních molekul a turgoru. Za pokus by také stálo zjistit, jestli projev osmotického stresu nenavozuje v rostlině stav, který může předznamenávat blížící se hrozbu soli.

5.2. Signální molekuly

Signální molekuly zprostředkovávají přenos informace od receptorů k efektorům. Obvykle tvoří celou větvenou kaskádu umocňující signál. Na konci obvykle bývá aktivace transkripčních faktorů podporujících nebo tlumících expresi genů (hlavně obranných).

5.2.1. Ca²⁺

Ca²⁺ ionty umí jako první signalizovat přítomnost Na⁺ v okolí buňky tím, že rostě jejich cytosolická koncentrace. Na⁺ stimuluje otevírání kanálů pro Ca²⁺, které proudí po koncentračním spádu do buňky (i z vakuoly) (Munns and Tester, 2008). Cytosolický Ca²⁺ může být detekován proteinem příbuzným kalcineurinu B (CBL4 – calcineurin B-like protein), který je součástí dráhy SOS jako SOS3 (viz níže) (Halfter et al., 2000), vazbou na kalmodulin nebo kalcium-dependentní proteinkinázou (CDPK). Nadprodukce receptorů vápníku, např. CDPK, vede ke zvýšené toleranci k osmotickému i solnému stresu (Bartels and Sunkar, 2005).

5.2.2. ABA a etylén

Kyselina abscisová (ABA) funguje jako signální molekula během osmotického, solného a vodního stresu. Stimuluje tvorbu osmolytů, LEA proteinů a dalších látek udržujících turgor a řídí uzavírání průduchů. ABA reguluje expresi genů přes promotorové úseky ABRE (ABA-responsive element). Jinou možnost řízení stresové odpovědi umožňuje metabolická dráha syntézy ABA, v níž jako klíčový enzym vystupuje 9-*cis*-epoxykarotenoid dioxygenáza (NCED), jejíž produkce je stimulována během stresu (Bartels and Sunkar, 2005), a zeaxantin-epoxidáza, jejíž nadměrná exprese urychluje zavírání průduchů a indukuje osmotickou toleranci (Park *et al.*, 2008).

Antagonistou kyseliny abscisové je etylén. Etylénový signál je přijímán ETR (ethylene response), ERS (ethylene response sensor) a EIN (ethylene insensitive protein) (Beaudoin et al., 2000). ETR1 ovlivňuje toleranci k solnému a osmotickému stresu a je ovlivňován kyselinou abscisovou. Ale i mezi alelami téhož genu se vztahy liší. Mutant *etr1-1* je více

citlivý k ABA a projevuje se sníženou stresovou tolerancí, zatímco *etr1-7* je ABA-insenzitivní a rostlina se stává více tolerantní (Wang et al., 2008a).

5.2.3. MAPK

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) je anglický název pro skupinu vysoce konzervovaných buněčných kináz, jež se navzájem postupně fosforylují, čímž vytvářejí jakousi síť nebo kaskádu vedoucí a umocňující signál. Na konci dráhy stojí látky citlivé k fosforylaci. Kinázy bývají označovány podle postupné aktivace jako MAPKKK-MAPKK-MAPK. MAPK-dráha pomáhá regulovat buněčný růst, dělení, smrt a účastní se také odpovědi na různé typy stresu. Drah je několik typů odlišujících se složením kináz a konečným účinkem (dráhy obvykle končí v jádře, kde fosforylují transkripční faktory). Např. u *Arabidopsis* existuje 20 MAPK, 10 MAPKK a 60 MAPKKK. Během sucha, solného a osmotického stresu se uplatňují AtMEKK1 (solný stres) a AtCTR1 (etylénový signál) jako MAPKKK; AtMKK1 (solný, sucho) a AtMKK2 (solný) jako MAPKK; AtMPK3 (osmotický, ABA-signál), AtMPK4 (osmotický, sucho) a AtMPK6 (osmotický, solný, sucho) jako MAPK. Nadměrná exprese příslušných genů může vést k toleranci stresu (Nakagami et al., 2005).

Proti kinázám fungují fosfatázy. Během solného stresu se u *Arabidopsis* produkuje protein-tyrozin fosfatáza (AtPTP1), která defosforyluje AtMPK4 (Bartels and Sunkar, 2005).

