

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Gabriela Lotová

Potenciál genového inženýrství pro šlechtění rostlin odolných k abiotickým stresům: tolerance
k chladu u rýže

Potential of genetic engineering for breeding plants tolerant to abiotic stresses: cold resistance
in rice

Bakalářská práce

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

Konzultant práce: RNDr. Petra Mašková, Ph.D.

Praha, 2018

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. a RNDr. Petře Maškové, Ph.D. za jejich cenné rady, trpělivost, ochotu a morální podporu, kterou mi v průběhu psaní bakalářské práce věnovaly. Taktéž bych chtěla poděkovat mé rodině a příteli za jejich podporu během celé doby mého studia.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci sepsala samostatně a uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce nebyla využita na získání podobného či jiného akademického titulu.

V Praze, 27. 4. 2018

Podpis

Abstrakt

S rostoucí populací a klimatickými změnami stoupá i snaha o vyšlechtění výkonnějších plodin. Genové inženýrství otevřelo nebývalé šlechtitelské možnosti ve vyvíjení rostlin s požadovanými vlastnostmi. Transgenní plodiny s lepšími vlastnostmi včetně odolnosti k nepříznivým podmínkám prostředí mohou přispět k řešení problému hladomoru a malnutrice v rozvojových zemích. Ačkoliv společnost vnímá geneticky modifikované plodiny spíše negativně, hojně se jich využívá jako krmiva pro hospodářská zvířata a mimo Evropu i pro výživu lidí. Vzhledem ke komplexní povaze odolnosti vůči abiotickým stresům se dříve nepředpokládala využitelnost genových manipulací pro šlechtění odolných rostlin. Ukázalo se však, že modifikace stresové signalizační kaskády či transkripčních faktorů může vést k úspěchu.

Tato práce shrnuje možnosti genetické modifikace plodin, jež mohou vyústit v lepší toleranci vůči chladu, a je orientována zejména na rýži. Část práce se zabývá transdukcí chladového signálu, jejíž modifikací lze také docílit zvýšené tolerance vůči chladu. Další část se zabývá transkripčními faktory, jež aktivují expresi genů zvyšujících odolnost vůči nízké teplotě. Největší pozornost věnuji transkripčním faktorům CBF/DREB, jež hrají v odolnosti vůči chladu klíčovou roli.

Klíčová slova: CBF/DREB, genové inženýrství, odolnost k chladu, rýže, transgenní plodiny, transkripční faktory

Abstract

With increasing population and climate change, there has been an increase in efforts to breed more efficient crops. Genetic engineering has opened unprecedented breeding possibilities in developing plants with desired traits. Transgenic crops with better qualities, including resistance to adverse environmental conditions, can contribute to solving problems of hunger and malnutrition in developing countries. Although society perceives genetically modified crops rather negatively, these crops are widely used as feed for livestock and outside Europe also for human nutrition. Because of the complexity of resistance to abiotic stress, the utility of genetic manipulations for the breeding of resistant plants was previously not anticipated. However, it turned out that modification of the stress signalling cascade or transcription factors can lead to success.

This thesis summarizes the possibilities of genetic modification of crops, which may result in better tolerance to cold, and is mainly focused on rice. Part of the work deals with transduction of cold signal, whose modification can also result in increased tolerance to cold. Another part deals with transcription factors that activate expression of low temperature-resistant genes. The greatest attention is paid to CBF/DREB transcription factors that play a key role in cold resistance.

Key words: CBF/DREB, cold tolerance, genetic engineering, rice, transcription factors, transgenic crops

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Geneticky modifikované plodiny	1
1.1.1. Transgenní rostliny a společnost.....	2
1.1.2. Rostliny a stres	3
2. Modelová plodina: rýže (Oryza sativa L.)	5
3. Transdukce chladového signálu.....	6
3.1. Percepce a přenos signálu	6
3.1.1. MAPK kaskáda	7
3.1.2. Trehalózová signalizace.....	7
3.2. Zvýšení tolerance genetickou modifikací komponent signalizační dráhy.....	7
4. Regulace genové exprese transkripčními faktory	9
4.1. CBF/DREB nezávislá dráha	11
4.1.1. Transkripční faktory WRKY.....	11
4.1.2. Transkripční faktory NAC	11
4.1.3. Zinc finger proteiny	12
4.2. CBF/DREB závislá dráha	13
4.2.1. Transkripční faktory MYB.....	13
4.2.1.1. <i>Vliv overexprese MYB na toleranci k chladu</i>	13
4.2.2. Transkripční faktor ICE	14
4.2.2.1. <i>Vliv overexprese ICE1 na toleranci vůči chladu</i>	15
4.2.3. Transkripční faktory CBF/DREB	17
4.2.4. Cílové geny zvyšující toleranci vůči nízké teplotě	21
5. Závěr.....	22
6. Seznam použité literatury	23

Seznam použitých zkratek

35S CaMV	promotor viru mozaiky kvěťáku
AP2	APETALA2
Ca ²⁺	vápenaté ionty
CAT	kataláza
CBF	C-repeat-binding factors
COIN	cold-inducible
COR	cold-regulated
DREB	dehydration-responsive element-binding
EREBP	ethylen responsive element binding protein
ERF	ethylen responsive factor
GM	geneticky modifikovaný
ICE	inducer of CBF expression
MAPK	mitogen activated protein kinase
MDA	malondialdehyd
NT	chlad
POD	peroxidáza
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
RING	really interesting new gene
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutáza
TF	transkripční faktory
TPP	trehalóza-6-fosfát-fosfatáza
TPS	trehalóza-6-fosfát-syntáza
Ubi	ubikvitinový promotor
WT	wild type (kontrola)
ZFP	zinc finger proteiny

1. Úvod

Podle aktuálních odhadů se do roku 2050 lidská populace zvýší na 9,8 miliard, do roku 2100 dokonce na 11,2 miliard. Na svět tak do poloviny tohoto století přibude více než dvě miliardy lidí, z nichž většina se bude nacházet v chudobě. S rostoucí populací se zvyšuje i množství potravy, kterou je nutné vypěstovat. Situaci ztěžují i klimatické změny a globální oteplování. Se vzrůstající teplotou a koncentrací CO₂ v atmosféře se v severních oblastech Evropy sice pravděpodobně zvýší produktivita rostlin a zvětší se území zemědělsky využívané půdy, zároveň však dojde k prohloubení problému nedostatku vody a extrémních výkyvů počasí. Tento negativní efekt by převažoval zejména v jižních oblastech (Olesen and Bindi, 2002). Klimatické změny mohou představovat obrovský problém především v zemích, kde je velká část obyvatelstva životně závislá na vlastní sklizni. Např. v Etiopii v letech 1999-2000 čelilo téměř 10 milionů lidí kritickému nedostatku potravy, kvůli neočekávaně nízkému úhrnu srážek následovanému záplavami (Hammond and Maxwell, 2002). Problém hladomoru v rozvojových zemích není jen výsledkem rychlého růstu populace a nedostatku potravin v daných zemích. Problém spočívá i v nerovnoměrné distribuci ploch pro zemědělskou produkci. Velká část vypěstovaných plodin se exportuje, často jako krmivo pro hospodářská zvířata Evropy. Pro řešení tohoto problému je tedy třeba zlepšit ekonomický systém (Monastra and Rossi, 2003). Jednou z mnoha možností jak s problematickou situací bojovat je zvýšení odolnosti plodin a zvýšení výnosů.

Obrovský průlom v historii zemědělské produkce (zejm. rýže a pšenice) se odehrál mezi 40. a 60. lety 20. století. Tento pokrok ve šlechtění, modernizaci technologií, mechanizaci kultivace a rozvoje používání hnojiv a pesticidů je znám jako Zelená revoluce (Borlaug, 2007). Jedním ze zakladatelů byl Norman Borlaug, který byl za svou práci roku 1970 oceněn Nobelovou cenou. Ačkoliv se během 40 let výrazně redukoval počet lidí trpících hladem, revoluce nevyřešila problém malnutrice v mnoha oblastech. Kromě toho vyšlechtěné plodiny nevykazují dostatečnou toleranci vůči nepříznivým podmínkám okolního prostředí (Landi et al., 2017).

1.1. Geneticky modifikované plodiny

Podobně výrazný přelom jakou byla Zelená revoluce, představuje rozvoj technik přípravy geneticky modifikovaných (GM) rostlin. První transformace, provedená roku 1982,

spočívala v integraci modifikované transferové DNA (T-DNA) nesoucí cílový gen pomocí *Agrobacteria tumefaciens* do genomu manipulované rostliny (Fraley et al., 1983).

Motivací pro vývoj a pěstování GM plodin je snaha o zvýšení odolnosti vůči biotickým a abiotickým stresům, zvýšení výnosu a dosažení lepších výživových vlastností. Transgenní plodiny mají také potenciál zmírnit problémy malnutrice a hladu v rozvojových zemích, např. obohacením plodin o různé vitamíny a minerály. Nejznámějším příkladem je zlatá rýže s vyšším obsahem betakarotenu a železa (Monastra and Rossi, 2003).

Před uvedením GM plodin na trh musí být daná rostlina v Evropě schválena vládou. V 90. letech byly inovace v zemědělských biotechnologiích na vzestupu. Tento trend však rychle poklesl po tom, co byla roku 1998 výrazně upravena regulační a tržní politika GM plodin. Počet schválených plodin se následně výrazně snížil (Miller and Bradford, 2010).

První GM kulturní plodinou bylo rajče Flavr Savr uvedené na trh roku 1994. Do genomu byl vložen gen kódující enzym polygalakturonázu v antisense orientaci, čímž došlo ke snížení produkce daného enzymu. Záměrem bylo oddálit zrání rajčete, a prodloužit tak dobu jeho skladování (Krieger et al., 2008). Mezi momentálně pěstované GM plodiny patří zejména kukuřice, rýže, brkev řepka, bavlna a sója. V České republice se do roku 2016 pěstovala BT (*Bacillus thuringiensis*) kukuřice, jako biopalivo a krmivo pro dobytek (The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), 2016). Mezi roky 2010 - 2012 se zde pěstoval i brambor Amflora společnosti BASF, který se však v Evropě přestal prodávat kvůli nepříznivému postoji společnosti vůči GM plodinám (James, 2013).

1.1.1. Transgenní rostliny a společnost

Ačkoliv mohou být transgenní plodiny výnosnější a mít lepší výživové vlastnosti, jsou ve společnosti vnímány velmi kontroverzně. Mnozí se obávají škodlivého efektu GM plodin na lidský organismus. Tím může být např. přenesení rezistence vůči antibiotikům z transgenních plodin nebo jejich údajná toxicita, alergenicita či karcinogenita. Někteří odmítají transgenní rostliny kvůli jejich nepřirozenosti nebo z náboženských důvodů (Uzogara, 2000). Je obava, že GM rostliny mohou ohrozit ekosystém přenosem transgenů na divoké druhy a také mohou způsobit vznik nových virů. Vzhledem k patentování transgenních odrůd jsou farmáři nuceni každý rok kupovat nová semena, s čímž je spojeno riziko vzniku monopolu (Bawa & Anilakumar, 2013; Uzogara, 2000). Bylo provedeno 12 dlouhodobých studií testujících

bezpečnost konzumace GM plodin (kukuřice, sója, rýže, brambor). Přestože nebyla prokázána žádná zdravotní rizika (Snell et al., 2012), ke změně veřejného mínění studie příliš nepomohly.

