

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



Tomáš Jedlička

Efektivita využití vody (WUE), její definice a význam v odolnosti rostlin k osmotickému stresu
Water use efficiency (WUE), its definition and importance in plant resistance against osmotic stress

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michal Hála, Ph.D.

Praha 2016

Poděkování

Mé poděkování patří především RNDr. Michalu Hálovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a trpělivost, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval.

Prohlášení

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

V Praze,

Podpis

Abstrakt

Voda patří mezi hlavní limitující faktory růstu rostlin. Dostupnost vody na naší planetě se snižuje, a pokud k tomu ještě připočteme rychle rostoucí lidskou populaci, bude se tento problém dále stupňovat. Vědci z celého světa, ale především ti ze suchých oblastí, dnes stojí před velkým problémem, kterým je snaha o co nejefektivnější využití vody rostlinami. Pokud chceme tento problém vyřešit, potřebujeme porozumět problematice efektivity využití vody rostlinami (z angl. water use efficiency, WUE). Tato práce se pokouší shrnout současné vědění související s problematikou WUE. Součástí práce je část zaměřená na anatomicko-fyziologické parametry regulace WUE, která se soustředí především na problematiku evapotranspirace. Další část práce má za cíl objasnit problematiku WUE na genové úrovni a s tím související biotechnologické možnosti. Na konci práce jsou zmíněny možnosti zvyšování WUE pomocí technik zavlažování.

Klíčová slova: efektivita využití vody, evaporace, transpirace, průduch, hustota průduchů, kyselina abscisová, ERECTA

Abstract

Water is one of the main limiting factors of plant growth. Availability of water on our planet is decreasing, and if we add fast-growing human population, we have a problem growing. Scientists from all around the world, especially those from arid regions, are facing a big problem, which is an attempt to make the most efficient use of water by plants. If this problem should be solved, we need to understand the issue of Water Use Efficiency (WUE). This paper attempts to summarize the current knowledge related to the issue of WUE, mainly focused on anatomical and physiological parameters control of WUE, which is focused primarily on the issue of evapotranspiration. Another part focuses on clarifying the issue of WUE at the gene level and the related biotech opportunities. At the end of the work are discussed possibilities of increasing WUE using irrigation techniques.

Key words: water use efficiency, evaporation, transpiration, stoma, stomatal density, abscisic acid, ERECTA

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Definice účinnosti využití vody (WUE)	2
1.1.1	Okamžitá WUE	2
1.1.2	Vnitřní WUE (Intrinsic WUE)	2
1.1.3	Integrovaná WUE.....	3
2	Anatomicko-fyziologické parametry ovlivňující WUE	3
2.1	Evapotranspirace	4
2.1.1	Trichomy	4
2.1.2	Kutikula.....	5
2.1.3	Funkce kutikuly.....	6
2.1.4	Kutikula a voda	6
2.2	Anatomické parametry listu ovlivňující transpiraci	7
2.2.1	Hustota průduchů	7
2.2.2	Velikost průduchů	8
2.2.3	Poloha průduchů.....	8
2.2.4	Primární regulace transpirace	10
3	Známé geny ovlivňující WUE.....	14
3.1	Gen ERECTA	15
3.1.1	Vliv genu ERECTA na rostlinu	15
3.1.2	Možnosti genu ERECTA	17
3.2	Gen ALX8	17
3.2.1	Alx8 a efektivita využití vody	18
3.3	Gen HARDY (HRD)	19
4	Biotechnologie zaměřené na zvyšování WUE	19
4.1	Biotechnologie a WUE	20
4.2	Možnosti modifikací	21
4.3	Šlechtění zaměřené na WUE	23
5	Nepřímé ovlivnění WUE.....	24
6	Závěr.....	25
7	Použitá literatura:	26

Seznam zkratek

WUE – water use efficiency (efektivita využití vody)

B – biomass (biomasa)

WU – water use (využitá voda)

cd1 – cutin deficient1 (nedostatečná kutikula1)

EPF – epidermal patterning factor (epidermální vzorovací faktor)

SDD1 – stomatal density and distribution1 (průduchová hustota a rozdělení1)

ABA – kyselina abscisová

PYR – pyrabactin resistance

PYL – PYR-like

RCAR – regulatory components of ABA receptors (regulační komponenty ABA receptorů)

RLK – receptor like kinase

RUBISCO - Ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza-oxygenáza

LRR – leucine rich repeat

HVA1 – *Hordeum vulgare* (Ječmen setý)

APX2 – askorbatperoxidáza2

ROS – reaktivní formy kyslíku

HSP – heat shock protein (protein teplotního šoku)

WT – wild type

PRD – partial root deiccation (částečné vysychání kořenů)