5.2.4. Další dráhy

Během stresu se uplatňují i jiné kinázy. Například SnRK2 (SNF1-related proteinkinase) se účastní kontroly při zavírání průduchů. Bývá regulována kyselinou abscisovou (Yoshida *et al.*, 2002). SnRK2 a další příbuzné kinázy jsou aktivovány suchem, solným a osmotickým stresem.

5.3. Transkripční faktory

Zpracování signálu z drah a regulace množství a typu syntetizovaných proteinů probíhá především v jádře pomocí specificky řízených transkripčních faktorů. Transkripční faktory inhibují nebo stimulují expresi genů tím, že se vážou do regulačních oblastí (hlavně do promotorové oblasti).

Během všech tří stresů se asi nejvíce projevují tzv. zinkové prsty z rodiny ZAT (ZAT7, ZAT10, ZAT12). Uvedené Zn-prsty se také účastní signalizace přítomnosti ROS. ZAT stimuluje syntézu proteinů vyvolávajících stresovou odpověď (Davletova et al., 2005). ZAT

působí velice rychle. Pravděpodobně mají vliv i na útlum uhlíkového metabolismu a fotosyntézy (Sakamoto *et al.*, 2004).

Spolu se ZAT transkripčními faktory se uplatňují i proteiny WRKY, jež se váží do oblasti W-boxu. WRKY proteiny mají konzervovanou sekvenci aminokyselin na N-konci, jinak jsou velice variabilní, nehledě na to, že spolu ještě mohou tvořit homo- a heterodimery. V rostlinách se vyskytuje mnoho druhů WRKY (u *Arabidopsis* 74 zástupců) účastnících se odpovědi na biotický i abiotický stres a uplatňujících se například při senescenci (Eulgem and Somssich, 2007).

Další soubor transkripčních faktorů lze rozdělit podle závislosti na kyselině abscisové. ABA-dependentní dráhy zahrnují oblast ABRE, MYB a MYC elementy a transkripční faktory bZIP. Dráhy nezávislé na ABA se vyznačují přítomností oblasti DRE (dehydration responsive element) (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2005). Do oblasti ABRE se váží transkripční faktory ABF (ABRE-binding factor) z rodiny bZIP, pro DRE jsou to DREB faktory (DRE-binding factor). DREB patří do velké skupiny AP2/ERF-vázající proteiny (APETALA2/ethylene-responsive factor-binding protein). DREB1A, DREB2A, DREB2B a DREB1D hrají roli při solném stresu a dehydrataci, DREB1F pouze při solném stresu. Je zajímavé, že zvýšená tvorba DREB1A a DREB1B stimuluje toleranci, zatímco toleranci u DREB1C navozuje mutant *dreb1c* (Bartels and Sunkar, 2005).

5.4. Malé RNA

V poslední době se stále více bere na vědomí existence tzv. malých RNA. Jedná se o krátké úseky nukleových kyselin, které se mohou párovat s mRNA, čímž utvoří dvouvláknovou RNA. Dvouvláknová RNA je buňkou ihned zlikvidována. Malé RNA tedy slouží k rychlé degradaci mRNA, k zastavení translace určitého proteinu a také k modifikaci chromatinu vedoucí k umlčení genu. Uplatňují se během vývoje rostliny a také při stresu. Malé RNA se dělí na dvě skupiny: mikroRNA (miRNA) a krátké (short) interferující RNA (siRNA).

miRNA je dlouhá 20-22 nukleotidů a vzniká rozštěpením jednovláknové vlásenky pomocí komplexu obsahujícího RNázu III, neboli DCL1 proteinu (Dicer-like 1) (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). HEN1 metyltransferáza upevňuje na 3'-konci nově vzniklé dvouvláknové struktury metylovou skupinu (Yu *et al.*, 2005). V cytoplasmě pak dochází k odstranění jednoho vlákna na komplexu RISC (RNA-induced silencing complex) a miRNA je připravena k použití (Jones-Rhoades *et al.*, 2006).

siRNA jsou dlouhé 21-24 nukleotidů. Interferují s mRNA genu, od něhož jsou odvozené. Původně vypadají jako dsRNA, které vznikají RNA-dependentní RNA-polymerázou. Pomocí DCL2, 3, 4 se pak tvoří siRNA, která také reaguje s RISC komplexem (Waterhouse et al., 2001). siRNA se mimo jiné uplatňují právě při DNA metylacích a histonových modifikacích (Chan *et al.*, 2006).