1.1.2. Rostliny a stres

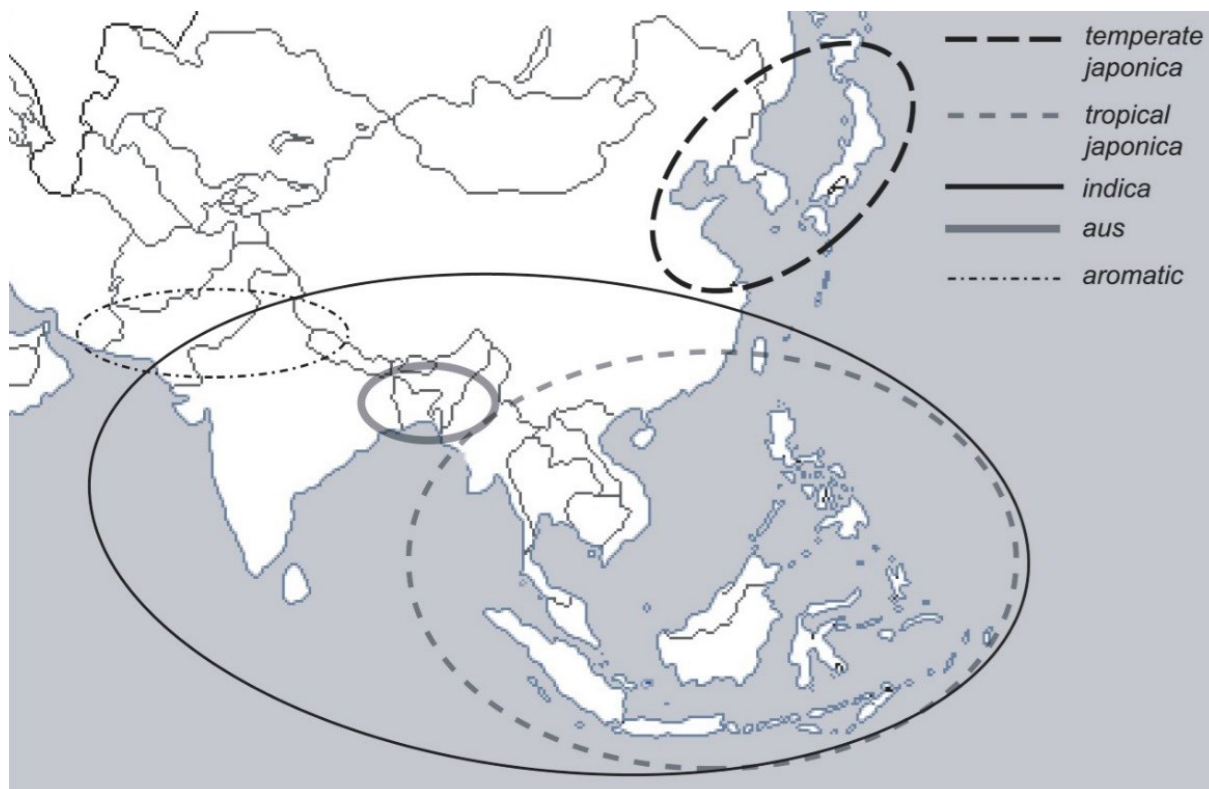
Kvůli svému sesilnému stylu života musí rostliny během svého života čelit mnohým abiotickým stresům. Patří mezi ně sucho, zaplavení, vysoká či nízká teplota a s tím související nadměrná ozáření, zasolení či přítomnost toxických látek v půdě a nedostatek živin. Kromě toho si rostliny musí poradit i s patogeny a parazity, jako je hmyz, houby, hlístice, bakterie či viry. V takovém případě mluvíme o biotickém stresu, proti němuž si rostliny vybudovaly imunitní systém. Ten zahrnuje stejně jako u živočichů pasivní a aktivní mechanismus obrany (Gimenez et al., 2018). V této práci se zaměřím na abiotický stres, konkrétně na nízkou teplotu. Působení nízké teploty a sucha na rostlinné buňky se v mnoha ohledech prolíná (změna membránového potenciálu, koncentrace buněčných solutů, negativní turgor) (Beck et al., 2007). Z toho vyplývá, že i některé mechanismy zvyšující toleranci vůči těmto stresům jsou obdobné. Nízká teplota, sucho i zasolení ovlivňují využitelnost nebo dostupnost vody. Na to mohou rostliny reagovat celou řadou mechanismů, např. akumulací proteinů LEA (Late Embryogenesis Abundant). Mezi poslední jmenované patří např. dehydriny, které prostřednictvím amfipatických segmentů asociují s hydrofobními doménami proteinů a lipidovými agregáty. Stabilizují tak membrány a proteiny (Beck et al., 2007). Následkem stresu se produkuje větší množství reaktivních forem kyslíku (ROS). Aby rostliny zabránily vzniku ROS, jako jsou např. vysoce reaktivní hydroxylové radikály, produkují zhášče ROS a antioxidanty (Bowler and Fluhr, 2000). V reakci na chlad a sucho se u mnoha rostlin zvyšuje hladina kyseliny abscisové (ABA). Ta může regulovat expresi genů zvyšujících toleranci (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). V odpovědi na nízkou teplotu je regulace skrze ABA minoritní, naproti tomu v odpovědi na sucho ABA-responzivní dráha dominuje (Beck et al., 2007).

Působení nízké teploty na rostliny můžeme rozdělit na chlad, dále označovaný také jako NT (při 0 - 15 °C) a mráz (méně než 0°C), přičemž navození tolerance vůči nim probíhá u rostlin odlišně. Rostliny z oblasti mírného pásu jsou vůči chladu odolnější než subtropické nebo tropické rostliny, avšak i ty jsou citlivé vůči mrazu (Zhu et al., 2007). Pro zvýšení tolerance vůči mrazu dochází v rostlinách při vystavení nízkým teplotám k chladové aklimaci (Gilmour et al., 1998). Tropické a subtropické rostliny však tuto schopnost postrádají (Zhu et al., 2007).

Chlad negativně ovlivňuje rostliny na tradičních stanovištích a zároveň omezuje jejich rozšíření do méně příznivých oblastí. Vytvořením odolnějších transgenních plodin by tak bylo možné rozšířit území, na nichž se senzitivní druhy pěstují. Cílem mé bakalářské práce bylo popsat úspěšné transformace vedoucí k vytvoření rostlin odolnějších k nízkým teplotám a zmapovat cílové geny s potenciálem přispět k této odolnosti. Vzhledem k velkému množství studií, jež byly provedeny, jsem téma zúžila na jednu z velmi důležitých plodin, rýži, a největší pozornost jsem věnovala modifikacím dráhy závislé na transkripčních faktorech CBF/DREB, jež aktivují expresi cílových genů zvyšujících odolnost vůči chladu.

2. Modelová plodina: rýže (*Oryza sativa* L.)

Stres z nízké teploty výrazně ohrožuje výnosy kulturních plodin. Rýže (*Oryza sativa* L.) je jednou z nejdůležitějších plodin na světě, více než polovina lidské populace spoléhá na rýži jako základní potravinu (Lafitte et al., 2004). Ve východní Asii je rýže nejvýznamnější obilninou (Man et al., 2017).



Obr. č. 1: Současný areál kultivace hlavních poddruhů a variet rýže v Asii. Podle Sweeney et al., 2007.

Mezi dva hlavní poddruhy rýže, hojně využívané pro konzumaci po celém světě, patří krátkozrnná *japonica* a dlouhozrnná *indica*. Důležité poddruhy a variety i s přibližným areálem kultivace jsou uvedeny na obr. č. 1. Temperátní poddruh *japonica* je tolerantnější vůči nízké teplotě než tropický poddruh *indica* (Andaya and Mackill, 2003).

Rozsah poškození rostliny způsobený chladem závisí nejen na délce působení a míře stresu, ale také na jejím vývojovém stádiu (Sperotto et al., 2018). Produktivita rýže je ovlivněna především ve vysokých nadmořských výškách v brzkém jaru, kdy chlad negativně ovlivňuje klíčení a inhibuje růst semenáčků (Andaya and Mackill, 2003). Kromě produktivity rostlin ovlivňuje chlad také jejich růst a geografické rozšíření (Zhu, Dong, & Zhu, 2007). Klasické šlechtění má omezené možnosti jak zvýšit toleranci vůči chladu. Vzhledem k požadavkům

zisku nových odrůd je klasické šlechtění navíc příliš zdlouhavé. Genové inženýrství se díky rychlému technologickému pokroku jeví jako nadějný nástroj jak zajistit vyšší produktivitu a toleranci vůči stresu (Sanghera et al., 2011). Rýže je jednou z nejprostudovanějších plodin, u které se využívá genetické modifikace (GM) pro zvýšení odolnosti vůči chladu. K tomu ji předurčuje nejen její zemědělský význam, ale také relativně malý diploidní genom, díky čemuž je ideální modelovou rostlinou. Představuje proto také vhodnou plodinu, na níž lze přiblížit mechanismy tolerance vůči chladu a využití GM ke zvýšení této tolerance u zemědělsky významných plodin.

Díky přirozeně lepší toleranci vůči chladu byla zatím geneticky modifikována hlavně *O. sativa* ssp. *japonica*. Zaměřit se pouze na jeden druh při vyvíjení odolnějších plodin však není řešením. Oba poddruhy mají specifické vlastnosti ustálené v jednotlivých kulturách, a není proto možné je jednoduše zaměnit. Nedávno byla provedena analýza genů exprimovaných pod chladovým stresem u poddruhů *japonica* a *indica* (Sperotto et al., 2018). Tato studie by mohla pomoci objasnit molekulární a fyziologické mechanismy chladové tolerance, a tím i přispět k budoucímu vyšlechtění transgenní rýže ssp. *indica* odolné vůči chladu.

3. Transdukce chladového signálu

Signál o působení nízké teploty je v rýži zachycen primárními senzory, které vyvolají vznik sekundárních signálních molekul, např. inositol-1,4,5-trifosfátu (IP₃) nebo reaktivních forem kyslíku (ROS) (Tuteja, 2010). Tyto molekuly v buňce mohou měnit hladinu vápenatých iontů (Ca²⁺), a vyvolat tak fosforylační kaskádu. Ta může aktivovat proteiny, které budou přímo odpovídat na působící stres, nebo aktivuje transkripční faktory (TF), jež spouští expresi specifických genů (Murata and Los, 1997).

