

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie rostlin



In vitro selekce řepky ozimé se zvýšenou
tolerancí vůči mrazu

Anna Janská

Diplomová práce
Praha 2006

Diplomovou práci jsem vypracovala na Výzkumném ústavu rostlinné výroby
Praha-Ruzyně v letech 2003 – 2006.

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Sylva Zelenková, CSc.

Konzultanti diplomové práce: Ing. Miroslav Klíma, RNDr. Ilja Prášil, CSc.,
Ing. Miroslava Vyvadilová, CSc.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně na základě experimentů a s použitím citované literatury a že nebyla předložena jako diplomová práce na jiné vysoké škole. Souhlasím s půjčováním práce ke studijním účelům.

Praha, duben 2006


Anna Janská

Velmi děkuji své školitelce, RNDr. Sylvě Zelenkové, CSc., za zodpovědné a přitom přátelské vedení diplomové práce, užitečné rady, připomínky a nesčetné revize textu. Mé poděkování patří taktéž všem konzultantům, Ing. Miroslavu Klímovi, RNDr. Iljovi T. Prášilovi, CSc. a Ing. Miroslavě Vyvadilové, CSc., za spousty milých a přínosných konzultací i zaučení do metod, jichž jsem využila v experimentální části diplomové práce. Ing. Miroslavu Klímovi děkuji také za fotodokumentaci. Zahradníkům, Jaroslavu Fajmanovi a Jaroslavu Šramkovi, děkuji za péči věnovanou testovaným rostlinám. Bc. Petře Bartošové a Václavě Střeskové patří můj dík za pomoc při práci v laboratoři i za příjemnou pracovní atmosféru, jenž mi spolu s ostatními pracovníky poskytly. Mgr. Kláře Kosové a Mgr. Pavlu Vítámvásovi patří mé poděkování za prostor, který mně mnohokrát věnovali ve své laboratoři. Své rodině, Martinovi a Martině děkuji za psychickou podporu a všeobecnou pomoc.

Diplomová práce byla vypracována v rámci grantů Národní agentury pro zemědělský výzkum č. QE0052 a 1G46061.

Obsah

1. Seznam použitých zkratek	8
2. Úvod	10
3. Přehled literatury	12
3.1. Vliv chladu a mrazu na rostliny	12
3.1.1. Úvod	12
3.1.2. Vliv nízkých teplot na rozšíření rostlin na Zemi	15
3.1.3. Chladový stres	17
3.1.3.1. Úvod	17
3.1.3.2. Poškození chladem	18
3.1.3.2.1. Primární poškození	18
3.1.3.2.2. Sekundární poškození	20
3.1.3.2.3. Symptomy chladového poškození	20
3.1.3.3. Fyziologické a biochemické efekty chladového stresu	21
3.1.4. Mrazový stres	23
3.1.4.1. Úvod	23
3.1.4.2. Proces mrznutí	23
3.1.4.3. Nukleace ledu	24
3.1.4.4. Mechanismy mrazové odolnosti	26
3.1.4.4.1. Mechanismy mrazové avoidance	26
3.1.4.4.2. Mechanismy mrazové tolerance	27
3.1.4.5. Reakce buněk na tání a opakování mrznutí	28
3.1.5. Aklimatizace rostlin k nízkým teplotám	29
3.1.5.1. Obecné děje nastávající při otužování	29
3.1.5.2. Signální dráhy v buňkách ovlivněných nízkou teplotou	31
3.1.5.2.1. Reakce vyvolané pomalým poklesem teploty	31
3.1.5.2.2. Reakce vyvolané rychlým poklesem teploty	34
3.1.5.2.3. Exprese chladem regulovaných genů	36
3.1.6. Adaptace rostlin k nízkým teplotám	38
3.2. Kompatibilní soluty	40
3.2.1. Kompartimentace a transport kompatibilních solutů	41
3.2.2. Manipulace s biosyntetickými drahami kompatibilních solutů	41

3.2.3. Prolin.....	43
3.2.3.1. Syntéza a degradace prolinu.....	43
3.2.3.2. Regulace syntézy a degradace prolinu	46
3.2.3.2.1. Regulace exprese genů biosyntézy a katabolismu prolinu.....	47
3.2.3.2.2. Syntéza prolinu ve vztahu k metabolismu uhlíku a dusíku.....	49
3.2.3.2.3. Regulace dostupnosti prekurzorů biosyntézy prolinu.....	50
3.2.3.2.4. Vliv polyaminů na syntézu prolinu.....	51
3.2.3.2.5. Reciproční regulace P5CS a PDH.....	51
3.2.3.2.6. Prolin ve vztahu ke kvetení	52
3.2.3.2.7. Prolin jako signální molekula.....	52
3.2.3.3. Funkce prolinu v rostlinách.....	54
3.2.3.3.1. Osmoprotekce	54
3.2.3.3.2. Ochrana membrán	54
3.2.3.3.3. Stabilizace proteinů.....	54
3.2.3.3.4. Ochrana před oxidačním poškozením.....	55
3.2.3.3.5. Udržování pH	55
3.2.3.3.6. Morfogeneze	56
3.2.3.3.7. Zdroj prvků a energie	56
3.2.3.4. Akumulace prolinu jako reakce na nepříznivé podmínky.....	57
3.2.3.4.1. Nedostatek vody	57
3.2.3.4.2. Zasolení	57
3.2.3.4.3. Teplota.....	58
3.2.3.4.4. Těžké kovy	59
3.2.3.5. Kompartimentace a transport prolinu.....	60
3.2.3.6. Využití <i>trans</i> -4-hydroxy-L-prolinu k selekci rostlin s vyšší akumulací volného prolinu	61
3.3. Řepka olejka v České republice	63
3.3.1. Mikrosporové kultury.....	64
4. Materiál a metody	69
4.1. Materiál	69
4.2. Metody	70
4.2.1. Mikrosporové kultury.....	70
4.2.2. Stanovení obsahu prolinu v listech	74

4.2.3. Testy mrazové odolnosti	75
4.2.4. Sušina	76
4.2.5. Statistické zhodnocení výsledků	76
5. Výsledky	77
5.1. Selekcí regenerantů ozimé řepky odolných vůči hydroxyprolinu.....	77
5.2. Obsah prolinu v listech a stupeň mrazuvzdornosti dihaploidních regenerantů	82
5.3. Obsah prolinu v listech a % suché hmotnosti listů haploidních regenerantů v podmírkách <i>in vitro</i>	94
5.4. Korelace mezi obsahem prolinu v listech a stupněm mrazové odolnosti dihaploidních regenerantů	107
6. Diskuse.....	108
6.1. <i>In vitro</i> selekce na mrazuvzdornost	108
6.2. Stanovení vhodné koncentrace hydroxyprolinu pro selekci <i>in vitro</i>	110
6.3. Doba aklimatizace dihaploidních rostlin	110
6.4. Obsah prolinu a mrazuvzdornost	111
6.5. Vztah mezi rezistencí k hydroxyprolinu a obsahem prolinu v rostlině	114
6.6. Obsah prolinu a suchá hmotnost <i>in vitro</i> rostlin	115
6.7. Vztah mezi sušinou a hladinou prolinu.....	116
6.8. Korelace mezi akumulací prolinu a odolností vůči nízkým teplotám	117
6.9. Využití vyselektovaných dihaploidních rostlin.....	117
7. Souhrn	118
8. Abstract.....	120
9. Seznam citované literatury	122

1. Seznam použitých zkratek

- ABA (*abscisic acid*) – kyselina abscisová
- APX – askorbátperoxidasa
- AsA – askorbát
- ATP – adenosintrifosfát
- BA (6-BAP) – N⁶-benzyladenin (N⁶-benzylaminopurin)
- BADH – betainaldehyddehydrogenasa
- CAT – katalasa
- CDH – cholindehydrogenasa
- CDPKs (*calcium-dependent protein kinases*) – Ca²⁺-dependentní proteinkinasy
- CMO – cholinmonooxygenasa
- COD – cholinoxidasa
- CORs (*cold-regulated proteins*) – chladem regulované bílkoviny
- DAG – diacylglycerol
- DHA – dehydroaskorbát
- DMSO – dimethylsulfoxid
- DW (*dry weight*) – suchá hmotnost
- EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
- GDH – glutamátdehydrogenasa
- γ-GK – γ-glutamylkinasa
- GPX - glutathionperoxidasa
- GR – glutathionreduktasa
- GSA – glutamát-γ-semialdehyd
- GSH – redukovaný glutathion
- GSL – glukosinoláty
- GSSG – oxidovaný glutathion
- GST – glutathion-S-transferasa
- hGSH – redukovaný homoglutathion
- hGSSG – oxidovaný homoglutathion
- HSPs (*heat-shock proteins*) – proteiny teplotního šoku
- HTE (*high-temperature exotherm*) – vysokoteplotní exotherma
- Hyp-rezistentní rostliny – rostliny rezistentní vůči hydroxyprolinu
- IAA – kyselina indol-3-octová
- IP₃ – inositol-1,4,5-trisfosfát
- I_t – index poškození
- LT₅₀ – teplota při 50% mrazovém poškození
- LTE (*low-temperature exotherm*) – nízkoteplotní exotherma
- MAP-kinasa (*mitogen activated protein kinase*) – proteinkinasa aktivovaná mitogeny
- NAA – kyselina 1-naftyloctová
- NAD⁺ – oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid
- NADP⁺ – oxidovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
- NADPH – redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
- OAT – ornithinaminotransferasa
- P5C – Δ¹-pyrrolin-5-karboxylát
- P5CR – P5C reduktasa

- P5CS – P5C synthetasa
- P5CDH – P5C dehydrogenasa
- PDH – prolindehydrogenasa
- PR proteiny (*pathogen-related proteins*) – proteiny indukované patogeny
- PSII (*photosystem II*) – fotosystém II
- RIR (*relative injury rate*) – parametr popisující rychlosť změny s ohľadom na teplotu
- ROS (*reactive oxygen species*) – (re)aktivné formy kyslíku
- R_t – relativná vodivost
- Rubisco – ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
- SAMK (*stress activated MAP kinase*) – stresem aktivovaná MAP-kinasa
- SMCO – S-methylcysteinsulfoxid
- SOD – superoxiddismutasa

2. Úvod

Většina rostlin se během svého životního cyklu setká s jedním či více stresovými faktory, které v nich vyvolají stresovou reakci. Rozšíření i pěstování rostlin na „modré“ planetě ovlivňují zejména dva z nich – nedostatek vody a teplota. Vegetace mírného pásu se v průběhu evoluce adaptovala na sezónní teplotní změny a je tedy schopna snášet každoroční pokles teplot pod bod mrazu. Na takové podmínky se rostliny připravují již na podzim pomocí procesu zvaného otužování neboli aklimatizace. Ten zahrnuje anatomické, fyziologické a biochemické změny, jakož i změny v genové expresi. Protože se však člověk rozhodl pěstovat v chladnějších oblastech i plodiny, které na takové podmínky adaptovány nejsou, teploty klesající v zimě hluboko pod bod mrazu se stávají často faktorem limitujícím. Pro zemědělství je proto důležité pěstovat takové odrůdy plodin, které jsou schopné těmto nepříznivým podmínkám odolávat.

Zvyšování mrazové odolnosti je jedním z hlavních cílů šlechtění ozimých plodin a výjimku netvoří ani naše nejvýznamnější olejnina – řepka olejka. Řepkový olej je nejen významnou surovinou pro potravinářský a chemický průmysl, ale v posledních letech se jeho význam rozšiřuje i na pole zdrojů obnovitelné energie, v tomto případě ekologického paliva – bionafty. Vedle klasického šlechtění se k tvorbě nových odrůd využívají rovněž moderní metody experimentální biologie rostlin, které poskytují nástroje ke šlechtění plodin nejen se zvýšenou tolerancí k mrazu a dalším abiotickým faktorům, ale rovněž k faktorům biotickým (škůdci, bakterie, viry...) a herbicidům. V neposlední řadě je kladen důraz na kvalitu oleje – v závislosti na jeho dalším využití.

Za účelem vytvoření nových odrůd ozimé řepky přizpůsobených našim půdním a klimatickým podmínkám vzniklo sdružení šlechtitelských organizací a výzkumných pracovišť „Česká řepka“, jehož členem je také Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně. Na zmíněné pracoviště jsou každoročně dodávány od ostatních členů sdružení F1 hybridy ozimé řepky jako výchozí materiál pro indukci embryogeneze a tvorbu homozygotních dihaploidních linií. Zároveň tato novošlechtění představují i experimentální materiál – např. pro studium možnosti zvyšování mrazové odolnosti.

Jednou z cest ke zvýšení této vlastnosti je i manipulace s hladinami ochranných ve vodě vysoce rozpustných látek - kompatibilních solutů. Kromě molekulárně biologických metod, které umožňují vnést do rostliny přímo geny kódující různé enzymy biosyntézy prolinu či jiných kompatibilních solutů, je možné aplikovat ke

tkáňovým kulturám analog prolinu (trans-4-hydroxy-L-prolin) pro pozitivní selekci linií s vyšší produkcí přirozené aminokyseliny, L-prolinu. K tomuto účelu lze využít metodu pylové embryogeneze, pomocí níž lze získat haploidní regeneranty. Po zdvojení chromosomů získané dihaploidní linie jsou cenným materiélem pro přípravu nových odrůd.

Záměrem předložené diplomové práce bylo zjistit, zda je možné metodou *in vitro* selekce v mikrosporových kulturách prostřednictvím hydroxyprolinu získat rostliny ozimé řepky se zvýšenou tolerancí vůči mrazu.

Sledovány byly tyto dílčí cíle:

- Vyselektovat regeneranty ozimé řepky rezistentní vůči hydroxyprolinu (Hyp-rezistentní regeneranty) pomocí pylové embryogeneze.
- Stanovit obsah prolinu v listech a stupeň mrazuvzdornosti Hyp-rezistentních regenerantů a porovnat hodnoty s hodnotami kontrolních rostlin (*in vitro* regeneranty kultivované v médiu bez přídavku hydroxyprolinu).
- Porovnat obsah prolinu v listech regenerovaných rostlin se stupněm jejich mrazuvzdornosti.

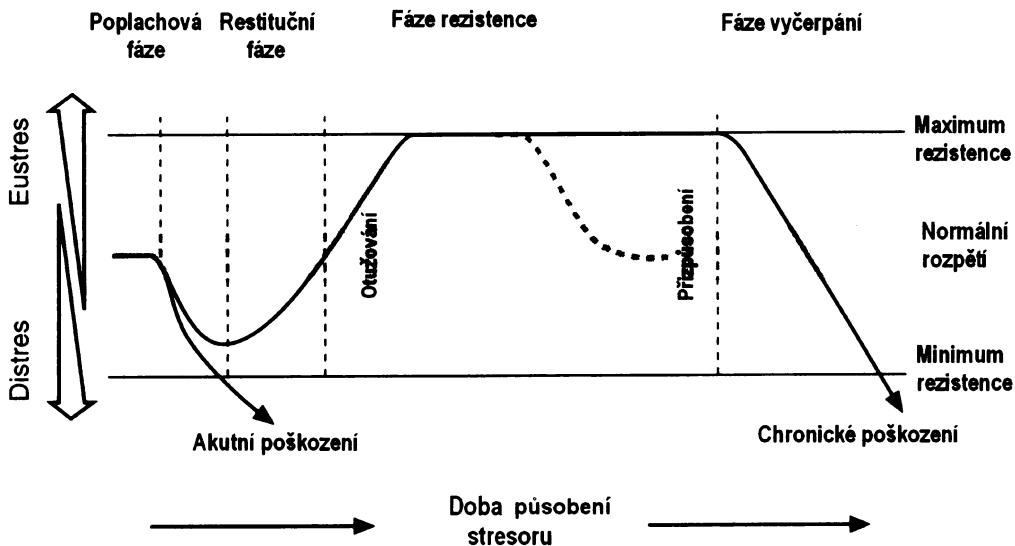
3. Přehled literatury

3.1. Vliv chladu a mrazu na rostliny

3.1.1. Úvod

Rostliny obecně řadíme mezi poikilothermní organismy, které nemohou regulovat svoji vnitřní teplotu. Rostlina se nemůže pohybovat z místa na místo, a tak se vyhnout nepříznivým podmínkám. Výsledkem toho je, že na rostlinu nepůsobí pouze teplota, ale i řada dalších nepříznivých faktorů vnějšího prostředí. Tyto stresory mohou být různé povahy – buď fyzikální, chemické, mechanické nebo biologické. Působení stresoru v rostlině vyvolá zvláštní stav, tzv. stres. Tento složitý dynamický komplex reakcí je charakterizován jako nespecifická odpověď organismu na určitý typ stresoru, případně jejich kombinaci (Gloser a Prášil 1998). Takový stav rostlina může buď po určitou dobu tolerovat nebo se mu vyhnout, často ovšem kombinuje obě dvě možnosti. Druhá možnost představuje pasivní způsob ochrany, který zahrnuje například vhodně načasované životní cykly nebo ochranné struktury jako kutikula, buněčná stěna apod. Tolerance naopak aktivně omezuje působení stresorů, avšak až po proniknutí plasmatickou membránou. Tím je spuštěna stresová reakce. Její průběh závisí především na délce působení stresového faktoru, adaptačních schopnostech rostliny a na interakcích s dalšími stresovými faktory (Tamás 1999).

Stresovou reakci neboli adaptační syndrom lze rozčlenit do čtyř fází, a to na fázi poplachovou, restituční, rezistenční a fázi vyčerpání (obr. 3.1). Poplachová fáze nastane ihned po interakci rostliny s příslušným stresorem, vede k narušení homeostáze rostliny a dočasnému snížení její odolnosti. Rostlina se snaží s tímto nepříznivým faktorem různými způsoby vyrovnat, což představuje fázi restituční. Jestliže je pokračující vystavení stresoru kompatibilní s adaptací, následuje fáze nejvyšší odolnosti, tedy fáze rezistence. Tento stav ovšem nemůže trvat donekonečna a pokud není působení stresoru odstraněno včas, rostlina se dostane do fáze vyčerpání a záhy umírá. Popsaný průběh stresové reakce je však velmi idealizovaný. Stresové faktory působící na rostliny jsou velmi rozmanité a obvykle působí současně. Mechanismus jejich působení je dosti složitý, proto je obecný adaptační syndrom často zpochybňován. Někteří autoři uvažují i o tzv. lokální stresové reakci. Tím je myšleno, že stres je primárně vyvolán v místě působení stresoru. Druhotně pak vyvolá stres v ostatních orgánech, tedy rozšíří se po celé rostlině a spustí obecný adaptační syndrom (McKersie a Leshem 1994).



Obr. 3.1. Ideální průběh stresové reakce. Upraveno podle Larcher 2003.

Při úvahách o tom, jak se rostliny vyrovnávají se stresem, je důležité rozlišovat mezi aklimatizací a adaptací na působení příslušného stresoru. Aklimatizace představuje nedědičné změny v rámci jednoho genotypu, zajištěné pouze fenotypovou plasticitou. Je to stav přechodný, indukovatelný a podléhá genovému řízení. Naopak adaptace jsou genetické změny, které organismy získaly v průběhu evoluce. Protože rostliny nemají možnost „utéci před stresory do příznivějších krajin“, představuje u nich aklimatizace velmi důležitý proces dočasné úpravy struktur a metabolických cest podle aktuálního stavu vnějších podmínek. Navíc jim umožňuje rychlou opravu poškozených částí (Gloser a Prášil 1998).

Stres nemusí být vždy škodlivý. Někteří autoři (např. McKersie a Leshem 1994) rozlišují dva typy stresu. První je tzv. distres, tedy stres z nedostatku. Existuje ovšem i tzv. eustres, který je příznivý, užitečný a v některých případech dokonce nezbytný. Vzpomeňme si například na některé druhy ovocných stromů, které musí projít chladovým stresem, aby došlo ke kvetení a k zahájení diferenciace jejich plodů.

V přírodě se běžně setkáváme s cyklickými a acyklickými změnami podmínek prostředí. Cyklické změny jsou charakteristické pro mírný pás. K určení ročního období v těchto oblastech používají vytrvalé bylinky délku dne a teplotu. Tyto rostliny mají fotoperiodický signální systém, který odhaluje přicházející zimu a iniciuje dormanci. Ta je důležitá pro přežití nepříznivé nízké teploty a další vývoj rostliny. Acyklická období

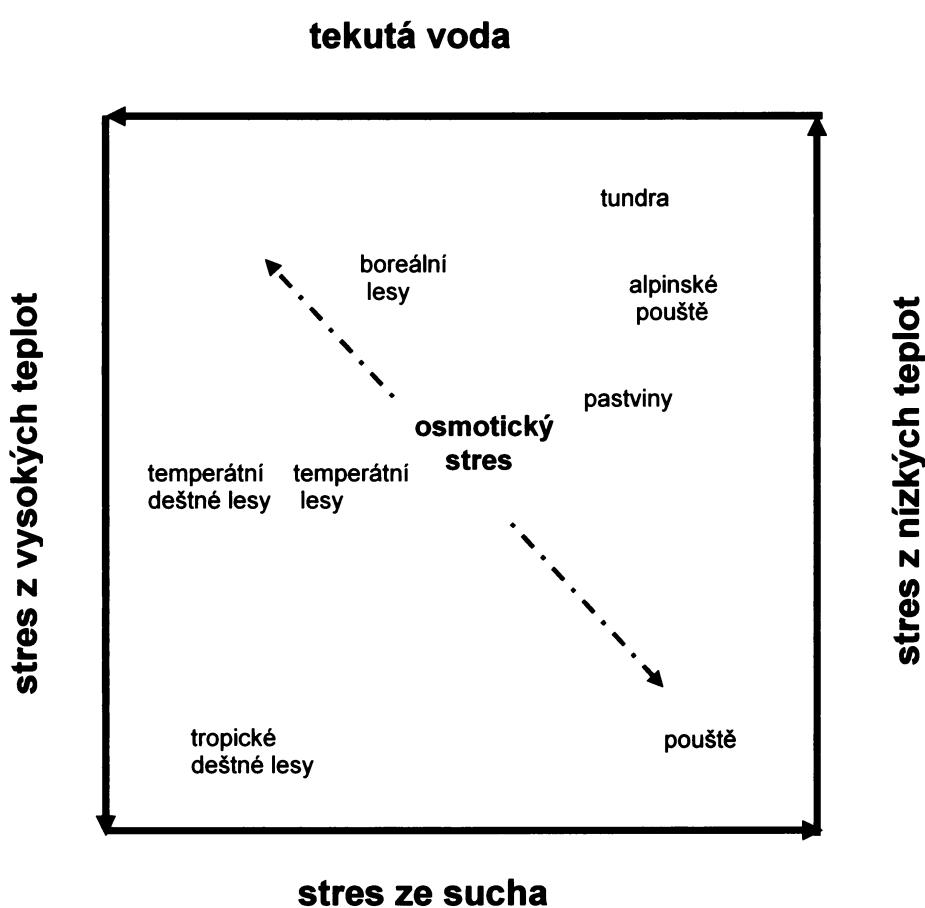
nebo mimořádné klimatické změny se objevují příležitostně a nepravidelně. Jejich vlivem může dojít k vymření populace nebo dokonce druhu (Guy 1999).

Většina studií fyziologie stresu se zaměřuje na působení jednotlivých stresových faktorů. V přírodě ovšem mezi nimi velmi často dochází k interakcím, které mohou různě modifikovat průběh stresové reakce. Zajímavá je také skutečnost, že některé metabolické změny vyvolané po působení stresoru mohou být společné více různým stresům. Mezi ně patří zejména tvorba stresových proteinů, a to jak konstitutivních (např. ubikvitin) tak indukovatelných určitým stresorem (např. specifické chaperony a proteasy). Dalším společným znakem je tvorba aktivních forem kyslíku (superoxid, peroxid vodíku, singletový kyslík a hydroxylový radikál). Také se zvyšuje produkce některých fytohormonů (kyselina abscisová, jasmonát, methyljasmonát a polyaminy). Zároveň dochází ke zvyšování hladiny osmoregulačních sloučenin (cukry, polyalkoholy a jednoduché dusíkaté látky) (McKersie a Leshem 1994, Kadlecová 1999, Solecka a Kacperska 2003, Tasgín *et al.* 2003, Parvanova *et al.* 2004, Zuther *et al.* 2004).

Pokusme se nyní nahlédnout do dějů, které probíhají v rostlinách, když teplota jejich okolí trvale klesá a do možných mechanismů, které jim umožňují tyto nepříznivé podmínky překonat.

3.1.2. Vliv nízkých teplot na rozšíření rostlin na Zemi

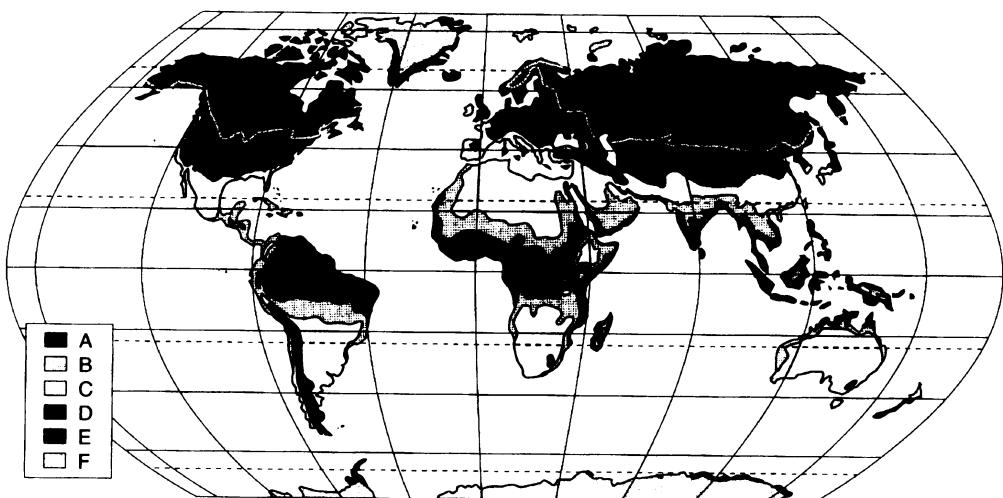
Rozšíření rostlinných druhů je limitováno především dvěma abiotickými faktory - přístupností vody a teplotou. Tyto dva faktory prostředí většinou působí společně a charakterizují klima i rozšíření rostlin na naší planetě (obr. 3.2). Biochemické i růstové procesy rostlin mají určité teplotní optimum. Toho se však rostlinám mnohdy nedostává, setkávají se spíše s podmínkami více či méně suboptimálními a nízké teploty jsou tak jedním z nejdůležitějších faktorů, které omezují růst rostlin (Guy 1999, Juntilla a Robberecht 1999).



Obr. 3.2. Vztah teploty a vodního stresu. Upraveno podle Guy 1999.

Teploty mohou klesat pod 0°C epizodicky, periodicky anebo takových hodnot mohou nabývat po celý rok, podle zeměpisné šířky. „Zima je nejhorší a nejrozšířenější nepřítel života na Zemi“ (Černý - ústní sdělení). Polární oblasti spolu s hlubokými oceány, kde klesá teplota niže než 2°C, zaujmají až 80% povrchu planety Země. Pouze

na jedné třetině zemského povrchu se nevyskytuje led. Území s minimální teplotou pod -20°C zahrnují přibližně 42% (Juntilla a Robberecht 1999). Naopak jen na 6,6% celkové kontinentální plochy neklesnou teploty pod $+15^{\circ}\text{C}$. To se týká povodí Amazonky, Konga a části jihovýchodní Asie (obr. 3.3) (Pokorná 2002).



Obr. 3.3. Výskyt nízkých teplot na Zemi.

- A – roční minimální teploty nad $+5^{\circ}\text{C}$; chladově citlivé tropické rostliny
- B – roční minimální teploty nad 0°C ; extrémně mrazově citlivé rostliny
- C – epizodické mrazy s teplotami až k -10°C ; rostliny využívající strategie přechlazení a snížení bodu mrznutí
- D – oblasti s chladnou zimou a průměrnými ročními minimálními teplotami mezi -10 a -40°C (bílé linky jsou isothermy s minimální teplotou -30°C); rostliny s limitovanou mrazovou tolerancí a stromy se dřevem schopným hlubokého přechlazení
- E – průměrné roční minimální teploty pod -40°C ; celkově mrazově tolerantní rostliny
- F – polární led

Upraveno podle Larcher 2003.

Dnes na naší planetě roste přibližně 250 000 druhů cévnatých rostlin, z nichž 40% obývá tropické deštné lesy. Tento údaj ukazuje, že množství druhů klesá se vzrostající nadmořskou výškou a zeměpisnou šírkou. Ačkoli je množství druhů schopných přežít periodické mrznutí stále malé, některé rostlinné druhy jsou dobře adaptovány k přežití měnících se klimatických podmínek. Poškozeny bývají, jen když se teplota nebo srážky odchylí od dlouhodobého průměru. Jsou známy druhy stromů, které dokáží přežít teploty blízké teplotě tekutého dusíku (-196°C), ačkoli se s takovou teplotou jen stěží někdy setkaly (Nilsen a Orcutt 1996, Juntilla a Robberecht 1999).

3.1.3. Chladový stres

3.1.3.1. Úvod

Chladový stres postihuje zejména rostliny původem ze subtropických nebo tropických oblastí světa. Teplota, vyvolávající chladový stres se totiž pohybuje od 0°C do +15 až +20°C. Nezáleží ale pouze na teplotě, důležitá je také doba, po kterou je rostlina příslušné teplotě vystavena.

Rostliny mají vyvinuty různé strategie, jak nejen přežívat, ale i růst a rozmnožovat se za podmínek běžných v jejich původním prostředí. Když se však dostanou, často i prostřednictvím člověka, do oblastí „nových“, pro ně méně vhodných nebo extrémní teploty překročí únosné meze, nastává problém, se kterým se rostliny musí nějak vyrovnat. Ty, kterým se to povede, nazýváme chladuvzdorné. Takové rostliny lze dále rozdělit na chladově tolerantní (neboli chladově rezistentní) a chladově necitlivé. U chladově tolerantních rostlin vyvolají sice nízké teploty primární poškození, nicméně jsou schopny odolávat sekundárnímu poškození, které vede k charakteristickým symptomům, nebo jej alespoň po určité době tolerovat. U chladově necitlivých rostlin primární poškození vůbec nenastane při teplotě nad 0°C. Naopak rostliny citlivé na chlad (neboli chladově sensitivní) jsou poškozeny nebo dokonce hynou při teplotách od 0°C do +15 až +20°C (McKersie a Leshem 1994, Nilsen a Orcutt 1996).

Citlivost rostlin na chlad je závislá nejen na jejich genetickém základu, ale také na řadě jiných faktorů – zejména na etapě vývoje, metabolickém stavu (dormance nebo aktivní růst), dostupnosti vody a živin, intenzitě světla, denní době aj.

Za nízkých teplot se snižuje schopnost kořenů vést vodu, navíc je blokována funkce průduchů. Vlivem vysokých intenzit slunečního záření může docházet snadněji k fotoinhibici a fotooxidaci (McKersie a Leshem 1994). Denní změny odolnosti vůči chladu souvisí s fluktuací zásob metabolitů, především sacharosy a glutathionu, jakož i se změnami v transkripci a translaci. Z hlediska živin je důležitým prvkem draslík, který souvisí s osmotickým přizpůsobením. Rostliny jsou obecně více citlivé k chladu v nedormantním stavu a během mladších etap vývoje. Naopak velmi odolné vývojové stádium rostliny je suché semeno, protože je to stádium klidové a obsahuje jen minimum vody. Odolává tedy i delšímu vystavení nízké teplotě. Jakmile však přijme vodu a začne klíčit, stává se citlivým na chlad (McKersie a Leshem 1994). Určujícím procesem je v tomto případě reorganizace a nestabilní stav membrán při přechodu ze

suchého do hydratovaného stavu semene. Jelikož nízká teplota poruší integritu membrány, zvýší se únik elektrolytů a nakonec dojde k zastavení klíčení. Pokud voda vnikne do semene za vyšší teploty a teprve pak je semeno vystaveno nízkým teplotám, k poškození nedojde. Podobné procesy se odehrávají v membránách pylu citlivých druhů rostlin.

Semenáčky jsou citlivější než dospělé rostliny. Kořeny, oddenky a cibulky bývají náchylnější než nadzemní vegetativní orgány. Protože jsou však chráněny půdou, nesetkávají se v přírodě s tak nízkými teplotami jako nadzemní části rostliny. Zdaleka nejcitlivější jsou reprodukční orgány. Nízká teplota může ovlivnit kvetení, produkci pylu, klíčení a u citlivých druhů může způsobit dokonce samčí sterilitu (McKersie a Leshem 1994).

3.1.3.2. Poškození chladem

Za primární poškození je považována počáteční rychlá reakce, která v rostlině sice způsobí různé inaktivace, ale je snadno reversibilní. Pokud vystavení nepříznivým teplotám pokračuje, následující sekundární změny mohou být nevratné a jejich výsledkem jsou charakteristické symptomy, které je možné na rostlině pozorovat.

3.1.3.2.1. Primární poškození

I když je známo, že buňky vnímají nízké teploty individuálně, zatím se nepodařilo jasně stanovit primární místo poškození na buněčné úrovni. Existují dva hlavní kandidáti, kteří jsou společní pro všechny druhy poškození vlivem nízkých teplot – změny metabolismu a plasmatické membrány.

Kdybychom považovali jako primární místo poškození metabolismu, sled možných reakcí by byl následující: vlivem nízké teploty by byly nepřiměřeně inhibovány určité enzymy, což by mohlo vést k nahromadění toxických meziproduktů, porušení integrity membrány a nakonec k projevení symptomů chladového poškození (McKersie a Leshem 1994).

Naopak jiní autoři jsou zastánci toho, že teplotu vnímá sama membrána, a to pomocí acylových konců fosfolipidů (McKersie a Leshem 1994, Yamada *et al.* 2002). Lipidová fáze se laterálně separuje – tvoří odlišné domény gelových a tekutých krystalických fází. Domény gelové fáze obsahují lipidy málo pohyblivé a jejich acylové řetězce jsou pevně stěsnány. To znemožňuje membráně chovat se semipermeabilně a

navíc je narušena funkce integrálních membránových proteinů a kanálů. Takto si lze dobře představit, že následkem primárního poškození membrány dojde ke ztrátě turgoru, úniku cytoplasmatických solutů, poklesu energetického metabolismu, rozvrácení fotosystémů, buněčné autolyze a nakonec smrti buňky, případně celé rostliny. Po působení chladu na membrány dochází k odpojení transportu elektronů od syntézy adenosintrifosfátu (ATP). Lze to jednoduše vysvětlit tím, že fyzikální změny vlastností membrány vyvolávají změny v aktivitě membránových enzymů. Existuje tedy velmi úzké spojení mezi teplotou, fluiditou membránových lipidů a aktivitou integrálních enzymů membrány. Dále bylo z pozorování, že rostliny, které se aklimatizují na nízké teploty, zvyšují podíl nenasycených mastných kyselin. To však neznamená, že by nenasycenosť lipidů byla jediným nebo nejvíce určujícím faktorem v odolnosti vůči chladu (McKersie a Leshem 1994, Kawamura a Uemura 2002).

Jednou z počátečních reakcí rostlin na nízkou teplotu je inhibice fotosyntézy. Poškození je znásobeno, je-li rostlina zároveň vystavena silnějšímu ozáření. Nízké teploty obecně zpomalují všechny metabolické reakce. V rámci fotosyntézy však můžeme rozlišit dvě zvláště citlivé – reakce zapojené do fixace oxidu uhličitého a reakce účastnící se regulace velikosti průduchů. To má dva okamžité důsledky – požadavek chemické energie klesá a schopnost průduchů regulovat ztrátu vody a výměnu CO₂ je blokována. Za nízkých teplot je odpověď průduchů na vnitřní i vnější podněty pomalá. To znamená, že když jsou v tu chvíli otevřené, přivírají se jen pomalu a naopak, když jsou zavřené, tak v tomto stavu zůstanou i nadále (Kratch a Wise 2000). Navíc je snížena vodivost vody plasmatickou membránou buněk kořenů (McKersie a Leshem 1994). Za nízké teploty a vysoké ozářnosti fotosyntetický aparát zachytí více energie než je potřeba, a tím se inhibuje činnost fotosystému II (PSII – *photosystem II*). Přitom se zpomaluje štěpení vody jako zdroje elektronů a dochází k degradaci proteinu D1 reakčního centra. Tento proces se nazývá fotoinhicice. Rostliny chladově tolerantní to řeší rozptýlením nadbytečné energie do okolí ve formě tepla. U chladově citlivých rostlin vede fotoinhicice k poklesu množství reakčních center. Je nutno dodat, že fotoinhicice probíhá i za nestresových podmínek, za suboptimálních podmínek je však výrazně zvýšena. Zajímavé je také pozorování, že fotosyntéza tropických luštěnin byla vážně poškozena ještě několik dní po jediné chladné noci (McKersie a Leshem 1994).

3.1.3.2.2. Sekundární poškození

Za chladného slunného dne může dojít k nadprodukci (re)aktivních forem kyslíku (ROS – *reactive oxygen species*) fotosystémy díky primárním změnám v elektrontransportním řetězci (McKersie a Leshem 1994). To je pokládáno za hlavní místo jejich produkce. ROS mohou být ovšem tvořeny i v ostatních systémech transportu elektronů, zejména v mitochondriích. Jejich vlivem dochází k peroxidaci mastných kyselin, která mění fyzikální vlastnosti membránových lipidů. To znemožní správnou funkci integrálních proteinů membrány a dojde k rozvoji viditelných symptomů chladového poškození. Mimoto jsou schopny přímo poškozovat DNA či navodit denaturaci proteinů. K zajímavému závěru dospěli Chen a Li (2002a), kteří sledovali ultrastrukturální změny v buňkách kukuřice vystavených chladu. Pozorované změny byly nápadně podobné změnám, které nastávají při programované buněčné smrti – mizely škrobové granule, vakuoly fúzovaly a praskaly, mitochondrie se zduřovaly, cytoplasma srážela a chromatin se začal rozpadat.

Přesto nelze ROS pokládat jen za toxické vedlejší produkty metabolismu, v nižších koncentracích totiž slouží jako významné signální molekuly (Chen a Li 2002a).

3.1.3.2.3. Symptomy chladového poškození

Citlivost rostlin k chladu může být odlišná mezi druhy téhož pásu, ale i mezi jednotlivými ekotypy stejného druhu (Pokorná 2002). Podobně symptomy chladového poškození se liší mezi jednotlivými druhy a jejich průběh může trvat od hodin k měsícům podle citlivosti rostliny a dalších podmínek prostředí (světlo, voda, vítr, živiny). U některých rostlin se symptomy projeví již během chladové periody, u jiných až poté, co jsou jejich tkáně opět zahřány. Symptomy chladového poškození zahrnují změny metabolické, buněčné a nakonec změny na úrovni celé rostliny.

Změny metabolismu obvykle předchází buněčným a viditelným symptomům poškození. Respirace se zrychluje či zpomaluje, v závislosti na vážnosti stresu. Je také stimulována glykolýza. To způsobuje nahromadění koncových produktů fermentace, ethanolu a laktátu. Sama akumulace těchto látek může být pro rostliny škodlivá. Některé tkáně urychlují produkci ethylenu, ale ten není původcem ani nezbytným agens pro rozvoj symptomů chladového poškození (McKersie a Leshem 1994).

Silnější chladový stres podněcuje plasmolýzu a senescenci buněk, následkem toho i ztrátu turgoru. Protože poškozená membrána umožňuje vytékání buněčných

tekutin do apoplastu, dochází k porušení buněčné integrity a kompartmentace. Buněčné roztoky, které unikly z buňky, navíc slouží jako dobré růstové médium pro bakterie a houby, které napadají rostlinu jako patogeni. Jedním z časných symptomů na buněčné úrovni je také zastavení proudění cytoplasmy, a tím i zastavení transportu uvnitř buňky i mezi buňkami. Chladnutí limituje energetický metabolismus v mitochondriích, a proto se buňce nedostává dostatečného množství ATP, které je pro proudění cytoplasmy nezbytné (McKersie a Leshem 1994).

Vlivem nízkých teplot je zpomalen prodlužovací růst a rostliny zůstávají viditelně zakrnělé. Díky fotooxidaci rostliny ztrácejí chlorofyl a jejich listy žloutnou. Listy se mohou různě stáčet, zkrucovat a dělat výběžky. Stonky praskají, cévy hnědnou a tkáň nasává vodu. Tyto degenerativní procesy stárnutí mohou probíhat buď v celé tkáni nebo jen místně. Příkladem lokálního poškození jsou dolíčkovité plochy na epidermis listů a plodů díky buněčnému kolapsu. Tyto propadlé jamky jsou zprvu nasáklé vodou, po zahřátí se ale vysuší a zanechají nekrotické skvrny na povrchu listu nebo plodu (např. na okurce). Navíc působením chladu nedozrává mnoho plodů (např. rajčat) nebo se správně nevyvine jejich chut'. Dřeň banánů se za nízkých teplot rozpadá a jejich slupka hnědne, vnitřní pletiva ananasu černají (Nilsen a Orcutt 1996). Může také docházet k odbarvení dužiny, cévních tkání a semen.

Ač to na první pohled nemusí být patrné, chladový stres je vnímán lokálně a pravděpodobně každou buňkou zvlášt'. To znamená, že i symptomy jsou výsledkem individuálního buněčného poškození a liší se mezi rostlinami i tkáněmi, jelikož i buňky jsou rozdílné (McKersie a Leshem 1994).

3.1.3.3. Fyziologické a biochemické efekty chladového stresu

Chladový stres může ovlivnit proteiny, a to jak kvalitativně, tak i kvantitativně. Množství rozpustných proteinů obvykle vzrůstá. Proteiny, které mají enzymatickou funkci, mohou být regulovány jak k nižším, tak k vyšším hladinám, v závislosti na specifické funkci, druhu rostliny a stupni chladového stresu (Nilsen a Orcutt 1996). Enzymy, jejichž hladina po působení chladu stoupá, mohou odrážet aklimatizační procesy. Enzymy, jejichž syntéza se snižuje, představují bud' citlivé enzymy nebo enzymy účastnící se indukce dormance. Proteiny jsou obecně labilnější za vysokých teplot, ale i za chladných podmínek může dojít k inaktivaci jejich funkce. Například enzymy P_i – dikanasa (zapojena v reakcích fixace uhlíku u C_4 rostlin) a

fosfofruktokinasa (zapojena v reakcích glykolysy) mohou být inaktivovány konversí tetramerů na dimery. Také K⁺-ATPasa, která je určující pro osmotické poměry v buňce, je ovlivnitelná chladem.

Působením nízkých teplot se oslabují hydrofobní interakce, odhalují sulfhydrylové skupiny a mění se lipidové prostředí obklopující membránové proteiny. Tím se mění konformace příslušných proteinů i enzymová kinetika. Ke změnám dochází zejména v reakční rychlosti (V_{max}) a afinitě enzymu pro daný substrát (K_m) (Nilsen a Orcutt 1996).