5.5. Geny solného stresu

Výše zmíněné geny, proteiny a další molekuly byly většinou společné všem třem typům stresu. Přímo pro solný stres jsou charakteristické transportéry Na^+ a k nim přiléhající dráha SOS.

5.5.1. Transportéry Na^+

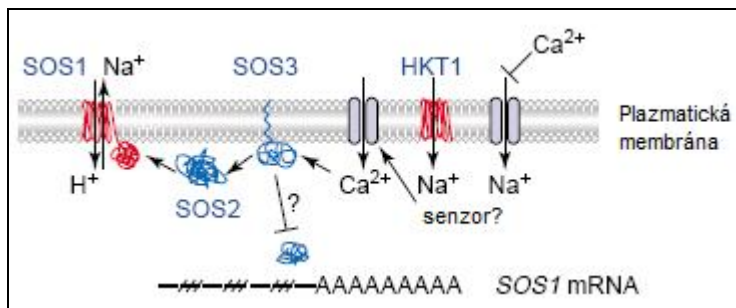
Při vniku sodné ionty využívají pasivní transport přes nespecifické kanály a přes vysokoafinní draselné kanály (HKT), které nerozlišují velikost iontů (Haro *et al.*, 2005). Během stresu se tyto kanály tvoří méně a spíše se selektují ionty, třeba pomocí K^+ -kanálů (K^+ -channels, KC1) a K^+ -transportérů (Bartels and Sunkar, 2005). Nespecifické kanály pro ionty mohou být regulované cyklickými nukleotidy nebo glutamátem (Leng et al., 2002; Demidchik et al., 2004). HKT se syntetizují ve větším množství během osmotického stresu (ne při solném) proto, aby do buňky pronikaly ionty, jež fungují jako osmolyty, a přitáhly za sebou vodu. HKT se člení na dvě skupiny. Skupina 1 zahrnuje Na^+ -kanály, skupina 2 Na^+/K^+ stejnosměrné přenašeče. U *Arabidopsis* se nacházejí pouze kanály první skupiny (Platten *et al.*, 2006). Je zajímavé, že mutace v genu *Athkt1;1* způsobuje náchylnost k solnému stresu akumulací Na^+ v prýtu, ale akumulace v kořeni je naopak potlačena (Munns and Tester, 2008).

Sekundárně aktivní přenašeče Na^+/H^+ (přenašeče využívající jako hnací sílu gradient protonů vytvořený aktivně, to jest za spotřeby energie, H^+ -pumpami štěpícími ATP nebo pyrofosfát) se dělí do dvou skupin. Přenašeče kódované *SOS1* jsou umístěné v plazmatické membráně a zajišťují odčerpávání Na^+ z buňky (Tester and Davenport, 2003). Druhou skupinou jsou NHX transportéry, které jsou zabudované v tonoplastu a jejich syntéza je podporována osmotickým stresem, hlavně s pomocí ABA. NHX slouží hlavně k uskladnění iontů do vakuoly a jako regulátory pH (Yokoi *et al.*, 2002). Během stresu se uplatňují i nespecifické kation/ H^+ -přenašeče (CHX). Spolu s těmito přenašeči vzrůstá také tvorba protonových pump H^+ -ATPáz a H^+ -PPáz (Munns, 2005).

5.5.2. SOS

Salt overly sensitive, neboli SOS, je označení pro soubor navzájem se ovlivňujících proteinů, jež hrají důležitou roli při signalizaci vyššího množství Na^+ a které v mutantní formě příslušných genů výrazně zvyšují náchylnost rostliny k salinitě.

SOS1 je regulováno SOS2, jež je zase řízeno SOS3. Gen *SOS3* kóduje calcineurin B-like protein (CBL), který je podobný calcineurinu B z kvasinek a funguje jako Ca^{2+} -dependentní proteinfosfatáza. Protein je přichycený na plazmatické membráně a je aktivován Ca^{2+} ionty. SOS3 aktivuje serin/treoninovou proteinkinázu (SOS2) tvorbou komplexu. Aktivní SOS2 fosforyluje SOS1 a podporuje expresi genu *SOS1*. *SOS1* dává vzniku Na^+/H^+ protisměrnému přenašeči (Zhu, 2002) umístěnému na membráně v kořeni a v parenchymatických buňkách okolo cévních svazků (Shi et al., 2002).