3.1. Percepce a přenos signálu

S klesající teplotou klesá fluidita membrány. Senzorem fluidity, tedy i nízké teploty, by mohla být mikrodoména membrány schopná detekovat konformační změnu, resp. přechod z tekutého do gelového stavu. Konkrétních primárních sensorů přijímajících signál nízkých teplot ještě stále nebylo objeveno mnoho. Membránovým senzorem detekujícím chlad u rýže je COLD1, který vyvolává vtok Ca²⁺ do cytoplazmy, a zahajuje tak signalizaci (Ma et al., 2015;

Murata and Los, 1997). V dalším předání stresového signálu hrají roli proteinkinázy (např. CDPK a MAPK) a fosfatázy.

Na Ca^{2+} se v buňce váží kalcineurin B-like proteiny (CBLs) a kalmoduliny (CaM), na které reagují kalcium-dependentní proteinkinázy (CDPKs). Po navázání vápenatých iontů prodělají CaM a CBLs konformační změnu a aktivují další komponenty signální kaskády (DeFalco et al., 2010). V cytoplazmě kalcineurin B-like proteiny (CBL) interagují se Ser/Thr proteinkinázami CIPK (CBL-interacting protein kinase) a aktivují je. CIPK následně fosforylují další komponenty kaskády (Xiang et al., 2007).

3.1.1. MAPK kaskáda

MAPK (mitogen activated protein kinase) kaskáda odpovídá na přijatý stresový signál (většinou na Ca^{2+}) postupnou fosforylací MAP kináz. Následkem aktivace MAPK kaskády se aktivují cytoskeletální proteiny, fosfolipázy, transkripční faktory (TF) a kaskáda vyúsťuje v expresi genů, jejichž produkty odpovídají na stresor. Schéma signalizační dráhy odpovídající na chlad u rýže je na obr. č. 2. Kromě odpovědi na stres hrají MAPK roli i ve vývoji, buněčném dělení a regulaci fyziologických procesů pomocí fytohormonů (Taj et al., 2010).

3.1.2. Trehalózová signalizace

V reakci na NT rostliny aktivují také signalizaci zprostředkovanou trehalózou, neredukujícím sacharidem složeným ze dvou glukózových zbytků spojených vazbou 1,1, který se vyskytuje u mnoha organismů. U vyšších rostlin má význam ve stresové signalizaci a řízení vývojových procesů (Jang et al., 2003). Trehalózu v rostlinách syntetizuje trehalóza-6-fosfát-syntáza (TPS) a trehalóza-6-fosfát-fosfatáza (TPP) (Ge et al., 2008). V následující podkapitole jsou popsány příklady, kdy overexprese *TPS* (Jang et al., 2003) a *TPP* u rýže přispěla k vyšší toleranci vůči chladu (Ge et al., 2008).

3.2. Zvýšení tolerance genetickou modifikací komponent signalizační dráhy

Zvýšení tolerance vůči NT lze docílit modifikací jednotlivých komponent signalizační dráhy. Např. overexprese genu *COLD1*, kódujícího membránový senzor NT, se u transgenní rýže (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) projevila zvýšenou tolerancí vůči chladu v porovnání

s netransformovanými rostlinami (Ma et al., 2015). Dalším příkladem je modifikace komponent již zmíněné CBL/CIPK signální dráhy u rýže, jež také přinesla zvýšenou toleranci vůči chladu. V rýži (*Oryza sativa*) je známo 20 genů *OsCIPK* odpovídajících na stres, z nichž 3 reagují na chlad (*OsCIPK01, 03 a 09*) (Xiang et al., 2007). Byla připravena transgenní rýže overexprimující *OsCIPK03*. Vnesený gen byl pod kontrolou promotoru viru mozaiky kvěťáku (35S CaMV) (Xiang et al., 2007). Transgenní a netransformované (WT, wild type) rostliny byly vystaveny chladu na 5 dní a poté na stejnou dobu vráceny do normálních podmínek. Po 3 dnech v chladu akumulovaly transgenní rostliny mnohonásobně víc prolinu a cukrů než v normálních podmínkách a také více než WT. Z WT rostlin nepřežila skoro žádná. Naproti tomu transgenní rostliny odolaly stresu téměř všechny. Mezi transgenními a kontrolními liniemi navíc nebyly v normálních podmínkách růstové ani vývojové rozdíly (Xiang et al., 2007). Prolin funguje jako tzv. osmoprotektant. Osmoprotektivní látky jsou malé rozpustné a nenabitě molekuly, které se akumulují v buňkách vystavených osmotickému stresu. Osmoprotektanty udržují rovnováhu mezi osmotickým tlakem vnějšího prostředí a cytosolu a stabilizují proteiny a membrány. Kromě prolinu jako osmoprotektanty fungují také např. polyaminy a rozpustné sacharidy, jako např. sacharóza či fruktany (Singh et al., 2015).

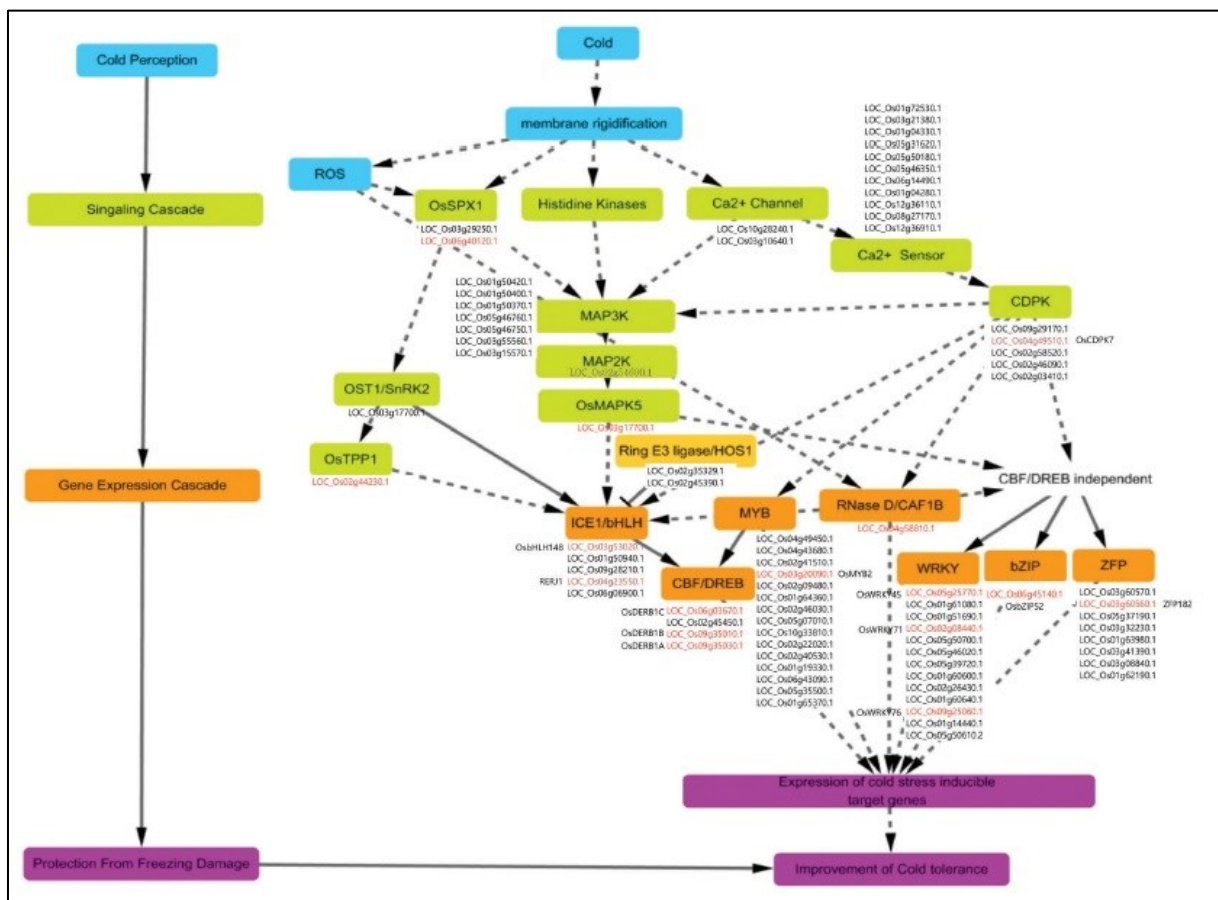
Také modifikace MAPK dráhy může vést k navýšení tolerance k NT; např. overexprese *OsMAPK5* (*O. sativa* cv. Nipponbare GA3). *OsMAPK5* je MAPK indukovaná kromě NT také kyselinou abscisovou (ABA), poraněním, suchem a zasolením. Pro vysvětlení funkce *OsMAPK5* byla vytvořena transgenní rýže se zvýšenou a sníženou expresí *OsMAPK5* (Xiong and Yang, 2003). Působení chladu přežilo z transgenní linie *OsMAPK5-OX* cca dvojnásobný počet rostlin než z linie exprimující *OsMAPK5 RNAi*. *OsMAPK5* tedy zřejmě kóduje pozitivní regulátor tolerance k chladu, suchu a zasolení. Ačkoliv *OsMAPK5* přispívá k toleranci vůči abiotickým stresům, negativně ovlivňuje expresi genů *PR* (*pathogenesis-related*), a tak snižuje imunitu rostliny. Rostliny mají omezený počet MAPK (20 v *A. thaliana*), a každá z nich má proto široký rozsah uplatnění. Před modifikací určité MAPK je proto důležité pečlivě zmapovat její možné dopady na fyziologické funkce (Xiong and Yang, 2003).

Pro objasnění významu trehalózové signalizace při stresu NT byla vytvořena transgenní rýže se zvýšenou syntézou trehalózy. Do rýže byl pod ubikvitinovým promotorem *Ubi1* z kukuřice vnesen fúzní gen vytvořený z genů *Escherichia coli* kódující enzym TPSP (Jang et al., 2003). *TPSP* byl vytvořený fúzí genu pro TPS, zodpovědnou za syntézu trehalóza-6-fosfátu (T-6-P), s genem pro TPP, katalyzující přeměnu T-6-P na trehalózu. Enzym TPSP výrazně zvýšil hladinu trehalózy v listech a semenech na 0,1 % čerstvé hmotnosti rostliny. Fenotyp rýže

(růst i fertilita) nebyl transformací ovlivněn; na rozdíl od bramboru, pro nějž byla stejná transformace letální. V semenech rýže však byl změněný poměr obsahu některých sacharidů, jelikož trehalóza pozitivně reguluje aktivitu enzymů účastnících se syntézy škrobu. Při nízké teplotě, suchu i zasolení si transgenní rýže dokázala zachovat účinnou fotosyntézu. Trehalóza mj. snížila inhibiční efekt NaCl při zasolení. Zatímco netransformované rostliny (WT) několikadenní působení sucha, zasolení a chladu téměř nepřežily, *Ubi1:TPSP* rostliny si zachovaly růst nadzemní části i kořene. Vysoká akumulace trehalózy zmírnila poškození listů a ztrátu chlorofylu, a pomohla tak udržet dostatečnou efektivitu fotosyntézy (Jang et al., 2003). Funkce trehalózové signalizace byla u rýže zkoumána i pomocí overexprese genu pro TPP, konkrétně *OsTPP1*. Jako promotor byl použit konstitutivní promotor viru mozaiky kvěťáku (35S CaMV) (Ge et al., 2008). Transformované rostliny byly po 3 týdnech v chladu stále dostatečně hydratované a celkově byly méně poškozené než dehydratované WT rostliny. Po navrácení do normálních podmínek se rostliny *35S:OsTPP1* na rozdíl od WT zotavily a mohly dále růst. Zvýšení exprese *OsTPP1* také přispělo ke zvýšení klíčivosti semen při zasolení (Ge et al., 2008). Zlepšení tolerance však nebylo způsobené jen zvýšením akumulace trehalózy, jež nebyla zdaleka tak signifikantní jako u *Ubi1:TPSP* (Jang et al., 2003). Za zlepšení tolerance u *35S:OsTPP1* rostlin mohla hlavně indukce exprese mnoha genů reagujících na stres. Patřil mezi ně např. *OsTPS1* a geny pro MAP kinázy, zejména *OsMPK3*, jež se podílí na chladové signalizaci a pravděpodobně na zvýšení tolerance vůči chladu. Je možné, že *OsTPP1* reguluje TF indukující tyto geny (Ge et al., 2008) nebo je regulační role *OsTPP1* ve skutečnosti zprostředkována samotným T-6-P, o němž je známo, že hraje regulační roli v metabolismu sacharidů a vývoji (Eastmond and Graham, 2003).