Dalším z biochemických efektů chladu na rostliny je inhibice fotosyntézy. Jak již bylo zmíněno v kapitole o primárním poškození, z hlediska fotosyntézy je pro rostliny nebezpečnější působení chladu za vysoké ozářenosti nebo také za sucha. Existuje několik enzymů účastnících se fotosyntézy, které jsou zvláště citlivé. To má za následek i zmenšení metabolické zásoby 3-fosfoglycerátu potřebné pro sekundární reakce fotosyntézy, čímž se snižuje množství fixovaného uhlíku. Klesá i transport uhlíku akumulovaného. Nižší rychlosti fotosyntézy mohou také odrážet nedostatečný příspun CO₂ do rostliny, jelikož při chladovém stresu jsou rostliny často dehydratovány a uzavírají průduchy. Tyto zdánlivě nevýhodné reakce mohou být významné z hlediska „vodní ekonomie“ rostliny a mohou být tedy rozhodující pro udržení nízké hladiny chladového poškození (Nilsen a Orcutt 1996). K vyvinutí plné mrazové tolerance bylin je potřebné, aby se vyvinuly nové listy při nízké teplotě. S tím souvisí přizpůsobení uhlíkového metabolismu – vzrůstá aktivita mnoha enzymů Calvinova cyklu, je selektivně stimulována syntéza sacharosy a v neposlední řadě se mění distribuce anorganického fosfátu mezi jednotlivými kompartmenty buňky (Hurry *et al.* 2002).

Působení nízkých teplot se dotýká i rychlosti respirace. Krátkodobý minimální stres respiraci zrychluje, protože se zvyšuje aktivita kyanid-necitlivé alternativní dráhy transportu elektronů. Naopak dlouhodobé nebo extrémně nízké teploty rychlosť respirace snižují (Nilsen a Orcutt 1996).

Během chladového stresu byly pozorovány i strukturální změny v organelách. Pořadí jednotlivých organel podle jejich citlivosti na chlad je následující: plastidy > mitochondrie > peroxisomy > jaderný obal > tonoplast > plasmatická membrána (Nilsen a Orcutt 1996). Zřejmě není náhoda, že zrovna tonoplast a plasmatická membrána jsou vůči působení chladu nejodolnější. Tonoplast významně ovlivňuje osmotické poměry v buňce. Role plasmalemy je ještě zřejmější – jakmile je protržena, šance buňky na zotavení je mizivá.

3.1.4. Mrazový stres

3.1.4.1. Úvod

Za mrazuvzdorné považujeme rostliny, které jsou schopny tolerovat nebo se vyhnout teplotám pod 0°C. Druhy, ale i jednotlivé kultivary se liší ve svém genetickém potenciálu odolnosti vůči mrznutí. Do hry ovšem vstupují i jiné faktory než jen samotná teplota a genom. Z těch nejvýznamnějších je to rychlosť mrznutí a tání, rychlosť a hloubka aklimatizace, rozdíly rostlinných tkání a orgánů, vodní poměry v rostlině i půdě, sněhová pokrývka, živiny, morfologické charakteristiky rostliny a charakter růstu (Nilsen a Orcutt 1996). Stejně jako u chladového stresu jsou citlivější časná stádia vývoje semenáčků než rostliny s vyvinutými pravými listy. Také existuje proměnlivost v mrazové rezistenci mezi tkáněmi a sezónní změny v citlivosti jednotlivých pletiv.

3.1.4.2. Proces mrznutí

Mrznutí lze obecně rozdělit na dva základní typy – radiační a advekční. Radiační mrznutí můžeme pozorovat za chladných jasných nocí, kdy je teplo z povrchu rostliny emitováno zpět do atmosféry. Za těchto okolností je teplota povrchu rostliny nižší než teplota okolní atmosféry. Tento rozdíl teplot může vést ke kondensaci vlhkosti na povrchu listu a jestliže je teplota dostatečně nízká, může to mít za následek tvorbu ledu. K advekčnímu mrznutí může dojít v případě, že se do určité oblasti dostane velmi studený vzduch z polárních částí světa. Ten způsobí extrémně nízké teploty vzduchu, což vyvolá rychlé mrznutí rostlin (Nilsen a Orcutt 1996).

Led se nejprve objevuje v místech s vyšším (nejméně negativním) osmotickým potenciálem. To zahrnuje zejména velké cévy xylému v listech a stoncích, buněčnou stěnu a mezibuněčný prostor. Velký průměr xylémových cév napomáhá tvorbě ledu. Jejich zředěná míza má obvykle nejvyšší bod mrznutí. Poté, co se zde led vytvoří, začne se rozširovat do extracelulárních prostor jiných pletiv rychlostí až $60 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ (Nilsen a Orcutt 1996). Krystal ledu však nemůže proniknout nepoškozenou plasmatickou membránou. Proto roste na úkor vodní páry a povrchové vrstvičky tekuté vody na buněčné stěně. Mrzne pouze „čistá voda“, ostatní látky jsou vylučovány do okolní tekutiny (McKersie a Leshem 1994). Extracelulární roztok se stává čím dál více koncentrovanějším, až mezi ním a roztokem uvnitř buňky vzniká gradient vodního potenciálu. Voda je tažena ven z buňky, dokud se vodní potenciály nevyrovnanají a následkem toho se cytoplasma dehydratuje. To má tři důležité fyziologické následky:

během mrznutí a tání musí projít plasmatickou membránou velké toky vody; krystaly ledu se rozšiřují v apoplastu, a pokud jim tento prostor nestačí, tkáň začne bobtnat a vnitrobuněčné spoje praskat a konečně, cytoplasma se vysouší a buňky tak mohou zkolaovat.

Z výše uvedeného je patrné, že plasmatická membrána má rozhodující funkci při procesu mrznutí. Nejen, že slouží jako fyzická bariéra průniku ledu do cytoplasmy, ale také udržuje buněčnou integritu během mrznutí a tání, kdy se buňka nejprve kontrahuje a poté expanduje. Navíc semipermeabilita plasmalemy ovlivňuje toky vody a solutů mezi cytoplasmou a extracelulárním prostorem. Z hlediska rychlosti tvorby ledu, která je zásadní pro míru poškození rostliny, hraje důležitou roli porosita plasmatické membrány a buněčné stěny. Čím je velikost a četnost pórů větší, tím rychleji je voda tažena ven z buňky a následkem toho se i rychleji tvoří led.

3.1.4.3. Nukleace ledu

Aby se mohl tvořit led uvnitř nebo na povrchu rostliny, musí nastat nukleace ledu. Ačkoli je za bod mrznutí vody považována teplota 0°C, čistá voda má ve skutečnosti jen malou šanci zmrznout při teplotě vyšší než -40°C. Ta představuje teplotu homogenní nukleace ledu. Protože se voda v přírodě nevyskytuje v čistém stavu, ale jako iontový nebo koloidní roztok, k jejímu mrznutí dochází při teplotě mnohem vyšší (Wisniewski a Fuller 1999).

Nejprve se musí vytvořit malý zárodek krystalu, čemuž napomáhají tzv. heterogenní nukleátory ledu. Mezi ně patří například specifické druhy bakterií, houby, hmyz, prach, vlhkost či samotný led. Tyto nukleační agens lze dále rozdělit na vnější a vnitřní. Mezi vnější agens patří zejména vlhkost a dva specifické druhy bakterií – *Pseudomonas syringae* a *Erwinia herbicola*. Tyto bakterie, aktivní v nukleaci ledu, produkují specifické proteiny, které orientují molekuly vody do ledové mřížky. Čím více je těchto bakterií na povrchu rostliny, tím vyšší je stupeň nukleace ledu. S nimi mohou kompetovat bakterie, které aktivní v nukleaci ledu nejsou, čehož lze využít při ochraně rostlin před zmrznutím. Jejich použití je však diskutabilní. Vnitřní nukleační agens si rostlina syntetizuje sama. Jsou důležité zejména u dřevin, kde jsou aktivní při teplotách lehce pod bodem mrazu a to ve zhruba stejném rozsahu jako vnější nukleátory u bylin (Wisniewski a Fuller 1999, Gusta *et al.* 2004). Heterogenní nukleátory ledu jsou velmi efektivní a četné, mrznutí tedy u rostlin nastává při mnohem vyšších teplotách

než je homogenní nukleace ledu. Rostliny citlivé na mráz jsou poškozovány v důsledku tvorby ledu již mezi -2 a -5°C (McKersie a Leshem 1994).

K přímému pozorování nukleace a propagace ledu v rostlinách se používá infračervená thermografie. Metoda vychází ze skutečnosti, že tvorba ledu je exothermický děj. Uvolnění tepla při přechodu vody z tekuté na pevnou fázi může být monitorováno a vizualizováno. Infračervená thermografie tedy umožňuje definovat iniciální místo nukleace ledu a pozorovat rozširování ledu do ostatních tkání. Tímto způsobem lze např. zjistit, že míra mrznutí může být přímo asociovaná s množstvím viditelného poškození (Wisniewski a Fuller 1999).

U rostlin je možno vystopovat dvě různé exothermy – vysokoteplotní exothermu (HTE - *high-temperature exotherm*) a nízkoteplotní exothermu (LTE - *low-temperature exotherm*). HTE reprezentuje extracelulární tvorbu ledu, která nastává za relativně vysokých teplot a není letální. Naopak LTE vyplývá z intracelulární tvorby ledu, která téměř vždy vede ke smrti buňky. LTE je charakteristická pro teploty přechlazení a je často nazývána eutektickým bodem. Protože může být charakterizována několikanásobnými vztuhy teploty, ukazuje na individuální mrznutí buněk při různých teplotách (Nilsen a Orcutt 1996).

Na nukleaci ledu má vliv i struktura rostlinky. Zřejmý rozdíl je mezi adaxiálním a abaxiálním povrchem listu. Kapky vody s bakteriemi aktivními v nukleaci ledu mrznou na obou površích stejně rychle, ale list mrzne nejprve na povrchu abaxiálním, protože se led šíří skrz průduchové štěrbiny. Je tedy patrné, že aby mrzla listová tkáň, krystaly ledu musí nejprve proniknout povrchem listu a to buď skrz průduchy, praskliny v kutikule nebo zlomené epidermální vlásky (Wisniewski *et al.* 2002).

Pro zabránění nukleace ledu jsou důležité tzv. *antifreeze* proteiny (Atici a Nalbantoglu 2003), které ovlivňují tvar i růst krystalů tím, že se navazují na jejich povrch. Výsledkem jsou malé jehličkovité krystaly. *Antifreeze* proteiny sice snižují bod mrazu jen o 0,2 až 0,4°C, ale mohou inhibovat aktivitu vnitřních i vnějších nukleačních agens. Proto hrájí důležitou roli ve vyhnutí se mrznutí (Wisniewski a Fuller 1999).

3.1.4.4. Mechanismy mrazové odolnosti

Mrazuvzdorné rostliny vyvinuly několik unikátních mechanismů, které jim umožňují vypořádat se s nízkými teplotami a možnou přítomností ledu v pletivech. Všechny tyto pozoruhodné strategie spadají do dvou obecných kategorií – mrazové tolerance a mrazové avoidance (neboli vyhnutí se mrznutí).

3.1.4.4.1. Mechanismy mrazové avoidance

Elegantní způsob prevence mrznutí vyvinuly některé sukulenty, které mají vysoký obsah vody v tkáních. Během dne akumulují residuální teplo a v průběhu chladové periody pak uskladněné teplo pomalu disipují.

Některé druhy z čeledi *Araceae* a rodu *Chlamydomonas* produkují metabolické teplo, a tím se ohřejí (Nilson a Orcutt 1996).

Jednoleté bylinky v příznivých teplotních podmínkách rostou a rozmnожují se, mráz přežívají pomocí dormantních orgánů (hlízy) nebo vývojových stádií (semena). Jiné rostliny jsou zase schopny stáhnout rostoucí konce výhonků pod listy nebo hrabanku. Toho využívají zejména přes noc, aby předešly radiačnímu mrznutí (Kacperska 1999).

Rostliny málokdy zmrznou při teplotě mrznutí buněčného roztoku, ale často se přechlazují. Toho jsou do určité míry schopny využívat všechny rostliny, některé se však mohou přechlazovat až k teplotě homogenní nukleace ledu. Mnoho druhů dřevin se touto strategií snaží vyhnout vysušení cytoplasmy. I mezi druhy, které tento mechanismus ochrany rozvinuly, najdeme velké rozdíly a specifický práh teploty, na kterou se jsou schopny přechladit, omezuje jejich geografickou distribuci (McKersie a Leshem 1994). Také mnoho ovocných dřevin (např. broskvoň, vinná réva, brusnice borůvka) se vyhýbá mrznutí, a to v květních pupenech, vegetativních pupenech a v částech tkáně kůry a dřeva tzv. hlubokým přechlazením. Primordium květního pupenu je obklopeno buněčnou vrstvou s množstvím vosku. Tato vrstva izoluje meristematické buňky od šupin a osy pupenu, čímž zabraňuje proniknutí krystalků ledu do primordia. Primordium tedy neobsahuje žádná nukleační agens a může se přechlazovat až ke kritické teplotě nukleace ledu. Když však teplota prostředí překročí kritický práh, primordium okamžitě kompletně zmrzne a umírá. Tento mechanismus je kombinován ještě s tzv. extraorgánovým mrznutím. Led se tvoří nejprve v šupinách a ose pupenu. Přítomnost ledu v šupinách pupene způsobí gradient potenciálu vody, která pak migruje

z apexu stonku nebo květu do míst extracelulárního ledu. U většiny druhů do šupin a osy pupene necestuje veškerá voda, ale část jí zůstává přechlazena v primordiu. Míra hlubokého přechlazení se mění na základě období – je postupně ztrácena s tím, jak pupeny začínají rašit. Rychlá ztráta schopnosti přechlazení u květních pupenů broskvoně je spojena se zráním prokambiálních cévních svazků v primordiu. U mnoha ovocných plodin i přirozených druhů dřevin mírného pásu je běžné hluboké přechlazení xylémových tkání. Jako u dormantních pupenů i zde musí existovat nějaká bariéra proti růstu krystalů ledu. V tomto případě hraje důležitou roli porosita buněčné stěny a plasmatické membrány, a zvláště pak struktura a složení ztenčeniny parenchymatických buněk xylému. Ztenčenina je tenká nelignifikovaná (alespoň první dva roky vývoje) část buněčné stěny, složená hlavně z celulosy a pektinů. Právě pektiny hrají zřejmě významnou roli v regulaci permeability a porosity buněčné stěny (Wisniewski a Fuller 1999). Hluboké přechlazení je charakteristické pro mírně otužilé dřeviny, protože je limitováno teplotou homogenní nukleace ledu.

Extrémně otužilé druhy vyvinuly ještě rafinovanější strategii k vyhnutí se mrznutí svých tkání, tzv. sklovatění. Stejně jako hluboké přechlazení i tato strategie reprezentuje situaci, kde je voda přítomna v metastabilním stavu. Zatímco rostliny upřednostňující přechlazení, se snaží zabránit přechodu vody z tekuté na pevnou fázi, sklovatění představuje mechanismus, pomocí nějž se buňky stanou osmoticky, thermálně i mechanicky netečné k přítomnosti externího ledu dokonce při teplotách blízkých teplotě tekutého dusíku, tedy -196°C . „Vodní skla“ jsou mimořádně viskózní přechlazené roztoky, ale nedochází u nich k nukleaci ledu, pokud je teplota dostatečně nízká, tedy pokud buňka zůstává pod teplotou tání sklovatého roztoku. Buněčná šťáva je v takovém stavu extrémně stabilní a relativně odolná ke všem stresům spojeným s mrznutím a přítomností ledu v pletivech (Wisniewski a Fuller 1999).

3.1.4.4.2. Mechanismy mrazové tolerance

Ačkoli mnoho rostlin mírného pásu dokáže přežít zimu tím, že se mrznutí nějakým z výše uvedených způsobů vyhnou, většina druhů, která přezimuje ve vegetativním stavu je nucena tolerovat růst ledových krystalů ve svých pletivech. Mechanismy mrazové tolerance zahrnují tvorbu ledu v rostlinných tkáních bez letálních následků. Led musí být ovšem tvořen extracelulárně, tzn. v prostoru buněčné stěny, v mezibuněčném prostoru či v xylému. Za intracelulární tvorbu ledu rostlinky obvykle zaplatí životem. Existují ale případy, kdy i intracelulární mrznutí nemusí být smrtelné.

Tato situace může nastat, je-li mrznutí velmi pomalé a ledové krystalky jemně strukturované, nicméně v přírodě se s tím setkáme jen velmi zřídka (Nilsen a Orcutt 1996). Mnohem častěji intracelulární tvorba ledu způsobí silné poškození membrán buněčných organel a následně smrt celé buňky.

Mrazové poškození je ovlivněno rychlostí a hloubkou mrznutí, složením roztoku, rychlostí tání a stupněm dehydratace (Reaney a Gusta 1999). Mrazová tolerance buněk je také závislá na objemu intersticiální vody. Buňky a pletiva zmírňují dopad mrznutí změnou extracelulárního prostředí. Přítomnost velkého množství intersticiální vody zřídí ochranné látky, které buňky během mrznutí exportují do apoplastu (malé cukerné molekuly a specifické enzymy) a jejich tolerance je oslabena.

3.1.4.5. Reakce buněk na tání a opakování mrznutí

Při tvorbě extracelulárního ledu se prostředí apoplastu stává hypertonické a voda je tažena ven z buněk. Tento proces se nazývá dehydrataci. Následkem toho se buňka scvrkává a plasmatická membrána je odbourávána pomocí malých endocytotických váčků, které putují s jejím materiélem do cytoplasmy. Povrch membrány se tím dramaticky zmenšuje. Když začne led roztávat, extracelulární prostředí se stane rázem hypotonické a voda putuje zpět do buňky. Nastává rehydratace cytoplasmy. Plasmatická membrána je ale velmi neelasticí a nemůže se vzrůstajícímu cytoplasmatickému objemu přizpůsobit. Navíc nelze připojit ani endocytotické váčky, které předtím s membránovým materiélem odcestovaly do cytoplasmy. Plasmatická membrána se protrhne. Takto se chovají buňky, které nejsou aklimatizovány na chlad. U buněk aklimatizovaných se plasmatická membrána chová během osmotické kontrakce odlišně. Místo endocytotických váčků se tvoří exocytotické extruse a tento proces je při rehydrataci vratný. To dokazuje, že během aklimatizace se mění mimo jiné i fyzikální vlastnosti membrány (McKersie a Leshem 1994, Reaney a Gusta 1999). Nebezpečí tvorby hexagonální II fáze a protržení plasmatické membrány aklimatizované buňky předchází zvýšením podílu dinenasycených druhů fosfatidylcholinu a fosfatidylethanolaminu. Vliv má i hromadění cukrů a syntéza specifických proteinů. Tyto proteiny nemají transmembránovou doménu, jsou tedy periferní, nekovalentně vázané na plasmatickou membránu. Řadíme je do šesti skupin a patří mezi ně zejména dehydriny a dále proteiny spojené s fixací CO₂, proteolýzou nebo osmotickým stresem (Kawamura a Uemura 2002).

Buňky jsou méně poškozeny, probíhá-li jejich rozmrzání pomalu. Buněčná stěna zůstává v podtlaku do té doby, než je uvolněn dostatek vody na hydrataci buněčné stěny a cytoplasmy. Zabrání se tak odtržení buněčné stěny od plasmatické membrány. Navíc buněčná stěna omezuje expanzi plasmalemy, a tím ji stabilizuje (Reaney a Gusta 1999).

Tání ledu může vyvolat embolii v xylému. To bylo pozorováno u stálezelených keřů v Kalifornii (Junttila a Robberecht 1999). Může to být dokonce faktor limitující růst, přežití a distribuci těchto druhů. U některých rostlin byla embolie vyvolána jen za sucha, u jiných na všech úrovních hydratace.

V oblastech mírného pásu je běžné, že teploty kolísají okolo bodu mrazu. To může tkáním způsobit cyklování mezi mrznutím a táním než přijde déletrvající období mrazu. Ukázalo se, že takto ovlivněné buňky mrznou rychleji díky přítomnosti větších objemů intersticiální vody, která se v nich nahromadila při předešlém tání (Reaney a Gusta 1999).

3.1.5. Aklimatizace rostlin k nízkým teplotám

3.1.5.1. Obecné děje nastávající při otužování

„Nedědičná modifikace struktury a funkce jako odpověď na nepříznivý klimatický faktor, která minimalizuje poškození a vylepšuje *fitness* rostliny“ (Kacperska 1999). Takto zní definice procesu, který obecně nazýváme aklimatizace.

V oblastech mírného pásu je aklimatizace zahájena na podzim, kdy jsou atmosférické podmínky suboptimální a fotoperioda se pomalu zkracuje. V tu dobu nastává tzv. předotužování, tedy první etapa aklimatizace k nízkým teplotám. Bylinky mohou vyžadovat pouze sníženou teplotu, alpinské druhy pouze fotoperiodu a některé druhy se spoléhají na obojí. U dřevin vede první etapa aklimatizace k rozvoji dormance, naopak bylinky se snaží nastavit růst a metabolismus k nastávajícím podmínek nízké teploty. Subletální teploty pak mohou vyvolat druhou fázi aklimatizace, která vede k dosažení maximální odolnosti vůči nízkým teplotám. Tato odolnost se rychle ztrácí během jara, jakmile teploty vystoupí nad 0°C, prodlouží se fotoperioda nebo je-li rostlina poškozena během zimy. Rychlosť odotužování pozitivně koreluje s teplotou (Junttila a Robberecht 1999, Kacperska 1999). Uměle lze rostliny otužit také vystavením vodnímu stresu nebo v některých případech aplikací kyseliny abscisové (ABA – abscisic acid).

Jednotlivé orgány rostliny se liší ve své odolnosti vůči mrazu. Např. nejméně odolné jsou kořeny, o něco odolnější jsou listy a největší stupeň mrazové odolnosti vykazují tkáně odnožovacích uzelů. Jejich přežití je určující pro přežití semenáčku, neboť obsahují meristematické oblasti, které produkovají nové kořeny a zahajují růst (McKersie a Leshem 1994).

Během aklimatizace se výrazně mění metabolismus celé rostliny. Tím se mění i hladiny metabolitů a aktivity příslušných enzymů. Rostliny akumulují velká množství cukrů (sacharosa, rafinosa, stachyosa), cukerných alkoholů (sorbitol, ribitol, inositol) a nízkomolekulárních látek, které obsahují dusík (prolin a glycinbetain). Tyto látky pomáhají stabilizovat membrány díky udržování hydrofobních interakcí a stabilizaci hlavičkové skupiny fosfolipidů. Protože udržují vodu okolo membránových proteinů, umožňují jim zachovat správnou konformaci a tedy i funkčnost. Navíc se tyto látky podílí na udržování příznivých iontových a osmotických poměrů v buňce (Hare *et al.* 1998, Iba 2002, Wang *et al.* 2003). Některé soluty uvolněné ze symplastu tvoří tekutou vrstvičku okolo plasmatické membrány, a tím brání adhesi ledu k plasmatické membráně, která by jinak mohla způsobit protržení buňky (Gusta *et al.* 2004). Díky výše uvedeným vlastnostem se tyto soluty často nazývají osmoticky aktivní látky nebo také kryoprotektanty.

V průběhu aklimatizace se také zvyšuje množství lipidů s nenasycenými mastnými kyselinami a obsah rozpustných proteinů. Mění se i hladiny hormonů, a to hlavně kyseliny abscisové a giberelinů. Pro zahájení otužování je důležité zpomalení růstu. Proto hladina giberelinů klesá, naopak množství kyseliny abscisové stoupá. Zvýšená hladina tohoto hormonu také souvisí s uzavíráním průduchů. Inhibice biosyntézy giberelinů v odpovědi na krátkou fotoperiodu je důležitá pro zastavení růstu a následný rozvoj dormance, opad listů a mrazové otužování (Junnila *et al.* 2002).

Mění se rychlosť respirace a fotosyntézy (viz výše). Zvýšená syntéza cukrů, proteinů a dalších rozpustných látek vyžaduje fotosyntézu, proto je nutný dostatek světla a CO₂. Fotosynteticky aktivní tkáně jsou chráněny modifikacemi buněčné stěny (Kacperska 1999).

Dochází také k syntéze úplně nových proteinů, které chrání buňky před mrazem a dehydratací. Řadíme mezi ně chladem regulované bílkoviny (CORs – *cold regulated proteins*, *antifreeze* („protimrazové“) proteiny, bílkoviny teplotního šoku (HSPs - *heat-shock proteins*) a proteiny indukované dehydratací, z nichž jsou nejvýznamnější dehydrinu (Faltus 2001).

3.1.5.2. Signální dráhy v buňkách ovlivněných nízkou teplotou

Rozpoznaní vnějšího podnětu je umožněno díky receptorům, následný přenos signálu díky specifickým molekulám. Hlavními vlastnostmi přenosu signálu jsou rychlosť, citlivost a specifita. Vnímání a přenosu signálu se účastní tři hlavní elementy – povrchové receptory, druzí poslové (*second messengers*) a proteinkinasy. Rozpoznávání signálu z prostředí se děje během poplachové fáze stresové reakce. V závislosti na síle stresoru a genetických vlastnostech rostliny mohou vést následné reakce buď ke zhroucení buněčné integrity nebo zahájení aklimatizace. Reakce rostlin na pokles teploty lze rozdělit do dvou kategorií – na reakce vyvolané pomalým nebo rychlým poklesem teploty (Kacperska 1999, Xiong *et al.* 2002, Shizonaki *et al.* 2003, Thomashow 1999).

3.1.5.2.1. Reakce vyvolané pomalým poklesem teploty

Díky změně stavu vody a nerovnováze mezi absorpcí vody kořeny a ztrátou vody transpirací klesá turgor a zastavuje se růst. Jednou z prvních změn po působení chladu na rostlinu je rigidifikace membrán následovaná přestavbou cytoskeletu. Přeskupení cytoskeletárních struktur je potřebné pro rozvinutí mrazové tolerance. Částečná přechodná depolymerizace mikrotubulů je u rezistentních kultivarů následována tvorbou chladově tolerantních mikrotubulů s charakteristicky nižším výskytem isotypu α -tubulinu TUA1/2 (Abdrakhamanova *et al.* 2003). Pro tvorbu chladově tolerantních mikrotubulů je potřebná ABA-independentní dráha. To je zřejmé z charakteru mikrotubulů, které tvořily po aplikaci ABA strmé šikmé svazky. Při chladové aklimatizaci byla z pozorování jemná příčná vlákna (Wang a Nick 2001). Mikrofilamenta a mikrotubuly jsou připevněny k plasmatické membráně, kterou drží pod napětím. Obě tyto struktury jsou mimo jiné připevněny k iontovým kanálům, které jsou mechanosensitivní. Cytoskeletární struktury tedy přenášejí síly z rigidifikované plasmalemy na vápníkové kanály a tím je otevírají. Mikrotubuly a mikrofilamenta tak nejsou jen cílem chladového stresu, ale jsou zahrnuty v řetězci událostí, které vyvrcholí ve zvýšené odolnosti k chladu (Nick 2000).

Vtok Ca^{2+} způsobí aktivaci Ca^{2+} -dependentních proteinkinas (CDPKs – *calcium-dependent protein kinases*) a MAP-kinasové (*mitogen activated protein kinase*) kaskády. Chladem aktivovaná MAP-kinasa se nazývá SAMK (*stress activated MAP kinase*). Pro její aktivaci je zapotřebí destabilizace cytoskeletu, vtok Ca^{2+} a akce

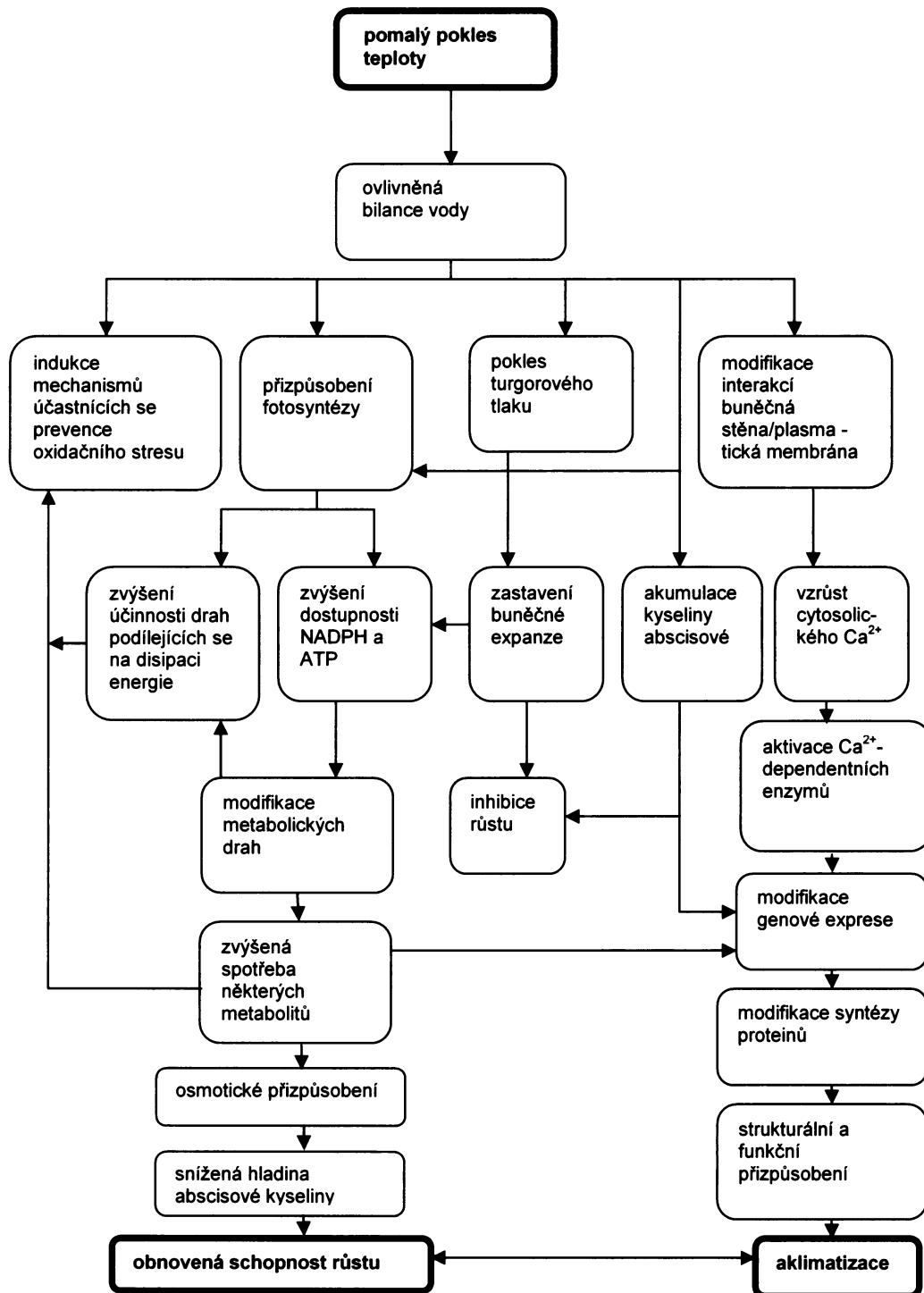
CDPKs. Výsledkem je změna ve fosforylací proteinů a exprese chladem indukovaných genů (Sangwan *et al.* 2002, Wang *et al.* 2003). Tyto změny jsou podobné pro reakce vyvolané pomalým i náhlým poklesem teploty.

Ve fotosynteticky aktivních buňkách je ovlivněna rovnováha mezi absorpcí a utilizací energie. Obrat reakčních center PSII je limitující v přeměně světelné energie do ATP a NADPH. Dochází k syntéze neenzymatických antioxidantů jako je tripeptidthiol, glutathion, vitamin C (askorbát) a vitamin E (α -tokoferol) i antioxidačních enzymů – superoxiddismutasa (SOD), glutathionperoxidasa (GPX), glutathionreduktasa (GR), askorbátperoxidasa (APX) a katalasa (CAT). Také jsou podpořeny dráhy přeměny a disipace nadbytečné zářivé energie. Ve větší míře se uplatňuje dráha alternativní oxidasy s rozpráhovacím proteinem, což umožňuje plynulou respiraci za stresových podmínek, protože elektrontransportní řetězec zůstává ve více oxidovaném stavu. Exprese alternativní oxidasy se zvyšuje aplikací ABA (Chen a Li 2002a).

Mění se metabolismus rostliny. Navíc, určité cukry, zejména glukosa, fruktosa i sacharosa, mohou ovlivňovat expresi genů (Winter a Huber 2000). Přechodně se zvyšuje hladina abscisové kyseliny. To může být vyvoláno vodním deficitem indukovaným nízkou teplotou. Během působení stresu se uplatňují dvě cesty regulace exprese genů, jedna závislá na ABA a druhá nezávislá (Kadlecová 1999).

Výstupy odpovědí rostlin na pomalý pokles teploty (modifikace růstu orgánů, metabolická a osmotická přizpůsobení, změny genové exprese atd.) umožňují aklimatizaci rostlin k nízkým teplotám.

Výše popsané procesy jsou schématicky znázorněny na obr. 3.4.

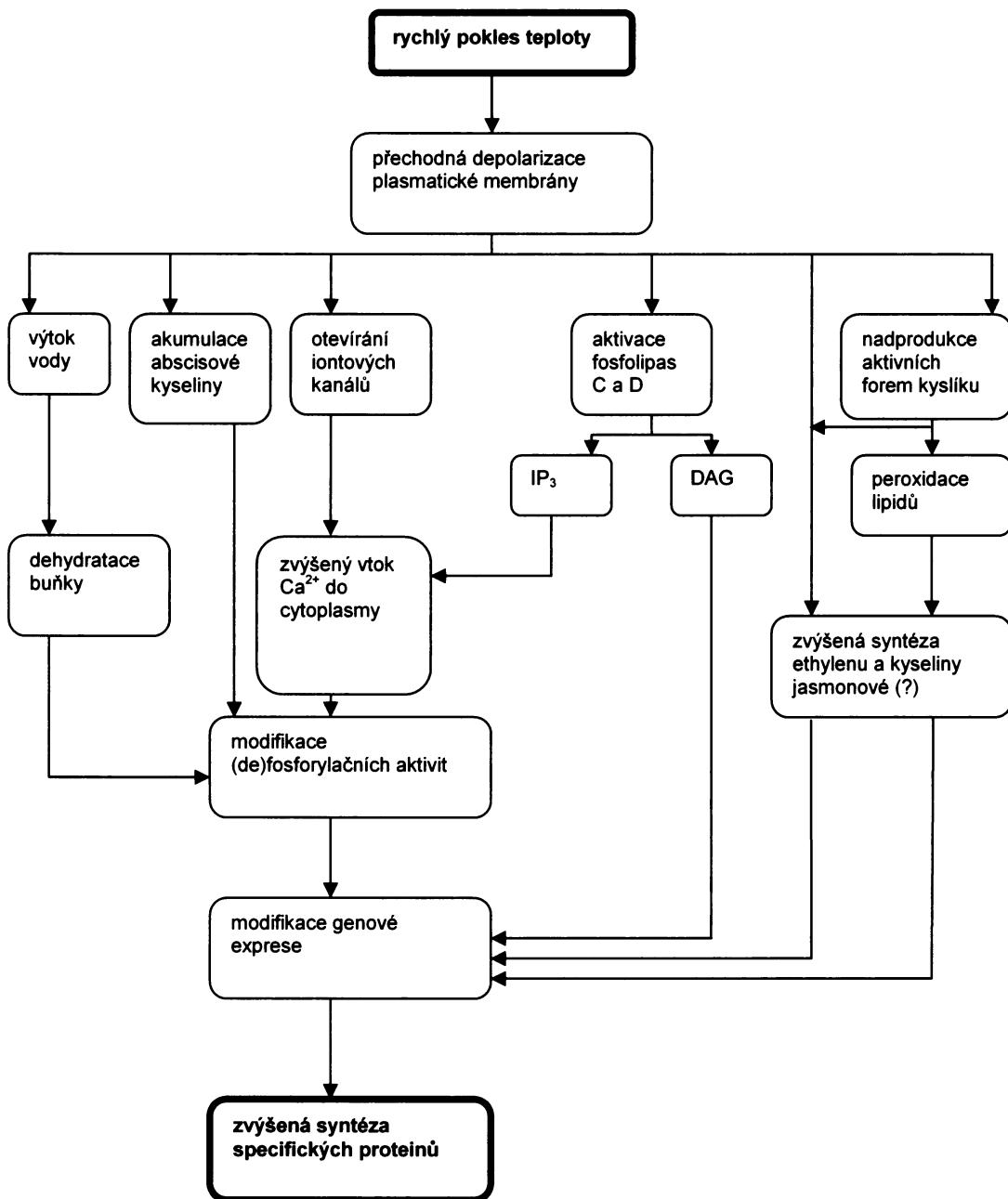


Obr. 3.4. Schéma možné sekvence dějů, které probíhají při reakci rostliny na pomalý pokles teploty. Upraveno podle Kacperska 1999.

3.1.5.2.2. Reakce vyvolané rychlým poklesem teploty

Citlivost každé rostliny k náhlému poklesu teploty je dána jejími genetickými vlastnostmi, vývojovým stádiem a fyziologickým stavem. V tomto případě nejprve dojde k inhibici exkrece protonů do apoplastu a tím k depolarizaci membrány. Dochází tedy k alkalizaci apoplastu, který slouží jako aniontová past, ve které se hromadí ABA a ke změnám toků iontů. Díky otevřání napěťově závislých kanálů Ca^{2+} rychle vteče do buňky. Jeho hladiny stoupají převážně vtokem z extracelulárních prostor (Thomashow 1999). Vzrůst koncentrace vápenatých iontů ovlivňuje různé buněčné funkce. Aktivace fosfolipasy C, v membráně upevněného mechanosensitivního enzymu, způsobí zvýšení hladiny diacylglycerolu (DAG) a inositol-1,4,5-trisfosfátu (IP₃). IP₃ způsobuje výtok Ca^{2+} z intracelulárních prostor, DAG aktivuje proteinkinasu C (Sangwan *et al.* 2002). Fosfolipasa D hydrolyzuje fosfolipidy v membránách, potlačení její aktivity může zvýšit toleranci k nízkým teplotám jak u chladově citlivých, tak i u chladově tolerantních rostlin (Rajashekhar 2000). Vtok Ca^{2+} inhibuje aktivitu proteinfosfatasy 2A, což vede k fosforylací několika proteinů účastnících se indukce exprese genu *CAS15* a aktivace chladové aklimatizace (Thomashow 1999). Rozvíjí se oxidační stres a zvyšuje se syntéza ethylenu, který se účastní regulace exprese obranných genů – hraje důležitou roli v kontrole systémových odpovědí rostlin na stresor (Kacperska 1999). Vyústěním výše uvedených procesů je modifikace genové exprese, a tím i změna skladby proteinů v buňce ovlivněné náhlým teplotním poklesem. Najdeme v ní dehydriny, které vykazují chaperonovou aktivitu nebo slouží jako surfaktanty. Zabraňují tedy agregaci makromolekul, a tím udržují strukturální integritu buněčných komponent. V buněčné stěně jsou přítomny extensiny, které se snaží zabránit deformacím buněčné stěny, ke které dochází vlivem dehydratace při extracelulárním mrznutí. Výsledkem náhlého poklesu teploty je i syntéza osmotinů a PR proteinů (*pathogen-related proteins*) (Kacperska 1999).

Výše popsané procesy jsou schématicky znázorněny na obr. 3.5.



Obr. 3.5. Schéma možné sekvence dějů, které probíhají během reakce rostliny na rychlý pokles teploty.

- DAG – diacylglycerol; IP₃ – inositol-1,4,5-trisfosfát

Upraveno podle Kacperska 1999.

3.1.5.2.3. Exprese chladem regulovaných genů

Mrazová tolerance představuje polygenní kvantitativní vlastnost, kdy efekty jednotlivých genů mohou být redundantní, aditivní či mezi sebou mohou interagovat (Cattivelli *et al.* 2002). Mnohé z těchto genů kódují proteiny se známou enzymatickou funkcí (desaturasa mastných kyselin), jiné molekulární chaperony nebo různé regulační proteiny. Mnoho chladem indukovaných proteinů je nových nebo podobných k LEA (*late embryogenesis abundant*) proteinům. Jako jiné osmoprotektanty jsou také hydrofilní, většina z nich zůstává rozpustná i po varu a mají převážně jednoduchou aminokyselinovou skladbu s řadou opakujících se sekvencí. Navíc obsahují oblasti schopné tvořit amfipatické α -helixy, které mohou být důležité pro stabilizaci membrán. Příkladem je chloroplastový COR 15am, který mění zakřivení vnitřní membrány chloroplastu, a tím zabraňuje tvorbě hexagonální II fáze (Thomashow 1999).

Geny *CBF1*, *2* a *3* (nebo také *DREB1b*, *c* a *a*) z *Arabidopsis thaliana* kódují transkripční aktivátory, které hrají ústřední roli v regulaci chladové aklimatizace. Cílové geny CBF (*CRT/DRE binding factor*) transkripčních faktorů jsou *CORs*. Každý z *COR* genů přispívá malým dílem k mrazové toleranci. *CBF1,2* a *3* patří do rodiny AP2/EREBP proteinů vázajících se na DNA (Zarka *et al.* 2003). Tyto transkripční faktory váží CRT (*C-repeat*)/DRE (*dehydration response element*) element přítomný v promotoru jak *COR* genů, tak i dalších chladově indukovaných genů a stimulují jejich transkripci. Nedávno byl identifikován transkripční faktor, který se váže na promotor *CBF* genů. Gen byl nazván *ICE1* (*inducer of CBF expression 1*) a kóduje protein bHLH (*MYC-like basic helix-loop-helix*). Tento protein se účastní regulace *CBF3*, *HOS1* a *FRY2* kódují negativní regulátory exprese *CBF*. *HOS1* je možná ligasa E3, která směruje CBF regulační proteiny k ubikvitinizaci a následné degradaci. Naopak *LOS4* kóduje pozitivní regulátor DEAD-box RNA helikasu. Celý systém vnímání teploty je zřejmě regulován negativní zpětnou vazbou, která zahrnuje samotné CBF proteiny a jejich cílové molekuly. Mechanismus chladového vnímání se stává po určité době necitlivý k příslušné teplotě – produkuje méně CBF transkriptů. Když se teplota o několik °C sníží, systém opět reaguje zvýšenou transkripcí *CBF* genů. Tento systém má jakousi „paměť“, neboť když je rostlina ze 4°C přesunuta do 22°C (na 1 až 8 h) a pak opět do 4°C, hladina transkriptů CBF se nezvyšuje, rostlina musí být ve vyšší teplotě 8 až 24 h. Jelikož exprese genů regulovaných CBF se účastní Ca^{2+} jako druhý posel, je možné, že tato „paměť“ souvisí s chladovou „pamětí“ vápníku. Na promotoru *CBF2* byla identifikována chladově-responsivní oblast o délce 125 bp a na ní nalezeny 2 segmenty

– ICEr1 a ICEr2 (*inducer of CBF expression region 1* nebo *2*). Tyto oblasti stimulují transkripcí *CBF* také v reakci na mechanické podněty a cykloheximid (inhibitor syntézy proteinů). Ukazuje se, že exprese genu pro xyloglukanendotransglykosylasu, *TCH4*, je regulována podobným systémem v odpovědi na chlad a mechanický stimul jako *CBF2* (Thomashow 1999, Zarka *et al.* 2003).