1 Úvod

Do roku 2050 by měla lidská populace narůst o 65%, to je o 3,7 miliardy lidí více, než máme dnes. Na planetě bude 10 miliard lidí, pro které bude nutné vypěstovat jídlo. V současnosti žije 7% populace v oblastech s nedostatkem vody. V roce 2050 by to mohlo být až 67%. Na zemědělskou výrobu se dnes používá přibližně 75% vody, kterou člověk využívá. Až si bude chtít 67% populace v roce 2050 vypěstovat potravu, tak na to nebude mít dostatek vody. Je jedno jestli v oblastech s dobrou nebo špatnou dostupností vody, ale pouze 10-30% vody je využito rostlinou a právě toto je prostor pro zlepšení (Wallace, 2000). Dostupnost vody je jedním z hlavních abiotických faktorů ovlivňujících růst rostliny a s tím související, pro společnost podstatný, ekonomický výnos (Mateos & Araus, 2016). V místech s omezeným přístupem k vodě je odolnost rostliny k suchu a její schopnost využít vodu co nejefektivněji rozhodující. Největší ztráty způsobené suchem jsou v rozvojových zemích, kde mohou dosahovat až 80% (Oshunsanya, 2016).

Velkým problémem je také vysychání půdy a desertifikace, které postihují více než polovinu rozlohy souše. Suchem ohrožené oblasti můžeme rozdělit na: hyper-aridní (méně než 100mm srážek za rok), aridní (100-300mm srážek za rok) a polo-aridní (300-600mm srážek za rok), jen pro představu průměrný úhrn srážek v ČR je okolo 800mm (v posledních letech méně). Pokud bychom chtěli pěstovat komerčně významné plodiny na výše zmíněných suchem ohrožených územích, bylo by nutné je dotovat nemalým množstvím závlah. V oblastech, které se potýkají s nedostatkem vody a jsou dotované závlahami, dochází k zasolování půd, což ovlivňuje vodní hospodaření rostlin. Tento jev je způsobený zavlažováním a následným výparem vody, zatímco soli minerálních živin dodané se závlahou v půdě zůstávají. K zasolování půdy dochází také díky přihnojování, kterého se ve světě také hojně využívá. Oblasti postižené nedostatkem vody tvoří více než polovinu pevniny a stále se zvětšují (Kassas, 1995). Pokud chceme pěstovat komerčně využitelné plodiny v suchých oblastech, potřebujeme vědět, jak efektivně hospodaří s vodou.

Osmotický stres výrazně ovlivňuje hospodaření rostliny s vodou a to především na buněčné úrovni. Při osmotickém stresu dochází, ke snížení vodního potenciálu v okolí buňky a k následnému výtoku vody z buňky do mezibuněčného prostoru. To negativně ovlivňuje stabilitu buněčných struktur, makromolekul a celkovou rovnováhu metabolických dějů. Hlavními faktory způsobujícími osmotický stres rostlin jsou: sucho, zasolení a chlad (mráz).

Problematika sucha je v současné době velice aktuální a zájem o ní bude v příštích letech jistě stoupat. Proto jsem se ve své práci zaměřil především na osmotický stres způsobený suchem (Fujita et al. 2011).

Ve své práci pracuji s termínem Efektivita využití vody (z anglického water use efficiency, WUE). Tato veličina může být popsána na několika úrovních a její definice jsou značně nejednotné. První dvě definice pracují s výměnou plynů a používají se především na úrovni rostliny jako jedince, následující definice pracuje se sušinou a takové pojetí WUE se dá použít na celý porost.

1.1 Definice účinnosti využití vody (WUE)

1.1.1 Okamžitá WUE (z angl. Instantaneous WUE)

Tato definice je zavedena na úrovni fotosyntetických orgánů (např. listů). Je definována jako počet molů asimilovaného oxidu uhličitého na počet molů vody ztracených při transpiraci za určitý čas (A/E, A-rychlost asimilace, E-rychlost transpirace). Měří se pomocí úrovně výměny plynů mezi listem a okolním prostředím. Nevýhodou takto zvolené definice, ale definice vnitřní WUE (viz dále) je, že se nedá experimentálně aplikovat na velké plochy (pouze matematicky) a musí se provádět pomocí specializovaných přístrojů, jejichž pořizovací cena je poměrně vysoká. (Wang et al. 2013).