4. Regulace genové exprese transkripčními faktory

Expese genů odpovídajících na chlad může být zprostředkována buď přes transkripční faktory CBF/DREB nebo může být na CBF/DREB dráze nezávislá. Schéma signalizační dráhy odpovídající na NT u rýže je znázorněno na obr. č. 2 (Kumar et al., 2017).



Obr. č. 2: Signalizační dráha chladové tolerance u rýže. Zeleně jsou vyznačeny jednotlivé komponenty signalizační kaskády. Oranžová označuje transkripční faktory regulující expresi cílových genů zvyšujících toleranci vůči chladu. Fialová označuje tyto cílové geny. Podle Kumar et al., 2017.

Signalizační dráha končí aktivací exprese genů, jejichž produkty zvyšují toleranci rostliny vůči chladu. Mezi dobře prostudované geny patří *cold-regulated (COR)* geny. U *A. thaliana* jsou také označovány jako geny *RD (responsive to desiccation)*, *KIN (cold-inducible)* a *LTI (low temperature-induced)* (Thomashow, 1999; Erpen et al., 2018). Na promotoru *COR* je regulační CRT (C-repeat)/DRE (dehydration-responsive) cis element (Gilmour et al., 1998). Na tento element se váží transkripční faktory CBF (CRT-binding factors), které jsou také známy pod názvem DREB (dehydration-responsive element-binding), a pozitivně ovlivňují transkripci *COR* genů (Kim et al., 2017). DREB patří do velké rodiny transkripčních faktorů AP2/EREBP (APETALA2/ethylen responsive element binding protein) a kromě nízké teploty odpovídají i na sucho a zasolení (Ke et al., 2014). U *A. thaliana* i u rýže se v odpovědi na NT exprimují geny *DREB1A/CBF3*, *DREB1B/CBF1* a *DREB1C/CBF2* (Ito et al., 2006). Naopak geny *DREB2A* a *DREB2B* jsou indukovány pouze při stresu z nedostatku vody; při suchu i zasolení. Jejich produkty se váží na CRT/DRE elementy genů odpovídajících na sucho (u *A.*

thaliana např. *RD29A/COR78*) a aktivují je (Liu et al., 1998). Exprese *RD29A* a také např. *COR15a* (u *A. thaliana* i u rýže) je často aktivována také v odpovědi na NT a zvyšuje vůči ní toleranci (Jaglo-Ottosen et al., 1998).

4.1. CBF/DREB nezávislá dráha

Do CBF/DREB nezávislé dráhy patří mnoho TF odpovídajících na chlad. Hlavními rodinami těchto TF jsou WRKY, ZFP a NAC. Za účelem zvýšení odolnosti vůči chladu bylo vytvořeno mnoho transgenních rostlin s modifikovanými TF nezávislými na CBF/DREB. V této kapitole proto uvádím jen některé případy. Potenciální využití TF WRKY, ZFP, NAC a DREB pro šlechtění rostlin odolných vůči abiotickým i biotickým stresům přehledně shrnul Erpen et al. (2018). Ačkoliv se následující TF pro přehlednost řadí do CBF/DREB nezávislé dráhy, tato nezávislost není absolutní a existují výjimky, které s CBF/DREB interagují.

4.1.1. Transkripční faktory WRKY

Mezi TF CBF/DREB nezávislé dráhy patří např. *OsWRKY71* nebo *OsWRKY76*. Overexprese *OsWRKY71* u transgenní rýže zvýšila její toleranci vůči chladu. Transgenní rostliny měly méně postiženou fluorescenci chlorofylu a vyšší hmotnost než rostliny netransformované (Kim et al., 2016). Transgenní rýže overexprimující *OsWRKY76* vykazovala také vyšší toleranci vůči NT, díky zvýšení exprese genů metabolismu lipidů a genů peroxidázy (Yokotani et al., 2013).

4.1.2. Transkripční faktory NAC

NAC (NAM, ATAF a CUC) je rodina TF u rostlin, která se účastní regulace vývojových procesů a odpovědi na biotický i abiotický stres (Hu et al., 2006). Do rodiny TF NAC patří např. gen *SNAC2*, izolovaný z rýže. Hu et al. (2008) vytvořili transgenní rýži *Zhonghua 11* overexprimující *SNAC2* pod nativním promotorem. Semenačky transgenní rýže byly na 5 dní vystaveny chladu. Promotor *SNAC2* byl výrazně indukován v chladu, suchu i zasolení. Během působení chladu nevykazovala transgenní linie odlišný fenotyp od WT. Po týdnu zotavování zůstala více než polovina transgenních rostlin vitálních se zdravými listy. Naproti tomu z WT linie nepřežila téměř žádná rostlina. Mezi geny indukovanými v transgenní linii byly např. geny pro peroxidázu, ornitinaminotransferázu nebo heat shock proteiny. Ačkoliv během experimentu

nebyl u transgenních rostlin pozorován negativní dopad na růst, došlo ke snížení exprese několika genů souvisejících s růstem, jako je gen kódující protein s Ca^{2+} -vázající EGF (epidermal growth factor) doménou nebo gen pro AAA ATPázu související s dělením buněk. Na základě výsledků lze řadit SNAC2 mezi nadějně TF s pozitivním vlivem na toleranci vůči abiotickým stresům (Hu et al., 2008). V rýži se odpovědi na suchu, zasolení a chlad účastní také *OsNAC6*. Konstitutivní exprese *OsNAC6* sice vedla k vyšší odolnosti vůči suchu a zasolení, měla ale negativní dopad na růst a výnos. Tomu by se možná dalo předejít využitím promotoru indukovaného stresem (Nakashima et al., 2007). Zajímavé je, že konstitutivní exprese *OsNAC6* izolovaného z horského typu rýže vneseného do nížinného typu neměla vliv na vzrůst a taktéž zvýšila toleranci vůči suchu a zasolení (Rachmat et al., 2014).

4.1.3. Zinc finger proteiny

Zinc finger proteiny (ZFP) obsahující proteinovou doménu zinc finger se u rostlin podílejí jak na regulaci růstu a vývoji, tak na odpovědi vůči stresu. Mezi ZFP patří i rodina RING finger, obsahující proteinovou doménu bohatou na cystein, schopnou vázat dvě molekuly zinku. Doménu RING finger můžeme najít např. v proteinu OsCOIN u rýže. Tento protein je kódován genem *OsCOIN* (*Oryza sativa cold-inducible*). Ten je exprimován ve všech orgánech rýže, a je tedy možné, že jde o tzv. house keeping gen (Liu et al., 2007). Již po krátkém vystavení rostliny chladu (na 30 min) se transkripce *OsCOIN* rychle zvýšila a na původní hodnotu se vrátila po několika dnech. Pro osvětlení funkce OsCOIN byla vytvořena transgenní linie rýže overexprimující *OsCOIN* pod ubikvitinovým (Ubi) promotorem z kukuřice (Liu et al., 2007). Transgenní semenáčky byly vystaveny 4°C na několik dní a poté vráceny do normálních podmínek. Transgenních rostlin se za 2 týdny zotavilo o 20-35 % víc než WT rostlin. Po vystavení chladu měly transgenní rostliny v porovnání s WT zvýšenou expresí genu *OsNAC6*, jehož overexprese zvyšuje odolnost vůči suchu a zasolení (více v předchozí kapitole). Také byla zvýšená exprese genů *OsP5CS* a *OsLti6b*. Gen *OsLti6b* kóduje nízkomolekulární hydrofobní protein udržující integritu plazmatické membrány při nízké teplotě (Morsy et al., 2005). U transgenních rostlin byla také dramaticky zvýšená hladina prolinu, pravděpodobně díky tomu, že *OsP5CS* kóduje enzym klíčový pro syntézu prolinu. Overexprese *OsCOIN* tedy zvýšila toleranci vůči chladu, ale i suchu a zasolení, částečně díky vysoké akumulaci prolinu (Liu et al., 2007).

Zvýšená exprese *OsP5CS* byla pozorována také u transgenní rýže, ve které byl overexprimován zinc finger protein kódovaný genem *ZFP182* (Huang et al., 2012). Tato rýže měla také zvýšenou toleranci vůči chladu, částečně zvýšením obsahu prolinu. *ZFP182* představuje jednu z výjimek, jelikož se účastní i CBF/DREB závislé dráhy, a to zesílením exprese *OsDREB1A* a *OsDREB1B* (Huang et al., 2012).

Do CBF nezávislé dráhy lze naopak zařadit i některé TF z rodiny MYB, jež typicky ovlivňují expresi TF CBF/DREB. Příkladem je TF *OsMyb4*. *OsMyb4* se podílí na řízení regulace metabolismu a vývoje a ochrany buňky. Své cílové geny aktivuje přímo nebo přes další transkripční faktory. Mezi produkty cílových genů *OsMyb4* patří např. komponenty antioxidantního systému (L-askorbátperoxidáza, superoxiddismutáza) (Park et al., 2010). Superoxiddismutáza zhasí superoxidový radikál a přeměňuje ho na peroxid vodíku, který askorbátperoxidáza konvertuje na vodu.

4.2. CBF/DREB závislá dráha

4.2.1. Transkripční faktory MYB

MYB je velká rodina TF, která se v rostlinách účastní cukerné a hormonální signalizace, metabolismu, vývoje a odpovědi na stres (Smita et al., 2015). TF MYB hrají roli jak v CBF/DREB závislé, tak nezávislé dráze, jak je vidět i na obr. č. 2. Např. *MYBS3* se v odpovědi na NT doplňuje s *DREB1*. Míra exprese *MYBS3* je závislá na stupni chladové tolerance. *MYBS3* reaguje na chlad poměrně pomalu, a odpovídá tak na dlouhodobý stres. *MYBS3* reprimuje *DREB1B*, který spolu s *DREB1A* a *DREB1C* reaguje již na krátce působící stres (Su et al., 2010). Souhra *DREB1* a *MYBS3* v reakci na chlad spočívá v ovlivnění metabolismu sacharidů. Při rychlé stresové reakci *DREB1* indukuje expresi α *Amy3*, a tak zvyšuje hydrolýzu škrobu na cukry, čímž dodává rostlině energii na překonání stresu. Po delším působení NT expresi α *Amy3* reprimuje *MYBS3*. Důvodem je zachování zásob polysacharidů při dlouhodobém stresu (Su et al., 2010).