V poslední době byly objeveny geny *SFR2*, které jsou exprimovány konstitutivně v nadzemních částech *Arabidopsis thaliana*. Mutace v těchto genech neumožňují rostlině pokračovat v růstu po vystavení nízkým teplotám. Protože u mutantních rostlin *sfr2* nedochází k výraznému výtoku elektrolytů za podmínek mrazu (na rozdíl od mutací, které ovlivňují regulační dráhu *CBF* a expresi *COR* genů), je role *SFR2* genů při chladové aklimatizaci odlišná od role genů regulovaných *CBF* (Martin a Jones 2004). Na kontrole dalších mechanismů mrazové rezistence se podílí gen *ESKIMO1 (ESK1)* – reguluje zejména syntézu prolinu, v menší míře i akumulaci cukrů a expresi *RAB 18* (Xin a Browne 1998). Expresi chladem indukovaných genů zahrnuje mnohé mechanismy, včetně transkripčních a posttranskripčních modifikací, ABA-dependentních a ABA-independetních drah. Není však jasné, zda genová expresi regulovaná *CBF/DREB* je zcela nezávislá na ABA, protože dráhy regulované ABA a *CBF/DREB* spolu v určitých bodech komunikují. Některé metabolické změny ani nemusejí, alespoň z části, odrážet změny v genové expresi, např. syntéza cukrů a změna lipidové skladby. Za to může být zodpovědná změna aktivity některých enzymů (Thomashow 1999).

Důležitou roli hrají i PR proteiny, které se taktéž hromadí během chladové aklimatizace. Patří mezi ně např. β -1,3-glukanasa, která zastává kryoprotektivní funkci v thylakoidech, zejména při cyklování buňky mezi mrznutím a tání. Další z PR proteinů, chitinasa a thaumatin, mohou být indukovány exogenní aplikací glycinbetainu (Rajashekhar 2000). Při studiu chladové aklimatizace ozimého ječmene byly objeveny PR proteiny, které jsou zároveň i *antifreeze* proteiny, jelikož se adsorbují na povrch ledových krystalů a inhibují jejich růst. Tyto proteiny během mrznutí a tání mění svoji strukturu a tvoří nová místa pro vazbu Ca^{2+} . Jakmile se do těchto míst vápníkové ionty naváží, proteiny ztrácí *antifreeze* i chitinasovou aktivitu. Ta může být opět obnovena přidáním chelátorů. V apoplastu je koncentrace vápníku nízká, proto lze předpokládat *antifreeze* aktivitu jako trvalý jev v rostlinách při mrznutí a tání. Ca^{2+} může regulovat chitinasovou aktivitu, když vzroste místní koncentrace Ca^{2+} buď uvolněním z pektinu nebo interakcí s proteiny vázajícími vápník (Stressmann *et al.* 2004).

Mnoho signálů je přenášeno pomocí posttranslační modifikace serinových, threoninových a tyrosinových zbytků proteinkinasami a fosfatasami. Proteinkinasy mohou fosforylovat několik substrátů a tím umožňovat komunikaci mezi regulačními drahami (Kacperska 1999).

V poslední době byly pro studium vlivu chladu a mrazu na rostliny využity nové techniky zabývající se transkriptomem (Seki *et al.* 2001, Sung *et al.* 2003, Nogueira *et al.* 2003, Kreps *et al.* 2002, Provart *et al.* 2003, Shinozaki *et al.* 2003). Také proteomika se rychle rozvíjí (Kawamura a Uemura 2003, Bae *et al.* 2003, Rose *et al.* 2004). Obrovský nárůst poznatků díky těmto metodám vede nejen k expansivnímu pokroku ve znalostech o biologických mechanismech působení chladu a mrazu na rostliny i spuštění aklimatizace a vzniku odolnosti, ale zároveň se stává nástrojem molekulární genetiky ve šlechtění chladu- a mrazuvzdorných odrůd užitkových rostlin.

3.1.6. Adaptace rostlin k nízkým teplotám

Již Charles Darwin si všimnul významu klimatických stresorů na rozšíření druhů na naši planetě. Skutečně, sezónní extrémy chladu a sucha jsou považovány za nejúčinnější selekční faktory ovlivňující druhovou rozmanitost. Rostliny se během evoluce přizpůsobovaly svému prostředí. Např. rostliny tropického původu se jen těžko vyrovnávají se sníženou teplotou jednoduše proto, že se s takovými podmínkami jejich předci nesetkali a nebylo tudíž nutné vyvinout příslušné adaptivní mechanismy. Naopak u rostlin mírného pásmu může být adaptace k sezónním klimatickým podmínkám tak těsná, že pro ně není možná existence v „příznivých“ tropech. Nicméně, severské tundrové oblasti jsou poměrně recentní, a proto je obývají i druhy, které nejsou na tyto ekosystémy dobře adaptovány. Nejvíce mrazuvzdorných druhů rostlin se nachází na severní polokouli. Na jižní polokouli panuje mírná oceánická zima a nesetkáme se zde s rostlinami, které by přežívaly teploty pod -30°C. Časování vývojových a fyziologických procesů s ohledem na převažující podmínky prostředí je dáno geneticky (Guy 1999). Mrazový stres má mnohé vlastnosti společné se stremem sucha, a proto není překvapující, že řada proteinů citlivých na nízké teploty je úzce homologní s proteiny indukovanými za sucha. To se týká např. dehydrinů, které se vyskytovaly již u sinic, „praotců“ chloroplastů dnešních vyšších rostlin. Pokud dehydriny neexistovaly u předků rostlin v čase endosymbiosy, tak se geny kódující tyto proteiny mohly „přestěhovat“ do hostitelského genomu (Guy 1999).

Rostliny osidlující chladná klimata vyvinuly důmyslné fyziologické i morfologické mechanismy. Patří mezi ně např. nízký plazivý habitus a redukovaná povrchová plocha. To jim umožňuje absorbovat teplo emitované z půdy během dne a naopak v noci se vyhnout chladnutí a vysušování. Teploty výhonu jsou nejvyšší blízko půdy, zatímco teplota kořene klesá s hloubkou. Během noci jsou pak teploty rostliny nižší než okolní atmosféry (Nilsen a Orcutt 1996). Proto se v těchto oblastech setkáme spíše s vytrvalými bylinami, travinami, poléhavými rostlinami a zakrslými keři. Naproti tomu v tropech dominují stromy.

Rostliny chladných stanovišť mají obvykle malé tlusté špičaté listy, vysoký poměr kořeny/nadzemní část a jejich kořeny rostou blízko povrchu půdy. Další významnou adaptací je snížená rychlosť růstu při rychlosti fotosyntézy srovnatelné s rostlinami teplejších stanovišť. To je možné zvýšením hladiny enzymu Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa). Většina těchto rostlin má fotosyntézu typu C₃ a větší část cukrů skladuje v podzemních orgánech, které jsou, mimo jiné, potřebné pro výživu kořene. Chladově adaptované rostliny mají charakteristicky vyšší rychlosti respirace než druhy z teplých oblastí. To jim umožňuje rychle využít uskladněné rezervy během krátkého období růstové sezóny. Cukry uložené v podzemních částech mohou také využít v extrémně chladných obdobích. Reprodukční strategie v těchto nepříznivých podmínkách odráží potřebu šetřit s uhlíkem (Nilsen a Orcutt 1996). Sexuální rozmnožování je energeticky velmi náročné, proto se rostliny chladných oblastí rozmnožují asexuálně. Navíc i opylovačů se v takových podmínkách vyskytuje poskrovnu. Když se i přesto rostliny množí pohlavně, jsou často dvoudomé. Květy parabolického tvaru dokáží efektivně soustředit sluneční paprsky do svého středu. Tím ohřívají reprodukční struktury a přitahují opylovače. Absorpce světla je také podpořena tmavou barvou květů i tím, že se otáčejí za sluncem (Nilsen a Orcutt 1996).

Některé ze znaků, které přispívají k odolnosti vůči nízkým teplotám mohou být evolučně staré, naopak jiné mohou být poměrně nedávné (Guy 1999).

3.2. Kompatibilní soluty

Jednou z nesčetných biochemických změn, ke kterým dochází v rostlině za stresových podmínek, je akumulace kompatibilních solutů. Jsou to nízkomolekulární, ve vodě vysoce rozpustné látky, které pro buňky nebývají toxické ani při vyšších koncentracích (až jednomolárních) a při neutrálním pH nenesou žádný náboj (Fricke a Pahlich 1990, Hare *et al.* 1998, Aubert *et al.* 1999b). Proto se mohou hromadit v cytoplasmě, přispívat k jejímu osmotickému potenciálu a podílet se tím na udržování turgoru, je-li rostlina vystavena osmotickému stresu. V cytoplasmě však mají tyto látky řadu dalších ochranných funkcí - stabilizují membrány, pomáhají zachovávat konformaci membránových i cytoplasmatických proteinů a navíc snižují oxidační poškození vychytáváním aktivních forem kyslíku (Hare *et al.* 1998, Wang *et al.* 2003). Důležitou roli mají kompatibilní soluty i poté, co stresové působení odezní – stávají se zdrojem uhlíku, dusíku i energie pro obnovení metabolismu rostliny.

Jaké látky kompatibilní soluty představují? Jsou to mnohé cukry a cukerné alkoholy (sacharosa, fruktany, trehalosa, manitol, sorbitol, ribitol, *myo*-inositol, D-ononitol, pinitol), aminokyseliny (např. prolin) a kvartérní amoniové sloučeniny (dimethylsulfoniopropionát, glycinbetain, prolinbetain) (Kavi Kishor *et al.* 1995, Petrusa a Winicov 1997, Hare *et al.* 1998, Konstantinova *et al.* 2002, Iba 2002, Wang *et al.* 2003).

3.2.1. Kompartmentace a transport kompatibilních solutů

Hladiny kompatibilních solutů jsou většinou analyzovány z extraktu pletiva nebo buněk bez přihlédnutí k jejich kompartmentaci (Hare *et al.* 1998). Tyto sloučeniny mají ovšem ochranné funkce v cytoplasmě, ačkoli menší část celkového obsahu se vyskytuje i ve vakuole. Subbuněčná kompartmentace glycinbetainu závisí na specifických transportních mechanismech, které však zatím objasněny nebyly (Aubert *et al.* 1999b). Po odeznění stresu se snižuje koncentrace glycinbetainu v listech jeho translokací do ostatních orgánů, nikoliv rozkladem (Hare *et al.* 1998). Transport je zřejmě důležitým aspektem funkčnosti i ostatních kompatibilních solutů, např. manitolu (Hare *et al.* 1998).

3.2.2. Manipulace s biosyntetickými drahami kompatibilních solutů

Mezi kvartérní amoniové sloučeniny patří různé betainy, což jsou deriváty aminokyselin s plně methylovaným atomem dusíku (Wang *et al.* 2003). Významným rostlinným betinem na poli „stresové fyziologie“ je především glycinbetain. Jeho syntéza probíhá v chloroplastech postupnou oxidací cholinu na betainaldehyd a glycinbetain cholinmonooxygenasou (CMO) a betainaldehyddehydrogenasou (BADH) (Burnet *et al.* 1995, Sakamoto *et al.* 2000, Wang *et al.* 2003).

V současné době je snaha zvýšit endogenní obsah různých kompatibilních solutů, včetně glycinbetainu, zejména pomocí molekulárně biologických metod. Pro úspěšnou akumulaci glycinbetainu u transgenních rostlin obsahujících CMO či BADH je ovšem zapotřebí aplikovat zároveň i prekurzory jeho syntézy. To bylo provedeno např. u rýže (*Oryza sativa*) a tyto transformanty vykazovaly zvýšenou toleranci k soli, nízké i vysoké teplotě (Nuccio *et al.* 1998, Kishitani *et al.* 2000). U některých bakterií (např. *Arthrobacter globiformis*) je glycinbetain syntetizován z cholinu pomocí jediného enzymu – cholinoxidasy (COD). Další, třetí variantu syntézy glycinbetainu najdeme např. u savčích buněk či určitých mikroorganismů (*E. coli*) – ty katalyzují tvorbu glycinbetainu dvěma enzymy, cholindehydrogenasou (CDH) a BADH (Sakamoto a Murata 2001). Transgenní rostlinky tabáku (*Nicotiana tabacum*) (Konstantinova *et al.* 2002) a *Arabidopsis thaliana* (Hayashi *et al.* 1997, Alia *et al.* 1998, Sakamoto *et al.* 2000) obsahující bakteriální gen pro cholinoxidasu (*Coda*) syntetizovaly glycinbetain a byly tolerantnější k soli a nízkým teplotám. Přesto byl obsah akumulovaného

glycinbetainu mnohem menší než u rostlin přirozeně tolerujících zasolení (Iba 2002). Důležité je rovněž správné subcelulární zacílení vneseného genu kódujícího enzym biosyntézy příslušného solutu (Sakamoto a Murata 2001, Konstantinova *et al.* 2002).

Ve středu zájmu mnohých molekulárních biologů je manipulace s hladinami některých cukrů a cukerných alkoholů. Tak např. transgenní rostliny tabáku obsahující bakteriální gen kódující manitol-1-fosfátdehydrogenasu nejen, že hromadily tento cukerný alkohol, ale vykazovaly též vyšší toleranci k soli (Tarczynski *et al.* 1993). Podobně i transgenní rostliny téhož druhu zkonstruované k akumulaci D-ononitolu měly lepší stresovou toleranci (k soli a suchu) (Sheveleva *et al.* 1997). Vyšší tolerance k různým abiotickým stresům bylo rovněž dosaženo vyšší produkcí trehalosy u transformantů rýže (Garg *et al.* 2002). Zvýšená produkce fruktanů, polymerů fruktosy, zlepšila mrazovou toleranci transgenního tabáku (Konstantinova *et al.* 2002).

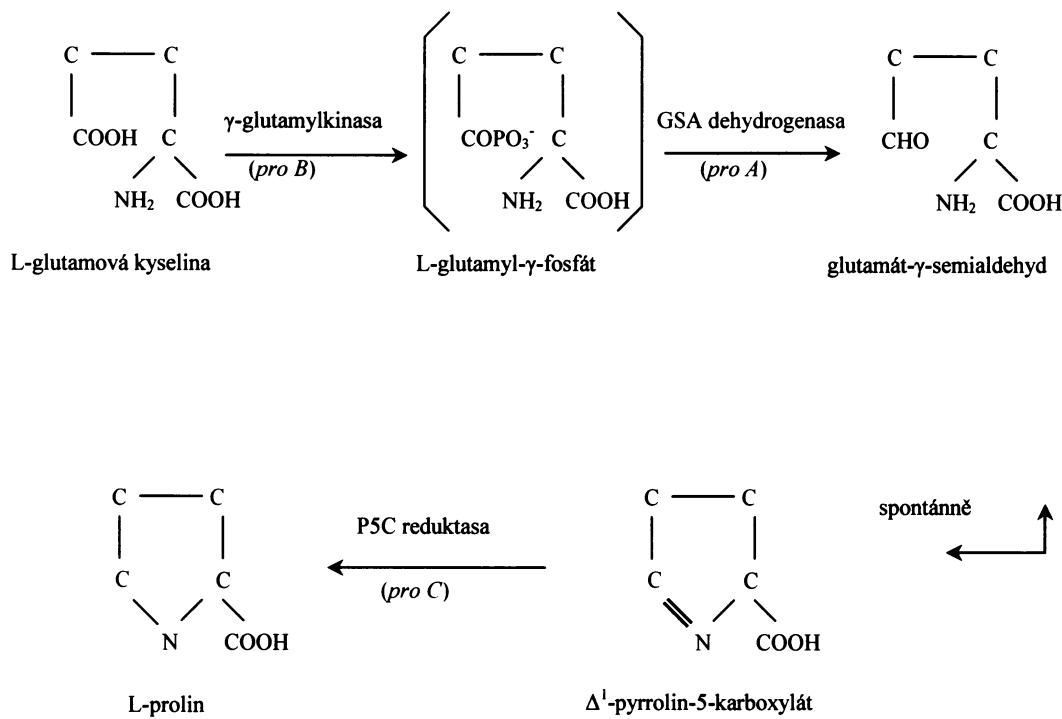
Díky vyšší produkci cukerných alkoholů může dojít k poruchám primárního metabolismu rostliny, a tím i k různým fenotypovým abnormalitám, jako v případě rostlin tabáku se zvýšenou produkcí sorbitolu, který interferoval s biosyntézou inositolu (Sheveleva *et al.* 1998). Pro minimalizaci těchto efektů je vhodné vnést geny pod stresem indukovatelným nebo tkáňově specifickým promotorem (Garg *et al.* 2002).

Některé soluty se akumulují pouze u úzkého spektra druhů – např. glycinbetain se vyskytuje pouze u rostlin s vysokou tolerancí k soli a nízkým teplotám (Iba 2002). Naopak jedním z nejrozšířenějších kompatibilních solutů je prolin. Za podmínek stresu se hromadí nejen u vyšších rostlin a řas, ale také u mořských bezobratlých, protozoí či eubakterií (Delauney a Verma 1993).

3.2.3. Prolin

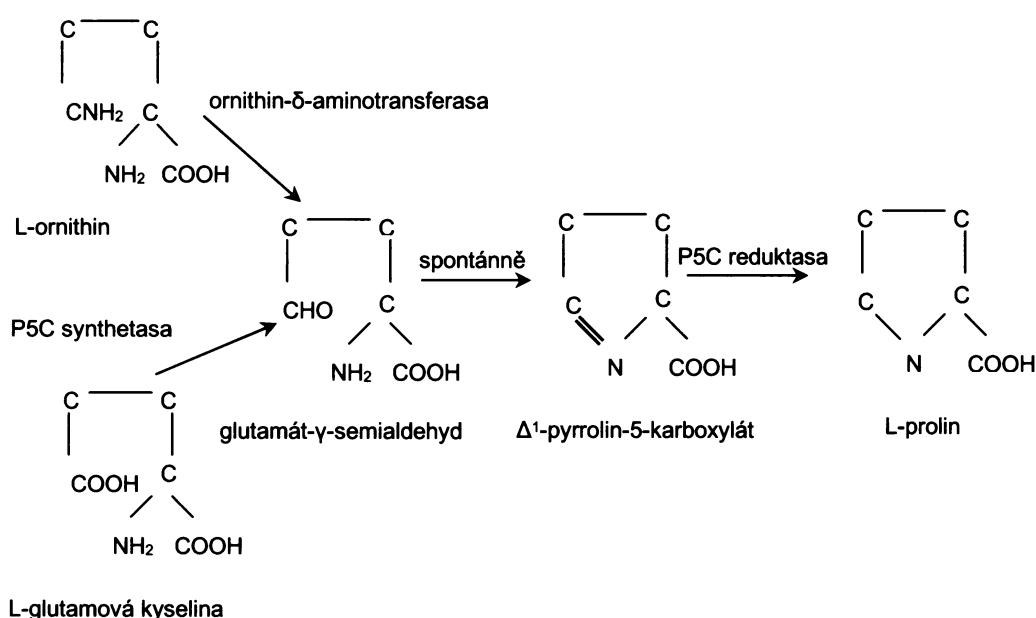
3.2.3.1. Syntéza a degradace prolinu

Biosyntéza prolinu byla poprvé správně charakterizována již roku 1952. Zasloužili se o to Vogel a Davis, modelovým organismem jim byla bakterie *Escherichia coli* (Delauney a Verma 1993). Prekurzorem syntézy prolinu *E. coli* je L-glutamát, který je fosforylován na γ -karboxylové skupině γ -glutamylkinasou (γ -GK) za spotřeby ATP a produkt reakce je následně redukován glutamát- γ -semialdehydhydrogenasou na glutamát- γ -semialdehyd (GSA). Enzymy γ -GK a GSA dehydrogenasa jsou u bakterií a kvasinek syntetizovány jako samostatné peptidy a vytváří heterodimér (Hong *et al.* 2000). GSA spontánně cyklizuje do Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátu (P5C) a ten je následně redukován na prolin. Tato reakce je katalyzována P5C reduktasou (P5CR). Geny *pro A*, *pro B* a *pro C* z *E. coli* kódující GSA dehydrogenasu, γ -GK a P5CR byly naklonovány a osekvenovány (Deutch *et al.* 1982, 1984) (obr. 3.6).



Obr. 3.6. Dráha biosyntézy prolinu u *E. coli* (upraveno podle Delauney a Verma 1993).

Rostliny jsou schopny syntetizovat prolin dvěma způsoby – z glutamátu nebo ornithinu (obr. 3.7). Glutamátová dráha je podobná dráze biosyntézy prolinu *E. coli*, jenž první dvě reakce nejsou katalyzovány komplexem dvou enzymů, ale pouze jedním bi-funkčním enzymem – P5C synthetasou (P5CS), podobně jako u živočichů (Hu *et al.* 1992, Zhang *et al.* 1995, Hu *et al.* 1999). Z *Vigna aconitifolia* (Hu *et al.* 1992) a *Arabidopsis thaliana* (Savouré *et al.* 1995, Yoshioka *et al.* 1995) byly izolovány cDNA klony kódující P5CS, ze soji (*Glycine max*) (Delauney a Verma 1990), hrachu (*Pisum sativum*) (Williamson a Slocum 1992) a *A. thaliana* (Verbruggen *et al.* 1993) pak cDNA klony P5CR. Enzymy P5CS i P5CR využívají jako kofaktor NADPH (Hare *et al.* 1998). Druhý způsob syntézy prolinu vyžaduje transaminaci δ -aminoskupiny ornithinu ornithinaminotranferasou (OAT), čímž vznikne GSA. Ten je posléze přeměněn na prolin stejným způsobem jako v případě dráhy glutamátové. Klon cDNA kódující OAT byl už také izolován (Delauney *et al.* 1993, Kavi Kishor *et al.* 1995). Další methylace prolinu může dát vznik prolinbetainu nebo hydroxyprolinbetainu (Hare *et al.* 1998). Některé bakterie (např. *Agrobacterium*) jsou schopny ornithin přeměnit přímo na prolin pomocí cyklodeaminasy (Delauney a Verma 1993).



Obr. 3.7. Biosyntéza prolinu u rostlin (upraveno podle Delauney a Verma 1993).

Degradace prolinu probíhá přes stejné intermediáty jako jeho syntéza, jen v opačném směru. První krok - oxidaci prolinu na P5C - katalyzuje prolinidehydrogenasa (PDH) (Charest a Phan 1990), jeho následný rozklad na glutamát P5C dehydrogenasa (P5CDH). Prekursor PDH je kódován genem *ERD5* (*early responsive to dehydration*), který byl izolován z *A. thaliana* (Kiyosue *et al.* 1996, Peng *et al.* 1996, Verbruggen *et al.* 1996). Naproti tomu gen pro P5CDH ještě izolován nebyl (Hayashi *et al.* 2000). Molekulová hmotnost P5CDH se pohybuje okolo 60 kDa, jako akceptor elektronů preferuje NAD⁺ (Forlani *et al.* 1997).

K biosyntéze prolinu může docházet v různých buněčných kompartmentech, zejména v cytoplasmě a chloroplastu, kde byla detekována i aktivita P5CR (Rayapati *et al.* 1989, Szoke *et al.* 1992, Verbruggen *et al.* 1993), zatímco oxidace prolinu na glutamát probíhá v mitochondriích – PDH je připevněna k vnitřní mitochondriální membráně, P5CDH je lokalizována přímo v matrix mitochondrie (Kiyosue *et al.* 1996). Oba enzymy byly poprvé charakterizovány Elthonem a Stewartem (1981) v mitochondriích kukurice (*Zea mays*).

3.2.3.2. Regulace syntézy a degradace prolinu

U *E. coli* byla zjištěna allosterická inhibice prvního enzymu biosyntézy prolinu (γ -GK) konečným produktem, prolinem. Několik mutací, které se týkaly jednonukleotidové záměny v *pro B* genu, zajišťovalo různý stupeň citlivosti γ -GK k prolinu a vedlo k různým úrovním jeho nadprodukce i následné osmotolerance (Dandekar a Uratsu 1988, Delauney a Verma 1993). Jednou z nich je i substituce adeninu za guanin v *pro B74* genu a tím změna aspartátu v pozici 107 na asparagin, která zvýšila syntézu prolinu a zlepšila toleranci k osmotickému stresu (Csonka *et al.* 1988, Dandekar a Uratsu 1988). Naopak skupina *Enthrobacteriaceae* reaguje na osmotický stres zvýšeným transportem prolinu z okolí (média) zvýšením aktivity prolinových transportérů, nikoliv jeho zvýšenou syntézou. Syntéza a degradace prolinu je pod osmotickou kontrolou u gram-pozitivních bakterií (Delauney a Verma 1993).

Regulace biosyntézy prolinu u rostlin je sice více komplexní (již s ohledem na existenci dvou alternativních biosyntetických drah), ovšem reakce prvního enzymu dráhy, který rovněž podléhá (resp. jeho γ -GK aktivita) zpětnovazebné inhibici prolinem, je limitujícím krokem biosyntézy i v tomto případě (Kavi Kishor *et al.* 1995, Yoshiha *et al.* 1995, Zhang *et al.* 1995, Nanjo *et al.* 1999b, Hong *et al.* 2000). Tím se liší od lidské P5CS, která podléhá zpětnovazebné inhibici ornithinem (Hu *et al.* 1999). Transgenní rostliny tabáku nadprodukující P5CS z *Vigna aconitifolia* akumulovaly 10-18krát více prolinu než kontrolní rostliny (Kavi Kishor *et al.* 1995). Konzervovaný zbytek aspartátu na pozici 128 u P5CS z *Vigna aconitifolia* zpětnovazebnou inhibici neovlivňuje (Zhang *et al.* 1995), zatímco nahrazením fenylalaninu na pozici 129 alaninem byla inhibice P5CS prolinem téměř odstraněna, ačkoli si mutovaná P5CS zachovala podobné kinetické charakteristiky jako nemutovaná P5CS (Zhang *et al.* 1995). Rostliny tabáku nesoucí tento mutovaný enzym z *V. aconitifolia* (P5CSF129A) akumulovaly až dvakrát více prolinu, produkovaly méně ROS a byly tolerantnější k osmotickému stresu než rostliny exprimující nemutovanou P5CS. Jejich semena, narozdíl od semen kontrolních, klíčila i za podmínek vysoké koncentrace solí (200mM NaCl) (Hong *et al.* 2000). Z výsledků je patrné, že zpětnovazebná inhibice P5CS není při podmínkách stresu zcela eliminována, tzn., že za stresu je syntéza prolinu ovlivňována nejen transkripční aktivací P5CS, ale i zpětnovazebnou inhibicí prolinem. Rostliny za stresových podmínek hromadí prolin ke hladinám, které by již normálně syntézu prolinu inhibovaly (Hong *et al.* 2000). Stejně jako u bakterií může být tedy pozměňována citlivost prvního enzymu

dráhy ke konečnému produktu modifikací různých aminokyselinových zbytků. Dosud však není jasné, zda tyto bodové mutace ovlivňují přímo allosterické místo enzymu nebo na toto místo působí přes změnu konformace P5CS (Hong *et al.* 2000). Za stresových podmínek se zvyšuje i aktivita P5CR (Mattioni *et al.* 1997, Delauney a Verma 1990), i když tento enzym není limitujícím prvkem biosyntézy prolinu a zvýšená aktivita P5CR nemusí souviset s jeho expresí (Mattioni *et al.* 1997).

Aktivita P5CS je kromě konečného produktu regulována i dostupností substrátu – při vodním stresu a vysoké koncentraci solí může zvýšená dostupnost glutamátu napomoci k vyšší produkci prolinu (Kavi Kishor *et al.* 1995). Za normálních podmínek se u rostlin uplatňují dráhy obě - glutamátová i ornithinová (Delauney *et al.* 1993). Protein ESK1 funguje v absenci stresu jako negativní regulátor exprese P5CS a zřejmě i zabraňuje akumulaci transkriptu RAB18 a rozpustných cukrů, jak naznačují izolované mutanty *Arabidopsis* (Xin a Browse 1998). Situace se však mění, dostanou-li se rostliny do nepříznivých podmínek či jsou-li limitovány dusíkem. Pak převažuje dráha syntetizující prolin z glutamátu, např. vysoká koncentrace solí přímo potlačuje expresi OAT a naopak indukuje P5CS (Hare *et al.* 1999). Je-li rostlinám dusík poskytnut, produkce prolinu se zvyšuje – jsou tedy aktivovány obě dráhy (Kavi Kishor *et al.* 1995). Při nadbytku dusíku je naopak ve větší míře aktivována dráha ornithinová (Delauney *et al.* 1993).

Degradace této aminokyseliny je regulována na úrovni prolindehydrogenasy, tedy opět prvního enzymu dráhy, jehož exprese je indukována aplikací exogenního prolinu a rehydratací, naopak potlačena dehydratací (Kirosue *et al.* 1996, Nakashima *et al.* 1998, Nanjo *et al.* 1999a, Mani *et al.* 2002).

3.2.3.2.1. Regulace exprese genů biosyntézy a katabolismu prolinu

Indukce určitých genů může být součástí primární odpovědi na stres, což zmírňuje poškození rostliny. Různé geny mohou být ovšem indukovány i vlivem sekundárních poškození (např. denaturací proteinů nebo inaktivací regulačních komponent) (Hare *et al.* 1999).

U *Arabidopsis thaliana*, vojtěšky (*Medicago sativa*) a rajčete (*Lycopersicon esculentum*) je P5CS kódována dvěma různě regulovanými geny (Hare *et al.* 1999). AtP5CS1 (P5CS z *A. thaliana*) se vyskytuje ve většině rostlinných orgánů kromě dělících se pletiv (v absenci stresu), zatímco AtP5CS2 je syntetizována v dělících se buňkách, v ostatních pletivech pak v menší míře (Strizhov *et al.* 1997).

Hromadění AtP5CS mRNA je regulováno tkáňově specificky a indukováno stresem sucha, vysokou koncentrací solí, kyselinou abscisovou a v menší míře i auxinem (Strizhov *et al.* 1997). Během stresu ze zasolení dochází k dvoufázové indukci AtP5CS1 a jen mechanismus počáteční fáze indukce je nezávislý na syntéze nových proteinů. Naopak akumulace AtP5CS2 mRNA je pomalejší a plně závislá na syntéze nových proteinů – tzn., že faktory umožňující transkripční aktivaci u nestresovaných buněk konstitutivně přítomny nejsou (Hare *et al.* 1999). Akumulaci P5CS transkriptů při chladovém a osmotickém stresu tedy regulují, alespoň u *Arabidopsis*, dvě různé dráhy (Hare *et al.* 1999).

Mutace ovlivňující vnímání ABA a auxinu (*abi1* a *axr2*) snižují během salinity akumulaci obou AtP5CS transkriptů (Strizhov *et al.* 1997). U mutací *abi2* a *abi3* žádný vliv na indukci *AtP5CS* genů při zasolení pozorován nebyl (Strizhov *et al.* 1997). Strizhov *et al.* (1997) na základě svých výsledků navrhli, že syntéza prolinu je regulována pomocí ABA.

Naproti tomu Savouré *et al.* (1997) ukázali, že exprese genů biosyntetické dráhy prolinu sice může být při chladovém a osmotickém stresu spuštěna exogenně aplikovanou ABA, ale přitom nemusí být závislá na endogenní hladině tohoto fytohormonu. Při zasolení ovšem endogenní obsah ABA akumulaci prolinu ovlivňuje. Proto se lze domnívat, že akumulace prolinu je regulována posttranskripčně a drahami závislými i nezávislými na ABA, které spolu interagují. Regulace může navíc záviset na typu stresového ošetření (Savouré *et al.* 1997, Trotel-Aziz *et al.* 2003). Posttranskripční regulace AtP5CS1 je narušena mutací v genu *ABI1*, posttranskripční regulace AtP5CS2 probíhá na úrovni stabilizace tohoto transkriptu pomocí ABA (Savouré *et al.* 1997). AtP5CR se po aplikaci ABA neakumulovala (Savouré *et al.* 1997).

U pšenice (*Triticum aestivum*) docházelo při otužování nejprve ke zvýšení osmolarity, poté vzrostla hladina ABA, následně se začal hromadit prolin a navíc vzrostla i mrazová tolerance (Lalk a Dörfpling 1985). ABA by mohla do určité míry regulovat jak akumulaci prolinu při osmotickém stresu, tak jeho následnou mobilizaci poté, co se rostlina dostane opět do normálních podmínek, jelikož změny hladin ABA (u listových disků řepky *Brassica napus*) předcházely změnám v obsahu prolinu (Trotel-Aziz *et al.* 2000). Hladiny ABA obecně dosahují maxima krátce po počátku stresu a poté klesají až k hladinám, jichž ABA dosahuje za normálních podmínek, ačkoli stresová situace stále přetrvává (Hare *et al.* 1999). Inhibiční vliv ABA na mobilizaci prolinu je zřejmě zprostředkován jak aktivací jeho biosyntézy, tak inhibicí katabolismu

(zejména snížením exprese i aktivity PDH) a tyto procesy jsou závislé na světle (Trotel-Aziz *et al.* 2000, Trotel-Aziz *et al.* 2003). Rychlosť spotřeby prolinu po navrácení rostlin do normálních podmínek je závislá na množství prolinu nahromaděného během stresu (Trotel-Aziz *et al.* 2000). ABA pomáhá stabilizovat membrány zvyšováním aktivit enzymů vychytávajících aktivní formy kyslíku (katalasa, askorbátperoxidasa a superoxiddismutasa) a zabráňuje tak u chladově tolerantních rostlin úniku prolinu z buněk. Ten pak dále napomáhá chránit membrány vychytáváním ROS a snižováním peroxidace lipidů. U chladově citlivých rostlin nedochází ke zmíněné stabilizaci membrán pomocí ABA, a proto zvyšování syntézy prolinu u těchto rostlin nezlepšuje chladovou toleranci (Chen a Li 2002b).

3.2.3.2.2. Syntéza prolinu ve vztahu k metabolismu uhlíku a dusíku

Význam integrace syntézy prolinu s asimilací energie je dokumentován skutečností, že sacharosa je pozitivním efektem akumulace prolinu a že s jeho hromaděním se zvyšuje i obsah dalších rozpustných cukrů (Hare *et al.* 1999, Hellmann *et al.* 2000, Larher *et al.* 1993, Balibrea *et al.* 1997, Clifford *et al.* 1998). Naopak PDH je sacharosou inhibována (Hellmann *et al.* 2000). Světlem byla indukována jak akumulace prolinu, tak aktivita nitrátreduktasy (NR) v přítomnosti i absenci stresu. U semenáčků rýže preinkubovaných v glukose se již po ovlivnění světlem hladina prolinu příliš nezvyšovala, což je dalším důkazem pro roli cukrů v indukci akumulace prolinu. Tak, jak obsah prolinu vzrůstal a klesal za světla a tmy v rostlinách *Arabidopsis*, fluktuovaly i hladiny mRNA a proteinů P5CS a PDH. Exprese těchto dvou genů citlivě reagovala na jemné změny ve vodním statusu buňky (Hayashi *et al.* 2000). Při vodním stresu pak aktivita NR klesá, obsah prolinu se naopak zvyšuje (Pandey a Agarwal 1998).

Další spojení mezi metabolismem uhlíku, dusíku a stresovou reakcí naznačuje společná regulace promotoru pro patatin cukrem a prolinem a přecitlivělost *rsr 1-1* (*reduced sugar response*) mutanta k prolinu (Hellmann *et al.* 2000).

Toxické intermediáty syntézy a degradace prolinu, GSA a P5C, kromě toho, že slouží jako regulátory stresových odpovědí buňky, mohou vyvolat u rostlin i živočichů buněčnou smrt (Hellmann *et al.* 2000). Přecitlivělost PDH antisense mutantů k exogennímu prolinu dokumentovali Tateishi *et al.* (2005) u tabáku a Mani *et al.* (2002) u *Arabidopsis*. Nelze určit, která ze sloučenin je v tomto směru aktivní, jelikož jsou ve spontánní rovnováze (Deuschle *et al.* 2001). Také u linií lidských nádorových

buněk nadprodukce PDH i P5C indukovala apoptosu (Maxwell a Davis 2000). Proces syntézy, katabolismu i transportu prolinu musí být proto přesně regulován, čemuž odpovídá odpojená indukce *AtPDH* a *AtP5CDH* genů i skutečnost, že změněné hladiny AtPDH pouze slabě modifikovaly akumulaci volného prolinu a dopad na vývoj a růst rostlin byl minimální. Navíc se zde může uplatňovat i genová redundancy (Mani *et al.* 2002). P5CDH se účastní inhibice hypersensitivních reakcí a prevence smrti buňky, proto je konstitutivně exprimována ve všech buňkách, nejvíce však v květech, které při normálních podmínkách obsahují nejvyšší hladiny prolinu (Deuschle *et al.* 2001). U kvasinkového (*Saccharomyces cerevisiae*) mutanta deficientního na P5CDH došlo k inhibici růstu a vyšší produkci ROS (Deuschle *et al.* 2001).

Degradace prolinu slouží jako signál pro obnovení metabolismu po stresu a *AtRSR1* zajišťuje indukci promotoru pro patatin i dalších endogenních genů. *AtRSR1* navíc předchází toxicitě degradačních produktů prolinu, jelikož je negativním regulátorem exprese PDH. Mutace v genu *AtRSR1* narušuje obě zmíněné funkce (Hellmann *et al.* 2000).

V přítomnosti prolinu a absenci přednostního zdroje dusíku je schopna *S. cerevisiae* využívat jako zdroj dusíku právě prolin. V těchto podmínkách dojde k indukci transkripčního regulátoru Put3p, který ovlivňuje expresi *PUT1* a *PUT2*, tedy genů utilizace prolinu (prolinoxidasy a P5C reduktasadehydrogenasy). Put3p je regulován na úrovni své aktivity a je-li hyperfosforylován, posouvá se z inaktivního do aktivního stavu pomocí konformačních změn vyvolaných prolinem (Des Etages *et al.* 2001).

Sivakumar *et al.* (2001) ukázali, že prolin potlačuje aktivitu Rubisca oslabováním hydrofobních interakcí mezi malými podjednotkami, a tím podněcuje jejich disociaci z oktamerního jádra velkých podjednotek. Tato inhibice je, narozdíl od potlačení aktivity Rubisca solí, nevratná (Sivakumar *et al.* 2001).

3.2.3.2.3. Regulace dostupnosti prekurzorů biosyntézy prolinu

Na zvýšenou syntézu prolinu během osmotického stresu u *Arabidopsis* mají rovněž vliv aminokyseliny glutamát, ornithin, arginin a glutamin (Hare *et al.* 1999). Ornithin je vytvářen z argininu a přispívá k tvorbě prolinu přes syntézu glutamátu a GSA (Dierks-Venting a Tonelli 1982, Charest a Phan 1990). Jestli se ornithin zapojí do močovinového cyklu nebo je katabolisován na prolin, závisí na allosterické regulaci arginasy prolinem (Charest a Phan 1990). Tvorbu glutamové kyseliny a GSA zvyšují při

chladové aklimatizaci změny v aktivitě a aktivační energii ornithintransaminasy (Charest a Phan 1990). OAT ovšem napomáhala syntéze prolinu za stresových podmínek pouze u semenáčků, nikoliv dospělých rostlin *Arabidopsis* (Hare *et al.* 1999). Za nízkých teplot se ve větší míře syntetizuje také glutamin, čehož je dosáhnuto vyšší aktivitou glutaminsynthetasy (GS) za těchto podmínek (Charest a Phan 1990).

3.2.3.2.4. Vliv polyaminů na syntézu prolinu

Naopak glycinbetain a polyaminy, alespoň *in vitro*, potlačují syntézu prolinu (Larher *et al.* 1996, Larher *et al.* 1998). Spermin působí proti senescenci a zabraňuje rozpadu chlorofylu i proteolýze. Inhibicí proteáz, které uvolňují aminokyseliny potřebné pro syntézu prolinu, zabraňuje jeho akumulaci. Spermin navíc inhibuje přeměnu aminokyselin, hlavně glutamátu, na prolin, a to zřejmě na úrovni glutaminsynthetasy (Larher *et al.* 1998). Před akumulací prolinu dochází nejprve k mírnému zvýšení hladin polyaminů, což by se posléze mohlo podílet na indukci hromadění prolinu při stresu. Polyaminy a prolin mají navíc stejný prekurzor, glutamát (Larher *et al.* 1998).

3.2.3.2.5. Reciproční regulace P5CS a PDH

Enzymy P5CS a PDH katalyzují kroky syntézy a degradace prolinu, které limitují rychlosť celého procesu (Kavi Kishor *et al.* 1995, Yoshioka *et al.* 1995, Zhang *et al.* 1995, Nanjo *et al.* 1999b, Hellmann *et al.* 2000, Hong *et al.* 2000, Mani *et al.* 2002, Tateishi *et al.* 2005). Geny kódující tyto enzymy jsou regulovány recipročně a podle prostředí (Peng *et al.* 1996, Hayashi *et al.* 2000, Trotel-Aziz *et al.* 2003), takže existuje reálný předpoklad pro existenci společné signální kaskády P5CS a PDH (Hare *et al.* 1999). Před patrnou akumulací prolinu dochází k přechodnému hromadění transkriptu AtPDH společně s transkriptem AtP5CS1, který je velmi rychle indukován. To svědčí o významu cyklování mezi prolinem a jeho prekuryzory pro zajištění homeostáze při mírných fluktuacích podmínek prostředí nebo v časných etapách stresu (Hare *et al.* 1998). V přizpůsobování se nepříznivým podmínkám je zřejmě důležitější sama syntéza prolinu, nikoliv dosažené hladiny tohoto osmolytu (Hare a Cress 1997, Hare *et al.* 1998). Neméně významný by mohl být aspekt indukce akumulace osmolytů v časných etapách stresu (Maggio *et al.* 1997).

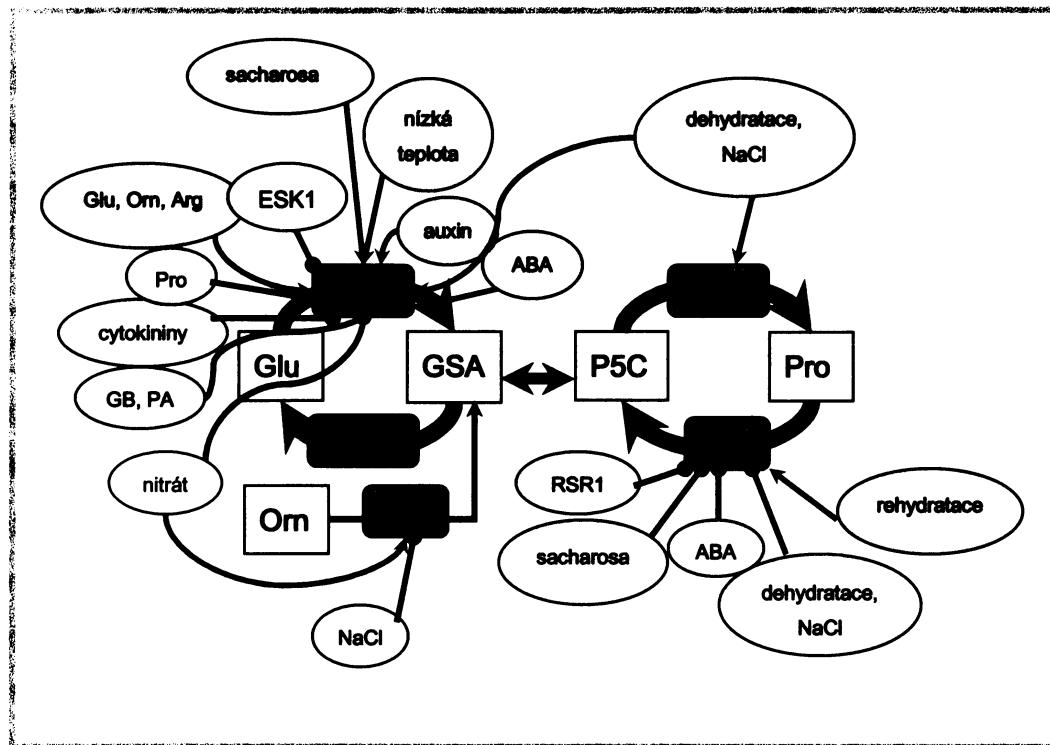
3.2.3.2.6. Prolin ve vztahu ke kvetení

Nedávno bylo navíc zjištěno, že gen pro P5CS je ovlivňován CONSTANS faktorem, jenž podporuje kvetení *Arabidopsis thaliana* při dlouhé fotoperiodě (Samach *et al.* 2000) a rostlinný onkogen *rolD*, rovněž podporující kvetení (Mauro *et al.* 1996), kóduje ornithincyclodeaminasu. Ta přímo přeměňuje ornithin na prolin a zajišťuje tím zvýšení hladiny prolinu za nestresových podmínek (Trovato *et al.* 2001). Aktivita PDH promotoru je snížena během dehydratace, naopak zvýšena během rehydratace a navíc je regulován i vývojově – je aktivní zejména v květních částech bohatých na prolin a sama tato aminokyselina dokáže promotor aktivovat (Nakashima *et al.* 1998). V absenci stresu exprese *AtPDH* koreluje s obsahem volného prolinu (Verbruggen *et al.* 1996).