Obr. 4: SOS dráha. Senzor Na^+ zatím nebyl identifikován. Mohly by to být kanály pro Ca^{2+} nebo SOS3. Na^+ pronikají do buňky nescifickými kanály a HKT1 přenašeči. SOS3 váže Ca^{2+} a aktivuje SOS2. SOS2 spouští činnost SOS1 kanálů transportujících Na^+ pryč z buňky. (Upraveno podle Ward et al. (2003))

Pro toleranci k Na^+ je klíčová nadprodukce SOS1. SOS1 bývá syntetizováno asi po 10 hodinách u normálních rostlin i u mutantů, ale u mutantních rostlin se zvýšenou expresí vzniká proteinů mnohem více, a to vede k efektivnějšímu odstraňování Na^+ (Shi et al., 2002). Předpokládá se, že SOS3, který má na sobě vazebná místa pro vápenaté ionty, by mohl fungovat jako senzor Na^+ (Ishitani et al., 2000). Kromě těchto specifických funkcí může kináza SOS2 spouštět signální kaskády MAPK (Chinnusamy et al., 2004).

5.6. Geny osmotického stresu

Rozdíl mezi solným a osmotickým stresem je patrný hlavně na genové úrovni. V předchozích kapitolách již bylo uvedeno několik genů a proteinů charakteristických jen pro

osmotický stres. Během osmotického stresu dochází ke zvýšení tekutosti membrány a ke změnám ve složení fosfolipidů. Teoreticky by na tom mohly mít podíl fosfolipázy (hlavně fosfolipáza C) produkující druhé posly inositol-1,4,5-trisfosfát (IP3), diacylglycerol (DAG) a kyselinu fosfatidovou (Bartels and Sunkar, 2005).

Jakýsi přechod mezi osmotickým a solným stresem by mohl hrát vakuolární Na^+/H^+ transportér, jehož syntéza může být stimulována ABA (Shi and Zhu, 2002).

5.7. Geny vodního deficitu

Vodní stres je velice rozsáhlá kapitola týkající se nejrůznějších situací. V této práci se jedná spíše o okrajovou záležitost. Typické projevy stresu jsou zmíněny výše.

Stres z vodního deficitu se v mnohém podobá osmotickému stresu. Asi nejznámější součástí rostlinné odpovědi je fytohormon ABA, jenž se účastní mimo jiné zavírání průduchů. Během vodního stresu dochází k omezení růstu buněk. Růst a dělení souvisí s cyklinem a cyklin-dependentními kinázami (CDK), jejichž syntéza je omezená během sucha. Zároveň dochází při nedostatku vody k produkci inhibitorů CDK.

Stimulace růstu kořenů však nemusí být v prostředí chudém na vodu postížena. Tento jev je patrný u tolerantnějších druhů, jimž se v apikální části kořene nadále syntetizují expanzíny. Při rehydrataci se pak expanzíny produkují i u ostatních druhů (Bartels and Sunkar, 2005). Při rehydrataci se také zvyšuje množství CYP707A (z rodiny oxigenáz cytochromu P450), které degraduje kyselinu abscisovou (Kushiro *et al.*, 2004).

6. Závěr

Výzkum solného, osmotického a vodního stresu za posledních dvacet let hodně pokročil. Již dnes by se mohlo na pole uvést několik tolerantních rostlin a zachránit tak část světa před hladomorem. Ale tak velký krok se by se neměl uspěchat. Je třeba prověřit všechna pro a proti. A také je aktuální vypořádat se s otázkou ohledně výsadby geneticky modifikovaných rostlin.