4.2.1.1. Vliv overexprese MYB na toleranci k chladu

Byla připravena transgenní rýže overexprimující TF *OsMYB3R-2* pod Ubi promotorem (Ma et al., 2009). V normálních podmínkách vykazovala transgenní linie zpomalený růst oproti WT linii. Obě linie byly krátkodobě vystaveny chladu (2°C). Po navrácení do normálních

podmínek se zotavila a začala opět růst pouze polovina rostlin transgenní linie a žádná z linie WT. Zvýšení míry přežívání a zmírnění negativního vlivu na růst by se možná dalo docílit využitím promotoru indukovaného stresem. OsMYB3R-2 aktivoval expresi *OsCPT1*, genu regulovaného CBF drahou přes CRT/DRE element v jeho promotoru. Co kóduje *OsCPT1* zatím není známo. V transgenních rostlinách byla pozorována vysoká akumulace prolinu, což je podle autorů regulováno právě přes CBF-CPT dráhu. Homolog *OsCPT1* v *A. thaliana* (*At2g02100*) ale pravděpodobně kóduje pathogenesis-related protein inhibující peptidázy. Funkce *OsCPT1* v chladové toleranci by tak měla být v budoucnu lépe prozkoumána. OsMYB3R-2 rozeznává specifickou sekvenci v promotoru genu pro cyklin B *OsCycB1;1* a indukuje jeho expresi. Overexprese *OsCycB1;1* také přinesla rostlině zvýšenou odolnost vůči NT (Ma et al., 2009). Rostliny overexprimující *OsMYB3R-2* měly vyšší podíl dělících se buněk (mitotický index) než WT. OsMYB3R-2 tedy v rýži pravděpodobně funguje jako pozitivní regulátor G₂/M fáze přes *OsCycB1;1*, a udržuje tak buněčné dělení i při chladovém stresu (Ma et al., 2009).

TF MYB propojují signální dráhy závislé a nezávislé na CBF/DREB mezi sebou. Kromě toho ovlivňují i trehalózovou signalizaci. Byla vytvořena transgenní rýže overexprimující *MYBS3* pod Ubi promotorem (Su et al., 2010). Při chladové stimulaci indukovala overexprese *MYBS3* expresi několika genů, např. *WRKY77*, *T6P fosfatáz* (*TPP1* a *TPP2*) a genů kódujících glutamátdekarboxylázu (GAD). GAD katalyzuje syntézu GABA (kyselina γ -aminomáselná) akumulující se při teplotním stresu (Bouché et al., 2004). Rostliny overexprimující *MYBS3* pěstované na poli ustály týdenní působení chladu a navíc si zachovaly normální růst (Su et al., 2010). *MYBS3* represí *α Amy3* chrání zásoby škrobu. Naproti tomu rychleji reagující *DREB1* posílením exprese *α Amy3* pomáhá rostlině vyrovnat se s nárazovým chladem. Lze se domnívat, že overexprese *MYBS3* a zároveň i *DREB1* by mohla vést k ještě větší toleranci vůči chladu. Je ovšem možné, že by se efekt obou TF vzájemně potlačoval. V případě předvídatelnosti chování prostředí, ve kterém by byla transgenní rýže pěstovaná, by bylo možná praktičtější využít overexprese pouze jednoho z těchto TF. Další výzkum v této oblasti nejen u rýže, ale i u dalších plodin, by mohl přinést zajímavé výsledky (Su et al., 2010).

4.2.2. Transkripční faktor ICE

Geny pro TF CBF jsou transkribovány velmi záhy po vystavení rostliny chladu. Jejich expresi totiž indukuje jiný TF, který se v buňce exprimuje i při normální teplotě. Byl pojmenován jako ICE (inducer of CBF expression). Regulace přes TF ICE1 (MYC-like bHLH)

je velmi složitá a stále ještě málo probádaná oblast. ICE1 obsahuje oblast bHLH, která se v chladu váže na element MYC v promotoru *CBF*, a indukuje tak jeho expresi (Chinnusamy et al., 2003). ICE1 je konstitutivně exprimován a v normálních podmínkách ubikvitinován a degradován v proteazomu. V chladu je této degradaci zabráněno stabilizací ICE1 prostřednictvím posttranslační fosforylace a sumoylace. V normálních podmínkách je ICE1 ubikvitinován ligázou HOS1 a degradován v proteazomu (Dong et al., 2006). V chladu o interakci s ICE1 kompetuje HOS1 se Ser/Thr protein kinázou OST1/SnRK2. OST1 stabilizuje ICE1 fosforylací a brání tak jeho degradaci (Ding et al., 2015). Stabilizační fosforylace ICE1 je také zajišťována OsMAPK3 (Zhang et al., 2017). Navíc je v chladu ICE1 stabilizován sumoylací, kterou provádí ligáza SIZ1. *SIZ1* se exprimuje konstitutivně a není přesně známo, jak chlad reguluje její aktivitu. Je možné, že NT indukuje posttranslační modifikaci SIZ1, a teprve poté může SIZ1 sumoylovat ICE1 (Miura et al., 2007). Jak již bylo uvedeno výše, exprese *CBF* je regulována také přes TF MYB. *CBF* je v normálních podmínkách reprimován MYB15. Celý mechanismus posiluje ICE1, který po sumoylací negativně reguluje expresi *MYB15* (Miura et al., 2007). V chladu je navíc MYB15 fosforylován MAP kinázou MPK6 a ztrácí afinitu k *CBF*. Na MYC element v promotoru *CBF* se poté může navázat ICE1 a zahájit expresi genů *CBF* (Kim et al., 2017). ICE1 také zvyšuje odolnost vůči chladu přes T-6-P-fosfatázu. Jak již bylo uvedeno výše, v chladu OsMAPK3 fosforyluje OsICE1, a ten následně aktivuje expresi *OsTPP1*, čímž se zvyšuje akumulace osmoprotektivní trehalózy (Zhang et al., 2017).

4.2.2.1. Vliv overexprese ICE1 na toleranci vůči chladu

Role ICE byla zkoumána u transgenní *A. thaliana* exprimující cDNA pro luciferázu (LUC) pod kontrolou promotoru *CBF3*. Rostliny *CBF3-LUC* podstoupily další mutagenézi a výsledná linie *ice1* byla na den vystavena 0°C (Chinnusamy et al., 2003). Takto mutované rostliny po vystavení mrazu vykazovaly výrazně nižší luminiscenci než nemutované linie. Také byla u těchto rostlin výrazně snižena exprese cílových genů *CBF* závislé dráhy (*RD29A*, *COR15A*, *COR47A*). *COR15a* se při NT exprimuje v listech. Produkt tohoto genu, kryoprotektivní protein COR15a, zabraňuje poškození chloroplastů a protoplastu při mrazu (Artus et al., 1996). Linie *ice1* byla méně tolerantní vůči mrazu než nemutovaná linie. Dále byla zkoumána overexprese *ICE1* u *A. thaliana* pod silným konstitutivním promotorem (Chinnusamy et al., 2003). Transgenní rostliny *Super-ICE1* v chladu skutečně overexprimovaly *CBF3*, ale i *CBF2*, *RD29A* a *COR15A*. Po vystavení chladu i mrazu byla míra přežití u *Super-ICE1* výrazně vyšší než u WT. Navíc nedošlo k vývojovým ani růstovým změnám. ICE1 je

tedy pozitivním regulátorem *CBF3* a má důležitou úlohu v aklimaci a toleranci k NT (Chinnusamy et al., 2003).

Overexprese *ICE1* byla zkoumána také u dalšího modelového organismu, rajčete. Do genomu rajčete byla stabilně transformována cDNA *ICE1*, připravená podle *ICE1* z *A. thaliana* (Yu et al., 2015). Ačkoliv také došlo ke zvýšení tolerance vůči chladu, overexprese *ICE1* u rajčete vyvolala odlišnou odpověď než u *A. thaliana*. Transgenní rostliny měly po krátkém vystavení NT vyšší hladinu prolinu, která se zvyšovala s pokračujícím stresem. Hladina katalázy (CAT) a peroxidázy (POD), zhášečů ROS, byla také vyšší než v netransformovaných rostlinách, nejvyšších hodnot přitom dosahovala 24 h po začátku chladového působení. Hladina malondialdehydu (MDA) naopak u transgenních rostlin zdaleka nedosahovala hodnot jako u kontroly. To indikuje, že transgenní rostliny prodělaly nižší peroxidaci membránových lipidů a z toho plynoucí nižší poškození buňky než kontrolní rostliny. Výsledky ukazují, že overexprese *ICE1* může snížit senzitivitu vůči chladu i u rajčete (Yu et al., 2015). Ačkoliv u rajčete i *A. thaliana* (Chinnusamy et al., 2003) byla zvýšená exprese stejného TF, žádné z nalezených cílových genů se v provedených studiích neshodovaly. Mechanismus zvýšení tolerance byl tedy nejspíš značně odlišný.

Účinek *ICE1* byl zkoumán i u rýže. Z pekingského zelí (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* Lour. Olsson) byl izolován *BcICE1* a pod kontrolou Ubi promotoru transformován do rýže (Xiang et al., 2017). Více než polovina transgenních rostlin překonala dvoudenní působení mrazu. Tyto rostliny měly po působení nízké teploty nižší hladinu MDA a méně poškozený chlorofyl a membrány, pravděpodobně díky zvýšené akumulaci prolinu a sacharidů. *BcICE1* aktivoval expresi genů pro TF *OsDREB1A* a *OsDREB1F*. Také došlo ke zvýšení exprese *OsDREB1B*, *OsTPP1* a genu *J013091D15* kódujícího cytochrom P450 (Xiang et al., 2017), které mají v promotorech CRT/DRE element a odpovídají na chladový stres (Ito et al., 2006).

Zvýšenou toleranci vůči chladu projevila i transgenní rýže s konstitutivní expresí *RsICE1*, izolovaného z ředkve (*Raphanus sativus* L.), plodiny odolnější vůči chladu než rýže. Transformace byla provedena pod kontrolou Ubi promotoru (Man et al., 2017). Transgenní rostliny měly zvýšenou hladinu cukrů, prolinu, sníženou hladinu MDA a méně poškozený chlorofyl než WT. Po chladovém působení také exprimovaly vyšší množství *OsTPP1*, *OsDREB1B*, *OsDREB1A* a *J013091D15*. Projev overexprese *RsICE1* byl u rýže tedy velmi podobný jako při overexpresi *BcICE1* (Xiang et al., 2017).