3.2.3.2.7. Prolin jako signální molekula

Prolin funguje jako regulační molekula schopná ovlivňovat svůj vlastní metabolismus i expresi různých dalších genů (Hellmann *et al.* 2000, Maggio *et al.* 2002). Expresi některých osmoticky regulovaných genů indukuje také intermediáty biosyntézy a degradace prolinu, např. glutamin či P5C (Iyer a Caplan 1998). Změnou v syntéze a degradaci prolinu za stresových podmínek dochází ke změnám v buněčném redox potenciálu. Tyto změny ovlivňují průběh signálních kaskád, což se následně odráží v pozměněné genové expresi (Hare a Cress 1997, Hare *et al.* 1998). Kromě změny redox potenciálu produkce NADP⁺ glutamátovou dráhou podporuje tvorbu ribosa-5-fosfátu, purinového prekurzoru, a tím se podílí na pozměňování biosyntézy ureidů. Ty jsou zapotřebí pro skladování a transport dusíku u hlízek rostlin fixujících dusík. Kromě toho je určité množství prolinu syntetizovaného v cytosolu rostliny rozloženo uvnitř endosymbionta pomocí PDH (Kohl *et al.* 1988).

Zjednodušené schéma regulace syntézy a degradace prolinu viz obr. 3.8.



Obr. 3.8. Zjednodušené schéma regulace syntézy a degradace prolinu u rostlin.

- pozitivní akce: →
- negativní akce: ←
- ABA (*abscidic acid*) – kyselina abscisová; Arg – arginin; ESK1 (ESKIMO1); GB – glicinbetaín; Glu – glutamát; GSA – glutamát- γ -semialdehyd; OAT – ornithinaminotranferasa; Orn – ornithin; PA – polyaminy; P5C – Δ^1 -pyrroline-5-karboxylát; P5CDH – P5C dehydrogenasa; P5CR – P5C reduktasa; P5CS – P5C synthetasa; PDH – prolindehydrogenasa; Pro – prolin; RSR1 (*reduced sugar response*)

3.2.3.3. Funkce prolinu v rostlinách

Akumulace kompatibilních solutů, včetně prolinu, může mít mnoho různých funkcí, což je, společně s existencí rostlinných isoforem P5CS, v souladu s redundancí složité rozvětvené signální sítě, která spojuje reakce rostlin na podněty z prostředí s endogenními vývojovými programy (Hare *et al.* 1998, 1999).

3.2.3.3.1. Osmoprotekce

Nejdéle známou, avšak stále do značné míry záhadnou, funkcí prolinu je osmoprotekce (Deutch *et al.* 1984, Handa *et al.* 1986, Csonka 1989, Delauney a Verma 1993, Rascio *et al.* 1994, Kavi Kishor *et al.* 1995, Tateishi *et al.* 2005). Zvýšená syntéza prolinu u transgenního tabáku nadprodukujícího P5CS při vodním stresu kromě snížení osmotického potenciálu listové šťávy zvýšila biomasu kořenů a vývoj květů (Kavi Kishor *et al.* 1995). I exogenně dodaný prolin může udělovat rostlinám i buněčným kulturám toleranci k osmotickému stresu (Kavi Kishor *et al.* 1995).

3.2.3.3.2. Ochrana membrán

Dále se prolin, sloučenina amfifilního charakteru, podílí na stabilizaci membrán, zejména udržováním hydratační vrstvy okolo fosfolipidů nebo vložením mezi skupiny fosfolipidové hlavičky (Rudolph *et al.* 1986). Hydrofobní část molekuly prolinu reaguje s hydrofobními zbytky biopolymerů a část hydrofilní je vystavena vně – do vodné fáze (cytoplasmy) (Schobert a Tschesche 1978). Zvýšená hladina prolinu inhibovala výtok draselných iontů skrz membránu po ošetření *Anacystis nidulans* subletálními koncentracemi mědi. Ještě lepších výsledků bylo v tomto směru dosaženo aplikací prolinu před ošetřením sinice mědí (Wu *et al.* 1995). Alternativním vysvětlením by mohla být komplementace mědi s prolinem, čímž by se snížila koncentrace volné mědi (Wu *et al.* 1995). I po vystavení chladu se prolin, společně s ABA, podílel na stabilizaci membrán buněk kukuřice (Chen a Li 2002b).

3.2.3.3.3. Stabilizace proteinů

Význam prolinu je patrný rovněž v udržování správné konformace membránových i cytoplasmatických proteinů. Prolin i glycinbetain jsou schopni indukovat při vodním stresu tvorbu obalu z molekul vody okolo proteinů, čímž udržují jejich správnou konformaci a tedy i funkčnost (Schobert a Tschesche 1978, Rascio *et al.*

1994). Interakcemi s hydrofobními zbytky proteinů ovlivňuje prolin jejich rozpustnost – váže se na proteiny hydrofobní částí a tím zvětšuje jejich hydrofilní povrch (Schobert a Tschesche 1978).

3.2.3.3.4. Ochrana před oxidačním poškozením

Velmi významnou roli hraje prolin ve vychytávání aktivních forem kyslíku (Bohnert *et al.* 1995, Hare *et al.* 1998, Hong *et al.* 2000, Saradhi *et al.* 1995). Manipulace se syntézou prolinu ovlivňuje hladiny různých antioxidantů, mimo jiné i proto, že jeden z nich, (homo)gluthation, má stejný prekurzor jako prolin – glutamát. Snižení obsahu glutamátu může mít tedy příčinu ve vyšší syntéze redukovaného glutathionu (GSH), prolinu nebo obou (Kocsy *et al.* 2005). Superoxiddismutasa katalyzuje detoxifikaci superoxidu za vzniku peroxidu vodíku, který je následně degradován v askorbát-glutathionovém cyklu. Toho se účastní několik složek: redukovaný glutathion, askorbát (AsA), askorbátperoxidasa a glutathionreduktasa (May *et al.* 1998, Noctor a Foyer 1998, Pastori a Foyer 2002). GSH a hGSH (redukovaný homoglutathion) se také podílejí na detoxifikaci lipidových peroxidů. Reakce je katalyzována glutathion-S-transferasou (GST) (Marrs 1996).

Transgenní rostliny soji obsahující cDNA P5CR v sense směru akumulovaly nejvyšší hladiny prolinu a askorbátu, zatímco u antisense transformantů byly nalezeny nejvyšší koncentrace hGSH, poměry AsA/dehydroaskorbát (DHA), (h)GSH/ oxidovaný (homo)glutathion ((h)GSSG) a aktivita askorbátperoxidasy. Po obnovení normálních podmínek vykazovaly sense transformanty mnohem menší stupeň peroxidace lipidů i procento poškození než antisense mutanty (Kocsy *et al.* 2005). Během osmotického stresu vzrostla u tolerantních genotypů pšenice *in vitro* aktivita SOD, APX i GR a tím i tolerance k oxidačnímu stresu. U citlivých genotypů se aktivita příslušných enzymů nezměnila nebo mírně klesla (Lascano *et al.* 2001).

3.2.3.3.5. Udržování pH

Prolin může sloužit i jako prostředek ke snižování kyselosti cytoplasmy, a tím udržovat pH příznivé pro vnitrobuněčné procesy. Lze ho tedy považovat za jakýsi intracelulární pufr (Hare a Cress 1997, Hare *et al.* 1998). Když se buňka ocitne ve stresových podmínkách, prolin ji svými funkciemi napomáhá vytvořit a udržovat novou homeostázi, nutnou pro zachování bazálního metabolismu.

3.2.3.3.6. Morfogeneze

Nedávno byla objevena specifická funkce prolinu v morfogenezi. Transgenní rostliny *Arabidopsis* s antisense P5CS vykazovaly morfologické změny v listech (morfologické abnormality epidermálních a parenchymatických buněk, zpomalení diferenciace cévního systému) a poruchu v elongaci květenství. Protože takové fenotypy byl schopen potlačit pouze L-prolin a nikoliv D-prolin ani další analoga této aminokyseliny, je zřejmé, že prolin neslouží pouze jako osmoprotektant. Deficience prolinu navíc ovlivnila speciálně strukturní proteiny buněčné stěny, které poskytují mechanickou oporu buňkám. Prolin se podílí na syntéze těchto proteinů buněčné stěny a část z něj je poté konvertována na hydroxyprolin (Nanjo *et al.* 1999b).

U transgenních kvasinek nadprodukujících prolin, které obsahovaly P5CS z rajčete, korelovala hladina prolinu v absenci stresu negativně s růstem buněk, zvýšila se úroveň ploidie a vakuolizace. Vyšší koncentrace prolinu ustila rovněž ve změnu akumulace některých transkriptů souvisejících s buněčným dělením a kontrolou genové exprese (Maggio *et al.* 2002).

3.2.3.3.7. Zdroj prvků a energie

Působení prolinu však rozhodně nekončí společně s odezněním stresových podmínek. Naopak, prolin se stává zdrojem uhlíku, dusíku, energie i redukčních ekvivalentů, a tím usnadňuje obnovení normálního metabolismu rostliny (Trotel *et al.* 1996, Verbruggen *et al.* 1996, Hare a Cress 1997, Larher *et al.* 1998). Postupnou oxidací každé molekuly prolinu a následným zapojením do Krebsova cyklu je buňka schopna získat 30 ATP (Mani *et al.* 2002), proto je považován za významné „palivo“ v energeticky intenzivních procesech jako je např. klíčení pylu (Zhang *et al.* 1982). Prolin, který vstupuje z rostlinných hostitelských buněk hlízek do endosymbiotických bakterií, je důležitým zdrojem energie pro fixaci vzdušného dusíku. Sója a další luštěniny syntetizují v cytosolu těchto buněk velká množství prolinu a endosymbionti vynikají vysokou aktivitou jeho oxidace (pomocí PDH) (Kohl *et al.* 1988).

3.2.3.4. Akumulace prolinu jako reakce na nepříznivé podmínky

Velmi častou reakcí rostlin na různé stresové podmínky je hromadění prolinu. Poprvé tento fenomén popsali Kemble a Macpherson v roce 1954 u jílku vytrvalého (*Lolium perenne*), který tak reagoval na osmotický stres. Akumulace prolinu je výsledkem regulace jeho biosyntézy, katabolismu i transportu (Nanjo *et al.* 1999a). I když ústřední roli hraje nejspíše biosyntéza prolinu, k regulaci dochází i na úrovni PDH - prvního enzymu degradace aminokyseliny (Delauney a Verma 1993, Kavi Kishor *et al.* 1995, Savouré *et al.* 1995, Yoshiha *et al.* 1995, Nanjo *et al.* 1999b, Hayashi *et al.* 2000, Hong *et al.* 2000, Trotel-Aziz *et al.* 2003). Hromadění prolinu však může ovlivňovat i změna aktivity či exprese P5CR a OAT (Charest a Phan 1990, De Ronde *et al.* 2000, Roosens *et al.* 2002, Mattioni *et al.* 1997, Delauney a Verma 1990). Ke zvyšování obsahu prolinu v pletivech přispívá také zvýšená aktivita glutamátdehydrogenasy (GDH), která přeměňuje α -ketoglutarát na glutamát, i zvýšená aktivita a snížená aktivační energie glutaminsynthetasy vedoucí ke zvýšené syntéze glutaminu (Charest a Phan 1990).

3.2.3.4.1. Nedostatek vody

Rostliny reagují hromaděním volného prolinu na stres sucha (Van Swaaij *et al.* 1985, Kavi Kishor *et al.* 1995, Yoshiha *et al.* 1995, Mattioni *et al.* 1997, Pandey a Agarwal 1998, Ain-Lhout *et al.* 2001). Bandurska a Stroinski (2003) detekovali při vodním deficitu vyšší akumulaci prolinu u rostlin ježmene tolerantních k suchu než u citlivých kultivarů. Transgenní rostliny rýže obsahující P5CS cDNA z *V. aconitifolia* pod kontrolou stresem indukovatelného promotoru nadprodukovaly P5CS a hromadily větší množství prolinu při stresu sucha i vysoké koncentraci solí. Druhá generace těchto rostlin produkovala více biomasy ve srovnání s netransformovanými kontrolami (Zhu *et al.* 1998).

3.2.3.4.2. Zasolení

Dobře dokumentována je i akumulace prolinu po vystavení rostlin vysoké koncentraci solí (Yoshiha *et al.* 1995, Mattioni *et al.* 1997, Petrusa a Winicov 1997, Zhu *et al.* 1998, Aubert *et al.* 1999a, b, Evers *et al.* 1999, Nanjo *et al.* 1999a). Při delší expozici semenáčků *Triticum durum* soli byly hladiny akumulovaného prolinu nižší než při periodě 24 hodin (Mattioni *et al.* 1997). Prolin se může hromadit u netolerantních

druhů v reakci na zvýšenou koncentraci solí v některých orgánech pomaleji než u druhů tolerantních. Např. Petrusa a Winicov (1997) ukázali, že ačkoli se prolin hromadil v prýtech všech rostlin vojtěšky vystavených soli, rychlé akumulace prolinu (během 24 hodin) byly schopny pouze kořeny tolerantních rostlin. Vyšší obsah prolinu byl u též rostliny detekovatelný rovněž v hlízkách s endosymbiotickými N-fixujícími bakteriemi – a to přímo v bakteroidech i v cytosolu hlízek (Fougère *et al.* 1991). U subantarktické rostliny z čeledi *Brassicaceae*, *Pringlea antiscorbutica*, byl prolin ve všech orgánech v reakci na zasolení hlavním akumulovaným kompatibilním solutem (Aubert *et al.* 1999a, b). Naopak zelená řasa *Prasiola crispa* kolonizující vlhké půdy Antarktidy při vyšší koncentraci solí významné rozdíly v proporcí prolinu nevykazovala (Jackson a Seppelt 1995).

3.2.3.4.3. Teplota

Zvýšenou akumulaci volného prolinu lze pozorovat po vystavení rostlin teplotním stresům, hlavně chladu. U druhů přizpůsobených podmírkám s vyššími teplotami (*Zea mays*) se prolin akumuloval v reakci na nižší teploty (10°C), naopak v *Avena sativa* L. se akumuloval tento osmolyt při 30°C. Efekty byly patrnější v kořenech než v nadzemní části (Öztürk a Szaniawski 1981). Zvýšenou hladinu prolinu v reakci na nízkou teplotu vykazovaly i suspenzní buněčné kultury kukuřice (Chen a Li 2002b) či rostliny pšenice, a to hlavně v odnožovacích uzlech, tedy pletivech, na jejichž rezistenci závisí přežití celé rostliny (Charest a Phan 1990). Rostliny *Arabidopsis* s antisensem PDH byly tolerantnější k mrazu nežli rostliny nemutované, což poskytuje další důkaz pro roli prolinu v mrazové toleranci rostlin (Nanjo *et al.* 1999a). Nízká teplota může spustit akumulaci prolinu, aniž by došlo k poklesu vodního potenciálu pletiva (Savouré *et al.* 1997). Chladové otužování v podmírkách sucha, i oba stresy samostatně, zvýšily obsahy prolinu v listech bramboru i jeho mrazovou toleranci. Účinky chladu a sucha jsou zřejmě alespoň zčásti aditivní a spouští mechanismy mrazové odolnosti samostatně (Van Swaaij *et al.* 1985). Také exogenně aplikovaný prolin zvýšil mrazovou toleranci tím, že se akumuloval v listech (Van Swaaij *et al.* 1985). Lalk a Dörffling (1985) zpozorovali vyšší akumulaci prolinu po chladové periodě mrazově tolerantnějšího kultivaru pšenice, nicméně prolin se hromadil i u kultivaru s menší tolerancí k mrazu. Antarktická řasa *Prasiola crispa* hromadila v zimním období prolin na úkor ostatních aminokyselin (tzn. došlo pouze ke kompoziční změně, ne nárůstu celkového obsahu volných aminokyselin, nejspíše z důvodu nejmenší škodlivosti prolinu pro buněčné

složky i při jeho vysokých koncentracích) a jeho obsahy negativně korelovaly s průměrnými měsíčními minimálními teplotami. Prolin se u *P. crispa* podílel na zachování fotosyntetických aktivit během mrznutí (Jackson a Seppelt 1995). Vzrůst koncentrace prolinu, který přispíval ke zvýšené mrazové toleranci, byl pozorován rovněž během chladové aklimatizace u rostlin *Arabidopsis* (Xin a Browse 1998). I vysoká teplota indukovala akumulaci prolinu – např. u rostlin soji (De Ronde *et al.* 2000) a ječmene (*Hordeum vulgare*) (Georgieva *et al.* 2003). Naopak Yoshiha *et al.* (1995) u *Arabidopsis* nezaznamenali indukci P5CS nízkou ani vysokou teplotou a Van Swaaij *et al.* (1985) zpozorovali rozdíly v mrazové toleranci i mezi některými genotypy se stejnou hladinou prolinu. Kromě možného ochranného vlivu prolinu mají tedy v mrazové toleranci velmi významnou funkci i jiné faktory (Van Swaaij *et al.* 1985).

3.2.3.4.4. Těžké kovy

Hromadění prolinu je, krom mnoha dalších mechanismů, jednou z reakcí buněk na vystavení těžkým kovům – kadmiu, kobaltu, zinku, olovu nebo mědi (Alia a Saradhi 1991, Wu *et al.* 1995, Wu *et al.* 1998, Siripornadulsil *et al.* 2002). Wu *et al.* (1995) zpozorovali pozitivní korelací mezi intracelulární hladinou prolinu a koncentrací mědi u sinice *Anacystis nidulans*. Zvýšení obsahu prolinu bylo nejvýraznější změnou v zásobě volných aminokyselin a navíc i jeho exogenní přídavek snížil inhibiční vliv mědi na růst buněk, zejména byl-li přidán před její aplikací.

Koncentrace prolinu v buňkách může vzrůstat i v reakci na znečištěné ovzduší (Wu *et al.* 1995), nepříznivé pH (Hare a Cress 1997) či UV záření (Saradhi *et al.* 1995).

3.2.3.5. Kompartmentace a transport prolinu

Aubert *et al.* (1999b) přímo vizualizovali kompartmentaci prolinu mezi vakuolou a cytoplasmou v listech *Pringlea antiscorbutica*. V cytoplasmě nalezli dvakrát až třikrát vyšší koncentraci této aminokyseliny nežli ve vakuole, která se zřejmě podílí na regulaci koncentrace cytoplasmatických solutů (např. Thom *et al.* 1982). Protoplasty *Nicotiana rustica* obsahovaly za normálních podmínek podobné koncentrace prolinu v cytoplasmě i vakuole, zatímco protoplasty rostlin vystavených vodnímu stresu hromadily třikrát více prolinu v cytoplasmě, pravděpodobně ovlivněním tonoplastového transportního systému pro prolin (Pahlich *et al.* 1983). Fricke a Pahlich (1990) zpozorovali negativní korelaci mezi celkovým obsahem prolinu v buňce a jeho procentem ve vakuole jak ve stresových, tak normálních podmínkách.

Cytoplasmatická voda je rozdělena do dvou fází – strukturně vázané („*vicinal*“) a volné („*bulk*“). Tyto fáze se liší ve schopnosti rozpouštět různé látky – např. prolin má sníženou rozpustnost kolem polymerů a v cytoplasmě tak může dojít k vnitřnímu rozdělení rozpustných látek. Vakuola a volná cytoplasmatická voda slouží jako místa přechodného skladování prolinu, zatímco ve vodě strukturně vázané dochází k metabolickým dějům spojeným se syntézou a katabolismem prolinu (Fricke a Pahlich 1990).

Zatím nejasná je role tonoplastových aminokyselinových transportérů v subcelulární kompartmentaci prolinu (Aubert *et al.* 1999b). Na úrovni interorgánového transportu už byly objeveny specifické transportéry pro prolin - ProT1 a ProT2 z *A. thaliana*. Oba jsou exprimovány v celé rostlině, ale pouze druhý z nich je silně indukován za stresu a významně se tak podílí na distribuci dusíku za nepříznivých podmínek (Rentsch *et al.* 1996).

3.2.3.6. Využití *trans*-4-hydroxy-L-prolinu k selekci rostlin s vyšší akumulací volného prolinu

Zprvu byla zkoumána rezistence k analogům aminokyselin ve snaze zajistit lepší výživnou hodnotu různých plodin změnou skladby aminokyselin v rostlině (Maliga 1984). Toxicita analogů aminokyselin vyplývá z jejich inkorporace do proteinů místo běžných aminokyselin. Analoga prolinu zřejmě navíc indukují expresi PDH a podporují tak katabolismus prolinu (Mani *et al.* 2002). Rostlina může tento toxickej efekt zmírnit nadprodukci přirozené aminokyseliny, která pak s příslušným analogem kompetuje o místa v proteinech. Transgenní rostliny ve větší míře produkující PDH, enzym rozkládající prolin, byly citlivé k analogům prolinu (Mani *et al.* 2002). Alternativní cestou rezistence je zabránění příjmu analogu nebo jeho selektivní diskriminace (Maliga 1984). Tento způsob však nevede ke zvýšené produkci přirozené aminokyseliny. Varner (1980) uvádí možnost enzymatické přeměny určitého množství analogu na přirozenou aminokyselinu, v tomto případě *trans*-4-hydroxy-L-prolinu na L-prolin. Prvním meziproduktem je s největší pravděpodobností 4,5-dehydro-L-prolin.

V dřívějších letech se studium v této oblasti zaměřilo zejména na regeneraci vyselektovaných rezistentních linií a analýzu obsahu přirozených aminokyselin v získaných regenerantech (Maliga 1984). Jedním z cílů bylo manipulovat s biosyntetickou dráhou aminokyselin vycházející z prekurzoru aspartátu, tedy threoninu, lysinu, methioninu a isoleucinu. V některých případech docházelo k orgánově specifické expresi mutace, např. pouze v kořenech (Bright *et al.* 1983) nebo v kalusech (i odvozených z regenerované rostliny) (Maliga 1984).

V pozdějších letech byla výše popsána technika aplikována na zvýšení stresové tolerance selekcí linií se zvýšeným obsahem prolinu. Jako toxickej analog byl ve většině případů použit *trans*-4-hydroxy-L-prolin. Csonka (1981) získal mutanty *Salmonella typhimurium* se zvýšenou produkci prolinu a tolerantnější k osmotickému stresu. U hydroxyprolin-rezistentních buněčných linií vojtěšky nebyla zpozorována konstitutivně zvýšená akumulace prolinu, ačkoli rostliny vykazovaly zvýšenou rezistenci k soli. Jediná získaná linie tolerantní k soli a vykazující konstitutivně vysokou hladinu prolinu však obsah prolinu po vystavení soli nezvyšovala. Rozdíl mezi citlivými (kontrolními) a tolerantními regeneranty byl v dvojnásobně rychlejší akumulaci prolinu v kořenech tolerantních rostlin po expozici soli (Petrusa a Winicov 1997). To, že rezistence vůči hydroxyprolinu má zřejmě i jinou příčinu než konstitutivně zvýšenou hladinu přirozené

aminokyseliny, naznačují výsledky experimentů Maggio *et al.* (1997) s buněčnými liniemi mrkve (*Daucus carota*). Autoři nezpozorovali významnou korelaci mezi rezistencí linií k hydroxyprolinu a obsahem prolinu v buňkách. V těchto případech mohlo dojít ke změnám membránového transportního systému, který by blokoval příjem toxicických analogů, a tím by snížil hladinu prolinu potřebnou k rozředění hydroxyprolinu (Maggio *et al.* 1997). Osmotolerance buněk mrkve se navíc měnila s vývojovým stádiem. Autoři se tudíž domnívají, že rostliny, jež produkují mírně zvýšené hladiny prolinu, mohou vykazovat toleranci vůči osmotickému stresu třeba jen v určitém specifickém stádiu vývoje. Jakým mechanismem, je nejasné (Maggio *et al.* 1997).

Jedny z prvních pokusů o produkci mrazově tolerantních rostlin pomocí *in vitro* selekce hydroxyprolinem byly provedeny na kalusových kulturách bramboru (*Solanum tuberosum* L.) (Van Swaaij *et al.* 1987). Rezistentní rostliny produkovaly větší množství celkových aminokyselin a vykazovaly zvýšenou mrazovou toleranci. Selektované vlastnosti si udržely jak regenerované rostliny, tak rostliny získané vegetativním množením pomocí hlízek. K podobným výsledkům později dospěli i Anjum a Villiers (1998). Hydroxyprolin-rezistentní linie pšenice také akumulovaly prolin ve větší míře a byly mrazově tolerantnější než kontrolní kalusy. Kromě těchto vlastností byl zaznamenán nárůst suché hmotnosti a pokles osmotického potenciálu. Ten však koreloval s vyšší mrazovou tolerancí kalusů více než obsah volného prolinu (Tantau a Dörffling 1991). O dva roky později dospěli Dörffling *et al.* (1993) k podobným výsledkům, kalusy již ale byly embryogenní, což umožnilo studii dědičnosti těchto vlastností. Regenerované hydroxyprolin-rezistentní rostliny i jejich potomci vykazovali po chladové aklimatizaci v dalších pěti generacích zvýšené obsahy prolinu v listech i zvýšenou mrazovou toleranci. Výsledky tedy podpořily hypotézu, že vlastnosti „zvýšený obsah prolinu“ a „zvýšená mrazová tolerance“ získané aplikací této metody u pšenice jsou dědičné. Mutace, zřejmě jednoho neúplně dominantního genu, pravděpodobně postihla nějakou z komponent regulujících biosyntézu prolinu (Dörffling *et al.* 1994, 1997a, b). K podobným závěrům dospěli Tantau *et al.* (2004), jejichž hydroxyprolin-rezistentní regeneranty ječmene byly mrazově tolerantnější než kontrolní regeneranty po devět sledovaných generacích.

Výše uvedené výsledky přispívají k názoru, že jakkoli je mrazová tolerance vlastnost polygenního charakteru, lze ji významně zlepšit i změnou jediného determinujícího faktoru (Tantau *et al.* 2004).

3.3. Řepka olejka v České republice

O tom, že řepka olejka (*Brassica napus* L. var. *napus*) je naší typickou plodinou, z olejin dokonce nejrozšířenější, nás během května lehce přesvědčí rozkvetlé žluté plochy rozprostírající se na mnohých místech naší vlasti. Drtivou většinu z nich pokrývají různé odrůdy ozimého typu. Řepka je rostlinnou dlouhodenní a vcelomilnou, třebaže může být z větší části samosprašná. Na konci vegetační sezóny, která se v našich podmínkách pohybuje v rozmezí 300 až 340 dnů, se čtyřčetné květy mění ve většinou dvouradé šešule s 15 až 20 semeny. Ačkoli má řepka u nás dlouholetnou tradici jak v pěstování, tak i šlechtění, její původní výskyt je vázán na oblast Středomoří. Ještě dříve se však v těchto oblastech vyskytovaly i další brukvovité rostliny – zejména bruķev zelná (*B. oleracea*) a řepice olejná (*B. rapa*). A jejich přirozená hybridizace dala vznik řepce, jež se proto označuje jako amfialotetraploid (v diploidní sestavě má 38 chromosomů, což je výsledek splynutí genomů brukve zelné s 18 chromosomy a řepice s 20 chromosomy). Rozšíření této plodiny je spjato s kulturou člověka, proto se s ní dnes můžeme setkat v celé oblasti mírného pásmu Země a také v některých oblastech subtropů. Původně byla řepka oblíbenou zeleninou. Již ve středověku byla ale kromě potravinářství využívána k výrobě různých olejů a ve dvacátém století se její uplatnění dále rozšiřovalo. Nejenže zůstala potravinářskou surovinou, ale extrahované šrot, pokrutiny i semena se přidávají do krmných směsí, biomasu lze využít i jako zelené krmení nebo hnojivo. V současné době se ve větší míře rozvíjí její uplatnění v oleochemii a v neposlední řadě, lze ji využít k výrobě ekologického paliva, tzv. bionafty.

Počátky šlechtění řepky na našem území sahají až do dob vlády T. G. Masaryka. Naše první vyšlechtěné odrůdy, Třebíčská a Slapská, byly povoleny až později - v letech 1941 a 1946. Na trhu se obě odrůdy udržely do osmdesátých let a poté je vystřídaly odrůdy s nízkým obsahem nežádoucí kyseliny erukové („0“ odrůdy). V devadesátých letech nastoupily tzv. dvounulové („00“) odrůdy - nejen se sníženou kyselinou erukovou, ale také s nízkými obsahy antinutričních látek, v tomto případě glukosinolátů (GSL), polymerů glukosy. Na světových trzích se již vyskytují i tří- a čtyř- nulové odrůdy – navíc k dvounulovým odrůdám ještě se sníženým obsahem vlákniny a kyseliny linolenové. Šlechtí se i na snížený obsah dalších antinutričních látek, S-methylcysteinsulfoxidu (SMCO) v rostlinách a sinapinu v semeně.

Požadavky na kvalitu ozimé řepky jsou dány jejím využitím - v potravinářském, krmivářském nebo chemickém průmyslu. Pro potravinářský průmysl jsou vhodné dostupné „00“ odrůdy, pro průmyslové využití postačí odrůdy typu „E0“ (vysoký obsah kyseliny erukové, nízký obsah GSL). Zde je však další požadavek – na snížení obsahu vlákniny ve prospěch vyššího obsahu oleje a bílkovin. Další snahou je u odrůd určených pro potravinářský průmysl zvyšovat obsah kyseliny linolové a olejové, naopak snížit hladinu kyseliny linolenové.

Za účelem vytvoření nových odrůd přizpůsobených našim půdním i klimatickým podmínkám vzniklo v roce 1997 sdružení „Česká řepka“ na základě dohody o spolupráci několika šlechtitelských společností a výzkumných pracovišť, konkrétně Oseva PRO s.r.o. - Výzkumný ústav olejin Opava (VÚOL), Sempra a.s. - Šlechtitelská stanice Slapy u Tábora, Selgen a.s. - Šlechtitelská stanice Chlumec nad Cidlinou, AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby s.r.o. Šumperk a Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně (VÚRV), zabývajících se problematikou šlechtění řepky od základního výzkumu až po vytvoření nových odrůd. Cílem „České řepky“ je „zefektivnit a urychlit proces šlechtění odrůd ozimé řepky s vysokou kvalitou a výnosem, odolných k abiotickým i biotickým stresům“ pomocí biotechnologických metod jako jsou *in vitro* kultury, produkce dihaploidních linií a využití molekulárních markerů. Jedním z dílčích cílů je také získat výchozí šlechtitelské materiály se zvýšenou mrazuvzdorností, což je tématem předložené diplomové práce.

3.3.1. Mikrosporové kultury

Významným přínosem nejen v oblasti základního výzkumu, ale zejména na poli aplikované biologie, jsou biotechnologické metody - mikrosporové a prašníkové kultury, pomocí nichž lze přesměrovat gametofytický vývoj na vývoj sporofytický a získat tak haploidní rostliny. Zdvojením chromosomů získané dihaploidní rostliny jsou vynikajícím materiélem pro výzkum, šlechtění i transformaci rostlin (přehled využití dihaploidů ve šlechtění ozimé řepky viz Kučera *et al.* 2002). Nespornou výhodou takových metod je nejen výrazné časové zkrácení ve šlechtění nových odrůd, ale v kombinaci s *in vitro* selekcí také možnost podchycení i recessivně založených znaků či spontánních mutací.

V přirozených podmínkách se z haploidních mikrospor postupně vyvíjí pylové zrno. Výsledkem určitých chemických nebo fyzikálních podnětů se však mohou

mikrospory vydat cestou androgeneze, která vyžaduje přepnutí vývojového programu. Takové přepnutí může být laboratorně vyvoláno různými stresovými situacemi, v závislosti na druhu i odrůdě použité rostliny – např. teplotním šokem, γ -zářením, ethanolem, hladověním, osmotickým stresem nebo kolchicinem (Binarova *et al.* 1997, Wang *et al.* 2000). Stresový podnět lze aplikovat na kvetenství, izolované prašníky či izolované mikrospory, opět s různou účinností dle typu použitého materiálu (Wang *et al.* 2000). Po úspěšném přesměrování vývoje mikrospory se buňky dále mitoticky dělí, diferencují, tvoří mnohobuněčné útvary a ty poté regenerují v haploidní rostliny.

Faktorů ovlivňujících úspěšnou produkci dihaploidních materiálů je hned několik – fyziologický stav a především genotyp donorových rostlin, způsob stresového ošetření, vývojové stádium mikrospor, vhodné podmínky kultivace – od založení mikrosporových kultur po regeneraci celistvých rostlin a správně zvolená metoda diploidizace. Nejlepším prostředím pro pěstování donorových rostlin jsou jejich přirozené podmínky pro kvetení s minimalizací stresů a infekcí (za účelem prodloužení období odběru kvetenství je teplota obvykle nižší, např. u ozimé řepky 15 až 20°C). Pro úspěšnou indukci embryogeneze v mikrosporových kulturách druhu *Brassica napus* je nevhodnější pozdně jednojaderné, případně časně dvoujaderné stádium mikrospory (Pechan a Keller 1988). Nevhodnější neznamená jediné, což experimentálně potvrdili Binarova *et al.* (1997), když dokázali indukovat embryogenezi pozdně dvoubuněčných mikrospor *B. napus* pozměněnými stresovými podmínkami – kromě mírného tepelného stresu (32°C) běžně používaného pro tento druh navíc aplikovali krátký tepelný šok (41°C). Tím došlo k syntéze DNA jak v generativním, tak ve vegetativním jádru (obě jádra podstupují S-fázi buněčného cyklu), přestavbě cytoskeletu a syntéze HSP70 (HSP s molekulovou hmotností 70 kDa), jejichž lokalizace se navíc změnila na jadernou (Binarova *et al.* 1997). Pouze vegetativní buňka, setrvávající do toho okamžiku v G1 fázi se po následné S-fázi buněčného cyklu dělí a dává vzniknout embryu. Přestavění cytoskeletárních struktur je úzce spojeno s charakteristicky symetrickým prvním mitotickým dělením po indukci sporofytického vývoje mikrospor. Za normálních podmínek se cytoskelet podílí na asymetrickém umístění jader a následné inekvální první pylové mitóze. Přestavba mikrotubulů, replikace DNA spolu se syntézou a jadernou lokalizací HSP70 silně koreluje s indukcí embryogeneze (ve všech zmíněných vývojových stádiích mikrospor) (Binarova *et al.* 1997). Pro potenciálně embryogenní mikrospory je charakteristická světlá cytoplasma, jež neobsahuje škrobová zrna. Obrovská vakuola nejprve tlačí jádro k okraji buňky. Na rozdíl od pozdních stádií se

potenciálně embryogenní mikrospory krátce po založení kultury neprodlužují, ale zvětšují, jádro se opět přesouvá do středu buňky, cytoplasma kolem něj vytváří hvězdicovitou strukturu a následně se jádro symetricky dělí (Coventry *et al.* 1988, Kott *et al.* 1988). Díky poruchám v mitotickém dělení či fúzi jader mohou v dalším průběhu kultivace vznikat spontánní dihaploidi (Wang *et al.* 2000, Möllers *et al.* 1994).

Další vývoj mikrospor může probíhat buď cestou přímé či sekundární embryogeneze nebo cestou tvorby kalusů. Sekundární embryogenezi lze u *B. napus* vyvolat, jsou-li embrya kultivována při nízké hustotě a za tmy (případně nízké ozářenosti). Alternativou může být mechanické poškození embryí nebo přídavek auxinu do kultivačního média, přičemž žádoucí je přítomnost hypokotylární části, protože má vyšší embryogenní kapacitu (Nehlin *et al.* 1995).

Jelikož je indukce androgeneze umožněna aplikací různých stresů, je za jeden z nejdůležitějších signálních prvků považován stresový hormon, kyselina abscisová. ABA pravděpodobně brání smrti mikrospor a zároveň potlačuje jejich vývoj směrem ke zralému pylu. Dalším krokem je zřejmě aktivace MAP-kinasové kaskády pomocí signální dráhy kyseliny abscisové, která zřejmě následně indukuje symetrické dělení a diferenciaci mikrospor (Hirt 2000, Wang *et al.* 2000).

Wang *et al.* (2000) zmínili významnou paralelu mezi androgenezí a vývojem haploidních spor u mechů a kapradin. U nich se ze spor vyvíjí haploidní mnohobuněčný prvoklíček, u mechů tvořící vlastní rostlinku. U kapradin zůstává tato struktura malá a vytváří gamety. Třebaže byl v průběhu evoluce gametofyt i vývoj haploidních spor do mnohobuněčných struktur stále více redukován, tato cesta je u rostlin dosud přítomna, lze ji určitými podněty aktivovat a vyvolat tak androgenezi.

Nejprve byla k indukci androgeneze u *B. napus* použita metoda prašníkových kultur – jako první ji aplikovali Thomas a Wenzel v roce 1975, poté Licher (1982) vyvinul metodu tvorby embryí přímo z izolovaných mikrospor. Oba přístupy se v následujících letech rozvíjely a modifikovaly, přičemž později u *B. napus* převládly kultury mikrosporové. Důvodem byla hlavně konkurence mikrospor uvnitř prašníků a inhibiční látky produkované jejich stěnou, což vedlo k menšímu zisku embryí než v případě mikrosporových kultur (Licher *et al.* 1988, Zelenková 1991). Autotoxicita není ovšem doménou prašníkových kultur, inhibiční látky jsou také produkované neembryogenními starými mikrosporami, které se mění v pylová zrna, praskají a jejich obsah se vylévá do kultivačního média (Chuong *et al.* 1988, Kott *et al.* 1988). Nejen že je tím snížena embryogeneze, ale také se mění morfologie embryí. Pro snížení hladiny

těchto toxinů je proto vhodná výměna média, přibližně po 24 hodinách, kdy už je většina toxinu vypuštěna v médiu (Kott *et al.* 1988). Hustota mikrospor v kultuře by neměla přesahovat 100 000 spor/ml (Polsoni *et al.* 1988).

Na tvorbu embryí mají vliv fyziologické podmínky donorových rostlin a hustota jejich sadby (Chuong *et al.* 1988). Neméně důležité je stáří květenství – nejproduktivnější bývají poupatá odebraná z rostlin zhruba týden po prvním kvetení, naopak rozdíl mezi poupaty postranních větví a terminálního květenství nebyl, pakliže byla odebrána poupatá s vhodným vývojovým stádiem mikrospor. To se pohybuje za běžných indukčních podmínek (mírně zvýšená teplota) od pozdně jednojaderného (G2-nebo M-fázni jádro) k časně dvoujadernému (vegetativní jádro ve fázi G1) (Chuong *et al.* 1988, Pechan a Keller 1988). Vhodná stádia mikrospor se obvykle nacházejí v poupatech s poměry korunní plátek/prášník $\frac{1}{4}$ až $\frac{3}{4}$ (Chuong *et al.* 1988) nebo s velikostí poupěte přibližně 2 až 5 mm. Nutná je cytologická analýza vývojového stádia mikrospor – potenciálně embryogenní mikrospory jsou kulaté, s jasnou cytoplasmou bez škrobových zrn a většinou jednojaderné, přičemž jádro je natlačeno objemnou vakuolou k buněčné stěně (Coventry *et al.* 1988, Kott *et al.* 1988). Tvar i velikost mikrospor se mezi jednotlivými druhy rodu *Brassica* významně liší (Lichter 1989). Pro indukci embryogeneze izolovaných mikrospor není, narozdíl od prášníkových kultur, nutná kyselina naftyloctová (NAA, auxin), zatímco N⁶-benzyladenin (BA, cytokinin) produkci embryí zvýšil (Charne a Beversdorf 1988). Tento cytokinin se poté přidával do modifikovaného Lichterova média (NLN) jako jeho nedílná součást. NLN médium ovšem obsahuje i NAA (Polsoni *et al.* 1988). Lichter (1989) zjistil, že hormony v NLN médiu nutné nejsou, protože mikrospory produkují některé z nich, hlavně auxiny, samy, nicméně jejich přídavek do média zvyšuje výtěžek embryí.

Ke zvýšení embryogeneze lze přidat do kultivačního média určité množství kolchicinu, který jakožto antimikrotubulární látka rozrušuje cytoskeletární struktury při první pylové mitóze, které by jinak udržovaly jádro v asymetrické poloze a umožňuje tak symetrické dělení mikrospory. Kromě toho je schopen již v této fázi zdvojit chromosomy dosud haploidních mikrospor s účinností až 90%. Takové míry diploidizace lze dosáhnout aplikací kolchicinu v koncentraci 50 mg/l po dobu 24 hodin. Nespornou výhodou je rovněž menší časová náročnost než při běžné metodě diploidizace celých rostlin a menší možnost přímého styku s tímto teratogenem (Chen *et al.* 1994, Igbal *et al.* 1994, Möllers *et al.* 1994, Weber *et al.* 2005). Bez jakéhokoliv

ošetření je např. přibližně 70 až 90% rostlin ozimé řepky haploidních (Weber *et al.* 2005, Wenzel *et al.* 1977).

Další kritérium představuje úspěšná regenerace. Pro zvýšení regenerační schopnosti lze embrya vystavit buď delší mírnější nebo kratší intenzivnější periodě vysoušení. Zejména pro ozimé odrůdy řepky je však vhodnější ponechat embrya několik (9 až 12) dní v chladu (1 až 4°C) (Kott a Beversdorf 1990). Další možností je kotyledonárním embryím seříznout 2/3 děložních lístků (Klíma *et al.* 2004).

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

Pro pokusy byly použity donorové rostliny ozimé řepky *Brassica napus* L. var. *napus*, jež pocházely z pracovišť šlechtitelských organizací Selgen a Sempra. Většina materiálů byly F₁ hybridy v procesu novošlechtění (označeny jako OP – z VÚOL Opava a CH – ze ŠS Chlumec nad Cidlinou). Přehled použitých materiálů je uveden v tab. 4.1. Materiály označené jako HP, pocházející rovněž z VÚOL, jsou linie v posledních fázích novošlechtění s kontrastní zimovzdorností. Z důvodů zařazení některých z HP genotypů do Státních odrůdových zkoušek nelze uvést jejich původ.