1.1.2 Vnitřní WUE (z angl. Intrinsic WUE)

Vnitřní WUE je poměr mezi množstvím asimilovaného oxidu uhličitého a vodivostí průduchů. Jinými slovy je to kolik rostlina protranspiruje přes průduchy vody na určité množství fixovaného oxidu uhličitého (Polley, 2002). Pro měření vodivosti průduchů se mimo jiné používá metoda diskriminace izotopu uhlíku (carbon isotope discrimination). Při této metodě se měří poměr mezi izotopy uhlíku C12 a C13 v rostlinném materiálu a okolní atmosféře. Při průchodu fotosyntetickým aparátem dochází v závislosti na koncentraci oxidu uhličitého uvnitř listu k preferenční asimilaci lehčího uhlíku C12. Tuto preferenci ovlivňuje fixační enzym RUBISCO (Ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza-oxygenáza). Také rychlost difúze C13 průduchy je nižší oproti lehčímu izotopu. V případě snížení vodivosti průduchů dochází ke zvýšení WUE a současně ke snížení vnitřní koncentrace oxidu uhličitého v listech, což vede k vyššímu zabudování těžšího izotopu uhlíku do rostlinného materiálu. Poměr zastoupení izotopů uhlíku C12 a C13 v rostlinném materiálu je tedy v korelaci s WUE a lze ho využít při jejím měření. Výhodou tohoto přístupu je možnost využití v různých časových

obdobích a snadná příprava vzorků. Nevýhodou jsou nároky na přístrojové vybavení a omezení na C3 rostliny, protože enzym fosfoenolpyruvátkarboxykináza, který se podílí na primární fixaci oxidu uhličitého u C4 rostlin, nevykazuje žádnou preferenci vůči izotopům uhlíku (Lopes & Mullan 1990).

1.1.3 Integrovaná WUE

Integrovaná definice se vztahuje k celé rostlině. Tato definice je využívána především v zemědělství, protože pro její měření není třeba žádných specializovaných přístrojů. Je definována jako množství vody (zálivky, srážek) nutné na vytvoření určitého množství sušiny (B/WU). Integrovaná definice má oproti předchozím jisté nevýhody, které mohou být rozděleny do dvou částí. První nevýhodou je, že akumulace sušiny zabere více času (v řádu dnů až měsíců) a zjištění integrované WUE je tedy časově náročnější. Druhou nevýhodou je, že do množství sušiny se v mnoha případech zahrnují i kořeny, stonkové části a jiné složky rostliny, které se nedají zahrnout do čistého výnosu (Tambussi et al. 2007)

Jako sušina se dá brát v úvahu celá biomasa nebo jenom její ekonomicky podstatná část (namř. u kukuřice-zrno). A podle tohoto je možno integrovanou WUE rozdělit na WUE biomasy nebo WUE výnosu (WUE výnosu pracuje se sklizňovým indexem). Sklizňový index (někde též plodinový index) je poměr mezi využitelnou produkcí a celkovou primární produkcí. Při výpočtu sklizňového indexu se u obilnin často zanedbává podzemní biomasa (kořeny). V tom případě se počítá pouze s celkovou nadzemní biomasou (Temocico & Alecu, 2015).

2 Anatomicko-fyziologické parametry ovlivňující WUE

Hlavním faktorem ovlivňujícím WUE je evapotranspirace, která je důležitou složkou vodního cyklu (Abbate et al., 2004). Hnací energií vodního cyklu je sluneční energie, která má hlavní vliv na odpar vody z vodních ploch a také zemského povrchu. K největšímu odparu ze zemského povrchu dochází právě působením evapotranspirace. Vlivem narůstající teploty klimatu dochází ke zvyšování evapotranspirace a tím se zintenzivňuje, zrychluje vodní cyklus. To může vést ke změně dostupnosti vody v mnoha oblastech, zvýšení frekvence silných bouří v tropických oblastech a s tím související záplavy. Dopad na krajinu bude jistě mnohem hlubší a více komplexní než je uvedeno výše (Huntington, 2006). Evapotranspirace se skládá ze dvou složek, kterými jsou evaporace a transpirace.

2.1 Evapotranspirace

Evapotranspirace je fyzikální výpar, který zahrnuje v širokém slova smyslu výpar z vodních ploch, půdy i těl rostlin a je podstatnou složkou vodního cyklu. Na úrovni krajiny nazýváme proces evaporací a zahrnujeme do něj odpar z vodních ploch a půdy.

Na úrovni odparu z rostlinného těla nazýváme jev transpirací. Transpiraci můžeme rozdělit na kutikulární, která tvoří 5-20% transpirované vody (rostlinou přímo neregulovatelná) a na transpiraci stomatární, která je majoritní složkou transpirace (je rostlinou regulovatelná). Z těla rostliny dochází transpirací ke ztrátám vody v řádu desítek procent. Část této vody by mohla být v opačném případě využita rostlinou.