4.2.3. Transkripční faktory CBF/DREB

V rýži bylo nalezeno devatenáct genů pro TF CBF. Pět z nich odpovídá na NT, jsou jimi *OsCBF1*, *OsCBF2*, *OsCBF3*, *OsCBF8* a *OsCBF9* (Cao et al., 2008). Jednotlivé TF se liší např. rychlostí, s jakou reagují na chlad, nebo indukcí své exprese i v odpovědi na jiné abiotické stresy. Pro CBF je charakteristická jaderná lokalizační sekvence (NLS) navádějící CBF do jádra, a doména ethylen-responsive factor (ERF)/APETALA2 (AP2), vázající se na CRT elementy v promotoru *COR* genů či jiných genů odpovídajících na chlad (Cao et al., 2008; Man et al., 2017).

Příkladem využití *CBF1* pro zvýšení tolerance vůči chladu je transgenní rajče, do něhož byl vpraven *CBF1* z *A. thaliana* pod kontrolou promotoru 35S CaMV (Zhang et al., 2011). Transgenní rostliny vykazovaly po dlouhodobém působení NT daleko nižší fotoinhibici fotosystému I (PSI) než netransformované rostliny (WT). Díky overexpresi *CBF1* se zvýšila ochrana před fotoinhibicí aktivací xantofylového cyklu. Také se zvýšila aktivita superoxid-dismutázy (SOD), zhášče ROS. SOD tak snižuje fotoinhibici a chrání chlorofyl před poškozením. Transgenní rostliny si také udržely integritu membránového systému díky zhášení ROS a zabránění peroxidace lipidů. Tyto protektivní mechanismy byly detekovány po několika dnech působícího stresu a přispěly k udržení aktivity PSI i PSII (Zhang et al., 2011).

U rýže bylo připraveno několik transgenních linií overexprimujících *OsDREB1A/CBF3*, *OsDREB1B/CBF1*, *AtDREB1A/CBF3*, *AtDREB1B/CBF1* a *AtDREB1C/CBF2* pod modifikovaným promotorem 35S CaMV (Ito et al., 2006). Geny *AtCBF* byly izolovány z *A. thaliana*, *OsCBF* pocházely z rýže. Většina linií vykazovala snížený vzrůst v normálních podmínkách. Linie byly po několik dní vystaveny chladu (2°C) a poté 3 týdny sledovány v normálních podmínkách. Zatímco všechny WT rostliny nepřežily, životaschopných bylo až 60 % z transgenních rostlin. Transgenní rostliny ve větším množství akumulovaly sacharidy, např. rafinózu, sacharózu, glukózu a fruktózu. S akumulací sacharidů pravděpodobně souvisí zvýšená produkce α -amylázy u linií overexprimujících *OsCBF3* a *AtCBF3* (ty akumulovaly sacharidy dokonce i bez působícího stresu). Významná byla i akumulace prolinu. Už v normálních podmínkách obsahovala transgenní linie *OsCBF3* 5násobné množství prolinu než WT, *AtCBF3* dokonce až 15násobné. Po vystavení linií chladu byl obsah prolinu také vyšší než u WT. Mezi proteiny zvýšené v transgenních rostlinách *OsCBF3*, byly např. dehydriny (kódované geny *Lip5* a *Lip9*), které zabraňují destabilizaci plasmatické membrány. Dále byla zvýšená exprese několika genů kódujících např. ACC oxidázu, cytochrom P450 nebo glycin-

rich proteiny. Overexprese *AtCBF3* zvýšila např. expresi genů pro Lip5 a ACC oxidázu. Produkty těchto genů pravděpodobně přispěly u transgenních linií k toleranci nejen vůči chladu, ale i suchu a zasolení (Ito et al., 2006). Je zajímavé, že overexprese *AtCBF3* v transgenní rýži, kterou provedli Oh et al. (2005), neměla negativní dopad na růst rostlin. Transformace byla pod kontrolou promotoru *Ubi1* z kukuřice. Transgenní rostliny byly vystaveny chladu, suchu a zasolení, zvýšenou toleranci však vykazovaly rostliny pouze vůči suchu a zasolení. Expres *Lip5* a *Dip1* (*Lip9*) byla u těchto rostlin také zvýšená, nikoliv však hladina prolinu. Kromě toho se zvýšila exprese genů *Jacalin1* a *Jacalin2*, jež kódují lektiny odpovídající zejm. na biotický stres (Oh et al., 2005). Absence zpomalení růstu pravděpodobně spočívala v použití jiného promotoru. Expres *AtCBF3* pod zřejmě slabším *Ubi1* tak možná nestačila ke zvýšení tolerance vůči chladu. Ti samí autoři však připravily *Ubi1:AtCBF3* znovu a tyto rostliny překvapivě odolnost vůči chladu vykazovali. Kromě toho se autoři rozhodli vyvinout transgenní rýži overexprimující *HvCBF4* a porovnat její růst s nově připravenou linií rostlin *Ubi1:AtCBF3*. *HvCBF4*, gen izolovaný z ječmene (*Hordeum vulgare*), byl do genomu rýže vnesen také pod kontrolou promotoru *Ubi1* z kukuřice (Oh et al., 2007). Růst obou linií nebyl negativně ovlivněn, kromě několika výjimek, které byly nejspíše způsobeny somaklonální variabilitou. Rostliny byly vystaveny chladu (4°C) na 24 h, suchu i zasolení. Všechny typy stresu tolerovaly transgenní rostliny výrazně lépe než WT (cca 90 % oproti 4 % u NT), přičemž *Ubi1:HvCBF4* tolerovaly chlad o něco lépe než *Ubi1:AtCBF3*. Transgenní rostliny měly méně poškozený fotosyntetický aparát a byly u nich v reakci na chlad indukovány geny *Lip5*, *Dip1*, *J013091D15* a *Jacalin2* (Oh et al., 2007). Zdá se tedy, že lektiny mají úlohu i v chladovém stresu.

Příznivé výsledky přinesli také Xu et al. (2011), kteří do rýže vnesli *ZmCBF3* izolovaný z kukuřice pod kontrolou *Ubi* promotoru z kukuřice. Transgenní rostliny byly vystaveny chladu (4°C na 24 h), suchu i zasolení. Po týdně se většina transgenních rostlin vystavených chladu zotavila (cca 80 %), z WT přežila pouze třetina. Overexprese *ZmCBF3* vedla k nižší hladině MDA, tedy i menšímu poškození membrán. Kromě toho, že overexprese nevyvolala zpomalení růstu, nebyl postižen ani výnos. Stejně jako při overexpresi *OsCBF3* (Ito et al., 2006) došlo ke zvýšení exprese genů *lip5* a *lip9* (*Dip1*) kódujících dehydriny (Xu et al., 2011). Také se zvýšila exprese *Hsp70*, genu kódujícího heat shock protein, jež se exprimuje např. v důsledku vysoké či nízké teploty. *Hsp70* zajišťují správné sbalení proteinu a chrání je před agregací při stresu (Sarkar et al., 2013).

V modifikaci TF CBF/DREB pro zvýšení odolnosti bylo také využito genů ze značně odolných rostlin, jako je např. *AaDREB1* izolovaný z hlaváčku amurského (*Adonis amurensis*),

rostliny schopné klíčit a kvést i ve sněhu. *AaDREB1* byl vnesen do rýže pod kontrolou promotoru 35S CaMV (Zong et al., 2016). Overexprese *AaDREB1* zvýšila toleranci vůči suchu, zasolení a nízké teplotě. Dlouhé působení chladu (4°C, 12 dní) přežila více než polovina transgenních rostlin a jejich růst nebyl výrazně omezen. Také u nich bylo naměřeno dvojnásobné množství prolinu než u WT, a to v normálních podmínkách i při působení chladu. Transgenní rostliny akumulovaly v normálních podmínkách zvýšené množství sacharidů než WT (Zong et al., 2016). Zachování normálního růstu u rýže overexprimující homolog *DREB1* dosáhli i Xu et al. (2011), kteří použili *ZmCBF3* z kukuřice pod kontrolou Ubi promotoru a Oh et al. (2007), kteří do rýže pod kontrolou Ubi promotoru vnesli *AtCBF3*. Naproti tomu overexprese *CBF3* izolovaného z *A. thaliana* a rýže pod kontrolou promotoru 35S CaMV růst transgenních linií rýže omezila (Ito et al., 2006). Ačkoliv geny *AaDREB1*, *AtDREB1* a *OsDREB1* odpovídají na chlad a zvyšují k němu toleranci, fungují pravděpodobně odlišně (Zong et al., 2016).

Zvýšení tolerance vůči chladu zajistila i overexprese *DaCBF7*, izolovaného z antarktického druhu trávy *Deschampsia antarctica*. *DaCBF7* byl vnesen do rýže pod kontrolou Ubi promotoru z kukuřice (Byun et al., 2015). Overexprese *DaCBF7* neměla negativní efekt na vzrůst rostlin a zvýšila odolnost vůči chladu, nevyšila však toleranci vůči suchu ani zasolení. Rostliny byly vystaveny na 8 dní chladu (4°C) a po navrácení se zotavila a opětovně rostla většina transgenních rostlin, z WT se jich zotavilo minimum. U transgenních rostlin byla lépe zachována integrita membrán. Také se overexprimovaly geny kódující dehydriny, chaperony a remoriny. Remoriny jsou rostlinné proteiny, jež pravděpodobně fungují jako “scaffold” proteiny a regulují i přenos stresového signálu (Jarsch and Ott, 2011).

V rýži ssp. *japonica* cv. Nipponbare byla zkoumána funkce genu *OsDREB6* přípravě transgenních linií se zvýšenou a sníženou expresí tohoto genu (Ke et al., 2014). S působením chladu a osmotického stresu se rostliny overexprimující *OsDREB6* vypořádaly výrazně lépe než WT, z nichž přežila méně než polovina. Z rostlin se sníženou expresí *OsDREB6* neustála působení těchto stresů žádná. Vzhled rostlin s rozdílnou mírou exprese *OsDREB6* v normálních podmínkách a po zotavení z chladového stresu je na obr. č. 3. Zlepšení tolerance bylo částečně zajištěno akumulací osmolytů a zvýšenou aktivitou CAT. Také došlo ke zvýšení exprese *P5CS*, *OsDREB1B* a *OsMYB2*. Ke zvýšení *P5CS* (biosyntéza prolinu) došlo i u rostlin overexprimujících TF *ZFP182* (Huang et al., 2012) a TF *OsCOIN* (Liu et al., 2007). TF *OsMYB2* hraje regulační roli v odpovědi na chlad, ale i na zasolení a sucho. Je tedy možné, že *MYB2*, stejně jako *MYB3*, propojuje CBF/DREB závislou a nezávislou dráhu.



Obr. č. 3: Vzhled rostlin rýže se zvýšenou (OE), sníženou (RNAi) a normální (Nipponbare) expresí *OsDREB6* za kontrolních podmínek a po vystavení chladu a následném zotavení. Podle Ke et al., 2014.