Problémem, ač se to nezdá, je samotná tvorba transgenních rostlin. Mnoho laboratoří už aplikuje poznatky z *Arabidopsis thaliana* na kulturní plodiny, ačkoliv výzkum modelové rostliny ještě zdaleka není u konce, nehledě na to, že samotná *Arabidopsis* má jistá omezení (např. množství biomasy negativně koreluje s obsahem sodíku v prýtu (Essah *et al.*, 2003). Vytvořit tolerantní rostlinu také není tak jednoduché, jak by se na první pohled mohlo zdát. Stresové odpovědi jsou komplexní záležitostí a většinou nestačí upravit jen jeden gen. Kromě

toho výzkum probíhá převážně *in vitro* a za umělých podmínek. Jak ale bude rostlina reagovat na nepříznivé lokální podmínky v různých částech světa, to zůstává víceméně záhadou.

Děkuji školitelce Doc. RNDr. Fatimě Cvrčkové, Dr. rer. nat. za pomoc a své rodině za podporu.

7. Použitá literatura

- Apse, M.P., and Blumwald, E. (2007).** Na⁺ transport in plants. *Febs Letters* 581, 2247-2254.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., and Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285, 1256-1258.
- Bartels, D., and Sunkar, R. (2005).** Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24, 23-58.
- Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F., and Giraudat, J. (2000). Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12, 1103-1115.
- Bianchi, G., Gamba, A., Murelli, C., Salamini, F., and Bartels, D. (1991). NOVEL CARBOHYDRATE METABOLISM IN THE RESURRECTION PLANT *CRATEROSTIGMA PLANTAGINEUM*. *Plant Journal* 1, 355-359.
- Buchanan, B., Gruissem, W., and Jones, R. (2000).** *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists).
- Chan, S.W.L., Henderson, I.R., Zhang, X.Y., Shah, G., Chien, J.S.C., and Jacobsen, S.E. (2006). RNAi, DRD1, and histone methylation actively target developmentally important non-CG DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plos Genetics* 2, 791-797.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., and Zhu, J.K. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 55, 225-236.
- Cramer, G.R. (2002). Response of abscisic acid mutants of *Arabidopsis* to salinity. *Functional Plant Biology* 29, 561-567.
- Davenport, R., James, R.A., Zakrisson-Plogander, A., Tester, M., and Munns, R. (2005). Control of sodium transport in durum wheat. *Plant Physiology* 137, 807-818.
- Davies, W.J., Kudoyarova, G., and Hartung, W. (2005). Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation* 24, 285-295.
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., and Mittler, R. (2005). The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139, 847-856.
- Demidchik, V., Essah, P.A., and Tester, M. (2004). Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of *Arabidopsis* root cells. *Planta* 219, 167-175.
- Essah, P.A., Davenport, R., and Tester, M. (2003). Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133, 307-318.
- Eulgem, T., and Somssich, I.E. (2007).** Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 366-371.

- Eun, S.O., and Lee, Y.S. (1997). Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid. *Plant Physiology* 115, 1491-1498.
- FAO. (2005). <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.
- Flowers, T.J., and Colmer, T.D. (2008).** Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179, 945-963.
- Flowers, T.J., Troke, P.F., and Yeo, A.R. (1977).** MECHANISM OF SALT TOLERANCE IN HALOPHYTES. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 28, 89-121.
- Gilliham, M., and Tester, M. (2005). The regulation of anion loading to the maize root xylem. *Plant Physiology* 137, 819-828.
- Greenway, H., and Munns, R. (1980).** MECHANISMS OF SALT TOLERANCE IN NON-HALOPHYTES. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 31, 149-190.
- Halfter, U., Ishitani, M., and Zhu, J.K. (2000). The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3735-3740.
- Haro, R., Banuelos, M.A., Senn, M.A.E., Barrero-Gil, J., and Rodriguez-Navarro, A. (2005). HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiology* 139, 1495-1506.
- Ishitani, M., Liu, J.P., Halfter, U., Kim, C.S., Shi, W.M., and Zhu, J.K. (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* 12, 1667-1677.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57, 19-53.
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J., and Harter, K. (2007). The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant Journal* 50, 347-363.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., and Nambara, E. (2004). The *Arabidopsis* cytochrome P450CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *Embo Journal* 23, 1647-1656.
- Leng, Q., Mercier, R.W., Hua, B.G., Fromm, H., and Berkowitz, G.A. (2002). Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiology* 128, 400-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. (2004).** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490-498.
- Munns, R. (2002).** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment* 25, 239-250.
- Munns, R. (2005).** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167, 645-663.
- Munns, R., and Tester, M. (2008).** Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651-681.
- Nakagami, H., Pitzschke, A., and Hirt, H. (2005).** Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci* 10, 339-346.
- Park, H.Y., Seok, H.Y., Park, B.K., Kim, S.H., Goh, C.H., Lee, B., Lee, C.H., and Moon, Y.H. (2008). Overexpression of *Arabidopsis* ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375, 80-85.
- Platten, J.D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R.J., Fairbairn, D.J., Horie, T., Leigh, R.A., Lin, H.X., Luan, S., Maser, P., Pantoja, O., Rodriguez-Navarro, A., Schachtman,