Donorové rostliny byly po dvouměsíční jarovizaci (4°C ± 2°C) pěstovány v kultivační komoře při fotoperiodě 16 hodin a teplotě 16°C den/12°C noc, s pravidelným hnojením i postříky proti houbovým patogenům a škůdcům.

CH - 993/03	I 60/4-85 x Inra 1
CH - 1045/03	I 77/8-193 x Inra 2
CH - 2008/03	A 4-37 x I 61/2
OP - 21/03	OP-1012/02 x OP-BN-08
OP - 22/03	OP-BN-07 x OP-1901/02
OP - 23/03	OP-BN-07 x OP-1101/02
OP - 24/03	OP-BN-08 x OP-BN-07
OP - 25/03	OP-1006/02 x OP-BN-08
OP - 26/03	Cando x OP-BN-08
OP - 27/03	OP-1611/02 x OP-BN-07
OP - 28/03	OP-1611/02 x Rasmus
OP - 29/03	OP-1611/02 x Ramiro

Tab. 4.1. Přehled použitých materiálů.

4.2. Metody

4.2.1. Mikrosporové kultury

Z donorových rostlin byla odebrána terminální květenství i květenství postranních větví, která obsahovala poupat dlouhá přibližně 2 až 4 mm. Ihned po odběru byla poupat umístěna ve vodní lázni do chladu. Z poupat v rozmezí 2,5 až 3,5 mm byly vypreparovány prašníky, obarveny 3% roztokem acetokarmínu a pod mikroskopem identifikováno vývojové stádium mikrospor. Na základě toho byla stanovena velikost poupat s převahou pozdně jednojaderných mikrospor. Takové mikrospory lze rozpoznat podle trojbokého až kulovitého tvaru, čiré cytoplasmy a periferně lokalizovaného jádra. Z květních stonků byla poté odebírána pod binokulární lupou poupat vhodné velikosti a bez zjevného poškození či pootevření do Petriho misky zvnějšku chlazené ledovou tříští. Přibližně třicet poupat bylo následně uzavřeno plastovou kancelářskou sponkou v síťce z monofylu a sterilizováno v 70% ethanolu 3 minuty. Tímto okamžikem počínaje probíhala veškerá manipulace s materiélem v aseptických podmínkách (sterilní box MF72, Gelaire). Síťka s poupaty byla několikrát důkladně propláchnuta v destilované vodě po dobu nejméně pěti minut, poupatá přendána do kádinky s tekutým NLN médiem (složení média viz tab. 4.2) a skleněnou tyčinkou rozmacerována. Obsah kádinky byl přefiltrován přes dvojitý nylonový filtr (100 µm a 60 µm), přelit do centrifugační kyvety a doplněn NLN médiem. Suspenze byla poté centrifugována, nejprve po deseti a poté dvakrát po pěti minutách při 100 g (centrifuga Rotofix 32, Hettich). Po každé centrifugaci byl odpipetován supernatant a k peletu doplněno chladné NLN médium. Po poslední centrifugaci bylo doplněno NLN médium na potřebný objem, suspenze promíchána a odebráno po 1 ml do každé Petriho misky. K tomu byly přidány další 4 ml buď samotného NLN média (kontrolní vzorky) nebo NLN média s různými koncentracemi *trans*-4-hydroxy-L-prolinu (Sigma-Aldrich Chemie), vždy po dvou opakováních. Výsledné koncentrace hydroxyprolinu v médiu s mikrosporami byly 1, 4, 10, 16 a 24 mM. Petriho misky byly následně uzavřeny dvojitým páskem parafilmu a umístěny do termostatu (Biological thermostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha) při 30°C a bez osvětlení. Mírným tepelným šokem vyvolané přepnutí gametofytického vývoje mikrospor na vývoj sporofytický s sebou přináší tvorbu globulárních embryí. Ta bylo možné zpozorovat zpravidla po 14 dnech kultivace a to byl také moment, kdy byly vzorky přesunuty na horizontální třepáčku (KS 260 basic, IKA) při 60 rpm do kultivační místonosti vyhřívané na 24°C ± 2°C.

s fotoperiodou 16 hodin. Po uplynutí třiceti dnů od založení mikrosporové kultury byla přeživší, přibližně 5 mm kotyledonární embrya, přenesena na pevné diferenciacní médium (složení média viz tab. 4.3). Po 5 až 7 dnech byly z embryí odříznuty asi 2/3 děložních lístků, embrya byla poté přenesena na médium regenerační (složení média viz tab. 4.4) a asi po třech týdnech na médium pro udržování a růst regenerantů (složení média viz tab. 4.5), kde byly rostliny kultivovány a klonovány delší dobu podle potřeby. Počínaje kotyledonárním stádiem byla embrya a z nich regenerované rostliny pěstovány v kultivační místnosti sice se stejným světelným režimem, ale s teplotou o 4°C nižší. Výše uvedený postup kultivace mikrospor *B. napus* je modifikací metodiky Coventry *et al.* 1988 podle Klíma *et al.* (2004).

Před vysazením do půdy byly rostliny ponořeny na 24 hodin (fotoperioda 16h, teplota 24°C ± 2°C) do roztoku kolchicinu o koncentraci 50 mg/l s přídavkem dimethylsulfoxidu (DMSO) v koncentraci 2 ml DMSO/100 ml roztoku. Zvolený způsob diploidizace podle Vyvadilová *et al.* (1993) je na pracovišti VÚRV dobře zavedenou metodou, která se zdá být zatím nejúčinnější v získávání dihaploidních rostlin *B. napus* získaných pomocí pylové embryogeneze. Po důkladném omytí rostlin od roztoku kolchicinu byly rostliny přesazeny do půdy a dopěstovány v samostatných květináčích ve skleníku do stádia, kdy mohly být umístěny do jarovizační komory (teplota 4°C ± 2°C, fotoperioda 8 hodin).

Zhruba po 60ti dnech byly odebrány vzorky listů kontrolních rostlin a hydroxyprolin-rezistentních regenerantů (vždy kontrola a příslušný Hyp-rezistentní regenerant společně) pro testy mrazové odolnosti a zároveň pro stanovení obsahu prolinu (listy pro tento účel byly ihned po odběru zmraženy v tekutém dusíku). Kromě toho byly regeneranty všech variant ještě v *in vitro* podmírkách a stádiu přibližně tří až pěti listů umístěny do jarovizační komory na 16 dní, a to za účelem získání homogennějšího materiálu pro stanovení obsahu prolinu v listech a zároveň porovnání procenta suché hmotnosti, nikoliv pro determinaci mrazové odolnosti (s ohledem na množství materiálu získaného z *in vitro* jarovizovaných rostlin).

NLN médium

<i>makroelementy</i>	mg/l
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	500
KH ₂ PO ₄	125
KNO ₃	125
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	125
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,8
<i>mikroelementy</i>	
MnSO ₄ · H ₂ O	18,94
H ₃ BO ₃	10
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	12
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025
<i>organické látky</i>	
glycin	2
myo-inositol	100
kyselina nikotinová	5
pyridoxin	0,5
thiamin	0,5
kyselina listová	0,5
biotin	0,05
glutamin	800
serin	100
glutathion	30
sacharosa	130 g/l
pH 6,0	

Diferenciační médium

<i>makroelementy</i>	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
KNO ₃	3000
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	150
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	500
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	750
FeNa-EDTA	40
<i>mikroelementy</i>	
H ₃ BO ₃	3
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025
<i>organické látky</i>	
thiamin HCl	10
pyridoxin HCl	1
kyselina nikotinová	1
myo-inositol	100
glutamin	800
serin	100
sacharosa	20 g
agar	8 g
<i>fytohormony</i>	
6-BAP	0,2
IAA	0,2
pH 5,8 - 6,0	

Tab. 4.2. Složení NLN média pro kultivaci mikrospor *B. napus* podle Licher (1985).

Tab. 4.3. Složení média pro diferenciaci embryí *B. napus* (Klima et al. 2004).

Regenerační médium

<i>makroelementy</i>	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440
FeNa-EDTA	36,7
<i>mikroelementy</i>	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025
KI	0,83
<i>organické látky</i>	
thiamin	0,1
pyridoxin	0,5
kyselina nikotinová	0,5
myo-inositol	100
glycin	2
sacharosa	10 g
agar	10 g
pH 5,9	

Tab. 4.4. Složení média pro regeneraci rostlin z embryí *B. napus* (Klíma et al. 2004).

MSd médium

<i>makroelementy</i>	mg/l
NH ₄ NO ₃	825
KNO ₃	950
KH ₂ PO ₄	85
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	185
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	220
FeNa-EDTA	18,35
<i>mikroelementy</i>	
H ₃ BO ₃	3,1
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	11,15
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	4,3
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,125
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,0125
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,0125
KI	0,415
<i>organické látky</i>	
thiamin	0,1
pyridoxin	0,5
kyselina nikotinová	0,5
myo-inositol	100
glycin	2
sacharosa	30 g
agar	8 g
<i>fytohormony</i>	
NAA	0,03
pH 5,6 - 5,8	

Tab. 4.5. Složení média pro růst a udržování regenerantů *B. napus*, modifikace Murashige-Skoog (MS) média (1962) podle Klíma et al. (2004).

4.2.2. Stanovení obsahu prolinu v listech

Obsah prolinu v listech byl stanoven podle Bates *et al.* (1973) s modifikacemi v postupu dle Prášila (ústní sdělení).

Listy byly odebírány z rostlin po šedesáti dnech jarovizace nebo z *in vitro* rostlin po šestnácti dnech chladové periody ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Vzorek byl po ponoření do tekutého dusíku lyofilizován (LYOVAC GT 2, Finn-Aqua) po dobu 24 hodin. Takto vysušený a následně rozemletý materiál byl připraven k analýze (mlýnek na rostlinný materiál IKA A10, IKA). Vzorky po aplikaci tekutého dusíku nebo lyofilizaci byly případně skladovány v mrazicím boxu při teplotě -30°C . Na analytických vahách bylo naváženo 15 až 20 mg (pro *in vitro* rostliny a pozdější pokusy 1 až 8 mg) rozemletého vzorku přesně, vždy ve dvou opakování. Do každé zkumavky bylo přidáno po 3 ml destilované vody a prolin extrahován ve vařící vodní lázni po dobu 45 minut. Obsah byl následně přelit do centrifugačních kyvet a centrifugován 25 minut při 4300 g a teplotě 4°C (centrifuga Minifuge T, Heraeus Sepatech). Do zkumavek pro vzorky bylo odpipetováno po 0,5 ml supernatantu a dodáno 1,5 ml destilované vody, do dalších zkumavek bylo odpipetováno po 2 ml kalibračních roztoků prolinu (Sigma-Aldrich Chemie), opět ve dvou opakování. Pro zajištění barevné reakce bylo do každé zkumavky přidáno po 4 ml detekčního činidla a směs vařena ve vodní lázni. Po hodině byly zkumavky z vodní lázně vyndány, vychlazeny a bylo do nich přidáno po 4 ml toluenu. Obsah každé zkumavky byl homogenizován nejméně 40 s (homogenizátor TK3S, Techno Kartell). Vzorky byly přes noc ponechány v chladové komoře (okolo 5°C), aby se ustavila vrchní barevná fáze, tedy aby se veškerý chromofor prolin-ninhydrin, extrahoval do toluenové vrstvy. Odezva barevné toluenové fáze byla měřena jako absorbance na spektrofotometru (Spekol 11, Carl Zeiss) při vlnové délce 520 nm, což je vlnová délka, při které má prolin absorpční maximum. Jako blank byl použit toluen. Koncentrace prolinu v sušině byla vypočtena podle vzorce:

$$[(\text{ml toluenu}) \times (\mu\text{g prolinu/ml})]/(\text{g vzorku} \times 2/3) = \mu\text{g prolinu/g sušiny.}$$

Příprava detekčního činidla pro stanovení obsahu prolinu v listech (pro 100 vzorků): 5 g ninhydrinu bylo rozpuštěno v 80 ml 6 M kyseliny fosforečné (tj. 57 ml 85% kys. fosforečné a 23,8 ml destilované vody) a přidáno 320 ml kyseliny octové. Činidlo je potřeba připravovat pro každou analýzu nově, neboť je stabilní pouze 24 hodin, a skladovat ho v chladu (okolo 4°C).

4.2.3. Testy mrazové odolnosti

Testy mrazové odolnosti byly prováděny podle metody Prášila a Zámečníka (1997) a Prášila (ústní sdělení). Z rostlin pěstovaných zhruba 60 dní v podmínkách chladu ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) a při 8 h fotoperiodě byly odebrány 4 listy (přibližně 3. až 4. inzerce, u daného opakování stejné). Listové terčíky o průměru 8 mm byly vytvářeny s ohledem na heterogenitu listové čepele v počtu 5 terčíků na zkumavku, vždy ve dvou opakováních. Po přemístění zkumavek do kryomatu (Ultra-Kryomat RUK 50, Messgeräte-Werk Landa; CTB 12F, Labio a.s.) s teplotou přibližně -2°C bylo kouskem ledu iniciováno extracelulární mrznutí pletiv terčíku, což se projevovalo jejich tmavším zabarvením. Po několika hodinách (nejméně 3,5) byly zkumavky přemístěny do mrazicích boxů (MHM/52, Mirkoz), kde byly vystaveny postupnému snižování teplot v průběhu 16ti hodin. Konečné teploty jednotlivých variant byly -3°C (kontrolní varianta), -10°C , -12°C , -14°C , -16°C a -30°C (kontrolní varianta). Další den byly zkumavky po přidání 12 ml destilované vody k listovým terčíkům umístěny na 1,5 hodiny na horizontální třepáčku (TE-3, Chirana) při 150 cyklech/min. a poté byla změřena vodivost roztoku (L_{t1}) na elektrickém konduktometru (OK-102/1, Radelkis). Ta je měřena ještě dvakrát – nejprve po další hodině třepání (L_{t2}) a nakonec po usmrcení vzorků (10 minut ve vařící vodní lázni) a následně půl hodině třepání (L_{tm}). Při měření vodivosti roztoku by měla být teplota pokaždé stejná, neboť hodnoty vodivosti jsou na teplotě silně závislé. Index poškození byl spočítán podle vzorce:

$$I_t(\%) = 100 (R_t - R_0) / (R_f - R_0),$$

přičemž R_0 je relativní vodivost kontrolních vzorků, R_t relativní vodivost vzorků zmražených na specifickou teplotu a R_f je relativní vodivost vzorků usmrčených mrazem. Relativní vodivost byla spočítána podle vzorce:

$$R_t (\%) = 100 L_t / L_{tm},$$

přičemž hodnota L_t představuje vodivost vzorku zmraženého na teplotu „ t “, L_{tm} pak vodivost stejněho vzorku po usmrčení varem. Pro výpočet indexu poškození byly použity hodnoty R_{t1} i R_{t2} . Pakliže docházelo ke zvyšování relativní vodivosti R_{t2} oproti R_{f1} , byly pro výpočet LT_{50} (teplota při 50% mrazovém poškození) a RIR (*relative injury rate*, popisuje rychlosť změny s ohledem na teplotu) použity oba indexy poškození (I_{t1} i I_{t2}). Výsledky byly zpracovány a statisticky zhodnoceny pomocí softwaru pro LT_{50} vyvinutého na pracovišti VÚRV (Janáček a Prášil 1991).

4.2.4. Sušina

Z *in vitro* rostlin po chladové periodě 16ti dnů byly odebrány listy, na analytických vahách zvážena čerstvá hmotnost, poté vzorky ponořeny do tekutého dusíku, lyofilizovány a znova zváženy – tentokrát jako suchá hmotnost. Procento sušiny bylo spočteno jako (suchá hmotnost/čerstvá hmotnost) x 100. Stejné vzorky pak byly použity ke stanovení obsahu prolinu.

4.2.5. Statistické zhodnocení výsledků

Statistické vyhodnocení dat a grafické zpracování bylo provedeno v programu SigmaPlot. Pro porovnání dvou souborů (kontroly a příslušného Hyp-rezistentního regeneranta) byl použit dvouvýběrový t-test. Velikost sloupců, v případě spojitých grafů hodnota značek, vyznačuje průměrnou hodnotu z opakování, chybová úsečka směrodatnou chybu (S.E.). Vzájemná závislost dvou veličin byla zhodnocena pomocí lineární regrese v programu SigmaPlot.

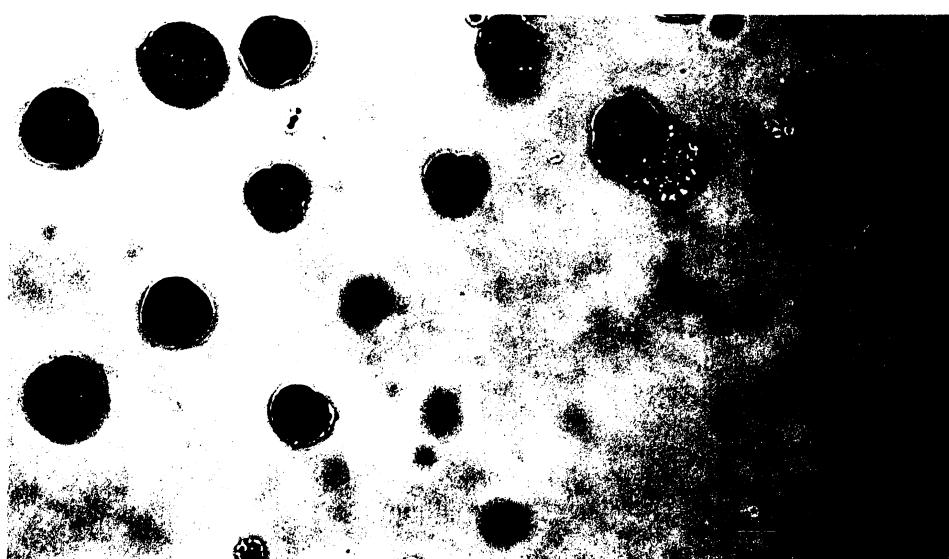
Hodnoty LT₅₀ a RIR byly vypočteny pomocí softwaru pro LT₅₀ a statisticky vyhodnoceny týmž programem pomocí metody LSD (*Least Significant Difference*) (Janáček a Prášil 1991).

5. Výsledky

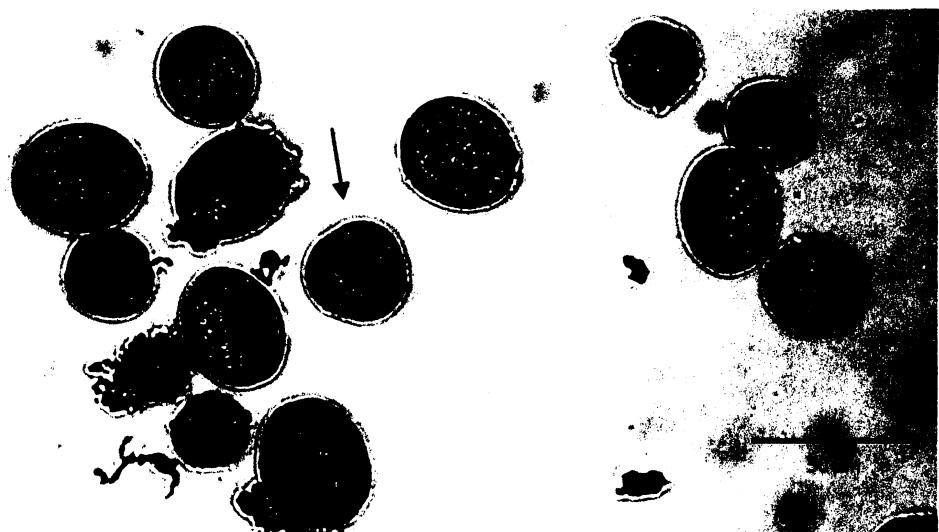
5.1. Selekcí regenerantů ozimé řepky odolných vůči hydroxyprolinu

Pro *in vitro* selekci rostlin s vyšším obsahem přirozené aminokyseliny L-prolinu byly přímo do tekutého NLN média k izolovaným mikrosporám přidávány odstupňované koncentrace (1, 4, 10, 16, 24 mM) jeho toxickeho analogu, *trans*-4-hydroxy-L-prolinu. Toxickej analog byl přidáván do média ihned po izolaci mikrospor (obr. 5.1, obrázky jsou vloženy na konec kapitoly 5.1). Během prvních 24 hodin docházelo k tvorbě dělicí přepážky (obr. 5.2) a po několika dnech již bylo možné pozorovat vícebuněčné útvary (obr. 5.3). Zhruba po dvou týdnech byla viditelná globulární embryo (obr. 5.4), která byla přemístěna z 30°C a tmy na třepačku (60 rpm) při fotoperiodě 16 hodin a do teploty okolo 24°C. Po dalších dvou týdnech se embryo přes srdčitá a torpédotváry vyvinula až v kotyledonární (obr. 5.5), která byla z tekutého NLN média umístěna na pevné médium diferenciální. Přibližně po týdnu byla embryo přesunuta na regenerační médium a po několika subkultivacích přemístěna na médium pro udržování a růst regenerantů (obr. 5.6). Každé embryo bylo označeno podle výchozího genotypu (např. OP21), příslušné koncentrace hydroxyprolinu v médiu (1, 4, 10, 16 nebo 24) a písmenem pro odlišení jednotlivých embryí stejného genotypu, jež přežila kultivaci v tekutém médiu o stejně koncentraci hydroxyprolinu. Tímto postupem byly získány haploidní regeneranty. Po diploidizaci kolchicinem byly již dihaploidy dopěstovány ve skleníku a po chladové periodě (4°C) přibližně 60ti dnů použity k analýze obsahu prolinu v listech a testům mrazové odolnosti.

Celkově bylo získáno po selekci hydroxyprolinem 52 regenerantů ozimé řepky, z toho 45 bylo po diploidizaci kolchicinem dopěstováno ve skleníku (přehled viz tab. 5.1 a 5.2). Jak je patrné z příslušných tabulek, regeneranty rezistentní k hydroxyprolinu byly získány pouze z koncentrací 10 a 16 mM hydroxyprolinu v médiu. Regeneranty z nižších koncentrací nebyly dopěstovány záměrně, jelikož se tyto koncentrace nezdaly být účinné – počet přeživších kotyledonárních embryí rostoucích v médiu o koncentraci hydroxyprolinu 1 nebo 4 mM byl přibližně stejný jako počet embryí kontrolních. Naopak koncentrace hydroxyprolinu 24 mM byla pro mikrospory příliš toxickej, takže se embryo buď vůbec nevyvinula nebo nebyla schopná regenerace.



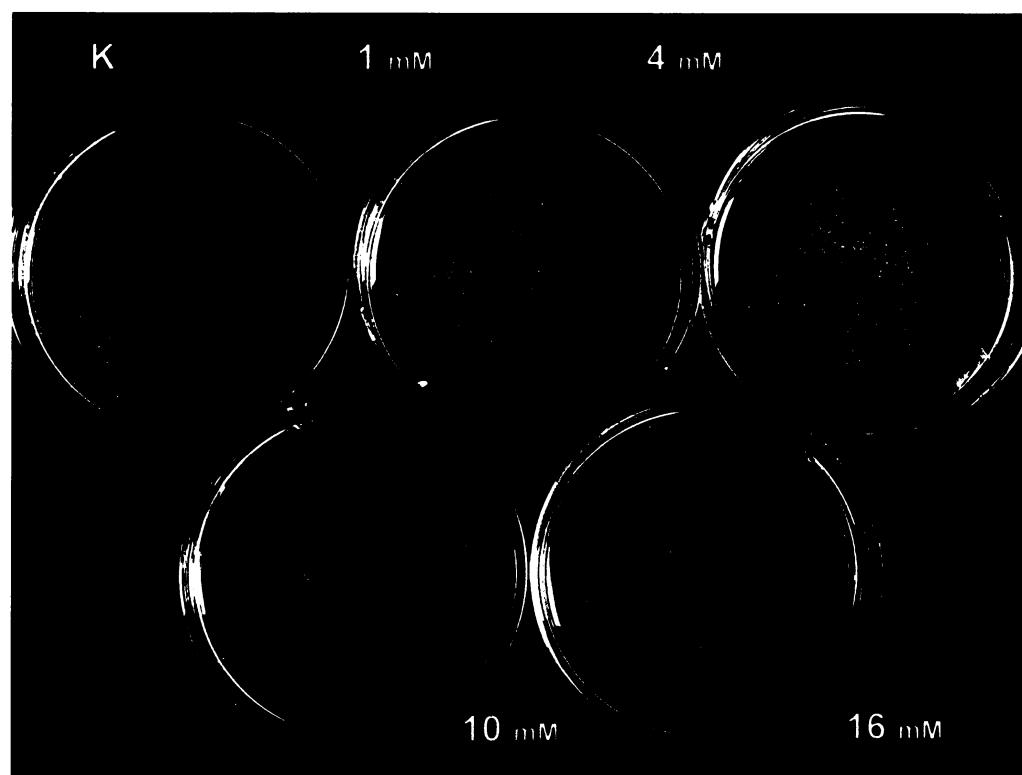
Obr. 5.1. Mikrospory *B. napus* 2 hodiny po založení mikrosporové kultury. Na snímku lze pozorovat nejen potenciálně embryogenní, ale též časně až středně jednojaderné (trojboké) a dvou- až třijaderné (oválné) mikrospory.



Obr. 5.2. Mikrospory *B. napus* 24 hodin po založení mikrosporové kultury. Potenciálně embryogenní mikrospora (označena šipkou) má již vytvořenou dělicí přepážku, která je umístěna symetricky.



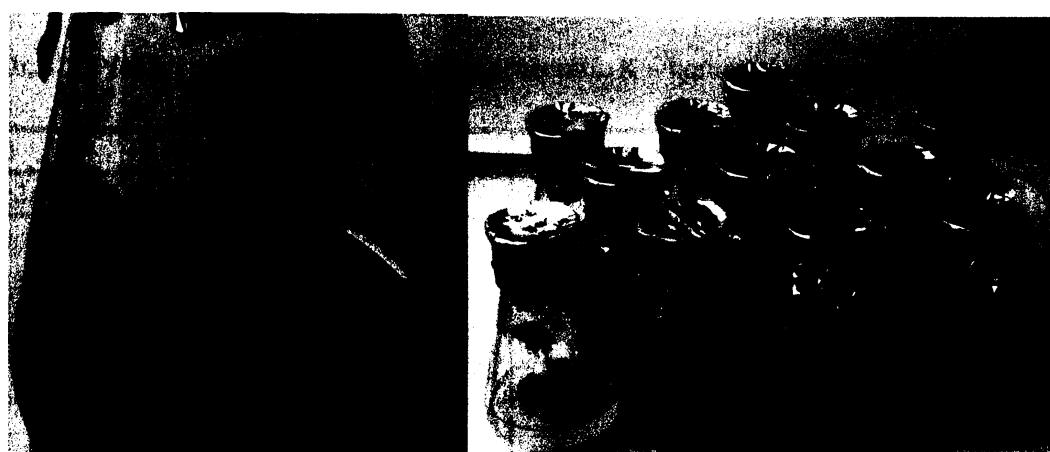
Obr. 5.3. Mikrospory *B. napus* 7 dní po založení mikrosporové kultury. Vznikající embryo je označeno šipkou.



Obr. 5.4. Globulární embrya *B. napus* kultivovaná v tekutém NLN médiu s různými koncentracemi hydroxyprolinu.



Obr. 5.5. Kotyledonární a torpédotovitá embrya *B. napus* kultivovaná v tekutém NLN médiu.



Obr. 5.6. Regenerované celistvé rostliny *B. napus*.

HP3	HP8	CH993	CH1045	CH2008	
K	K	K	K	K	
10A	16A	10A	10A	10A	
10B		10B		10B	
10C		10C		10C	
10D		10D		10D	
10E		10E			
10F		10F			
16A		10G			
16B		10H			
16C		10J			
16D		10K			
		10L			
		16A			
		16B			
OP21	OP22	OP24	OP25	OP26	OP27
K	K	K	K	K	K
10A	10A	10A	10	10A	10A
10B	10B	10B		10B	10B
10C	10C	10C		10C	10C
10D	10D	10D		10D	
16A	10E	10E		10E	
	16A	16B			
	16B	16C			
	16C	16D			

Tab. 5.1. Přehled získaných haploidních regenerantů. K – kontrolní regenerant.

HP3	HP8	CH993	CH1045	CH2008	
K(K2A, K2B)	K2	K	K	K	
10A	16A	10A	10A	10A	
10B		10C		10C	
10C		10F		10D	
10D		10G			
10E		10H			
10F		10J			
16A		10K			
16B		16A			
16C		16B			
16D					
OP21	OP22	OP24	OP25	OP26	OP27
K(KX)	K(KX)	K(KX)	K	K	K
10C(10CX)	10A	10A(10A2)	10	10A	10A
16A	10B	10B(10BX)		10B	10B
	10C(10CX)	10D		10C(10C2)	10C(10C2)
	10E	10E		10D(10D2)	
	16A(16AX)	16D		10E	
	16B				

Tab. 5.2. Přehled získaných dihaploidních regenerantů. K – kontrolní regenerant.

5.2. Obsah prolinu v listech a stupeň mrazuvzdornosti dihaploidních regenerantů

Dihaploidní regenerované rostliny byly umístěny přibližně na 60 dnů do chladové komory ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) a poté analyzovány na obsah prolinu v listech a stupeň jejich mrazuvzdornosti. Odběr materiálu na obě analýzy byl prováděn současně a pouze z rostlin po stejně dlouhé periodě chladu (obr. 5.7). Obsah prolinu i stupeň mrazové odolnosti byly zároveň stanoveny u kontrolní *in vitro* regenerované rostliny a příslušných Hyp-rezistentních regenerantů.



Obr. 5.7. Regenerované rostliny *B. napus* po chladové periodě 60 dní.

Hyp-rezistentní rostliny genotypu HP3 získané z tekutého média s 16 mM hydroxyprolinem po chladové periodě 57 dní sice obsahovaly v listech o něco více prolinu než kontrolní rostliny (graf 5.1, grafy a tabulky jsou umístěny na konci kapitoly 5.2.), nicméně rozdíl nebyl statisticky významný a mrazová odolnost dokonce nižší než u kontrolních rostlin (graf 5.2, tab. 5.3). U jednotlivých variant se nelišil parametr RIR, který vyjadřuje, jak prudce dochází ke změně z minimálního k maximálnímu poškození (tab. 5.3). Čím vyšší je hodnota RIR, tím prudčeji dochází ke změně z mírného k maximálnímu poškození se snižující se teplotou. Do značné míry protikladná situace nastala u stejného genotypu po 53 dnech aklimatizace. Hyp-rezistentní regenerant získaný z média o koncentraci hydroxyprolinu 10 mM obsahoval přibližně stejné množství prolinu jako kontrolní varianta (graf 5.3), jeho mrazová odolnost byla však mnohem vyšší (graf 5.4, tab. 5.4). Hodnoty RIR se významně nelišily (tab. 5.4). Mezi regenerantem HP8 – 16A a kontrolní rostlinou po 57 dnech chladové periody nebyl

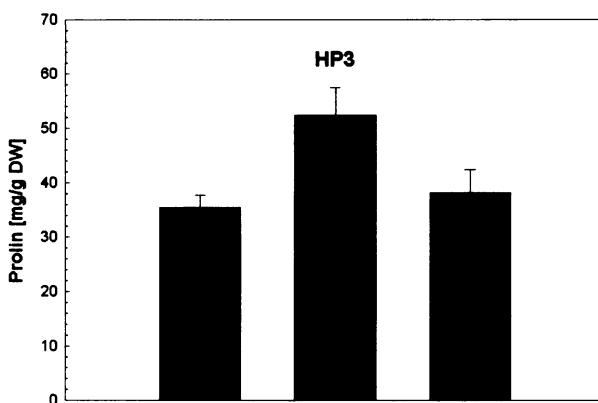
zjištěn významný rozdíl v žádném ze sledovaných parametrů (graf 5.5, 5.6, tab. 5.5). Hladina prolinu a stupeň mrazuvzdornosti byly u Hyp-rezistentní varianty mírně zvýšeny a hodnota RIR nižší.

Kvůli technické závadě na kryomatu byl aplikován u genotypu OP21 po 57 denní aklimatizaci jiný typ předošetření než u ostatních genotypů. Místo několikahodinové chladové lázně při -2°C pro iniciaci extracelulárního mrznutí byly vzorky umístěny do lázně s teplotou -7°C. Obsah prolinu byl signifikantně vyšší ($P < 0,01$) u Hyp-rezistentní rostliny kultivované v médiu s 10 mM hydroxyprolinem (graf 5.7). U stejné varianty byla významně vyšší i mrazová odolnost (graf 5.8, tab. 5.6), hodnota RIR ovšem představovala vyšší rychlosť změny se snižující se teplotou (tab. 5.6).

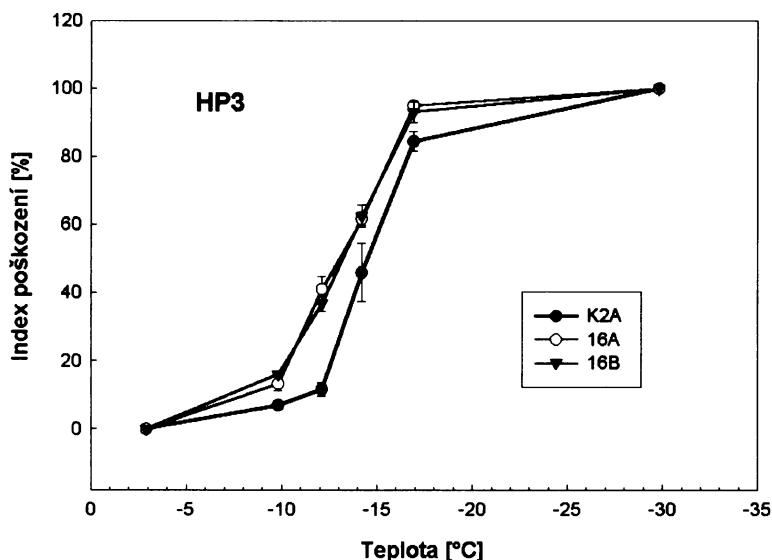
Vyšší hodnotu parametru RIR lze pozorovat i u Hyp-rezistentních variant genotypu OP22 po 57 dnech chladové periody (tab. 5.7). Regenerant OP22 – 16AX se ve zbývajících charakteristikách od kontroly nelišil, varianta OP22 – 10CX byla méně odolná vůči mrazu (graf 5.9, 5.10, tab. 5.7). Signifikantně vyšší mrazuvzdornost a nižší hodnotu RIR vykazoval Hyp-rezistentní regenerant OP24 – 10A2 po aklimatizaci 58 dní (graf 5.12, tab. 5.8). Dosažená hladina prolinu se však od kontroly nijak významně nelišila (graf 5.11). Podobných rozdílů bylo dosaženo u stejného genotypu po 53 denní aklimatizaci s Hyp-rezistentní variantou OP24 – 10BX (graf 5.13, 5.14, tab. 5.9). Hyp-rezistentní varianta genotypu OP25 (OP25 – 10) vykazovala významně nižší obsah prolinu v listech (graf 5.15) i mrazovou odolnost (graf 5.16, tab. 5.10), hodnoty RIR se však významně nelišily (tab. 5.10).

U genotypu CH993 byly s kontrolní regenerovanou rostlinou porovnávány 4 varianty, jejichž embryogeneze probíhala v NLN médiu o koncentraci hydroxyprolinu 10 mM. Významně zvýšenou hladinu prolinu po aklimatizaci 55ti dní měla pouze varianta CH993 – 10G, bylo u ní však provedeno pouze jedno opakování. Ostatní varianty se v obsahu prolinu od kontroly signifikantně nelišily (graf 5.17) a mrazovou odolnost měly významně nižší (graf 5.18, tab. 5.11). Výjimkou byla pouze varianta CH993 – 10J, jež byla, i když ne statisticky významně, mrazově odolnější a navíc parametr RIR dosahoval u tohoto Hyp-rezistentního regeneranta významně nižších hodnot (graf 5.18, tab. 5.11). Nižší hodnoty RIR byly zjištěny také u variant CH993 – 10C a CH993 – 10G (tab. 5.11). Vysoká hladina prolinu Hyp-rezistentní rostliny CH2008 – 10D po 59 dnech chladové periody (graf 5.19) se neprojevila ani ve vyšší mrazové odolnosti ani v nižší hodnotě RIR, ale právě naopak (graf 5.20, tab. 5.12).

Regeneranty genotypu HP3 po chladové periodě 57 dní



Graf 5.1. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

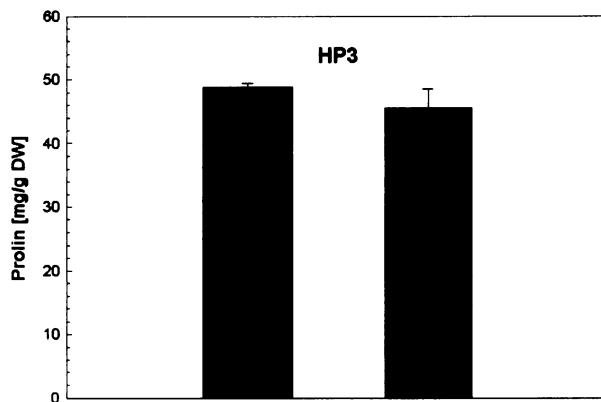


Graf 5.2. Změny indexu poškození (I_t) se snižující se teplotou. Jednotlivé body představují průměr I_t při dané teplotě \pm S.E., $n = 4$. U bodů bez vyznačené S.E. byla velikost chybové úsečky menší než velikost příslušné značky.

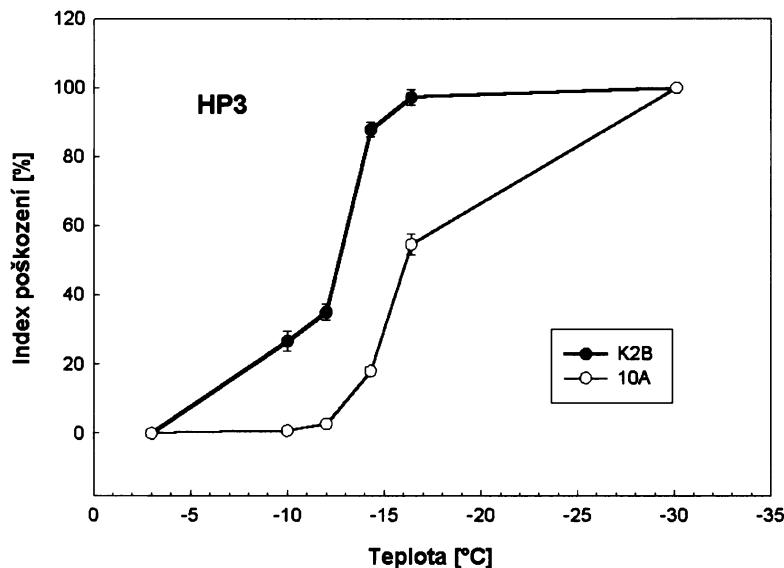
	HP3 – K2A	HP3 – 16A	HP3 – 16B
LT_{50} [°C]	$-14,5 \pm 0,2$	$-12,9 \pm 0,2^*$	$-13,1 \pm 0,2$
RIR	$0,187 \pm 0,03$	$0,147 \pm 0,01^*$	$0,141 \pm 0,01^*$

Tab. 5.3. Hodnoty LT_{50} (teplota při 50% mrazovém poškození) a RIR (*relative injury rate*, popisuje rychlosť změny s ohľadom na teplotu). Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$.

Regeneranty genotypu HP3 po chladové periodě 53 dní



Graf 5.3. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

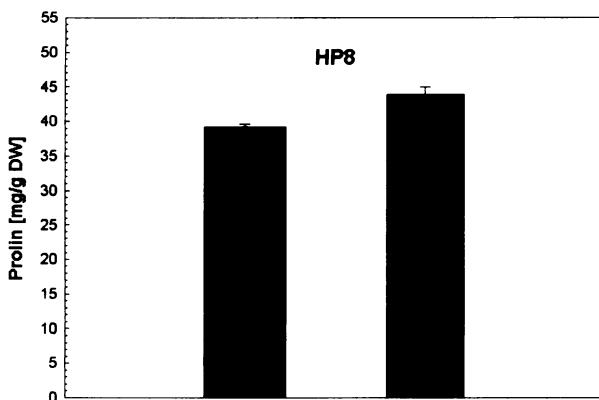


Graf 5.4. Změny indexu poškození (I_t) se snižující se teplotou. Jednotlivé body představují průměr I_t při dané teplotě \pm S.E., $n = 4$. U bodů bez vyznačené S.E. byla velikost chybové úsečky menší než velikost příslušné značky.

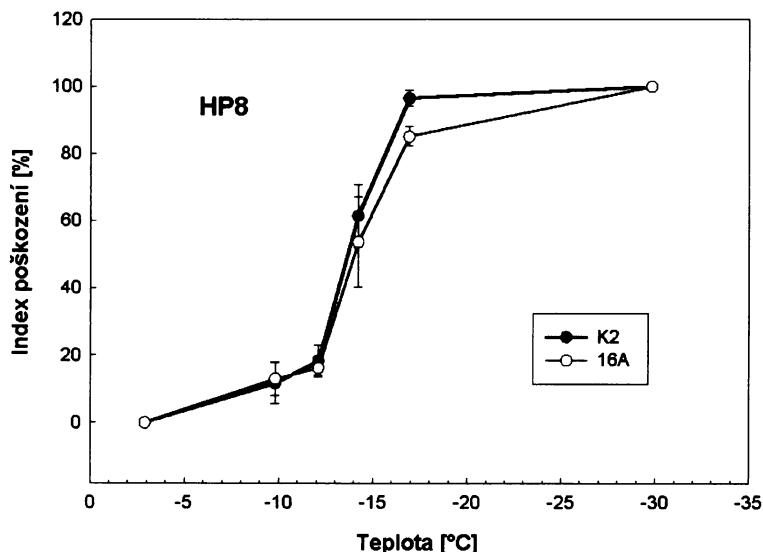
	HP3 – K2B	HP3 – 10A
LT_{50} [°C]	$-12,4 \pm 0,2$	$-16,2 \pm 0,1^*$
RIR	$0,214 \pm 0,03$	$0,204 \pm 0,01$

Tab. 5.4. Hodnoty LT_{50} (teplota při 50% mrazovém poškození) a RIR (*relative injury rate*, popisuje rychlosť změny s ohľadom na teplotu). Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$.

Regeneranty genotypu HP8 po chladové periodě 57 dní



Graf 5.5. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

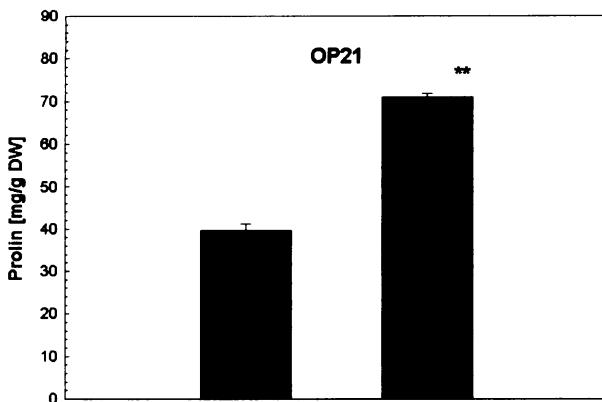


Graf 5.6. Změny indexu poškození (I_t) se snižující se teplotou. Jednotlivé body představují průměr I_t při dané teplotě \pm S.E., $n = 4$. U bodů bez vyznačené S.E. byla velikost chybové úsečky menší než velikost příslušné značky.