Gen *OsDREB1F* (*RCBF2*) izolovaný z horské odrůdy rýže (*O. sativa* cv. IAPAR9) byl vnesen do rýže ssp. *japonica* pod 35S CaMV promotorem (Wang et al., 2008). *OsDREB1F* se exprimuje po působení chladu, sucha, zasolení, ale také v reakci na ABA. Také se pravděpodobně účastní vývojových procesů, jeho přesná úloha však není známa. *OsDREB1F* aktivoval expresi *RD29B*, což naznačuje jeho úlohu i v ABA závislé dráze. Transgenní rostliny byly vystaveny týdennímu chladu (10°C), suchu a zasolení. Ke všem typům stresů byly transgenní rostliny tolerantnější než WT (Wang et al., 2008). Transformace neměla vliv na růst rostlin, na rozdíl od konstitutivní exprese *OsDREB1* a *AtDREB1* v rýži, jež způsobila zpomalení růstu v normálních podmínkách (Ito et al., 2006). *OsDREB1F* přes DRE elementy aktivoval expresi *RD29A* a *COR15a*, a to již v normálních podmínkách. Samotnému *OsDREB1F* v promotoru DRE element chybí, není tedy regulován jinými TF DREB. Obsahuje však několik MYB/MYC vazebných míst. Jelikož došlo ke zvýšení jeho exprese u rostlin overexprimujících *BcICE1* (Xiang et al., 2017), je možné jeho regulaci přes ICE1 potvrdit.

4.2.4. Cílové geny zvyšující toleranci vůči nízké teplotě

Na základě provedených studií lze konstatovat, že mezi geny přímo zvyšující toleranci vůči chladu patří geny kódující enzymy potřebné pro syntézu kompatibilních solutů s kryoprotektivními účinky, jako je např. sacharóza nebo prolin. Také jsou exprimovány geny pro kryoprotektivní protein COR15a nebo dehydriny, které stabilizují membrány a proteiny. Mezi produkty cílových genů patří i zhášedce ROS udržující integritu membránového systému (jako např. kataláza, peroxidáza) nebo chaperony, zabraňující agregaci poškozených proteinů, a cytochrom P450.

5. Závěr

Pro šlechtění transgenních rostlin odolných vůči chladu existuje několik cest. Samotné navýšení exprese genů, jejichž produkty přímo zvyšují toleranci vůči stresu, se neukázalo jako ideální přístup. Výhodnější je pravděpodobně zacílit manipulaci o stupeň výš a zvýšit toleranci ovlivněním transkripčních faktorů řídících expresi cílových genů nebo dokonce komponent signální transdukce. Vzhledem k šíři jejich působení tak lze pozměnit více drah a umocnit odpověď na stres. Ze stejného důvodu však taková manipulace může mít i negativní efekt. Zvýšením odolnosti vůči chladu může dojít např. ke zpomalení růstu nebo dokonce snížení odolnosti vůči jinému typu stresu. Zdá se, že velký podíl na modifikovaném fenotypu transgenních plodin má i volba promotoru vneseného genu. Ačkoliv mají geny exprimované pod silným konstitutivním promotorem významný vliv na toleranci vůči chladu, může tato modifikace narušit normální vývoj rostliny a vést k zakrslosti, případně nízkému výnosu. Tento efekt je možné zmírnit např. využitím promotoru aktivovaného jen pod působícím stresem nebo využitím slabšího promotoru. Také volba rostliny, ze které bude gen pro transformaci izolován, může ovlivnit celkový výsledek manipulace. Předpoklad, že geny se stejnou funkcí v různých rostlinách budou po transformaci fungovat stejně, zjevně neplatí. Gen z jedné rostliny může např. omezit růst, zatímco jeho homolog z jiné rostliny růst neovlivní.

Při posuzování potenciálu genového inženýrství na základě provedených studií si je potřeba také uvědomit, že experimenty neodráží skutečné pěstitelské podmínky a zaměřují se hlavně na vegetativní období růstu rostlin. Kromě toho se autoři zaměřují hlavně na geny, u kterých je již předpokládána/známá role v chladové odolnosti. Je proto možné, že se na odolnosti podílí faktory či geny, jež zatím unikají pozornosti. Tomu však napomáhají transkriptomické studie, které mapují geny exprimované v odpovědi na stres. Ty tak mohou naznačit směr jakým se vydat při šlechtění nových tolerantních linií.

Přes zmíněné překážky lze konstatovat, že modifikace dráhy závislé na CBF/DREB, a to především overexpresí jednotlivých transkripčních faktorů, je perspektivní metodou pro zvýšení odolnosti rýže vůči chladu. Využití genů izolovaných z velmi odolných rostlin se zdá být nadějnou cestou, zvláště pro absenci negativního vlivu na růst rostlin.

6. Seznam použité literatury

- Andaya, V.C., Mackill, D.J., 2003. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. *J. Exp. Bot.* 54, 2579–2585. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg243>
- Artus, N.N., Uemura, M., Steponkus, P.L., Gilmour, S.J., Lin, C., Thomashow, M.F., 1996. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13404–13409. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13404>
- Bawa, A.S., Anilakumar, K.R., 2013. Genetically modified foods: Safety, risks and public concerns - A review. *J. Food Sci. Technol.* 50, 1035–1046. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0899-1>
- Beck, E.H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., Bhattarai, T., 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *J. Biosci.* 32, 501–510. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0049-5>
- Borlaug, N., 2007. Feeding a Hungry world. *Science.* 318, 359. <https://doi.org/10.1126/science.1151062>
- Bouché, N., Fait, A., Zik, M., Fromm, H., 2004. The root-specific glutamate decarboxylase (GAD1) is essential for sustaining GABA levels in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 55, 315–325. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0650-z>
- Bowler, C., Fluhr, R., 2000. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci.* 5, 241–246. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01628-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01628-9)
- Byun, M.Y., Lee, J., Cui, L.H., Kang, Y., Oh, T.K., Park, H., Lee, H., Kim, W.T., 2015. Constitutive expression of DaCBF7, an Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* CBF homolog, resulted in improved cold tolerance in transgenic rice plants. *Plant Sci.* 236, 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.03.020>
- Cao, Y., Wang, J., Guo, L., Xiao, K., 2008. Identification, characterization and expression analysis of transcription factor (CBF) genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Front. Agric. China* 2, 253–261. <https://doi.org/10.1007/s11703-008-0052-0>
- DeFalco, T.A., Bender, K.W., Snedden, W.A., 2010. Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochem. J.* 425, 27–40. <https://doi.org/10.1042/BJ20091147>
- Ding, Y., Li, H., Zhang, X., Xie, Q., Gong, Z., Yang, S., 2015. OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 32, 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.023>
- Dong, C.-H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q., Zhu, J.-K., 2006. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 8281–8286. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602874103>
- Eastmond, P.J., Graham, I.A., 2003. Trehalose metabolism: A regulatory role for trehalose-6-phosphate? *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 231–235. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00037-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00037-2)
- Erpen, L., Devi, H.S., Grosser, J.W., Dutt, M., 2018. Potential use of the DREB/ERF, MYB, NAC and WRKY transcription factors to improve abiotic and biotic stress in transgenic plants. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 132, 1–25. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1320-6>
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L., Woo, S.C., 1983. Expression of bacterial genes in plant cells (plant protoplasts/transformation/foreign DNA/antibiotic resistance/selectable markers). *Genetics* 80, 4803–4807. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.15.4803>

- Ge, L.F., Chao, D.Y., Shi, M., Zhu, M.Z., Gao, J.P., Lin, H.X., 2008. Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene OsTPP1 confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta* 228, 191–201. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0729-x>
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., Thomashow, M.F., 1998. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J.* 16, 433–442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00310.x>
- Gimenez, E., Salinas, M., Manzano-Agugliaro, F., 2018. Worldwide research on plant defense against biotic stresses as improvement for sustainable agriculture. *Sustain.* 10, 1–19. <https://doi.org/10.3390/su10020391>
- Hammond, L., Maxwell, D., 2002. The Ethiopian crisis of 1999-2000: Lessons learned, questions unanswered. *Disasters* 26, 262–279. <https://doi.org/10.1111/1467-7717.00204>
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., Xiong, L., 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12987–12992. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604882103>
- Hu, H., You, J., Fang, Y., Zhu, X., Qi, Z., Xiong, L., 2008. Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol. Biol.* 67, 169–181. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9309-5>
- Huang, J., Sun, S., Xu, D., Lan, H., Sun, H., Wang, Z., Bao, Y., Wang, J., Tang, H., Zhang, H., 2012. A TFIIIA-type zinc finger protein confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 80, 337–350. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9955-5>
- Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Taji, T., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2006. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.* 47, 141–153. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci230>
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., Thomashow, M.F., 1998. Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*. 280, 104–106. <https://doi.org/10.1126/science.280.5360.104>
- James, C., 2013. ISAAA Briefs: brief 39 Global status of Commercialized biotech / GM Crops : 2008. ISAAA Briefs 317. <https://doi.org/10.1017/S0014479706343797>
- Jang, I., Oh, S., Seo, J., Choi, W., Song, S.I., Kim, C.H., Kim, Y.S., Seo, H., Choi, Y. Do, Nahm, B.H., Kim, J., 2003. Expression of a Bifunctional Fusion of the. *Society* 131, 516–524. <https://doi.org/10.1104/pp.007237.which>
- Jarsch, I.K., Ott, T., 2011. Perspectives on Remorin Proteins, Membrane Rafts, and Their Role During Plant–Microbe Interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 7–12. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0166>
- Ke, Y.G., Yang, Z.J., Yu, S.W., Li, T.F., Wu, J.H., Gao, H., Fu, Y.P., Luo, L.J., 2014. Characterization of OsDREB6 responsive to osmotic and cold stresses in rice. *J. Plant Biol.* 57, 150–161. <https://doi.org/10.1007/s12374-013-0480-0>
- Kim, C.Y., Vo, K.T.X., Nguyen, C.D., Jeong, D.H., Lee, S.K., Kumar, M., Kim, S.R., Park, S.H., Kim, J.K., Jeon, J.S., 2016. Functional analysis of a cold-responsive rice WRKY gene, OsWRKY71. *Plant Biotechnol. Rep.* 10, 13–23. <https://doi.org/10.1007/s11816-015-0383-2>
- Kim, S.H., Kim, H.S., Bahk, S., An, J., Yoo, Y., Kim, J.Y., Chung, W.S., 2017. Phosphorylation of the transcriptional repressor MYB15 by mitogen-activated protein kinase 6 is required for freezing tolerance in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 45, 6613–6627. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx417>