- D.P., Schroeder, J.I., Sentenac, H., Uozumi, N., Very, A.A., Zhu, J.K., Dennis, E.S., and Tester, M. (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in Plant Science* 11, 372-374.
- Potocky, M., Jones, M.A., Bezvoda, R., Smirnoff, N., and Zarsky, V. (2007). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytologist* 174, 742-751.
- Rengasamy, P., Chittleborough, D., and Helyar, K. (2003). Root-zone constraints and plant-based solutions for dryland salinity. *Plant and Soil* 257, 249-260.
- Ředitelství silnic a dálnic ČR (2008). <http://www.rsd.cz/doc/Udrzba-komunikaci/Zimni-udrzba/zima-20045-patrila-poctem-zasahovych-udrzbovych-dni-k-nadprumernym>.
- Sakamoto, H., Maruyama, K., Sakuma, Y., Meshi, T., Iwabuchi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiology* 136, 2734-2746.
- Shi, H.Z., and Zhu, J.K. (2002). Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology* 50, 543-550.
- Shi, H.Z., Quintero, F.J., Pardo, J.M., and Zhu, J.K. (2002). The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* 14, 465-477.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. In *International Conference on Integrated Approaches to Sustain and Improve Plant Production under Drought Stress* (Rome, ITALY: Oxford Univ Press), pp. 221-227.
- Smith-Espinoza, C.J., Richter, A., Salamini, F., and Bartels, D. (2003). Dissecting the response to dehydration and salt (NaCl) in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell and Environment* 26, 1307-1315.
- Somerville, C., and Dangl, L. (2000). Genomics - Plant biology in 2010. *Science* 290, 2077-2078.
- Tester, M., and Davenport, R. (2003).** Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91, 503-527.
- Thiyagarajah, M., Fry, S.C., and Yeo, A.R. (1996). *In vitro* salt tolerance of cell wall enzymes from halophytes and glycophytes. *Journal of Experimental Botany* 47, 1717-1724.
- Wang, Y.N., Wang, T., Li, K.X., and Li, X. (2008a). Genetic analysis of involvement of ETR1 in plant response to salt and osmotic stress. *Plant Growth Regulation* 54, 261-269.
- Wang, Y.N., Zhang, W.S., Li, K.X., Sun, F.F., Han, C.K., Wang, Y., and Li, X. (2008b). Salt-induced plasticity of root hair development is caused by ion disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* 121, 87-96.
- Ward, J.M., Hirschi, K.D., and Sze, H. (2003).** Plants pass the salt. *Trends in Plant Science* 8, 200-201.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B., and Finnegan, E.J. (2001). Role of short RNAs in gene silencing. *Trends in Plant Science* 6, 297-301.
- Weston, D.J., Gunter, L.E., Rogers, A., and Wullschleger, S.D. (2008). Connecting genes, coexpression modules, and molecular signatures to environmental stress phenotypes in plants. *Bmc Systems Biology* 2, 17.
- Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., Ruiz, M.T., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., and Pardo, J.M. (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant Journal* 30, 529-539.

- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J.R., and Shinozaki, K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 43, 1473-1483.
- Yu, B., Yang, Z.Y., Li, J.J., Minakhina, S., Yang, M.C., Padgett, R.W., Steward, R., and Chen, X.M. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307, 932-935.
- Zhang, J.Z., Creelman, R.A., and Zhu, J.K. (2004). From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiology* 135, 615-621.
- Zhu, J.K. (2002).** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53, 247-273.

* *tučně zvýrazněné články jsou shrnující (review)*