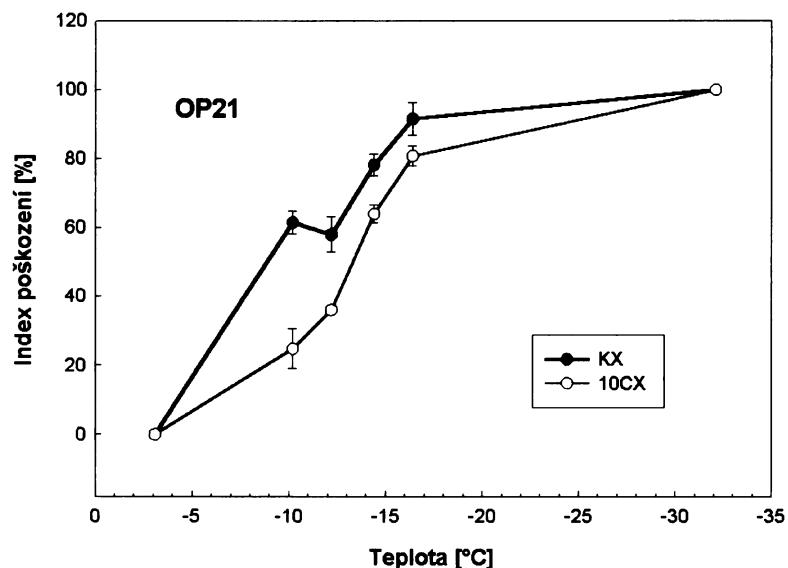
	HP8 – K2	HP8 – 16A
LT₅₀ [°C]	$-13,7 \pm 0,2$	$-14,0 \pm 0,4$
RIR	$0,214 \pm 0,05$	$0,149 \pm 0,04$

Tab. 5.5. Hodnoty LT₅₀ (teplota při 50% mrazovém poškození) a RIR (*relative injury rate*, popisuje rychlosť změny s ohľadom na teplotu). Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$.

Regeneranty genotypu OP21 po chladové periodě 57 dní



Graf 5.7. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

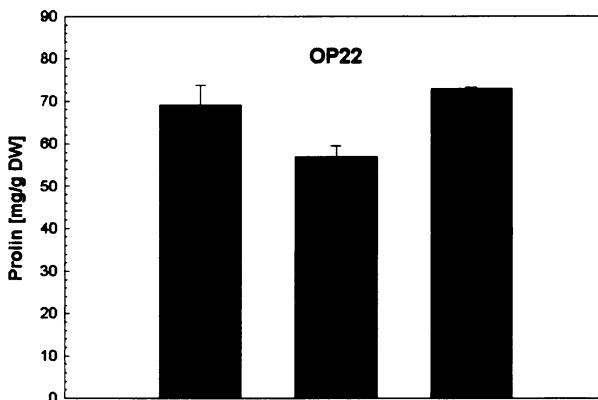


Graf 5.8. Změny indexu poškození (I_t) se snižující se teplotou. Jednotlivé body představují průměr I_t při dané teplotě \pm S.E., $n = 4$. U bodů bez vyznačené S.E. byla velikost chybějící menší než velikost příslušné značky.

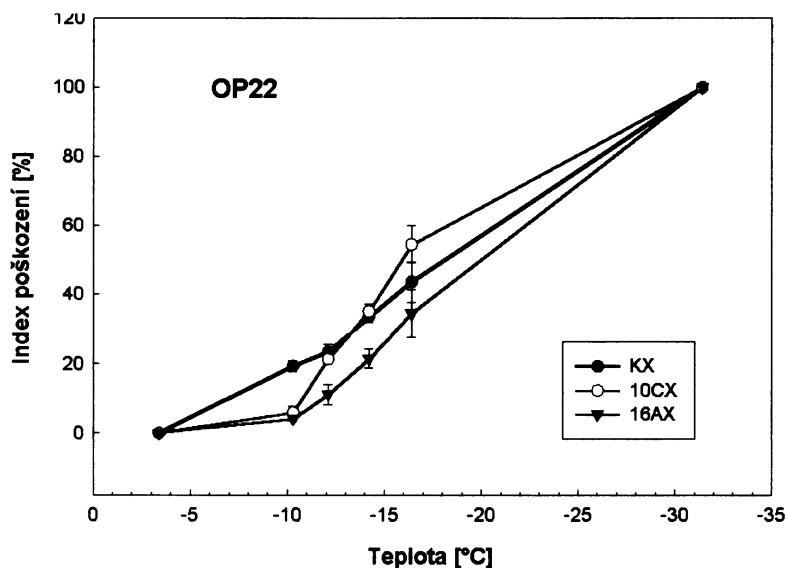
	OP21 – KX	OP21 – 10CX
LT_{50} [°C]	$-9,3 \pm 0,9$	$-13,2 \pm 0,2^*$
RIR	$0,063 \pm 0,01$	$0,108 \pm 0,01^*$

Tab. 5.6. Hodnoty LT_{50} (teplota při 50% mrazovém poškození) a RIR (*relative injury rate*, popisuje rychlosť změny s ohľadom na teplotu). Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$.

Regeneranty genotypu OP22 po chladové periodě 57 dní



Graf 5.9. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

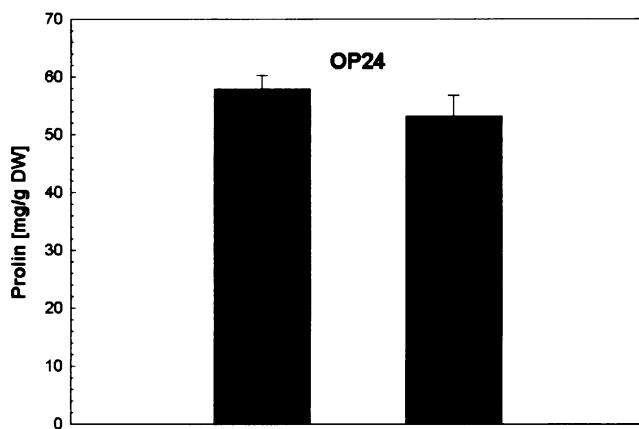


Graf 5.10. Změny indexu poškození (I_t) se snižující se teplotou. Jednotlivé body představují průměr I_t při dané teplotě \pm S.E., $n = 4$. U bodů bez vyznačené S.E. byla velikost chybové úsečky menší než velikost příslušné značky.

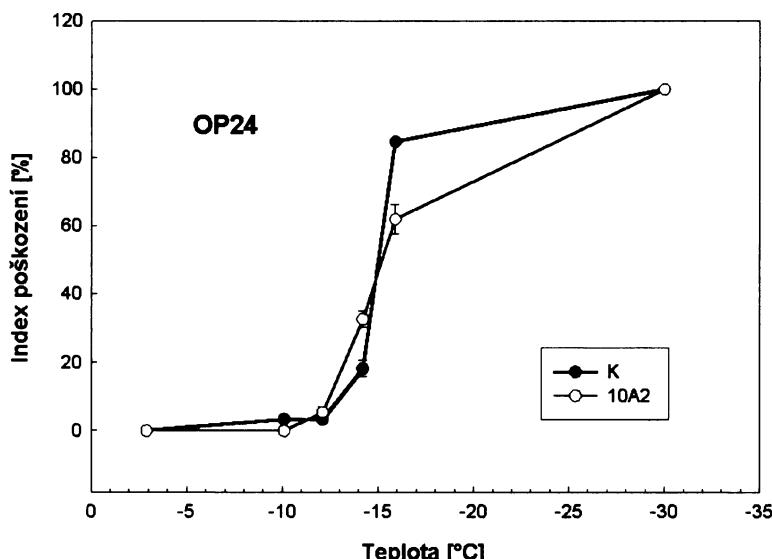
	OP22 – KX	OP22 – 10CX	OP22 – 16AX
LT_{50} [°C]	$-17,7 \pm 0,8$	$-15,8 \pm 0,3^*$	$-18,2 \pm 0,7$
RIR	$0,05 \pm 0,0$	$0,099 \pm 0,01^*$	$0,087 \pm 0,02^*$

Tab. 5.7. Hodnoty LT_{50} (teplota při 50% mrazovém poškození) a RIR (*relative injury rate*, popisuje rychlosť změny s ohľadom na teplotu). Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$.

Regeneranty genotypu OP24 po chladové periodě 58 dní



Graf 5.11. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

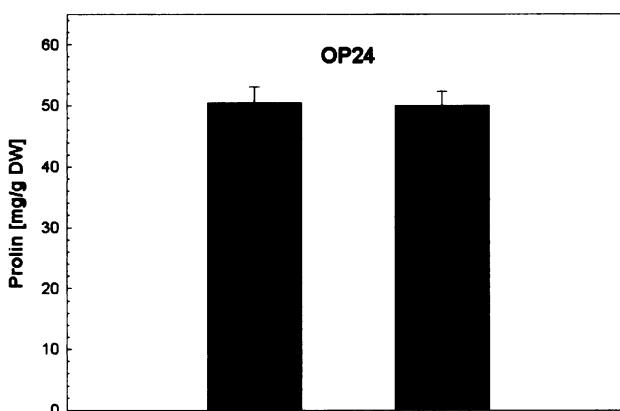


Graf 5.12. Změny indexu poškození (I_t) se snižující se teplotou. Jednotlivé body představují průměr I_t při dané teplotě \pm S.E., $n = 4$. U bodů bez vyznačené S.E. byla velikost chybové úsečky menší než velikost příslušné značky.

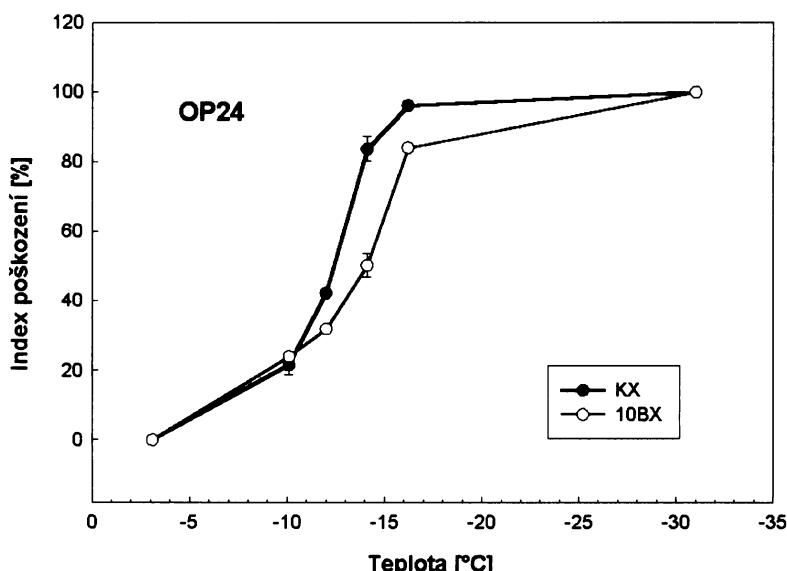
	OP24 – K	OP24 – 10A2
LT₅₀ [°C]	$-15,0 \pm 0,1$	$-15,3 \pm 0,1^*$
RIR	$0,469 \pm 0,03$	$0,204 \pm 0,02^*$

Tab. 5.8. Hodnoty LT₅₀ (teplota při 50% mrazovém poškození) a RIR (*relative injury rate*, popisuje rychlosť změny s ohľadom na teplotu). Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$.

Regeneranty genotypu OP24 po chladové periodě 53 dní



Graf 5.13. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

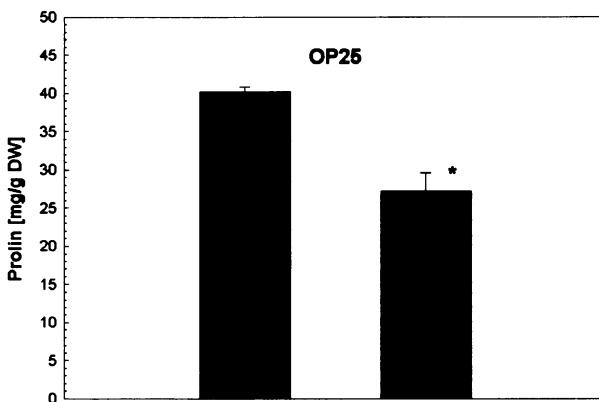


Graf 5.14. Změny indexu poškození (I_t) se snižující se teplotou. Jednotlivé body představují průměr I_t při dané teplotě \pm S.E., $n = 4$. U bodů bez vyznačené S.E. byla velikost chybové úsečky menší než velikost příslušné značky.

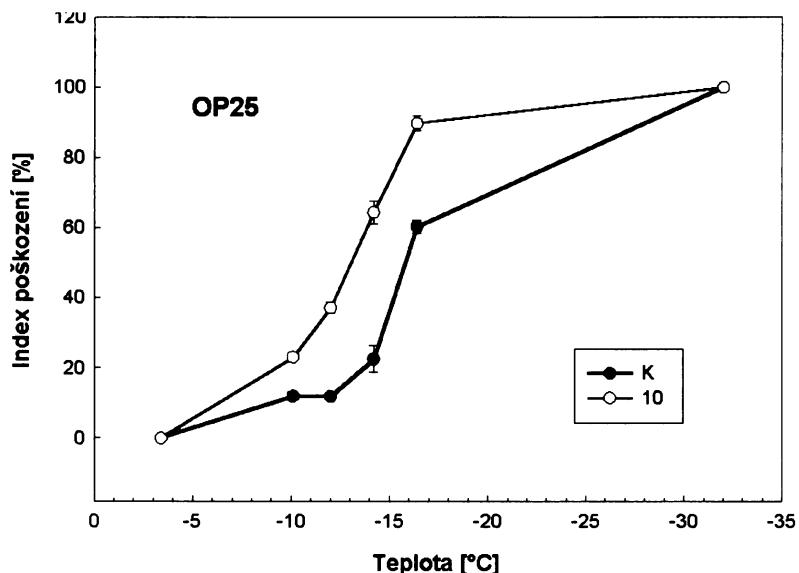
	OP24 – KX	OP24 – 10BX
LT ₅₀ [°C]	-12,2 \pm 0,1	-13,4 \pm 0,2*
RIR	0,187 \pm 0,02	0,110 \pm 0,01*

Tab. 5.9. Hodnoty LT₅₀ (teplota při 50% mrazovém poškození) a RIR (*relative injury rate*, popisuje rychlosť změny s ohľadom na teplotu). Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$.

Regeneranty genotypu OP25 po chladové periodě 59 dní



Graf 5.15. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

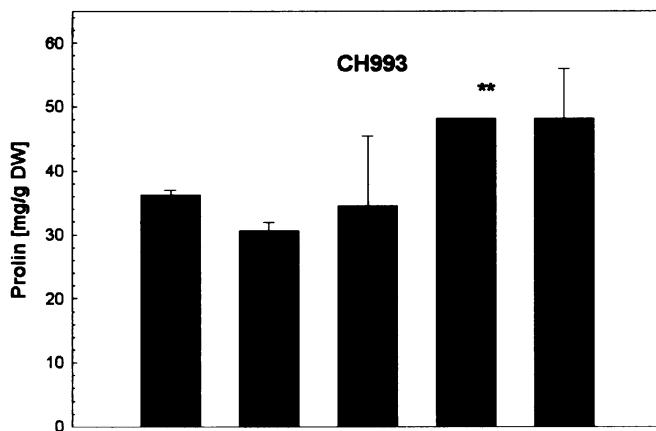


Graf 5.16. Změny indexu poškození (I_t) se snižující se teplotou. Jednotlivé body představují průměr I_t při dané teplotě \pm S.E., $n = 4$. U bodů bez vyznačené S.E. byla velikost chybové úsečky menší než velikost příslušné značky.

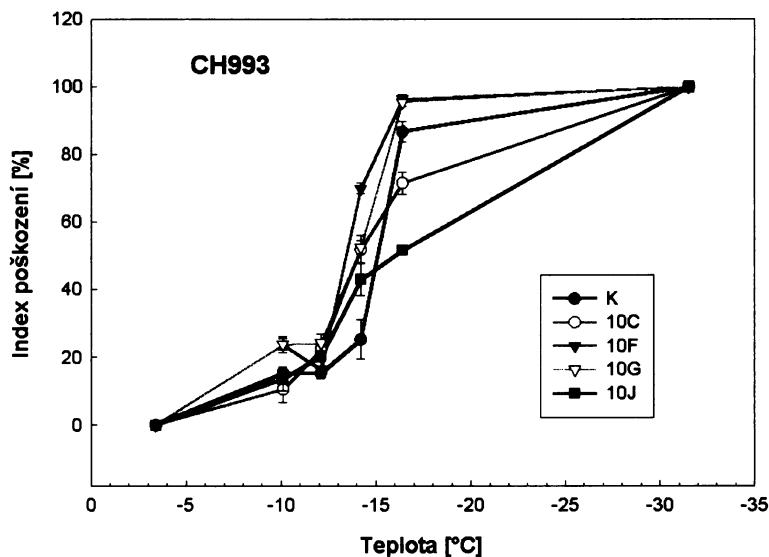
	OP25 – K	OP25 – 10
LT ₅₀ [°C]	-15,7 \pm 0,2	-12,9 \pm 0,1*
RIR	0,145 \pm 0,03	0,127 \pm 0,0

Tab. 5.10. Hodnoty LT₅₀ (teplota při 50% mrazovém poškození) a RIR (*relative injury rate*, popisuje rychlosť změny s ohľadom na teplotu). Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$.

Regeneranty genotypu CH993 po chladové periodě 55 dní



Graf 5.17. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$, u vzorku CH993 – G byl získán pouze jeden výsledek, proto není vyznačena S.E. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

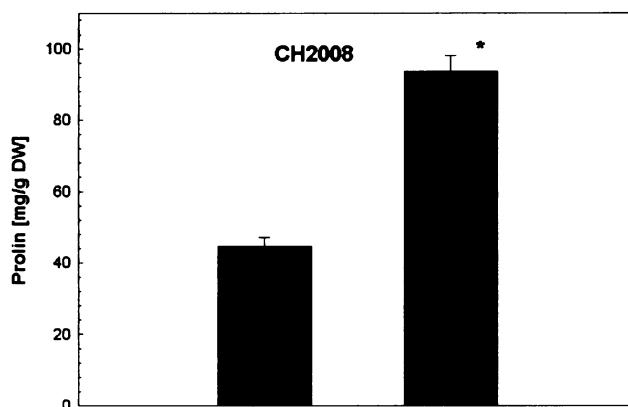


Graf 5.18. Změny indexu poškození (I_t) se snižující se teplotou. Jednotlivé body představují průměr I_t při dané teplotě \pm S.E., $n = 4$. U bodů bez vyznačené S.E. byla velikost chybové úsečky menší než velikost příslušné značky.

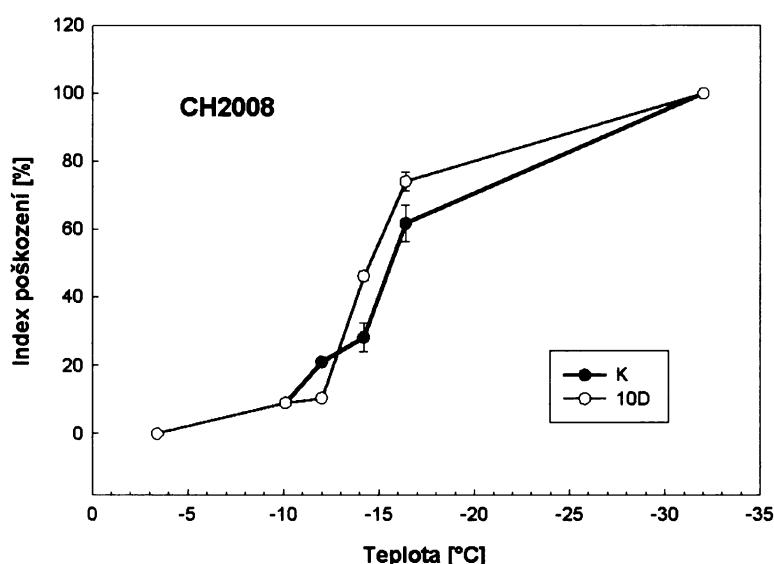
	CH993 - K	CH993 - 10C	CH993 - 10F	CH993 - 10G	CH993 - 10J
LT_{50} [°C]	$-15,0 \pm 0,2$	$-14,3 \pm 0,2^*$	$-13,4 \pm 0,2^*$	$-13,6 \pm 0,3^*$	$-15,8 \pm 0,3$
RIR	$0,280 \pm 0,07$	$0,125 \pm 0,01^*$	$0,215 \pm 0,05$	$0,151 \pm 0,02^*$	$0,078 \pm 0,01^*$

Tab. 5.11. Hodnoty LT_{50} (teplota při 50% mrazovém poškození) a RIR (relative injury rate, popisuje rychlosť změny s ohľadom na teplotu). Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$.

Regeneranty genotypu CH2008 po chladové periodě 59 dní



Graf 5.19. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.



Graf 5.20. Změny indexu poškození (I_i) se snižující se teplotou. Jednotlivé body představují průměr I_i při dané teplotě \pm S.E., $n = 4$. U bodů bez vyznačené S.E. byla velikost chybové úsečky menší než velikost příslušné značky.

	CH2008 – K	CH2008 – 10D
LT_{50} [°C]	$-15,6 \pm 0,3$	$-14,6 \pm 0,1^*$
RIR	$0,119 \pm 0,02$	$0,165 \pm 0,01^*$

Tab. 5.12. Hodnoty LT_{50} (teplota při 50% mrazovém poškození) a RIR (*relative injury rate*, popisuje rychlosť změny s ohľadom na teplotu). Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$.

5.3. Obsah prolinu v listech a % suché hmotnosti listů haploidních regenerantů v podmírkách *in vitro*

Veškeré získané haploidní regenerované rostliny byly po 16ti denní chladové periodě ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) v podmírkách *in vitro* analyzovány na obsah prolinu v listech. Zároveň bylo stanoveno procento suché hmotnosti listů takto aklimatizovaných rostlin. Protože suchá hmotnost byla stanovena z listů vysušených lyofilizací, na analýzu prolinu mohl být použit tentýž materiál.

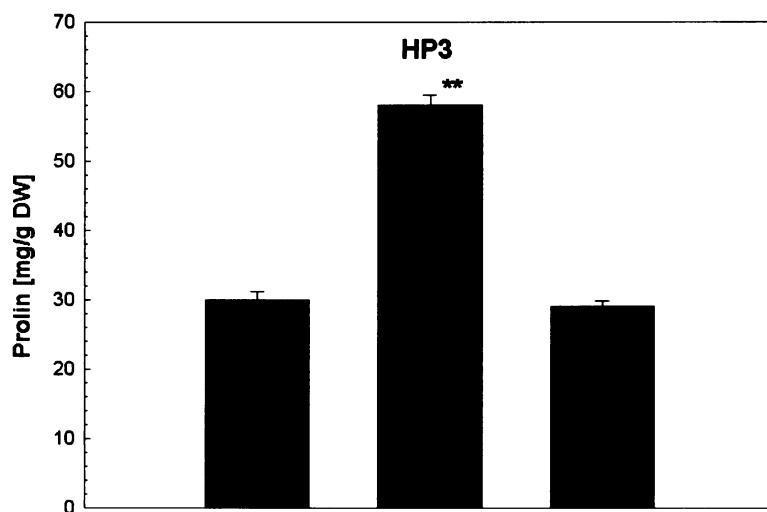
U genotypu HP3 vykazoval významně vyšší ($P < 0,01$) obsah prolinu v listech než kontrolní rostlina pouze Hyp-rezistentní regenerant HP3 (graf 5.21, grafy jsou umístěny na konci kapitoly 5.3.), jehož embryogeneze probíhala v tekutém médiu o koncentraci hydroxyprolinu 10 mM. Procento suché hmotnosti listů stejněho regeneranta bylo nižší než kontroly a varianty HP3 – 16B (graf 5.22). Hyp-rezistentní rostlina HP8 – 16A obsahovala signifikantně více ($P < 0,01$) prolinu než rostlina kontrolní (graf 5.23), procento suché hmotnosti HP8 – 16A bylo mírně vyšší než u kontroly (graf 5.24).

U obou Hyp-rezistentních variant genotypu OP21 byl zjištěn významně nižší obsah prolinu než u varianty kontrolní (graf 5.25), zatímco procento suché hmotnosti bylo u regenerované rostliny OP21 – 10C vyšší, u OP21 – 16A nižší než kontroly (graf 5.26). U regenerantů OP22 byla vidět značná variabilita v obsahu prolinu, nicméně statisticky významná byla pouze nižší hladina prolinu Hyp-rezistentního regeneranta OP22 – 10A vzhledem ke kontrolní variantě (graf 5.27). U stejného regeneranta je také poměrně nízké procento suché hmotnosti oproti ostatním regenerantům včetně kontroly (graf 5.28). Podobných výsledků bylo dosaženo v případě genotypu OP24, kde byl zjištěn signifikantně nižší obsah prolinu v listech regenerantů OP24 – 10B ($P < 0,01$), OP24 – 10E a OP24 – 16D (graf 5.29), nižší procento suché hmotnosti oproti kontrole vykazovaly regeneranty OP24 – 10D a OP24 – 10E (graf 5.30). Významně vyšší hladinu prolinu v listech oproti kontrole vykazovala Hyp-rezistentní rostlina OP25 – 10 (graf 5.31), zatímco procento suché hmotnosti bylo u této varianty srovnatelné s variantou kontrolní (graf 5.32). Veškeré Hyp-rezistentní varianty genotypu OP26 dosahovaly vyšších hladin prolinu nežli kontrola, statisticky významné rozdíly byly nalezeny jen u variant OP26 – 10A, OP26 – 10B a OP26 – 10D ($P < 0,01$) (graf 5.33). Kromě varianty OP26 – 10A, jenž měla procento suché hmotnosti nižší, byly všechny varianty srovnatelné s variantou kontrolní (graf 5.34). Veškeré Hyp-rezistentní

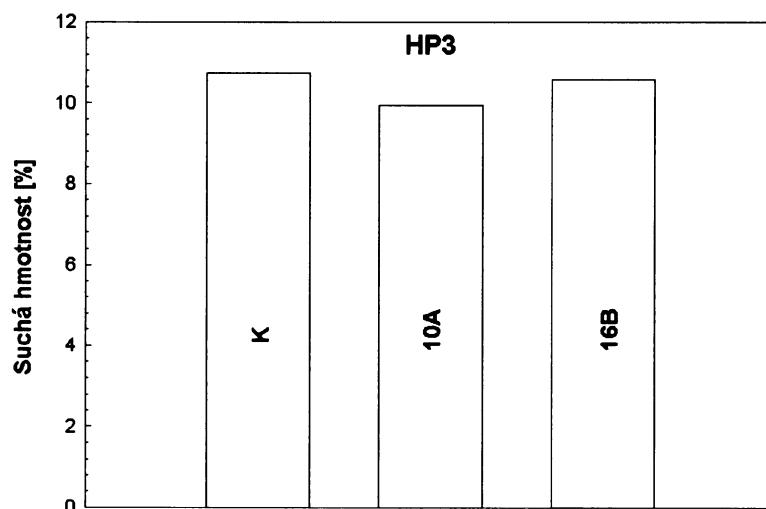
regeneranty OP27 vykazovaly vyšší hladinu prolinu než kontrola, varianty OP27 – 10A a OP27 – 10C statisticky významně ($P < 0,01$) (graf 5.35). Vyšší procento suché hmotnosti bylo zjištěno pouze u varianty OP27 – 10A (graf 5.36).

Obsah prolinu v listech rostlin genotypu CH993 byl značně variabilní, signifikantně vyšších hodnot dosáhly regeneranty CH993 – 10A ($P < 0,01$), CH993 – 10E ($P < 0,01$) a CH993 – 16A, naopak významně nižší hladiny tohoto osmolytu vykazovaly varianty CH993 – 10G ($P < 0,01$), CH993 – 10K ($P < 0,01$), CH993 – 10L ($P < 0,01$), CH993 – 16B ($P < 0,01$) (graf 5.37). Procento suché hmotnosti bylo u všech Hyp-rezistentních regenerantů nižší než toto kontroly (graf 5.38). Hyp-rezistentní rostlina CH1045 – 10A dosáhla mírně vyšší hladiny prolinu (graf 5.39) i procenta suché hmotnosti listů (graf 5.40), nicméně rozdíly statisticky významné nebyly. Veškeré Hyp-rezistentní varianty genotypu CH2008 vykazovaly nižší obsah prolinu ve srovnání s kontrolní rostlinou (graf 5.41) a kromě varianty CH2008 – 10B i nižší procento suché hmotnosti listů (graf 5.42). Rozdíly v obsahu prolinu mezi kontrolou a Hyp-rezistentními variantami byly kromě varianty CH2008 – 10C signifikantní ($P < 0,01$).

Regeneranty genotypu HP3

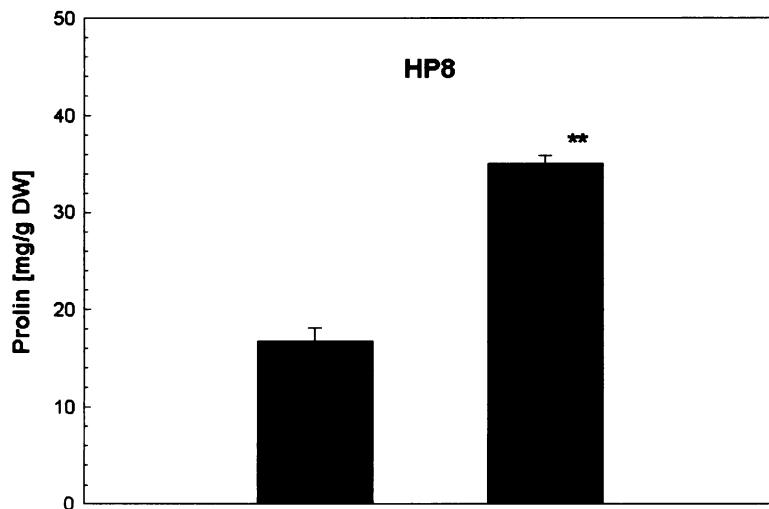


Graf 5.21. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

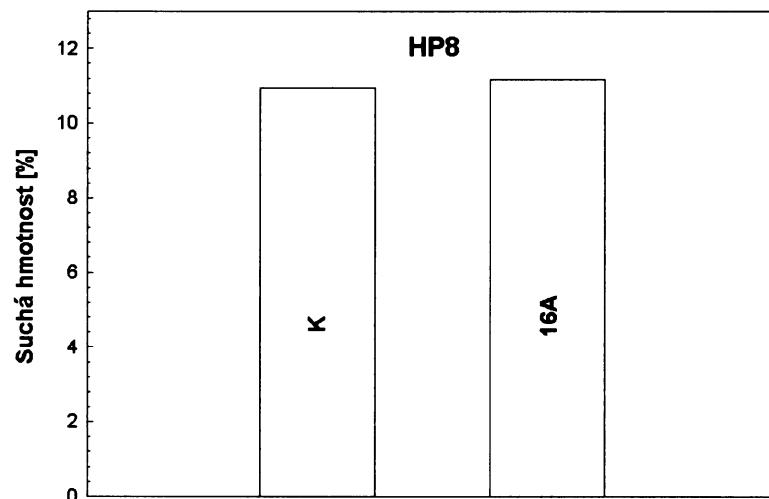


Graf 5.22. % suché hmotnosti listů.

Regeneranty genotypu HP8

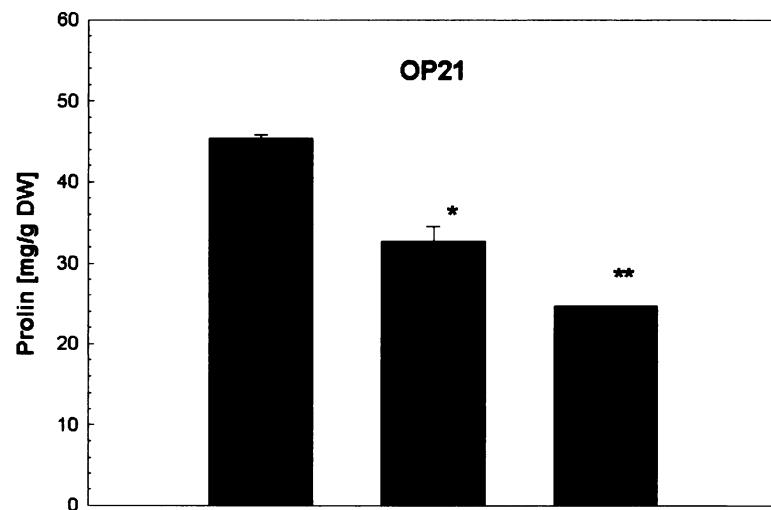


Graf 5.23. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

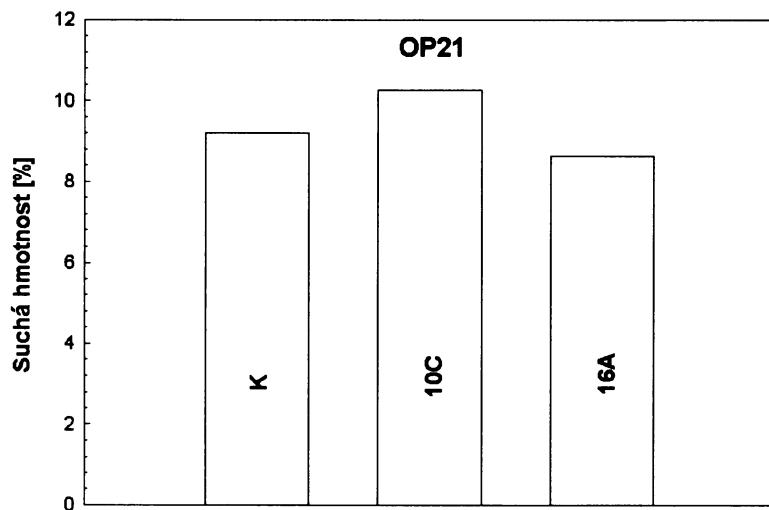


Graf 5.24. % suché hmotnosti listů.

Regeneranty genotypu OP21

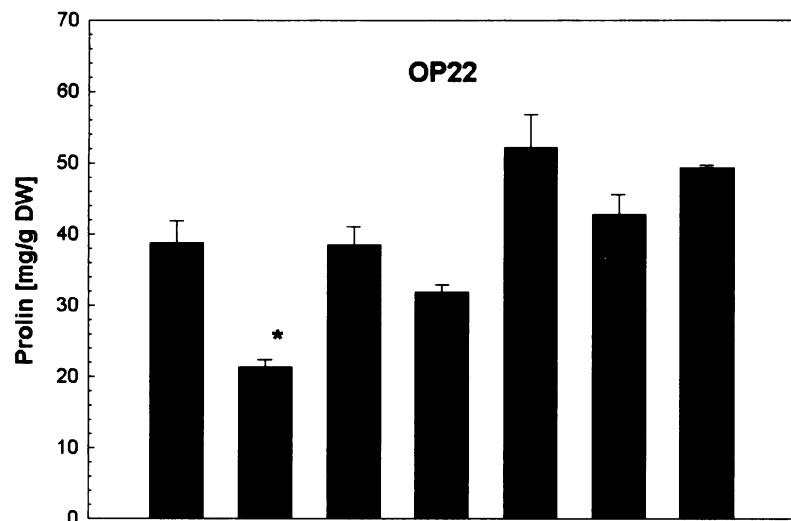


Graf 5.25. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$, u vzorku OP21 – 16A byl získán pouze jeden výsledek, proto není vyznačena S.E.. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hypo- rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

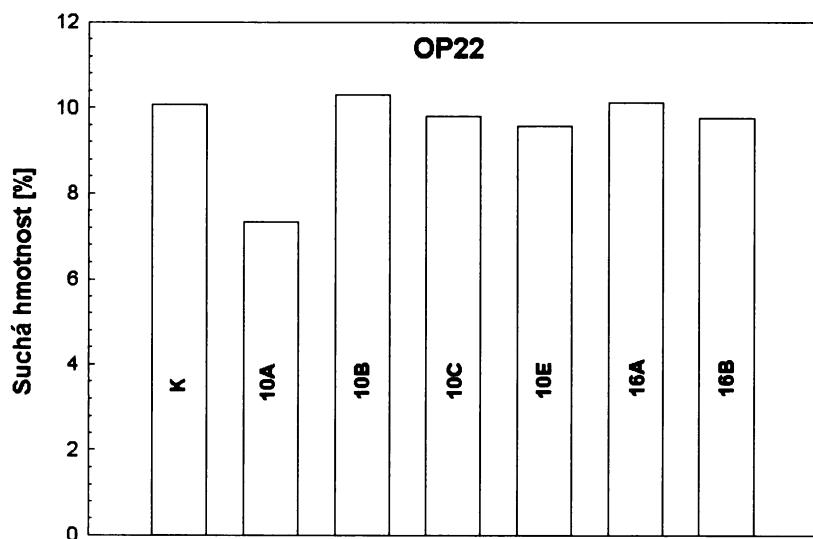


Graf 5.26. % suché hmotnosti listů.

Regeneranty genotypu OP22

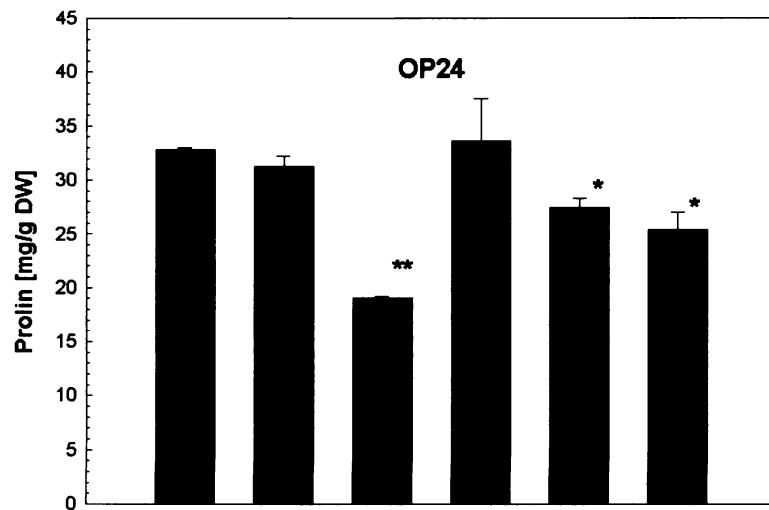


Graf 5.27. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

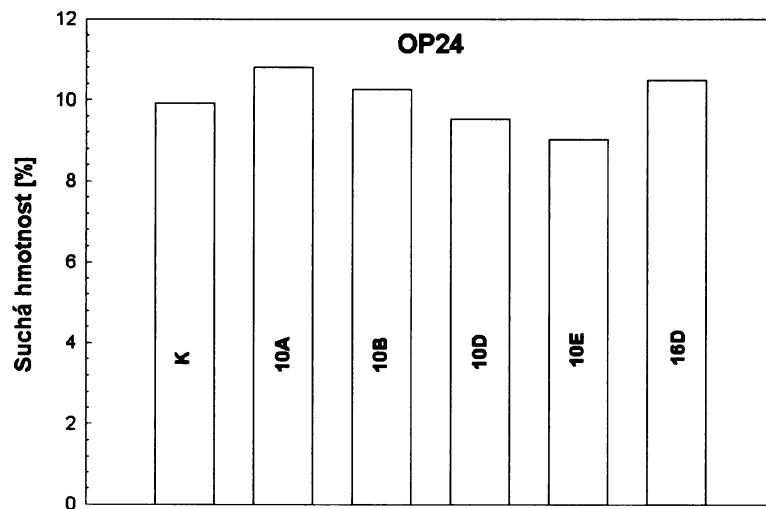


Graf 5.28. % suché hmotnosti listů.

Regeneranty genotypu OP24

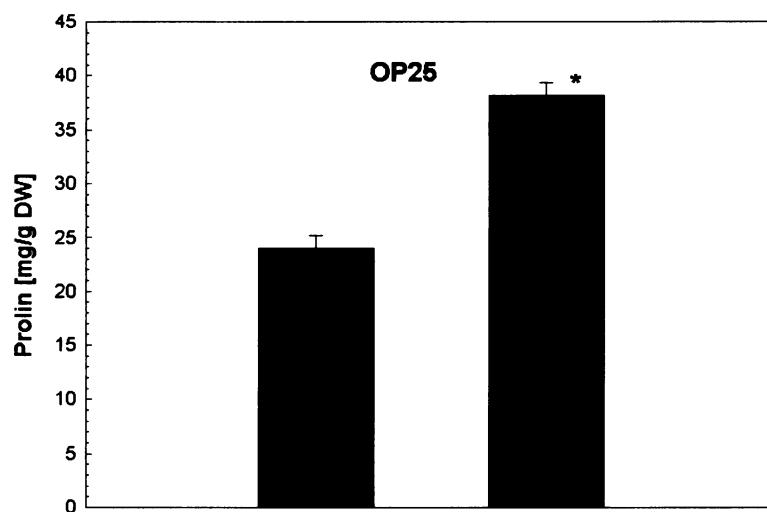


Graf 5.29. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

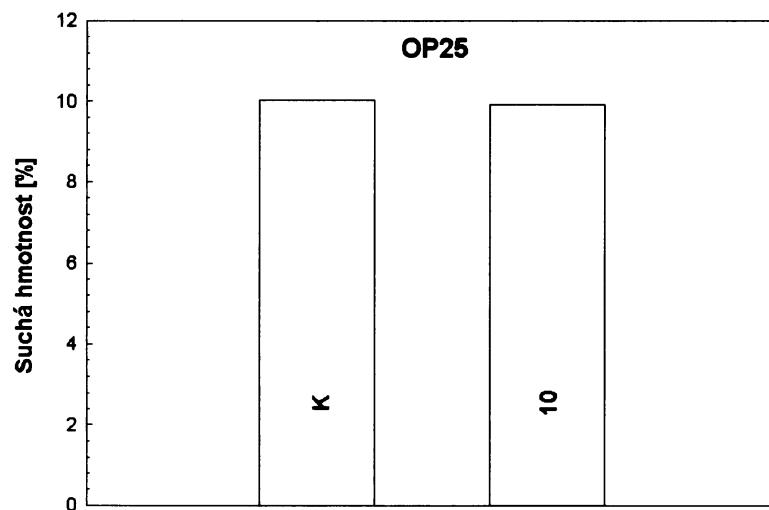


Graf 5.30. % suché hmotnosti listů.