- Krieger, E.K., Allen, E., Gilbertson, L.A., Roberts, J.K., Hiatt, W., Sanders, R.A., 2008. The Flavr Savr tomato, an early example of RNAi technology. *HortScience* 43, 962–964.
- Kumar, M., Gho, Y.-S., Jung, K.-H., Kim, S.-R., 2017. Genome-Wide Identification and Analysis of Genes, Conserved between japonica and indica Rice Cultivars, that Respond to Low-Temperature Stress at the Vegetative Growth Stage. *Front. Plant Sci.* 8, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01120>
- Lafitte, H.R., Ismail, A., Bennet, J., 2004. Abiotic stress tolerance in rice for Asia: progress and the future. In: Fischer, T., Turner, N., Angus, J., McIntyre, L., Robertson, M., Borrell, A., Lyod, D. (Eds.), *Proceedings of the Fourth International Crop Science Congress on New Directions for a Diverse Planet*. Brisbane, Australia, 26 September–1 October 2004. Published on CDROM Website [www.cropscience.org.au](http://www.cropsscience.org.au)
- Landi, S., Hausman, J.-F., Guerriero, G., Esposito, S., 2017. Poaceae vs. Abiotic Stress: Focus on Drought and Salt Stress, Recent Insights and Perspectives. *Front. Plant Sci.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01214>
- Liu, K., Wang, L., Xu, Y., Chen, N., Ma, Q., Li, F., Chong, K., 2007. Overexpression of OsCOIN, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice. *Planta* 226, 1007–1016. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0548-5>
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1998. Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 1391. <https://doi.org/10.2307/3870648>
- Ma, Q., Dai, X., Xu, Y., Guo, J., Liu, Y., Chen, N., Xiao, J., Zhang, D., Xu, Z., Zhang, X., Chong, K., 2009. Enhanced Tolerance to Chilling Stress in OsMYB3R-2 Transgenic Rice Is Mediated by Alteration in Cell Cycle and Ectopic Expression of Stress Genes. *Plant Physiol.* 150, 244–256. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133454>
- Ma, Y., Dai, X., Xu, Y., Luo, W., Zheng, X., Zeng, D., Pan, Y., Lin, X., Liu, H., Zhang, D., Xiao, J., Guo, X., Xu, S., Niu, Y., Jin, J., Zhang, H., Xu, X., Li, L., Wang, W., Qian, Q., Ge, S., Chong, K., 2015. COLD1 confers chilling tolerance in rice. *Cell* 160, 1209–1221. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.046>
- Man, L., Xiang, D., Wang, L., Zhang, W., Wang, X., Qi, G., 2017. Stress-responsive gene RsICE1 from *Raphanus sativus* increases cold tolerance in rice. *Protoplasma* 254, 945–956. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1004-9>
- Miller, J.K., Bradford, K.J., 2010. The regulatory bottleneck for biotech specialty crops. *Nat. Biotechnol.* 28, 1012–1014. <https://doi.org/10.1038/nbt1010-1012>
- Miura, K., Jin, J.B., Lee, J., Yoo, C.Y., Stirm, V., Miura, T., Ashworth, E.N., Bressan, R.A., Yun, D.-J., Hasegawa, P.M., 2007. SIZ1-Mediated Sumoylation of ICE1 Controls CBF3/DREB1A Expression and Freezing Tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell Online* 19, 1403–1414. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048397>
- Monastra, G., Rossi, L., 2003. Transgenic Foods as a Tool for Malnutrition Elimination and Their Impact on Agricultural Systems. *Riv. di Biol. - Biol. Forum* 96, 363–384.
- Morsy, M.R., Almutairi, A.M., Gibbons, J., Yun, S.J., De Los Reyes, B.G., 2005. The OsLti6 genes encoding low-molecular-weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature. *Gene* 344, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.09.033>

- Murata, N., Los, D.A., 1997. Membrane Fluidity and Temperature Perception. *Plant Physiol.* 115, 875–879. <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.875>
- Nakashima, K., Tran, L.S.P., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J.* 51, 617–630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03168.x>
- Oh, S., Song, S.I., Kim, Y.S., Jang, H., Kim, S.Y., Kim, M., Kim, Y., Nahm, B.H., Kim, J., Bioscience, D., O, K.S., 2005. Arabidopsis CBF3 / DREB1A and ABF3 in Transgenic Rice Increased Tolerance to Abiotic Stress without Stunting Growth. *Society* 138, 341–351. <https://doi.org/10.1104/pp.104.059147.1>
- Oh, S.J., Kwon, C.W., Choi, D.W., Song, S.I., Kim, J.K., 2007. Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnol. J.* <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00272.x>
- Olesen, J.E., Bindi, M., 2002. Consequences of climate change for European agricultural productivity, land use and policy. *Eur. J. Agron.* 16, 239–262. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(02\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(02)00004-7)
- Park, M.R., Yun, K.Y., Mohanty, B., Herath, V., Xu, F., Wijaya, E., Bajic, V.B., Yun, S.J., de Los Reyes, B.G., 2010. Supra-optimal expression of the cold-regulated OsMyb4 transcription factor in transgenic rice changes the complexity of transcriptional network with major effects on stress tolerance and panicle development. *Plant, Cell Environ.* 33, 2209–2230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02221.x>
- Rachmat, A., Nugroho, S., Sukma, D., Aswidinnoor, H., Sudarsono, 2014. Overexpression of OsNAC6 transcription factor from Indonesia rice cultivar enhances drought and salt tolerance. *Emirates J. Food Agric.* 26, 519–527. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i6.17672>
- Sanghera, G. S., Wani, S. H., Hussain, W., Singh, N. B., 2011. Engineering Cold Stress Tolerance in Crop Plants. *Curr. Genomics* 12, 30–43. <https://doi.org/10.2174/138920211794520178>
- Sarkar, N.K., Kundnani, P., Grover, A., 2013. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*). *Cell Stress Chaperones* 18, 427–437. <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0395-6>
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2015. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14, 407–426. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9372-8>
- Smita, S., Katiyar, A., Chinnusamy, V., Pandey, D.M., Bansal, K.C., 2015. Transcriptional Regulatory Network Analysis of MYB Transcription Factor Family Genes in Rice. *Front. Plant Sci.* 6, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01157>
- Snell, C., Bernheim, A., Bergé, J.B., Kuntz, M., Pascal, G., Paris, A., Ricroch, A.E., 2012. Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: A literature review. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1134–1148. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.048>
- Sperotto, R.A., de Araújo Junior, A.T., Adamski, J.M., Cargnelutti, D., Ricachenevsky, F.K., de Oliveira, B.H.N., da Cruz, R.P., dos Santos, R.P., da Silva, L.P., Fett, J.P., 2018. Deep RNAseq indicates protective mechanisms of cold-tolerant indica rice plants during early vegetative stage. *Plant Cell Rep.* 37, 347–375. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2234-9>
- Su, C.F., Wang, Y.C., Hsieh, T.H., Lu, C.A., Tseng, T.H., Yu, S.M., 2010. A Novel MYBS3-Dependent Pathway Confers Cold Tolerance in Rice. *Plant Physiol.* 153, 145–158. <https://doi.org/10.1104/pp.110.153015>
- Taj, G., Agarwal, P., Grant, M., Kumar, A., 2010. MAPK machinery in plants. *Plant Signal. Behav.* 5, 1370–1378. <https://doi.org/10.4161/psb.5.11.13020>

- The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Briefs 317. <https://doi.org/10.1017/S0014479706343797>
- Thomashow, M.F., 1999. PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 571–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.571>
- Tuteja, N., 2010. Cold, Salinity, and Drought Stress. *Plant Stress Biol. From Genomics to Syst. Biol.* 444, 137–159. <https://doi.org/10.1002/9783527628964.ch7>
- Uzogara, S.G., 2000. The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: A review. *Biotechnol. Adv.* 18, 179–206. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00033-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00033-1)
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee B, Hong X, Agarwal A, Zhu JK: ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Gene Dev* 2003, 1043-1054. <https://doi.org/10.1101/gad.1077503>
- Wang, Q., Guan, Y., Wu, Y., Chen, H., Chen, F., Chu, C., 2008. Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. *Plant Mol. Biol.* 67, 589–602. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9340-6>
- Xiang, D., Chai, Y., Man, L., Sun, Y., Zhang, T., Wei, C., Xie, Z., Li, H., Zhang, W., Liu, D., Cheng, D., Wang, X., Liu, C., 2017. Overexpression of a heading Chinese cabbage ICE1 gene confers freezing tolerance in transgenic rice. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 128, 43–54. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1080-8>
- Xiang, Y., Huang, Y., Xiong, L., 2007. Characterization of Stress-Responsive CIPK Genes in Rice for Stress Tolerance Improvement. *Plant Physiol.* 144, 1416–1428. <https://doi.org/10.1104/pp.107.101295>
- Xiong, L., Yang, Y., 2003. Disease Resistance and Abiotic Stress Tolerance in Rice Are Inversely Modulated by an Abscisic Acid – Inducible Mitogen-Activated Protein Kinase. *Plant Cell* 15, 745–759. <https://doi.org/10.1105/tpc.008714.ported>
- Xu, M., Li, L., Fan, Y., Wan, J., Wang, L., 2011. ZmCBF3 overexpression improves tolerance to abiotic stress in transgenic rice (*Oryza sativa*) without yield penalty. *Plant Cell Rep.* 30, 1949–1957. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1103-1>
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2006. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance To Dehydration and Cold Stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 781–803. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444>
- Yokotani, N., Sato, Y., Tanabe, S., Chujo, T., Shimizu, T., Okada, K., Yamane, H., Shimono, M., Sugano, S., Takatsuji, H., Kaku, H., Minami, E., Nishizawa, Y., 2013. WRKY76 is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 64, 5085–5097. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert298>
- Yu, X.H., Juan, J.X., Gao, Z.L., Zhang, Y., Li, W.Y., Jiang, X.M., 2015. Cloning and transformation of INDUCER of CBF EXPRESSION1 (ICE1) in tomato. *Genet. Mol. Res.* 14, 13131–13143. <https://doi.org/10.4238/2015.October.26.9>
- Zhang, Y.J., Yang, J.S., Guo, S.J., Meng, J.J., Zhang, Y.L., Wan, S.B., He, Q.W., Li, X.G., 2011. Overexpression of the Arabidopsis CBF1 gene improves resistance of tomato leaves to low temperature under low irradiance. *Plant Biol.* 13, 362–367. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00365.x>
- Zhang, Z., Li, J., Li, F., Liu, H., Yang, W., Chong, K., Xu, Y., 2017. OsMAPK3 Phosphorylates OsBHLH002/OsICE1 and Inhibits Its Ubiquitination to Activate OsTPP1 and Enhances Rice Chilling Tolerance. *Dev. Cell* 43, 731–743.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.11.016>

- Zhu, J., Dong, C.H., Zhu, J.K., 2007. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.010>
- Zong, J.M., Li, X.W., Zhou, Y.H., Wang, F.W., Wang, N., Dong, Y.Y., Yuan, Y.X., Chen, H., Liu, X.M., Yao, N., Li, H.Y., 2016. The AaDREB1 transcription factor from the cold-tolerant plant *Adonis amurensis* enhances abiotic stress tolerance in transgenic plant. *Int. J. Mol. Sci.* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17040611>

Internetové zdroje:

- TAIR. *Locus: AT2G02100* [online]. Naposledy modifikováno 30/11/2015. Citováno 07/05/2018. Dostupné z: <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?name=AT2G02100&type=locus>
- UN. *World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100* [online]. Publikováno 21/06/2017. Citováno 08/05/2018. Dostupné z: <https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2017.html>