Regeneranty genotypu OP25

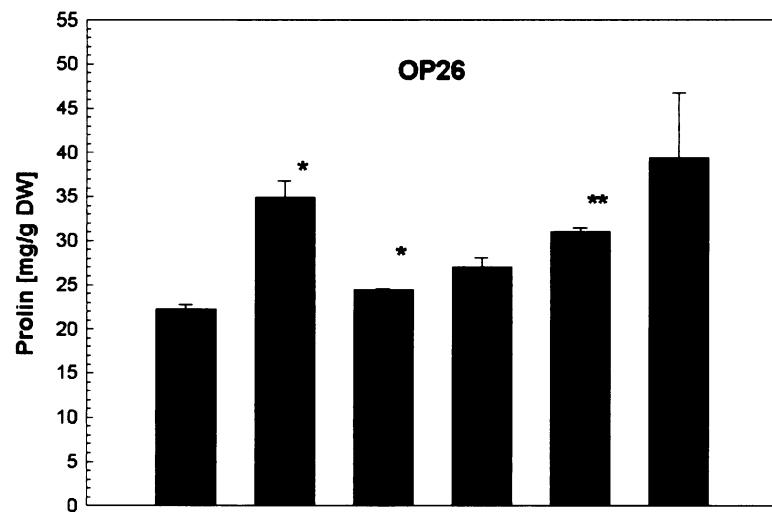


Graf 5.31. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

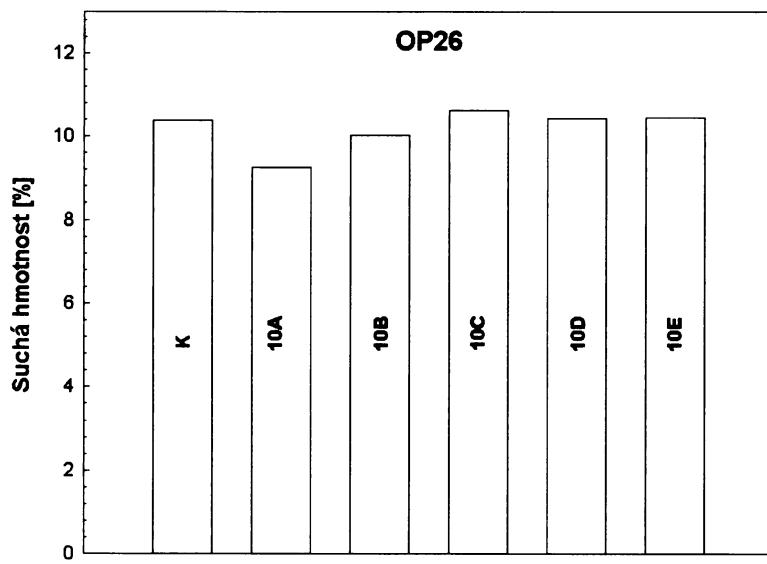


Graf 5.32. % suché hmotnosti listů.

Regeneranty genotypu OP26

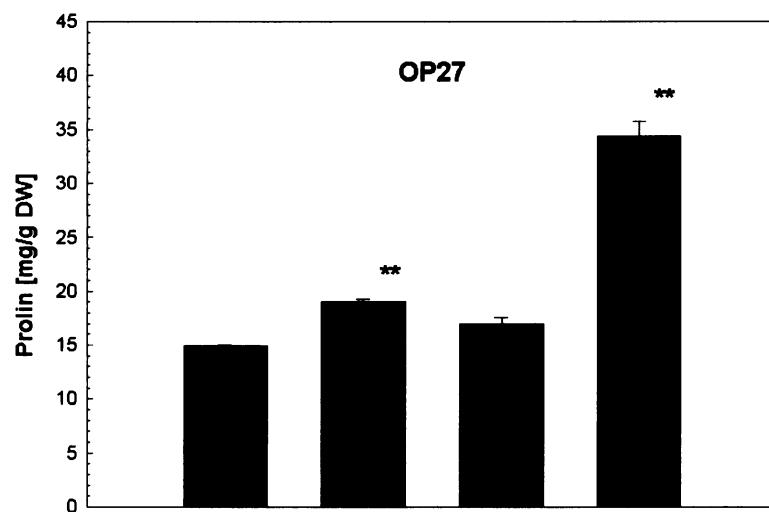


Graf 5.33. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

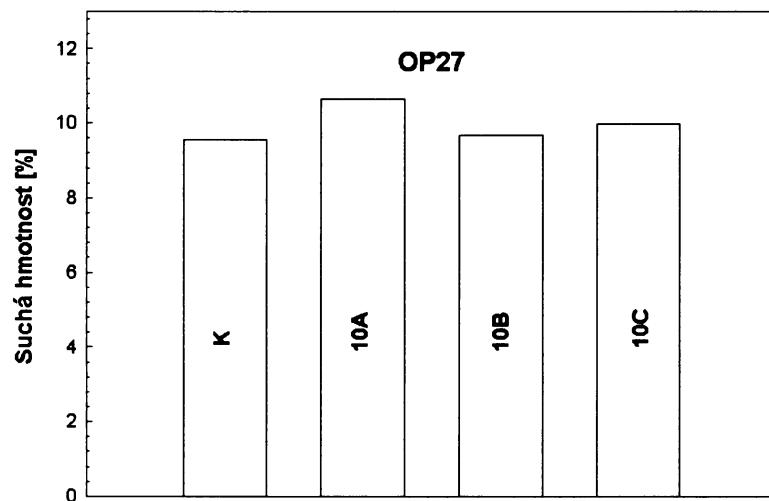


Graf 5.34. % suché hmotnosti listů.

Regeneranty genotypu OP27

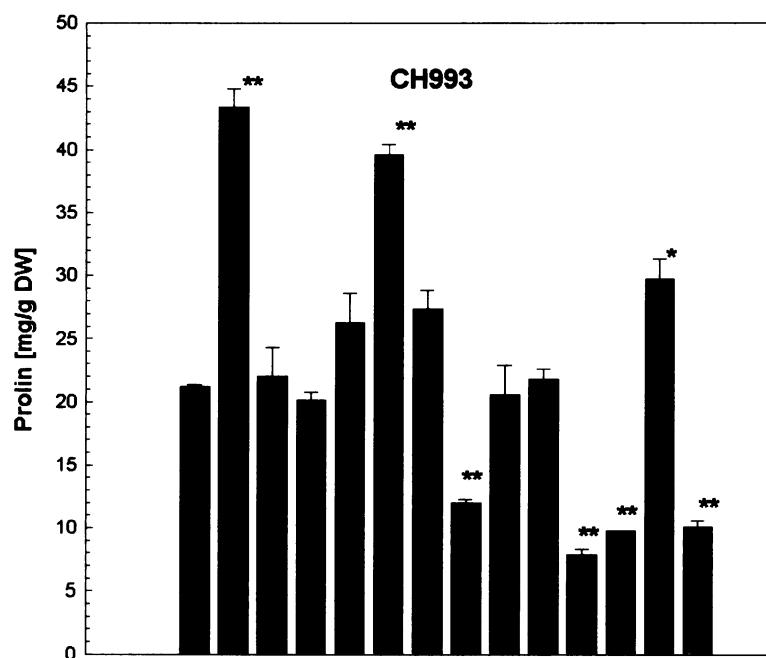


Graf 5.35. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

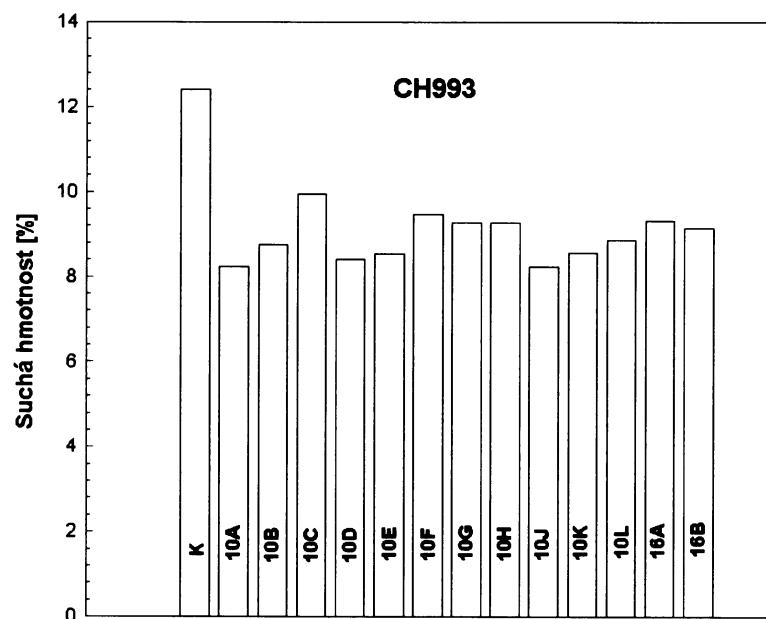


Graf 5.36. % suché hmotnosti listů.

Regeneranty genotypu CH993

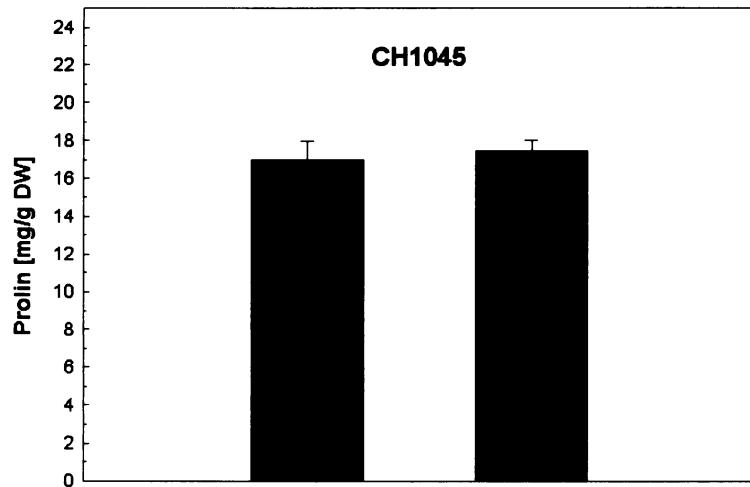


Graf 5.37. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$, u vzorku CH993 – 10L není chybová úsečka patrná, protože hodnota S.E. je příliš nízká. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hypo-resistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

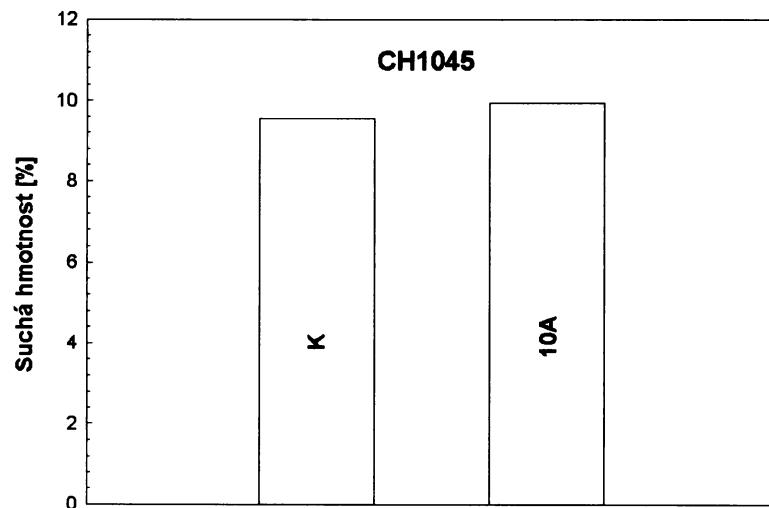


Graf 5.38. % suché hmotnosti listů.

Regeneranty genotypu CH1045

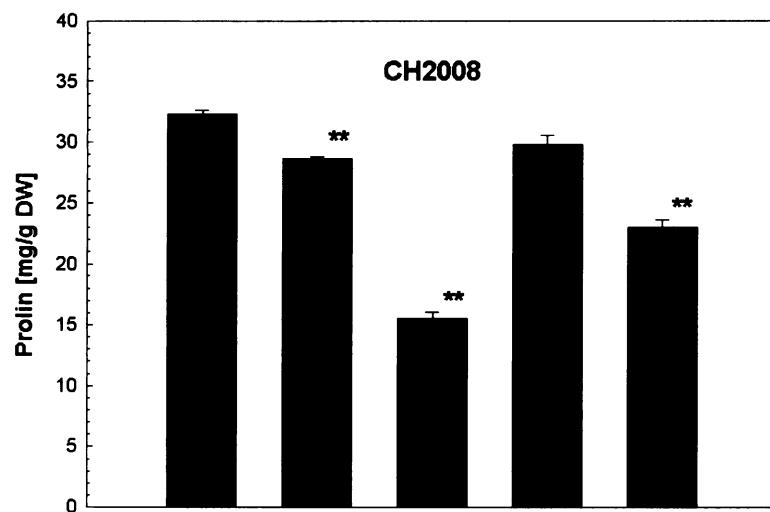


Graf 5.39. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

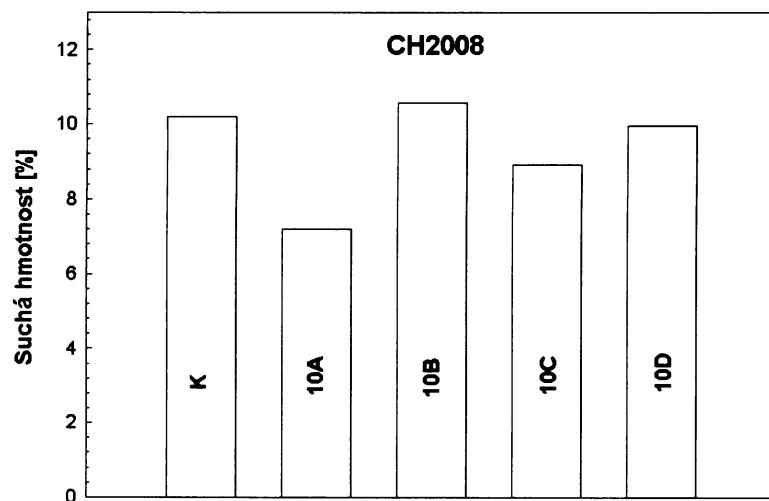


Graf 5.40. % suché hmotnosti listů.

Regeneranty genotypu CH2008



Graf 5.41. Obsah prolinu v listech. Vyznačeny jsou průměry \pm S.E., $n = 2$. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a Hyp-rezistentními regeneranty jsou znázorněny (*) pro $P \leq 0,05$ a (**) pro $P \leq 0,01$.

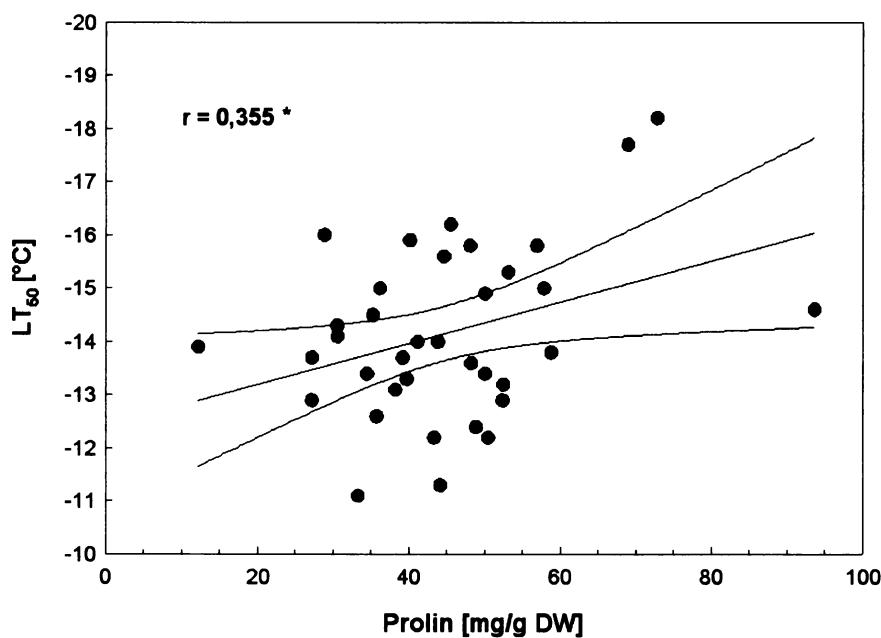


Graf 5.42. % suché hmotnosti listů.

5.4. Korelace mezi obsahem prolinu v listech a stupněm mrazové odolnosti dihaploidních regenerantů

Pro zjištění závislosti mrazové odolnosti na obsahu prolinu v listech byly použity veškeré údaje získané u dihaploidních regenerantů po chladové periodě 53 až 64 dní, s výjimkou genotypu OP21, u nějž byl použit jiný typ předošetření a hodnoty mrazové odolnosti tak nejsou srovnatelné s ostatními variantami.

Hodnota korelačního koeficientu je na 5% hladině významná, ale vzhledem ke své velikosti ukazuje jen na mírnou závislost mrazové odolnosti na obsahu prolinu v listech (graf 5.43). Vyšší mrazovou odolnost lze pouze z necelých 13% vysvětlit vyšším obsahem prolinu v listech regenerovaných rostlin (index determinance $R^2 = 0,126$).



Graf 5.43. Závislost stupně mrazové odolnosti na obsahu prolinu v listech. (*) – korelační koeficient významný pro $P \leq 0,05$, $n = 36$.

6. Diskuse

6.1. *In vitro* selekce na mrazuvzdornost

Chlad a mráz jsou kromě sucha limitujícími faktory, jenž ovlivňují rozšíření rostlin na Zemi. V průběhu evoluce většina rostlin vyvinula řadu strategií, jak takovým podmínkám odolávat. Pro většinu rostlin mírného pásma to představuje různé mechanismy tolerance nízkých teplot, mezi něž patří i akumulace osmoticky aktivních látek, kompatibilních solutů. Mezi nejrozšířenější sloučeniny takového charakteru patří i aminokyselina prolin. Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda je možné pomocí *in vitro* selekce získat rostliny ozimé řepky akumulující vyšší množství prolinu v listech a zda se zvýšené hladiny tohoto osmolytu podílí na toleranci rostlin vůči mrazu.

Šlechtění na toleranci vůči chladu klasickými metodami křížení je časově náročné a často neefektivní, proto je mnohdy doplňováno různými metodami *in vitro* selekce, jenž se používají pro podchycení odolnějších variant zejména po přídavku mutačních činidel. Kromě aplikace různých mutagenů lze také, podobně jako v našem případě, využít přirozenou variabilitu potomstva hybridních rostlin. Nespornou výhodou selekčních systémů *in vitro* s následnou diploidizací je zkrácení šlechtitelského postupu a hlavně možnost podchycení i recessivně založených znaků a spontánních mutací. Proto jsou takové metody hojně používány v moderních šlechtitelských programech pro zvýšení rezistence vůči nepříznivým abiotickým (zasolení, nízké teploty, těžké kovy apod.) i biotickým (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, *Leptosphaeria nodorum*, *Erwinia carotovora* apod.) podmínkám u mnoha plodin - obilnin, brukvovitých rostlin, brambor, rýže, vojtěšky, mrkve, ale i ostružiníku maliníku, banánovníku, citrusů apod. (Van Swaaij *et al.* 1987, Ahmad *et al.* 1991, Dörrfling *et al.* 1993, Deane *et al.* 1996, He a Yu 1997, Maggio *et al.* 1997, Petrusa a Winicov 1997, Palonen a Buszard 1998, Wu a Luo 1998, Lin *et al.* 1999, Matsumoto *et al.* 1999, Wicki *et al.* 1999, Zhang a Takahata 1999, Barnabás *et al.* 2000, Tantau *et al.* 2004, Liu *et al.* 2005).

Jednou z možností, jak selektovat rostliny s vyšším obsahem L-prolinu je působení jeho toxickeho analogu, *trans*-4-hydroxy-L-prolinu, na tkáňové kultury. Diplomová práce navazuje na studie prováděné v laboratoři prof. Dörrflinga z Hamburgské univerzity, kteří se zabývali *in vitro* selekcí hydroxyprolin-rezistentních kalusů pšenice a ječmene po aplikaci mutačního činidla (2,4-dichlorofenoxyoctové

kyseliny). Příslušné Hyp-rezistentní linie vykazovaly nejen zvýšenou hladinu prolinu ve srovnání s kontrolní variantou, ale také zvýšenou odolnost vůči mrazu a tyto vlastnosti byly u obou plodin dědičné, pravděpodobně díky jedinému neúplně dominantnímu genu (Tantau a Dörffling 1991, Dörffling *et al.* 1993, 1994, 1997a, b, Tantau *et al.* 2004). Podobných výsledků bylo dosaženo také v případě kalusových kultur bramboru (Van Swaaij *et al.* 1987, Anjum a Villiers 1998).

Naše práce se zaměřila jednak na selekci Hyp-rezistentních regenerantů v mikrosporových kulturách, stanovení obsahu prolinu a stupně mrazové odolnosti v listech těchto regenerantů a kontrolních rostlin, jednak na zjištění vztahu mezi mírou mrazové odolnosti a obsahem prolinu v listech regenerovaných rostlin *Brassica napus*. Vzhledem k dobře zavedené metodice mikrosporových kultur druhu *B. napus* na pracovišti VÚRV nebyl k *in vitro* selekci využit systém kalusových kultur, jenž využívá nejen laboratoř prof. Dörfflinga, ale i většina dostupných prací zabývající se touto problematikou, nýbrž právě kultury mikrosporové.

Pro *in vitro* selekci Hyp-rezistentních linií byly zvoleny dva odlišné soubory donorových rostlin. První představoval linie v posledních fázích novošlechtění (označené HP) s kontrastní zimovzdorností (náchylné, resp. odolné k vymrzání v zimě 2002/2003) a bylo tak možné zjistit, zda se tyto rozdíly projeví v možnosti získání Hyp-rezistentních regenerantů. Předpokladem bylo, že Hyp-rezistentní regeneranty obsahují vyšší hladiny prolinu a díky této vlastnosti mají i vyšší mrazovou odolnost. Druhým, obsáhlějším, souborem donorových rostlin byly F_1 hybrydy (označené OP a CH), jejichž mikrospory poskytovaly potenciálně vysoce variabilní materiál. Prostřednictvím *in vitro* selekce v mikrosporových kulturách, ovlivněných hydroxyprolinem, bylo možné podchytit Hyp-rezistentní varianty a po jejich následné diploidizaci získat dihaploidní Hyp-rezistentní rostliny.

6.2. Stanovení vhodné koncentrace hydroxyprolinu pro selekci *in vitro*

Konzentrace selekčního činidla byla zvolena na základě údajů z literatury, kde byly pro různé druhy rostlin (*Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Solanum tuberosum*, *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Leymus chinensis*, *Daucus carota*, *Medicago sativa*) používány pro selekci Hyp-rezistentních linií koncentrace hydroxyprolinu v přibližně stejném rozsahu od 3 do 30 mM (Van Swaaij *et al.* 1987, Tantau a Dörfpling 1991, Dörfpling *et al.* 1993, 1994, Chen *et al.* 1995, Deane *et al.* 1996, Dörfpling *et al.* 1997a, b, Maggio *et al.* 1997, Petrusa a Winicov 1997, Anjum a Villiers 1998, Tantau *et al.* 2004) a na základě předběžných pokusů (Klíma, unpubl.).

Do tekutého NLN média byly přidávány různé koncentrace hydroxyprolinu tak, aby jeho výsledná koncentrace v médiu byla 1, 4, 10, 16 a 24 mM. Dopěstovány a analyzovány byly jen rostliny, jejichž embryogeneze probíhala v médiu o koncentraci hydroxyprolinu 10 a 16 mM. Nižší koncentrace neměla na vývoj embryí zjevný negativní vliv, naopak nejvyšší testovaná koncentrace byla natolik toxická, že bránila správnému dělení mikrospor, následné diferenciaci nebo regeneraci v celistvé rostliny. Z mikrospor kultivovaných v 10ti a 16ti mM hydroxyprolinu se postupně vyvinulo vždy jen několik kotyledonárních embryí, která byla dopěstována na pevných médiích bez přídavku toxického analogu.

6.3. Doba aklimatizace dihaploidních rostlin

Před odběrem materiálu na analýzy mrazové odolnosti a obsah prolinu v listech byly regenerované rostliny umístěny do chladové komory ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) přibližně na 60 dnů, ačkoli pro chladovou aklimatizaci i zvýšení hladiny prolinu v listech je postačující mnohem kratší perioda. Dva měsíce v nízkých teplotách jsou ovšem postačující také pro jarovizaci ozimé řepky a rostliny mohly být přímo po odběru materiálu dopěstovány ve skleníku a přemnoženy. Z technických důvodů nebylo možné dodržet periodu 60ti dnů u všech genotypů, ale pouze vždy u stejného opakování (kapacita kryomatů byla maximálně 5 vzorků).

6.4. Obsah prolinu a mrazuvzdornost

Z 20 genotypů ozimé řepky bylo získáno celkem 52 regenerantů odolných vůči hydroxyprolinu, z toho 45 dihaploidních. Ze souboru genotypů označených jako HP se podařilo získat Hyp-rezistentní linie pouze u varianty HP3 (15% přeživších donorových rostlin po zimě 2002/2003) a HP8 (63% přeživších donorových rostlin po zimě 2002/2003). Příčinu nelze hledat ve vyšší citlivosti ostatních genotypů k hydroxyprolinu, protože ve většině případů se nepodařilo získat ani kontrolní regeneranty, ale spíše ve faktorech s tímto nesouvisejících, např. v nižším embryogenním potenciálu příslušných genotypů, kontaminacích apod.

Výsledky mrazových testů genotypů HP3 a HP8 po 57 denní aklimatizaci se lišily od polních výsledků zimovzdornosti donorových rostlin (zima 2002/2003). Z části lze tuto skutečnost vysvětlit tím, že zimovzdornost v sobě zahrnuje více složek odolnosti a odolnost vůči mrazu je jen jedinou z nich (McKersie a Leshem 1994). Kontrolní varianta odolnějšího genotypu HP8 (podle polních testů zimovzdornosti) se v našich pokusech jevila stejně nebo méně odolná než varianta HP3. Hyp-rezistentní regeneranty už tuto tendenci neměly, naopak Hyp-rezistentní regeneranty HP3 měly významně sníženou mrazovou odolnost v porovnání s kontrolou i genotypem HP8. Obsah prolinu Hyp-rezistentních variant se ani v jednom případě od kontrol nelišil, což odpovídá skutečnosti, že mikrospory genotypů HP nejsou odvozeny z F₁ hybridů. Nelišil se ovšem ani mezi genotypem HP3 a HP8 po stejně dlouhé periodě chladu. Vyšší mrazová odolnost donorové rostliny HP8 může být dána jinými faktory než zvýšenou hladinou prolinu, neboť zvyšování hladiny prolinu je pouze jeden z mnoha mechanismů, který rostlinám umožňuje tolerovat působení nízkých teplot. Genotyp HP3 vykazoval po kratší (53 denní) aklimatizaci odlišné výsledky než v předchozím případě – mrazová odolnost kontroly byla o 2°C nižší než kontroly po 57 dnech chladové periody a rozdíl mezi kontrolou a Hyp-rezistentním regenerantem představoval 4°C (hodnota LT₅₀ Hyp-rezistentního regeneranta dosahovala až za hranici -16°C), obsah prolinu v listech se mezi variantami nikterak výrazně nelišil. Rozdíly mezi LT₅₀ hodnotami kontrolních genotypů HP3 mohou být dány nejen rozdílnou dobou působení chladu, ale také rozdílným fyziologickým stavem a stářím rostlin, neboť důraz na srovnatelnost jednotlivých variant byl kláden především u kontroly a Hyp-rezistentních variant analyzovaných zároveň a po stejně dlouhé době chladové periody. Rozdíl 4°C mezi kontrolní a Hyp-rezistentní variantou genotypu HP3 po 53 dnech chladové

periody ovšem rozdílným fyziologickým stavem vysvětlit nelze, v úvahu lze vzít spontánní mutaci. Vzhledem k tomu, že linie HP představují F₆ generaci, lze také připustit mírnou variabilitu, zejména v rámci polygenních vlastností, jakou je mrazuvzdornost. Pro spolehlivost by však bylo lepší mrazové testy zopakovat nejen metodou výtoku elektrolytů, ale především v polních podmínkách.

Další výsledky se týkaly již variabilního potomstva F₁ hybridů. Nebyla nalezena jednoznačná závislost mezi obsahem prolinu v listech a parametry mrazuvzdornosti. Vyšší mrazové odolnosti Hyp-rezistentních regenerantů bylo dosaženo u genotypu OP24 po 53 i 58 dnech chladové periody (OP24 – 10BX a 10A2), stejně tak i nižších hodnot RIR charakterizujících pozvolnější průběh poškození se snižující se teplotou. Statisticky průkazné rozdíly v obsahu prolinu mezi kontrolními a Hyp-rezistentními variantami však nalezeny nebyly. Hyp-rezistentní regeneranty genotypu OP22 nevykazovaly, stejně jako předchozí příklad, rozdíly v obsahu prolinu, nicméně hodnoty RIR přesahovaly tyto kontrolní varianty, OP22 – 10CX měla i nižší mrazovou odolnost. Kontrolní rostlina OP25 vykazovala nejen významně vyšší mrazuvzdornost, ale také obsah prolinu v listech. Hodnoty RIR se ale mezi kontrolní a Hyp-rezistentní variantou nelišily.

Sníženou mrazovou odolnost, vyšší hodnotu RIR a naopak vysokou hladinu prolinu oproti kontrole bylo možné detektovat u Hyp-rezistentní varianty CH2008 – 10D. Značnou variabilitu v mrazové odolnosti, hodnotě RIR i obsahu prolinu vykazovaly regeneranty genotypu CH993. Statisticky průkazné byly pouze nižší hodnoty RIR Hyp-rezistentních rostlin CH993 – 10C, 10G a 10J a nižší mrazová odolnost regenerantů CH993 – 10C, 10F a 10G. Varianta CH993 – 10G obsahovala významně více prolinu v listech než varianta kontrolní. Vzhledem k jedinému opakování je však tento údaj nutné dále ověřit.

Paradoxně vyšší koncentrace prolinu v listech a vyšší mrazová odolnost kontrolních rostlin některých genotypů může být dána skutečností, že i kontrolní regeneranty jsou odvozeny z F₁ hybridů, a přestože k mikrosporovým kulturám kontrolních variant nebylo přidáno selekční činidlo, mohla být náhodně vybrána varianta s vyšším obsahem prolinu, vyšším stupněm mrazuvzdornosti nebo obojím. Pro zajištění dostatečného množství materiálu a synchronizaci vysazení rostlin do *ex vitro* podmínek byly klonovány nejen Hyp-rezistentní rostliny, ale také rostliny kontrolní. Nelze tudíž vyloučit, že pro analýzy byl použit materiál z jediné naklonované kontroly,

jenž mohla náhodně disponovat obdobnými charakteristikami jako některý z Hyp-rezistentních regenerantů.

Zajímavé výsledky poskytl experiment, kdy nebylo předošetření v ledové lázni, jež předchází vystavení rostlinných pletiv snižujícím se teplotám od -3°C do -30°C, uskutečněno při -2°C, aby se iniciovalo extracelulární mrznutí pletiv a vzorky se postupně aklimatizovaly, ale na vzorky byl aplikován chladový šok - 3,5 hodiny v ledové lázni při -7°C. Takto stresovaná pletiva byla poškozena již v průběhu předošetření, což bylo patrné z vysokých hodnot relativní konduktivity naměřených již u vzorků vystavených -3°C (tedy kontrolních). Varianty ovšem reagovaly na další pokles teplot odlišně – kontrolní regenerant již poškození vyvolaná chladovým šokem překonat nedovedl, zatímco relativní konduktivita roz toku s pletivy Hyp-rezistentního regeneranta rostla postupně a hodnoty LT₅₀ bylo dosaženo až při teplotě -13,2°C (oproti kontrolní -9,3°C). Jelikož i hodnoty prolinu Hyp-rezistentní rostliny jsou téměř dvojnásobné, prolin by se mohl podílet na ochraně buněčných struktur v pletivech poškozených chladovým šokem a zmírnit tak vliv dalšího snižování teploty. Hodnota RIR kontrolní rostliny je sice nižší, při pohledu na graf 5.8 je však patrné, že průběh křivky je nepravidelný a navzdory nízké hodnotě nenaznačuje pozvolný průběh mrazového poškození.

6.5. Vztah mezi rezistencí k hydroxyprolinu a obsahem prolinu v rostlině

Ačkoli existuje řada prací ukazující na pozitivní korelaci mezi rezistencí tkáňových kultur vůči hydroxyprolinu a obsahem prolinu v jejich pletivech, zejména u obilnin (Tantau a Dörfpling 1991, Dörfpling *et al.* 1993, 1994, 1997a, b, Tantau *et al.* 2004) či bramboru (Van Swaaij *et al.* 1987, Anjum a Villiers 1998), existují i studie, v nichž tato korelace neplatila – např. u Hyp-rezistentních buněčných linií vojtěšky autoři Petrusa a Winicov (1997) konstitutivně zvýšenou hladinu prolinu nenalezli. Rostliny přesto vykazovaly zvýšenou rezistenci vůči zasolení. Rozdíl mezi variantami kontrolními a rezistentními vůči hydroxyprolinu spočíval v rychlejší akumulaci prolinu v kořenech Hyp-rezistentních rostlin po vystavení soli. Bylo by proto zajímavé pozorovat dynamiku akumulace prolinu i v případě vyselektovaných Hyp-rezistentních rostlin, a to nejen v průběhu aklimatizace, ale zejména po chladovém šoku. Vzhledem k mnohem mírnějšímu poškození Hyp-rezistentního regeneranta genotypu OP21 po vystavení chladovému šoku a následnému snižování teplot, je možné, že by i v tomto případě mohlo docházet k rychlejšímu hromadění pozorovaného osmolytu, a tím k vyšší ochraně buněčných komponent než v případě kontrolní rostliny s pomalejší indukcí. Protože však obsah prolinu v listech nebyl analyzován po chladovém šoku, ale jen po chladové aklimatizaci, kdy byl rostlinám poskytnut dostatek času k hromadění ochranných látek, je takové tvrzení pouze hypotetické.

Významnou korelací mezi rezistencí vůči toxicitému analogu prolinu a obsahem prolinu v pletivech nezpozorovali ani Maggio *et al.* (1997) v případě buněčných linií mrkve. Autoři se tudíž domnívají, že mohlo dojít ke změnám v membránovém transportním systému, který by příjem hydroxyprolinu blokoval. Osmotolerance buněk se navíc měnila s vývojovým stádiem, což vedlo autory k závěru, že rostliny produkující více prolinu mohou vykazovat toleranci vůči osmotickému stresu např. jen v určitém specifickém stádiu vývoje. Jelikož v předložené diplomové práci nebylo používáno žádné mutační činidlo, ale selekce linií s nadprodukcií prolinu byla založena pouze na přirozené variabilitě potomstva (přičemž bylo díky metodě pylové embryogeneze a následné diploidizaci možno zachytit i recessivně založené znaky), je více pravděpodobné, že v případě odolných kontrol či kontrol s vyšší produkcí prolinu byly náhodně vybrány odolné varianty, než možnost spontánní mutace v některé ze složek

membránového transportu. Další možnost představuje enzymatická přeměna určitého množství hydroxyprolinu na prolin (Varner 1980).

6.6. Obsah prolinu a suchá hmotnost *in vitro* rostlin

Pro spolehlivější srovnání obsahu prolinu v listech kontrol a příslušných Hyp-rezistentních variant byly všechny regeneranty ve stádiu tří až pěti listů a podmínkách *in vitro* aklimatizovány při 4°C po dobu 16ti dnů, která by měla být postačující pro zjištění rozdílů v množství akumulovaného prolinu mezi jednotlivými variantami (např. Dörfpling *et al.* ukázali rozdíly v obsahu prolinu u ozimé pšenice již po 6ti až 10ti dnech při 2°C). Stanoveno bylo u *in vitro* rostlin také procento suché hmotnosti listů, které se v některých případech (např. u ječmene) u Hyp-rezistentních regenerantů zvyšovalo (např. Tantau *et al.* 2004).

Zatímco procento suché hmotnosti Hyp-rezistentních variant se u obou genotypů HP, kromě varianty HP3 – 10A, nelišil, s výjimkou HP3 -16B byla hladina prolinu Hyp-rezistentních regenerantů významně vyšší než u kontrolních rostlin.

Hyp-rezistentní rostliny OP21 vykazovaly nižší obsah prolinu než kontrola, varianta OP21 – 10C měla vyšší procento suché hmotnosti. Hodnoty regeneranta OP21 – 16A nelze, vzhledem k chlorotickým listům, pokládat za spolehlivé. Genotypy OP22 i OP24 vykazovaly v obou parametrech značnou variabilitu, Hyp-rezistentní regenerant genotypu OP25 obsahoval v listech významně více prolinu než regenerant kontrolní, ačkoli procento suché hmotnosti bylo téměř identické. U veškerých Hyp-rezistentních rostlin OP26 a OP27 byla zjištěna vyšší hladina prolinu v listech, statisticky průkazně u variant OP26 – 10A, 10B, 10D, OP27 – 10A a 10C. Nižší procento suché hmotnosti listů oproti kontrolní rostlině bylo nalezeno u variant OP26 – 10A a 10B, zatímco vyšší u varianty OP27 – 10A.

Opět vysoká variabilita obsahu prolinu v listech byla zpozorována u variant CH993, s výrazně vyššími hodnotami u regenerantů CH993 – 10A, 10E a 16A. Procento suché hmotnosti listů bylo zdaleka nejvyšší u kontrolní varianty. Hyp-rezistentní regenerant CH1045 projevoval mírné zvýšení obou parametrů, nicméně rozdíl v obsahu prolinu nebyl oproti kontrole statisticky významný. Vzhledem k horšímu fyziologickému stavu (nažloutlé listy) většiny Hyp-rezistentních regenerantů genotypu CH2008 lze uvažovat pouze variantu CH2008 – 10B, u níž bylo zjištěno

mírně vyšší procento suché hmotnosti, ovšem stanovena byla výrazně nižší hladina prolinu v listech nežli u kontrolní varianty.

Variabilitu v obsahu prolinu jednotlivých variant lze vysvětlit podobně jako v případě rostlin po delší periodě chladu a v nesterilních podmínkách. Výsledky získané na materiálu z podmínek *in vitro* ve většině případů neodpovídají rozdílům v obsahu prolinu mezi kontrolou a příslušným Hyp-rezistentním regenerantem v nesterilních podmínkách. Takové neshody mohou být dány spíše než kratší chladovou periodou odlišným stavem vývoje rostlin v podmínkách *in vivo* oproti rostlinám pěstovaným v podmínkách *in vitro*. Tolerance vůči různým stresovým faktorům i hromadění osmoticky aktivních látek se může měnit s vývojovým stádiem rostlin (Maggio *et al.* 1997 toto pozorovali u suspenzních buněčných kultur), které bylo v případě *in vitro* a *in vivo* rostlin odlišné. *In vitro* rostliny byly o několik (3-5) měsíců mladší nežli rostliny dopěstované po diploidizaci ve skleníku a po dvouměsíční chladové periodě.

6.7. Vztah mezi sušinou a hladinou prolinu

Nebyla zjištěna žádná korelace mezi obsahem prolinu v listech a suchou hmotností listů. Ačkoli existují studie, které ukazují na signifikantně vyšší procento suché hmotnosti Hyp-rezistentních regenerantů (např. u ječmene Tantau *et al.* 2004), nám se tento fenomén u ozimé řepky zjistit nepodařilo. Protože *in vitro* rostliny nebyly podrobeny mrazovým testům, není jasné, zda rostliny s vyšší suchou hmotností představují také rostliny mrazuvzdornější. V případě, že by tomu tak bylo, byla by vyšší mrazová odolnost podpořena spíše jinými faktory nežli konstitutivně vyšší hladinou prolinu. Vzhledem ke genetické variabilitě mikrospor v našich kulturách lze takovou alternativu připustit.

6.8. Korelace mezi akumulací prolinu a odolností vůči nízkým teplotám

Ačkoli mnohé studie zabývající se problematikou stresu nízkých teplot ukazují na pozitivní korelací mezi množstvím akumulovaného prolinu v rostlinných pletivech nebo buněčných kulturách a odolností vůči nízkým teplotám (Charest a Phan 1990, Dörffling *et al.* 1993, 1994, 1997a, b, Tantau *et al.* 2004, Chen a Li 2002b), v jiných studiích vztah tak jednoznačný nebyl (např. Van Swaaij *et al.* 1985, Fahl *et al.* 1994). Ani naše studie nepřispěla k názoru, že by se konstitutivně vyšší hladina prolinu z větší míry podílela na vyšší odolnosti vůči nízkým teplotám. Stejně tak ovšem nelze ani usuzovat, že by role prolinu v ochraně rostlin vůči nízkým teplotám byla zanedbatelná. Je možné, že více než konstitutivně zvýšená hladina prolinu je významná dynamika zvyšování jeho hladiny, podobně jako v případě rostlin vojtěšky po expozici soli a/nebo obrat prolinu *per se*, jež se ovlivňováním redox potenciálu buňky podílí na snižování oxidačního poškození (Hare *et al.* 1998).

Trendem ve výzkumu vlivu kompatibilních solutů, včetně prolinu, na stresovou toleranci rostlin je rovněž použití metod molekulární genetiky k dosažení jejich nadprodukce manipulacemi s geny pro jednotlivé enzymy biosyntetických dráh (např. Wang *et al.* 2003). Kromě těchto snah o zvyšování konstitutivní hladiny prolinu by mohlo být nejen velmi zajímavé, ale i užitečné, pokusit se přesměrovat tuto dráhu k dráze, jež by ve větší míře syntetizovala deriváty prolinu, které jsou, alespoň u bakterií, účinnějšími osmoprotektanty než L-prolin (Maggio *et al.* 1997). Methylací prolinu prostřednictvím N-methyltransferasy vzniká prolinbetain, který neinhibuje γ -GK aktivitu P5CS, což umožňuje jeho značnou akumulaci. Kromě toho odčerpává prolin, a tím umožňuje vyšší tok skrz jeho biosyntetickou dráhu (Maggio *et al.* 1997).

6.9. Využití vyselektovaných dihaploidních rostlin

Všechny získané dihaploidní regeneranty, jenž byly v rámci práce získány *in vitro* selekcí pomocí selekčního činidla hydroxyprolinu, budou dále dopěstovány, samoopyleny a osivo bude předáno šlechtitelským organizacím, které jsou zapojeny v projektu „Česká řepka“, k hodnocení mrazuvzdornosti pomocí laboratorních i polních testů a dalších hospodářských znaků. Vhodné dihaploidní linie tak budou využity jako výchozí šlechtitelský materiál pro přípravu nových odrůd.

7. Souhrn

- Metodou pylové embryogeneze a selekcí *in vitro* bylo z 20ti různých genotypů ozimé řepky získáno celkem 52 rostlin rezistentních vůči hydroxyprolinu, z toho 45 bylo diploidizováno a vysazeno do *ex vitro* podmínek.
- V případě linií v posledních fázích novošlechtění (HP) nebyl u žádného z dihaploidních regenerantů, odolných vůči hydroxyprolinu, pozorován významně vyšší obsah prolinu v listech oproti kontrolní rostlině. Odolnost vůči mrazu byla signifikantně vyšší u varianty HP – 10A.
- Ačkoli některé dihaploidní Hyp-rezistentní regeneranty (CH993 – 10G, CH2008 – 10D), získané z hybridních donorových rostlin, vykazovaly vyšší obsahy prolinu v listech nežli kontrolní rostliny, rozdíly mezi Hyp-rezistentními rostlinami a kontrolou ve většině případů významné nebyly. V případě jedné varianty rezistentní vůči toxickému analogu (OP25 – 10) byla nalezena průkazně nižší hladina prolinu v listech.
- Signifikantně vyšší mrazové odolnosti než u kontrolních rostlin bylo dosaženo u dvou dihaploidních Hyp-rezistentních rostlin – OP24 - 10A2 a OP24 -10BX. U ostatních regenerantů odolných vůči hydroxyprolinu buď odolnost nebyla statisticky průkazná nebo byla nižší než odolnost kontrolních rostlin.
- Dihaploidní Hyp-rezistentní regenerant genotypu OP21, vystavený společně s kontrolním regenerantem po dvouměsíční aklimatizaci při 4°C chladovému šoku -7°C po dobu 3,5 hodiny, vykazoval významně vyšší stupeň mrazové odolnosti než kontrolní rostlina. Konstitutivní hladina prolinu v listech tohoto Hyp-rezistentního regeneranta po aklimatizaci dosahovala téměř dvojnásobných hodnot oproti kontrole.
- U *in vitro* rostlin, aklimatizovaných 16 dnů, byla pozorována variabilita kromě množství prolinu také v suché hmotnosti listů. Množství prolinu v listech *in vitro* rostlin s procentem suché hmotnosti stejných listů nekorelovalo.

- Byla zjištěna mírná závislost mrazové odolnosti na obsahu prolinu v listech dihaploidních rostlin. Pouze necelých 13% mrazové odolnosti bylo možné vysvětlit obsahem prolinu v listech.

8. Abstract

The geographical distribution of plant species is limited by various environmental factors, two of which are probably the most important - the water availability and temperature. In addition, these two phenomena are closely correlative whereas increased hardiness to one leads to increased hardiness to the other. Perhaps the most feared stress factor is the low temperature. The perception and sensibility are very variable among plants, so we can distinguish the species as chilling or freezing sensitive, insensitive or tolerant. The ways of managing the environmental stress are as various as is the plant kingdom itself. The same variety can be observed even in the scope of one plant - some of plant's parts try to avoid the stress, other tolerate it to some measure. Besides defence mechanisms developed during evolution, plants are also capable of much faster adaptation to current conditions by acclimation. However, even this process requires enough time to develop the maximum tolerance possible.

Chilling and freezing tolerance of many plants is supported by accumulation of osmotically active agents called compatible solutes, among which one of the most spread is the amino acid proline. Thanks to its amphiphilic nature, it is able to hold back the water within the cells under conditions of osmotic stress. It can also stabilize membrane and cytoplasmic proteins as well as membranes themselves. The metabolism of proline *per se* is of the same importance – because of the regulation of synthesis and degradation of this amino acid it comes to cycle process between proline and its intermediates under various conditions. This is the way, how the redox potential can change (the enzymes of proline biosynthesis require NADPH as cofactor). Proline can be the means of reducing acidity of cytoplasm and the compound able to scavenge reactive oxygen species. After recovery from stress, proline becomes the source of carbon, nitrogen, energy and reducing equivalents, which makes the recovery of plant's normal metabolism easier.

Because of the proline's participation in the stress tolerance, the aim of this thesis was to find out if it is possible to obtain winter oilseed rape plants with increased level of proline and freezing tolerance using *in vitro* selection in microspore cultures by *trans*-4-hydroxy-L-proline. The partial aims were the selection of hydroxyproline resistant (Hyp-resistant) regenerants, the determination of the proline content in the respective variants (Hyp-resistant and control) and the comparison of the values of control plants and Hyp-resistant regenerants. The goal was also to find out the

relationship between the grade of reached freezing resistance and the level of proline in leaves of control and Hyp-resistant plants.

By microspore embryogenesis and *in vitro* selection 52 Hyp-resistant regenerated plants were obtained. As for regenerants of F₆ donor plants, there was no significantly higher content of proline in the leaves of Hyp-resistant than in control doubled haploid plants. The cold hardiness was significantly higher in HP – 10A variant if compared with the control plant. Although some Hyp-resistant doubled haploids (CH993 – 10G, CH2008 – 10D) obtained from hybrid donor plants showed higher levels of proline in leaves than control plants, differences between Hyp-resistant regenerants and the respective control plants weren't in most cases significant. Only in one variant resistant to toxic analogue (OP25 – 10) lower level of proline was found. Significantly higher cold hardiness than in control plants was reached in case of two doubled haploid Hyp-resistant plants – OP24 – 10A2 and OP24 – 10BX. In the rest of regenerants resistant to hydroxyproline hardiness wasn't either statistically important or it was lower than the hardness of control plants. The double haploid Hyp-resistant regenerant of OP21 genotype exposed after two months' acclimation by 4°C to temperature shock (-7°C) for 3,5 hours, showed significantly higher level of cold hardiness than the control plant treated same way. The constitutive proline level in the leaves of the mentioned Hyp-resistant regenerant after acclimation reached double values if compared with the control plant. In the *in vitro* plants, acclimated for 16 days, the variability was observed – not only in the amount of proline in the leaves but also in the leaves' dry weight. The amount of proline in the leaves of *in vitro* plants and the percentage of dry weight of the same leaves didn't correlate. A slight dependence of cold hardiness on the proline content in the doubled haploid plants' leaves was found. Less than 13% of their cold hardiness was possible to explain by the proline content in the leaves of tested plants.

With respect to conclusions mentioned above, for the application of the winter oilseed rape's *in vitro* selection with increased freezing tolerance, it could be appropriate to use mutagenic agens for raising the natural variability of F₁ hybrid plants' microspores. The freezing tolerance could be given by other factors than by constitutively increased level of proline and on the other hand, proline can contribute to tolerance of different stress factors with the same determinant – osmotic stress.

9. Seznam citované literatury

- Abdrakhamanova, A., Wang, Q.Y., Khokhlova, L., Nick, P.:** Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant Cell Physiol.* **44:** 676-686, 2003.
- Ahmad, I., MacDonald, M.V., Ingram, D.S.:** *In vitro* selection of primary embryos derived from UV-treated microspores of rapid cycling *Brassica napus* for herbicide tolerance. *Cruciferae Newslett.* **14-15:** 86-87, 1991.
- Ain-Lhout, F., Zunzunegui, M., Barradas, M.C.D., Tirado, R., Clavijo, A., Novo, F.G.:** Comparison of proline accumulation in two mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant Soil* **230:** 175-183, 2001.
- Alia, Hayashi, H., Chen, T.H.H., Murata, N.:** Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of *Arabidopsis* during germination and early growth. *Plant Cell Environ.* **21:** 232-239, 1998.
- Alia, Saradhi, P.P.:** Proline accumulation under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* **138:** 554-558, 1991.
- Anjum, M.A., Villiers, T.A.:** Selection of hydroxyproline-resistant cell lines from *Solanum tuberosum* L. callus. I. Stability and frost tolerance. *J. Genet. & Breed.* **53:** 113-117, 1998.
- Atici, O., Nalbantoglu, B.:** Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry* **64:** 1187-1196, 2003.
- Aubert, S., Assard, N., Boutin, J.-P., Frenot, Y., Dorne, A.-J.:** Carbon metabolism in the subantarctic Kerguelen cabbage *Pringlea antiscorbutica* R. Br.: environmental controls over carbohydrates and proline contents and relation to phenology. *Plant Cell Environ.* **22:** 243-254, 1999a.
- Aubert, S., Hennion, F., Bouchereau, A., Gout, E., Bligny, R., Dorne, A.-J.:** Subcellular compartmentation of proline in the leaves of the subantarctic Kerguelen cabbage *Pringlea antiscorbutica* R. Br. *In vivo* ^{13}C -NMR study. *Plant Cell Environ.* **22:** 255-259, 1999b.
- Bae, M.S., Cho, E.J., Choi, E., Park, O.K.:** Analysis of the nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J.* **36:** 652-663, 2003.
- Balibrea, M.E., Rus-Alvarez, A.M., Bolarin, M.C., Perez-Alfocea, F.:** Fast changes in soluble carbohydrates and proline contents in tomato seedlings in response to ionic and non-ionic iso-osmotic stresses. *J. Plant Physiol.* **151:** 221-226, 1997.
- Bandurska, H., Stroinski, A.:** ABA and proline accumulation in leaves and roots of wild (*Hordeum spontaneum*) and cultivated (*Hordeum vulgare* „Maresi“) barley genotypes under water deficit conditions. *Acta Physiol. Plant.* **25:** 55-61, 2003.
- Barnabás, B., Kovács, G., Hegedűs, A., Erdei, S., Horváth, G.:** Regeneration of doubled haploid plants from *in vitro* selected microspores to improve aluminium tolerance in wheat. *J. Plant Physiol.* **156:** 217-222, 2000.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D.:** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* **39:** 205-207, 1973.
- Binarova, P., Hause, G., Cenklová, V., Cordewener, J.H.G., Van Lookeren Campagne, M.M.:** A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. Sex. *Plant Reprod.* **10:** 200-208, 1997.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., Jensen, R.G.:** Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* **7:** 1099-1111, 1995.

- Bright, S.W.J., Kueh, J.S.H., Rognes, S.E.**: Lysine transport in two barley mutants with altered uptake of basic amino acids in the root. *Plant Physiol.* **72**: 821-824, 1983.
- Burnet, M., Lafontaine, P.J., Hanson, A.D.**: Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. *Plant Physiol.* **108**: 581-588, 1995.
- Cattivelli, L., Crosatti, C., Maré, C., Grossi, M., Mastrangelo, A.M., Mazzucotelli, E., Govoni, Ch., Galiba, G., Stanca, A.M.**: Expression of cold-regulated (*cor*) genes in barley: molecular bases and environmental interaction. In: Li, Ch., Palva, E.T. (eds.): *Plant Cold Hardiness*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 121-137, 2002.
- Clifford, S.C., Arndt, S.K., Corlett, J.E., Joshi, S., Sankhla, N., Popp, M., Jones, H.G.**: The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *J. Exp. Bot.* **49**: 967-977, 1998.
- Coventry, J., Kott, L., Beversdorf, W.D.**: Manual for microspore culture technique for *Brassica napus*. Department of Crop Science Tech. Bull. OAC Pub. 0489, University of Guelph, 1988.
- Csonka, L.N.**: Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **182**: 82-86, 1981.
- Csonka, L.N.**: Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**: 121-147, 1989.
- Csonka, L.N., Gelvin, S.B., Goodner, B.W., Orser, C.S., Siemieniak, D., Slightom, J.L.**: Nucleotide sequence of a mutation in the *proB* gene of *Escherichia coli* that confers proline overproduction and enhanced tolerance to osmotic stress. *Gene* **64**: 199-205, 1988.
- Dandekar, A.M., Uratsu, S.L.**: A single base pair change in proline biosynthesis genes causes osmotic stress tolerance. *J. Bacteriol.* **170**: 5943-5945, 1988.
- Deane, C.R., Dix, P.J., Fuller, M.P.**: Selection of hydroxyproline resistant proline accumulating mutants of cauliflower for improved frost resistance. *Acta Horticulturae* **407**: 123-129, 1996.
- Delauney, A.J., Hu, Ch.-A.A., Kavi Kishor, P.B., Verma, D.P.S.**: Cloning of ornithine δ-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by *trans*-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **268**: 18673-18678, 1993.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S.**: A soybean gene encoding Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 299-305, 1990.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S.**: Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* **4**: 215-223, 1993.
- De Ronde, J.A., Spreeth, M.H., Cress, W.A.**: Effect of antisense L- Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress. *Plant Growth Regul.* **32**: 13-26, 2000.
- Des Etages, S.A.G., Saxena, D., Huang, H.L., Falvey, D.A., Barber, D., Brandriss, M.C.**: Conformational changes play a role in regulating the activity of the proline utilization pathway-specific regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **40**: 890-899, 2001.
- Deuschle, K., Funck, D., Hellmann, H., Däschner, K., Binder, S., Frommer, W.B.**: A nuclear gene encoding mitochondrial Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate

- dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. Plant J. **27**: 345-355, 2001.
- Deutch, A.H., Rushlow, K.E., Smith, C.J.**: Analysis of the *Escherichia coli proBA* locus by DNA and protein sequencing. Nucleic Acids Res. **12**: 6337-6355, 1984.
- Deutch, A.H., Smith, C.J., Rushlow, K.E., Kretschmer, P.J.**: *Escherichia coli* Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase: gene sequence, protein overproduction and purification. Nucleic Acids Res. **10**: 7701-7714, 1982.
- Dierks-Ventling, Ch., Tonelli, Ch.**: Metabolism of proline, glutamate, and ornithine in proline mutant root tips of *Zea mays* (L.). Plant Physiol. **69**: 130-134, 1982.
- Dörffling, K., Dörffling, H., Lesselich, G.**: *In vitro*-selection and regeneration of hydroxyproline-resistant lines of winter wheat with increased proline content and increased frost tolerance. J. Plant Physiol. **142**: 222-225, 1993.
- Dörffling, K., Dörffling, H., Lesselich, G., Luck, E., Melz, G.**: Improvement of frost tolerance in winter wheat by *in vitro* selection of proline-overproducing mutants. Acta Agronomica Hungarica **45**: 295-299, 1997a.
- Dörffling, K., Dörffling, H., Lesselich, G., Melz, G., Jürgens, H.U.**: *In vitro* selection and genetic analysis of increased frost tolerance in winter wheat. In: Dörffling, K., Brettschneider, B., Tantau, H., Pithan, K. (eds.): Crop adaptation to cool climates. Workshop COST 814, October 12-14, Hamburg. ECSP-EEC-EAAC, Brussels, Luxembourg, Belgium, 259-264, 1994.
- Dörffling, K., Dörffling, H., Lesselich, G., Luck, E., Zimmermann, C., Melz, G., Jürgens, H.U.**: Heritable improvement of frost tolerance in winter wheat by *in vitro*-selection of hydroxyproline-resistant proline overproducing mutants. Euphytica **93**: 1-10, 1997b.
- Elthon, T.E., Stewart, C.R.**: Submitochondrial location and electron transport characteristics of enzymes involved in proline oxidation. Plant Physiol. **67**: 780-784, 1981.
- Evers, D., Overney, S., Simon, P., Greppin, H., Hausman, J.F.**: Salt tolerance of *Solanum tuberosum* L. overexpressing an heterologous osmotin-like protein. Biol. Plant. **42**: 105-112, 1999.
- Fahl, E., Kunkel, S., Dörffling, K.**: Low-temperature induced changes in frost tolerance and proline content in three winter rape varieties under field and growth chamber conditions. In: Dörffling, K., Brettschneider, B., Tantau, H., Pithan, K. (eds.): Crop adaptation to cool climates. Workshop COST 814, October 12-14, Hamburg. ECSP-EEC-EAAC, Brussels, Luxembourg, Belgium, 99-106, 1994.
- Faltus, M.**: Proces otužování vůči mrazu a indukce chladem regulovaných bílkovin u obilovin. Disertační práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Katedra fyziologie rostlin, Praha, 2001.
- Forlani, G., Scainelli, D., Nielsen, E.**: Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from cultured cells of potato. Purification and properties. Plant. Physiol. **113**: 1413-1418, 1997.
- Fougère, F., Le Rudulier, D., Streeter, J.G.**: Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant. Physiol. **96**: 1228-1236, 1991.
- Fricke, W., Pahlich, E.**: The effect of water stress on the vacuole-extravacuole compartmentation of proline in potato cell suspension cultures. Physiol. Plant. **78**: 374-378, 1990.

- Garg, A.K., Kim, J.-K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V., Wu, R.J.**: Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. PNAS **99**: 15898-15903, 2002.
- Georgieva, K., Fedina, I., Maslenkova, L., Peeva, V.**: Response of chlorina barley mutants to heat stress under low and high light. Funct. Plant Biol. **30**: 515-524, 2003.
- Gloser, J., Prášil, I.**: Fyziologie stresu. In: Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol.: Fyziologie Rostlin. Academia, Praha, 412-431, 1998.
- Gusta, L.V., Wisniewski, M., Nesbitt, N.T., Gusta, M.L.**: The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. Plant Physiol. **135**: 1642-1653, 2004.
- Guy, Ch.**: The influence of temperature extremes on gene expression, genomic structure, and the evolution of induced tolerance in plants. In: Lerner, H.R. (ed.): Plants Responses to Environmental Stresses. From Phytohormones to Genom Reorganization. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 497-548, 1999.
- Handa, S., Handa, A.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A.**: Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. Plant Physiol. **80**: 938-945, 1986.
- Hare, P.D., Cress, W.A.**: Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regul. **21**: 79-102, 1997.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J.**: Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell Environ. **21**: 535-553, 1998.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J.**: Proline synthesis and degradation: A model system for elucidating stress-related signal transduction. J. Exp. Bot. **50**: 413-434, 1999.
- Hayashi, H., Alia, Mustardy, L., Deshni, P., Ida, M., Murata, N.**: Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. Plant J. **12**: 133-142, 1997.
- Hayashi, F., Ichino, T., Osanai, M., Wada, K.**: Oscillation and regulation of proline content by P5CS and ProDH gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. Plant Cell Physiol. **41**: 1096-1101, 2000.
- He, D.Y., Yu, S.W.**: Inheritance of the higher proline content characteristic and salt tolerance of high proline producing variant of rice. Acta Phytophysiol. Sin. **23**: 357-362, 1997.
- Hellmann, H., Funck, D., Rentsch, D., Frommer, W.B.**: Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. Plant Physiol. **122**: 357-367, 2000.
- Hirt, H.**: Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. PNAS **97**: 2405-2407, 2000.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D.P.S.**: Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiol. **122**: 1129-1136, 2000.
- Hu, Ch.-A.A., Delauney, A.J., Verma, D.P.S.**: A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 9354-9358, 1992.
- Hu, Ch.-A.A., Lin, W.-W., Obie, C., Valle, D.**: Molecular enzymology of mammalian Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase: Alternative splice donor utilization

- generates isoforms with different sensitivity to ornithine inhibition. *J. Biol. Chem.* **274**: 6754-6762, 1999.
- Hurry, V., Druart, N., Cavaco, A., Gardeström, P., Strand, Å.:** Photosynthesis at low temperatures: a case study with *Arabidopsis*. In: Li, Ch., Palva, E.T. (eds.): *Plant Cold Hardiness*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 161-179, 2002.
- Charest, Ch., Phan, Ch.T.:** Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*): properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiol. Plant.* **80**: 159-168, 1990.
- Charne, D.G., Beversdorf, W.D.:** Improving microspore culture as a rapeseed breeding tool: the use of auxins and cytokinins in an induction medium. *Can. J. Bot.* **66**: 1671-1675, 1988.
- Chen, H., Kuang, B.J., Wang, J.J.:** Isolation and characterization of a Chinese *Aneurolepidium* cell line resistant to hydroxyproline. *Acta Bot. Sin.* **37**: 103-108, 1995.
- Chen, W.P., Li, P.H.:** Attenuation of reactive oxygen production during chilling in ABA-treated maize cultured cells. In: Li, Ch., Palva, E.T. (eds.): *Plant Cold Hardiness*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 223-233, 2002a.
- Chen, W.P., Li, P.H.:** Membrane stabilization by abscisic acid under cold aids proline in alleviating chilling injury in maize (*Zea mays L.*) cultured cells. *Plant Cell Environ.* **25**: 955-962, 2002b.
- Chen, Z.Z., Snyder, S., Fan, Z.G., Loh, W.H.:** Efficient production of doubled haploid plants through chromosome doubling of isolated microspores in *Brassica napus*. *Plant Breeding* **113**: 217-221, 1994.
- Chuong, P.V., Deslauriers, C., Kott, L.S., Beversdorf, W.D.:** Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture of *Brassica napus*. *Can. J. Bot.* **66**: 1653-1657, 1988.
- Iba, K.:** Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 225-245, 2002.
- Iqbal, M.C.M., Möllers, C., Röbbelen, G.:** Increased embryogenesis after colchicine treatment of microspore cultures of *Brassica napus* L. *J. Plant Physiol.* **143**: 222-226, 1994.
- Iyer, S., Caplan, A.:** Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiol.* **116**: 203-211, 1998.
- Jackson, A.E., Seppelt, R.D.:** The accumulation of proline in *Prasiola crispa* during winter in Antarctica. *Physiol. Plant.* **94**: 25-30, 1995.
- Janáček, J., Prášil, I.:** Quantification of plant frost injury by nonlinear fitting of an S-shaped function. *Cryo-Letters* **12**: 47-52, 1991.
- Junntila, O., Robberecht, R.:** Ecological aspects of cold-adapted plants with special emphasis on environmental control of cold hardening and dehardening. In: Margesin, R., Schinner, F. (eds.): *Cold-Adapted Organisms – Ecology, Physiology, Enzymology and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 57-77, 1999.
- Junntila, O., Welling, A., Li, Ch., Berhany, A.T., Palva, E.T.:** Physiological aspects of cold hardiness in northern deciduous tree species. In: Li, Ch., Palva, E.T. (eds.): *Plant Cold Hardiness*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 65-76, 2002.
- Kacperska, A.:** Plant responses to low temperature: signaling pathways involved in plant acclimation. In: Margesin, R., Schinner, F. (eds.): *Cold-Adapted Organisms – Ecology, Physiology, Enzymology and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 79-103, 1999.

- Kadlecová, Z.**: Kyselina abscisová – stresový hormon. Biol. listy **64**: 1-17, 1999.
- Kavi Kishor, P.B., Hong, Z., Miao, G.-H., Hu, C.-A.A., Verma, D.P.S.**: Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiol. **108**: 1387-1394, 1995.
- Kawamura, Z., Uemura, M.**: Changes in the plasma membrane from *Arabidopsis thaliana* within one week of cold acclimation. In: Li, Ch., Palva, E.T. (eds.): Plant Cold Hardiness. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 181-194, 2002.
- Kawamura, Y., Uemura, M.**: Mass spectrometric approach for identify in putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves assotiated with cold acclimation. Plant J. **2**: 141-154, 2003.
- Kemble, A.R., Macpherson, H.T.**: Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. Biochem. J. **58**: 46-49, 1954.
- Kishitani, S., Takanami, T., Suzuki, M., Oikawa, M., Yokoi, S., Ishitani, M., Alvarez-Nakase, A.M., Takabe, T., Takabe, T.**: Compatibility of glycine betaine in rice plants: evaluation using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase from barley. Plant Cell Environ. **23**: 107-114, 2000.
- Kiyosue, T., Yoshioka, Y., Yamaguchi-Shinjaki, K., Shinozaki, K.**: A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. Plant Cell **8**: 1323-1335, 1996.
- Klíma, M., Vybádková, M., Kučera, V.**: Production and utilization of doubled haploids in *Brassica oleracea* vegetables. Hort. Sci. (Prague) **31**: 119-123, 2004.
- Kocsy, G., Laurie, R., Szalai, G., Szilágyi, V., Simon-Sarkadi, L., Galiba, G., De Ronde, J.A.**: Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stresses. Physiol. Plant. **124**: 227-235, 2005.
- Kohl, D.H., Schubert, K.R., Carter, M.B., Hagedorn, C.H., Shearer, G.**: Proline metabolism in N₂-fixing root nodules: energy transfer and regulation of purine synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 2036-2040, 1988.
- Konstantinova, T., Parvanova, D., Atanassov, A., Djilianov, D.**: Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. Plant Sci. **163**: 157-164, 2002.
- Kott, L.S., Beversdorf, W.D.**: Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection. Plant Cell Tiss. Org. Cult. **23**: 187-192, 1990.
- Kott, L.S., Polsoni, L., Ellis, B., Beversdorf, W.D.**: Autotoxicity in isolated microspore cultures of *Brassica napus*. Can. J. Bot. **66**: 1665-1670, 1988.
- Kratch, H., Wise, R.R.**: The ultrastructure of chilling stress. Plant Cell Environ. **23**: 337-350, 2000.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H., Zhu, T., Wang, X., Harper, J.F.**: Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. Plant Physiol. **130**: 2129-2141, 2002.
- Kučera, V., Vybádková, M., Klíma, M.**: Utilisation of doubled haploids in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) breeding. Czech J. Genet. Plant Breed. **38**: 50-54, 2002.
- Lalk, I., Dörfpling, K.**: Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. Physiol. Plant. **63**: 287-292, 1985.

- Larher, F., Aziz, A., Deleu, C., Lemesle, P., Ghaffar, A., Bouchard, F., Plasman, M.**: Suppression of the osmoinduced proline response of rapeseed leaf discs by polyamines. *Physiol. Plant.* **102**: 139-147, 1998.
- Larher, F., Leport, L., Petrivalsky, M., Chappart, M.**: Effectors for the osmoinduced proline response in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **31**: 911-922, 1993.
- Larher, F., Rotival-Garnier, N., Lemesle, P., Plasman, M., Bouchereau, A.**: The glycine betaine inhibitory effect on the osmoinduced proline response of rape leaf discs. *Plant Sci.* **113**: 21-31, 1996.
- Larcher, W.**: *Physiological Plant Ecology – Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2003.
- Lascano, H.R., Antonicelli, G.E., Luna, C.M., Melchiorre, M.N., Gómez, L.D., Racca, R.W., Trippi, V.S., Casano, L.M.**: Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and *in vitro* studies. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**: 1095-1102, 2001.
- Lichter, R.**: Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* **105**: 427-434, 1982.
- Lichter, R.**: From microspores to rape plants: a tentative way to low glucosinolate strains. In: Sorensen, H. (ed.): *World Crops: Production, Utilization, Description*. Lancaster, Dr. W. Junk Publ., 268-277, 1985.
- Lichter, R.**: Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* species. *Plant Breeding* **103**: 119-123, 1989.
- Lichter, R., De Groot, E., Fiebig, D., Schweiger, R., Gland, A.**: Glucosinolates determined by HPLC in the seeds of microspore-derived homozygous lines of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding* **100**: 209-221, 1988.
- Lin, D.B., Yan, Q.S., Shen, D.X.**: A study on selection of hydroxyproline-resistant somaclonal cell line from *Citrus* and evaluation of its cold tolerance. *J. Zhejiang Agricultural University* **25**: 94-98, 1999.
- Liu, S., Wang, H., Zhang, J., Fitt, B.D.L., Xu, Z., Evans, N., Liu, Y., Yang, W., Guo, X.**: *In vitro* mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Rep* **24**: 133-144, 2005.
- Maggio, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Locy, R.D.**: Moderately increased constitutive proline does not alter osmotic stress tolerance. *Physiol. Plant.* **101**: 240-246, 1997.
- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J.I., Damsz, B., Narasimhan, M.L., Hasegawa, P.M., Joly, R.J., Bressan, R.A.**: Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *Plant J.* **31**: 699-712, 2002.
- Maliga, P.**: Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 519-542, 1984.
- Mani, S., Van de Cotte, B., Van Montagu, M., Verbruggen, N.**: Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **128**: 73-83, 2002.
- Marrs, K.A.**: The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 127-158, 1996.
- Martin, C., Jones, J.**: Cold tolerance, *SFR2*, and the legacy of Gary Warren. *Plant Cell* **16**: 1955-1957, 2004.
- Matsumoto, K., Souza, L.A.C., Barbosa, M.L.**: *In vitro* selection for *Fusarium* wilt resistance in banana I. Co-cultivation technique to produce culture filtrate for race 1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Fruits Paris* **54**: 97-102, 1999.

- Mattioni, C., Lacerenza, N.G., Troccoli, A., De Leonardis A.M., Di Fonzo, N.:** Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiol. Plant.* **101**: 787-792, 1997.
- Mauro, M.L., Trovato, M., De Paolis, A., Gallelli, A., Costantino, P., Altamura, M.M.:** The plant oncogene *rolD* stimulates flowering in transgenic tobacco plants. *Dev. Biol.* **180**: 693-700, 1996.
- Maxwell, S.A., Davis, G.E.:** Differential gene expression in p53-mediated apoptosis-resistant vs. apoptosis-sensitive tumor cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13009-13014, 2000.
- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, Ch., Van Montagu, M., Inzé, D.:** Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.* **49**: 649-667, 1998.
- McKersie, B.D., Leshem, Y.Y.:** Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.
- Möllers, C., Iqbal, M.C.M., Röbbelen, G.:** Efficient production of doubled haploid *Brassica napus* plants by colchicine treatment of microspores. *Euphytica* **75**: 95-104, 1994.
- Murashige, T., Skoog, F.:** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497, 1962.
- Nakashima, K., Satoh, R., Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.:** A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **118**: 1233-1241, 1998.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshioka, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Schinozaki, K., Schinozaki, K.:** Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **461**: 205-210, 1999a.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshioka, Y., Sanada, Y., Wada, K., Tsukaya, H., Kakubari, Y., Yamaguchi-Schinozaki, K., Schinozaki, K.:** Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**: 185-193, 1999b.
- Nehlin, L., Möllers, Ch., Glimelius, K.:** Induction of secondary embryogenesis in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. *Plant Sci.* **111**: 219-227, 1995.
- Nick, P.:** Control of the response to low temperature. In: Plant Microtubules. Nick, P. (ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 121-135, 2000.
- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M.:** The Physiology of Plants Under Stress – Abiotic Factors. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Weinheim, 1996.
- Noctor, G., Foyer, Ch.H.:** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 249-279, 1998.
- Nogueira, F.T.S., Rosa, V.E., Menossi, M., Ulian, E.C., Arruda, P.:** RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiol.* **132**: 1811-1824, 2003.
- Nuccio, M.L., Russell, B.L., Nolte, K.D., Rathinasabapathi, B., Gage, D.A., Hanson, A.D.:** The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant J.* **16**: 487-496, 1998.

- Öztürk, M., Szaniawski, R.K.**: Root temperature stress and proline content in leaves and roots of two ecologically different plant species. *Z. Pflanzenphysiol.* **102**: 375-377, 1981.
- Pahlich, E., Kerres, R., Jäger, H.-J.**: Influence of water stress on the vacuole/extravacuole distribution of proline in protoplasts of *Nicotiana rustica*. *Plant Physiol.* **72**: 590-591, 1983.
- Palonen, P., Buszard, D.**: *In vitro* screening for cold hardiness of raspberry cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **53**: 213-216, 1998.
- Pandey, R., Agarwal, R.M.**: Water stress-induced changes in proline contents and nitrate reductase activity in rice under light and dark conditions. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **4**: 53-57, 1998.
- Parvanova, D., Ivanov, S., Konstantinova, T., Karanov, E., Atanassov, A., Tsvetkov, T., Alexieva, V., Djilianov, D.**: Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 57-63, 2004.
- Pastori, G.M., Foyer, Ch.H.**: Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of „redox“ and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* **129**: 460-468, 2002.
- Pechan, P.M., Keller, W.A.**: Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plant.* **74**: 377-384, 1988.
- Peng, Z., Lu, Q., Verma, D.P.S.**: Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 334-341, 1996.
- Petrusa, L.M., Winicov, I.**: Proline status in salt-tolerant and salt-sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. *Plant Physiol. Biochem.* **35**: 303-310, 1997.
- Pokorná, J.**: Vliv chladu na aktinový cytoskelet buněčné linie tabáku BY-2 (*Nicotiana tabacum* L.). Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Katedra fyziologie rostlin, Praha, 2002.
- Polsoni, L., Kott, L.S., Beversdorf, W.D.**: Large-scale microspore culture technique for mutation-selection studies in *Brassica napus*. *Can. J. Bot.* **66**: 1681-1685, 1988.
- Prášil, I., Zámečník, J.**: The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury. I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury. *Environ. Experim. Bot.* **40**: 1-10, 1998.
- Provart, N.J., Gil, P., Chen, W., Han, P., Chang, H., Wang, X., Zhu, T.**: Gene expression phenotypes of *Arabidopsis* associated with sensitivity to low temperatures. *Plant Physiol.* **132**: 893-906, 2003.
- Rajashekhar, C.B.**: Cold response and freezing tolerance in plants. In: Wilkinson, R.E. (ed.): *Plant-Environment Interactions*, Second Edition. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 321-341, 2000.
- Rascio, A., Platani, C., Scalfati, G., Tonti, A., Di Fonzo, N.**: The accumulation of solutes and water binding strength in durum wheat. *Physiol. Plant.* **90**: 715-721, 1994.
- Rayapati, P.J., Stewart, C.R., Hack, E.**: Pyrroline-5-carboxylate reductase is in pea (*Pisum sativum* L.) leaf chloroplasts. *Plant Physiol.* **91**: 581-586, 1989.
- Reaney, M.J.T., Gusta, L.V.**: Modeling sequential responses of plant cells to freezing and thawing. In: Margesin, R., Schinner, F. (eds.): *Cold-Adapted Organisms – Ecology, Physiology, Enzymology and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 119-135, 1999.

- Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E., Frommer, W.B.**: Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell* **8**: 1437-1446, 1996.
- Roosens, N.H., Bitar, F.A., Loenders, K., Angenon, G., Jacobs, M.**: Overexpression of ornithine- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol. Breed.* **9**: 73-80, 2002.
- Rose, J.K.C., Bashir, S., Giovannonni, J.J., Jahu, M.N., Saravanan R.S.**: Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J.* **39**: 715-733, 2004.
- Rudolph, A.S., Crowe, J.H., Crowe, L.M.**: Effects of three stabilising agents – proline, betaine and trehalose on membrane phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **245**: 134-143, 1986.
- Sakamoto, A., Murata, N.**: The use of bacterial choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants. *Plant Physiol.* **125**: 180-188, 2001.
- Sakamoto, A., Valverde, R., Alia, Chen, T.H.H., Murata, N.**: Transformation of *Arabidopsis* with the *codA* gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. *Plant J.* **22**: 449-453, 2000.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F., Coupland, G.**: Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* **288**: 1613-1616, 2000.
- Sangwan, V., Örvar, B.L., Dhindsa, R.S.**: Early events during low temperature signaling. In: Li, Ch., Palva, E.T. (eds.): *Plant Cold Hardiness*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 43-53, 2002.
- Saradhi, P.P., Alia, Arora, S., Prasad, K.V.S.K.**: Proline accumulates in plants exposed to UV-radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**: 1-5, 1995.
- Savouré, A., Hua, X.-J., Bertauche, N., Van Montagu, M., Verbruggen, N.**: Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 104-109, 1997.
- Savouré, A., Jaoua, S., Hua, X.-J., Ardiles, W., Van Montagu, M., Verbruggen, N.**: Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **372**: 13-19, 1995.
- Seki, M., Narusaki, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Schinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K.**: Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**: 61-72, 2001.
- Sheveleva, E., Chmara, W., Bohnert, H.J., Jensen, R.G.**: Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.* **115**: 1211-1219, 1997.
- Sheveleva, E.V., Marquez, S., Chmara, W., Zegeer, A., Jensen, R.G., Bohnert, H.J.**: Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco. High amounts of sorbitol lead to necrotic lesions. *Plant Physiol.* **117**: 831-839, 1998.
- Shinozaki, K., Yamaguchi - Shinozaki, K., Seki, M.**: Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 410-417, 2003.

- Schobert, B., Tschesche, H.**: Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **541**: 270-277, 1978.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S., Sayre, R.T.**: Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* **14**: 2837-2847, 2002.
- Sivakumar, P., Sharmila, P., Saradhi, P.P.**: Proline suppresses Rubisco activity by dissociating small subunits from holoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**: 236-241, 2001.
- Solecka, D., Kacperska, A.**: Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. *Physiol. Plant.* **119**: 253-262, 2003.
- Stressmann, M., Kitao, S., Griffith, M., Moresoli, Ch., Bravo, L.A., Marangoni, A.G.**: Calcium interacts with antifreeze proteins and chitinase from cold-acclimated winter rye. *Plant Physiol.* **135**: 364-376, 2004.
- Strizhov, N., Ábrahám, E., Ökrész, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C., Szabados, L.**: Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by *ABA1*, *ABII* and *AXR2* in *Arabidopsis*. *Plant J.* **12**: 557-569, 1997.
- Sung, D.Y., Kaplan, F., Lee, K.J., Guy, C.L.**: Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci.* **8** (4): 179- 187, 2003.
- Szoke, A., Miao, G.-H., Hong, Z., Verma, D.P.S.**: Subcellular location of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. *Plant Physiol.* **99**: 1642-1649, 1992.
- Tamás, L.**: Nízká teplota - stres - proteíny. *Biol. listy* **64**: 19- 32, 1999.
- Tantau, H., Balko, Ch., Brettschneider, B., Melz, G., Dörffling, K.**: Improved frost tolerance and winter survival in winter barley (*Hordeum vulgare* L.) by *in vitro* selection of proline overaccumulating lines. *Euphytica* **139**: 19-32, 2004.
- Tantau, H., Dörffling, K.**: *In vitro*-selection of hydroxyproline-resistant cell lines of wheat (*Triticum aestivum*): accumulation of proline, decrease in osmotic potential, and increase in frost tolerance. *Physiol. Plant.* **82**: 243-248, 1991.
- Tarczynski, M.C., Jensen, R.G., Bohnert, H.J.**: Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* **259**: 508-510, 1993.
- Tasgin, E., Atici, O., Nalbantoglu, B.**: Effect of salycic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Reg.* **41**: 231-236, 2003.
- Tateishi, Y., Nakagawa, T., Esaka, M.**: Osmotolerance and growth stimulation of transgenic tobacco cells accumulating free proline by silencing proline dehydrogenase expression with double-stranded RNA interference technique. *Physiol. Plant.* **125**: 224-234, 2005.
- Thom, M., Maretzki, A., Komor, E.**: Vacuoles from sugarcane suspension cultures. I. Isolation and partial characterization. *Plant Physiol.* **69**: 1315-1319, 1982.
- Thomas, E., Wenzel, G.**: Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenzücht* **74**: 77-81, 1975.
- Thomashow, M.J.**: Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **150**: 571-599, 1999.
- Trotel, P., Bouchereau, A., Niogret, M.F., Larher, F.**: The fate of osmo-accumulated proline in leaf discs of rape (*Brassica napus* L.) incubated in a medium of low osmolarity. *Plant Sci.* **118**: 31-45, 1996.
- Trotel-Aziz, P., Niogret, M.-F., Deleu, C., Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F.R.**: The control of proline consumption by abscisic acid during osmotic stress recovery of canola leaf discs. *Physiol. Plant.* **117**: 213-221, 2003.

- Trotel-Aziz, P., Niogret, M.-F., Larher, F.**: Proline level is partly under the control of abscisic acid in canola leaf discs during recovery from hyper-osmotic stress. *Physiol. Plant.* **110**: 376-383, 2000.
- Trovato, M., Maras, B., Linhares, F., Costantino, P.**: The plant oncogene *rolD* encodes a functional ornithine cyclodeaminase. *PNAS* **98**: 13449-13453, 2001.
- Van Swaaij, A.C., Jacobsen, E., Feenstra, W.J.**: Effect of cold hardening, wilting and exogenously applied proline on leaf proline content and frost tolerance of several genotypes of *Solanum*. *Physiol. Plant.* **64**: 230-236, 1985.
- Van Swaaij, A.C., Nijdam, H., Jacobsen, E., Feenstra, W.J.**: Increased frost tolerance and amino acid content in leaves, tubers and leaf callus of regenerated hydroxyproline resistant potato clones. *Euphytica* **36**: 369-380, 1987.
- Varner, J.E.**: The direct conversion of hydroxyproline to proline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**: 692-696, 1980.
- Verbruggen, N., Hua, X.-J., May, M., Van Montagu, M.**: Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8787-8791, 1996.
- Verbruggen, N., Villarroel, R., Van Montagu, M.**: Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **103**: 771-781, 1993.
- Vyvadilová, M., Zelenková, S., Tomášková, D., Košner, J.**: Diploidizace a cytologická kontrola haploidů *Brassica napus* L. *Rostl. Výr.* **39**: 129-137, 1993.
- Wang, M., Van Bergen, S., Van Duijn, B.**: Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiol.* **124**: 523-530, 2000.
- Wang, Q.I., Nick, P.**: Cold acclimation can induce microtubular cold stability in a manner distinct from abscisic acid. *Plant Cell Physiol.* **42**: 999-1005, 2001.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A.**: Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1-14, 2003.
- Weber, S., Ünker, F., Friedt, W.**: Improved doubled haploid production protocol for *Brassica napus* using microspore colchicine treatment *in vitro* and ploidy determination by flow cytometry. *Plant Breeding* **124**: 511-513, 2005.
- Wenzel, G., Hoffmann, F., Thomas, E.**: Anther culture as a breeding tool in rape. I. Ploidy level and phenotype of androgenetic plants. *Z. Pflanzenzücht* **78**: 149-155, 1977.
- Wicki, W., Messmer, M., Winzeler, M., Stamp, P., Schmid, J.E.**: *In vitro* screening for resistance against *Septoria nodorum* blotch in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **99**: 1273-1280, 1999.
- Williamson, C.L., Slocum, R.D.**: Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase (*proC*) gene in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* **100**: 1464-1470, 1992.
- Winter, H., Huber, S.C.**: Sucrose metabolism and the actin-binding cytoskeleton: SuSy as actin-binding protein. In: Staiger, C.J., Baluška, F., Volkman, Barlow, M.W. (eds.): *Actin: Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland, 119-129, 2000.
- Wisniewski, M., Fuller, M.**: Ice nucleation and deep supercooling in plants: new insights using infrared thermography. In: Margesin, R., Schinner, F. (eds.): *Cold-Adapted Organisms – Ecology, Physiology, Enzymology and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 105-118, 1999.

- Wisniewski, M., Fuller, M., Glenn, D.M., Gusta, L., Duman, J., Griffith, M.:** Extrinsic ice nucleation in plants: what are the factors involved and can they be manipulated? In: Li, Ch., Palva, E.T. (eds.): Plant Cold Hardiness. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 211-221, 2002.
- Wu, J.-T., Hsieh, M.-T., Kow, L.-Ch.:** Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella sp.* (*Chlorophyceae*) cells. *J. Phycol.* **34**: 113-117, 1998.
- Wu, J.-T., Chang, S.-Ch., Chen, K.-S.:** Enhancement of intracellular proline level in cells of *Anacystis nidulans* (cyanobacteria) exposed to deleterious concentrations of copper. *J. Phycol.* **31**: 376-379, 1995.
- Wu, Y.Y., Luo, P.:** Selection and determination of an HYP-resistant mutant in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Chinese J. Oil Crop Sci.* **20**: 10-15, 1998.
- Xin, Z., Browse, J.:** *Eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7799-7804, 1998.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., Zhu, J.K.:** Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* S165-S183, Suppl., 2002.
- Yamada, T., Kuroda, K., Jitsuyama, Y., Takezawa, D., Arakawa, K., Fujikawa, S.:** Roles of the plasma membrane and the cell wall in the responses of plant cells to freezing. *Planta* **215**: 770-778, 2002.
- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y., Shinozaki, K.:** Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.* **7**: 751-760, 1995.
- Zarka, D.G., Vogel, J.T., Cook, D., Thomashow, M.F.:** Cold induction of *Arabidopsis CBF* genes involves multiple ICE (inducer of *CBF* expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiol.* **133**: 910-918, 2003.
- Zelenková, S.:** RFLP analýzy *Brassica napus* a *Brassica oleracea*. Kandidátská disertační práce, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně, Praha, 1991.
- Zhang, F.I., Takahata, Y.:** Microspore mutagenesis and *in vitro* selection for resistance to soft rot disease in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. spp. *pekinensis*). *Breed. Sci.* **49**: 161-166, 1999.
- Zhang, H.-Q., Croes, A.F., Linskens, H.F.:** Protein synthesis in germinating pollen of *Petunia*: role of proline. *Planta* **154**: 199-203, 1982.
- Zhang, Ch.-S., Lu, Q., Verma, D.P.S.:** Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **270**: 20491-20496, 1995.
- Zhu, B., Su, J., Chang, M., Verma, D.P.S., Fan, Y.-L., Wu, R.:** Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. *Plant Sci.* **139**: 41-48, 1998.
- Zuther, E., Büchel, K., Hundertmark, M., Stitt, M., Hincha, D.K., Heyer, A.G.:** The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **576**: 169-173, 2004.