Nekontrolovanému odparu ze svého povrchu se rostliny snaží zabránit. S tímto problémem se potýkaly i první suchozemské rostliny. Suchozemské prostředí je totiž velice odlišné od vodního, a proto se rostliny musely přizpůsobit na nové podmínky. Hlavní problémy, se kterými bylo nutné se vypořádat, byly: gravitace, silné UV záření, větší výkyvy teplot a také právě vysychání. Rostlina si musela vytvořit bariéru, která by zabránila nekontrolovaným únikům vody a zároveň by propustila fotosynteticky aktivní záření. Oba tyto požadavky byly pro přežití rostlin na souši klíčové. Jako odpověď na tyto požadavky si rostliny vytvořily kutikulu (Waters, 2003). Jako ochranu před UV zářením a ztrátami vody si rostliny nevytvořily pouze kutikulu, ale mají na svém povrchu také speciální anatomické struktury - trichomy a také ochranné pigmenty (např. flavonoidy), které jsou ukládány v pokožkových buňkách jako UV filtr (Li et al. 1993).

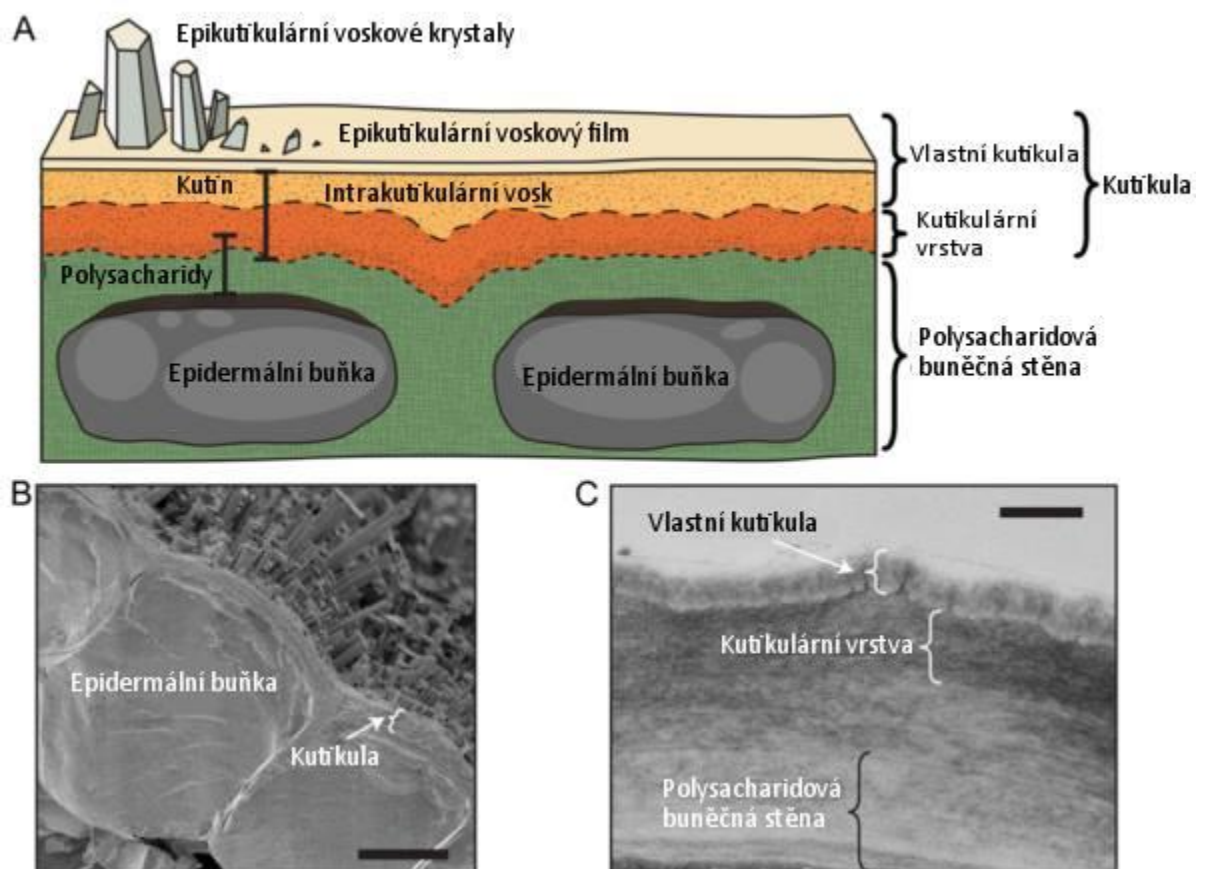
2.1.1 Trichomy

Trichomy jsou chloupky, které se nacházejí na povrchu listu a vytvářejí se z epidermálních buněk. Jejich přítomnost na abaxiální a adaxiální straně listu je druhově specifická. V rostlinné říši se dokonce nacházejí rostliny, které na svých listech žádné trichomy nemají, jsou tzv. glabrózní. Rostliny, které nemají na svém povrchu žádné trichomy, musejí mít o to kvalitnější kutikulární vrstvu. Také morfologie trichomů je druhově specifická a odvíjí se od toho jaká je jejich primární funkce (ochrana před UV zářením a přehříváním listu, ochrana před ztrátami vody nebo ochrana před herbivory) (Brewer & Smith, 1991).

2.1.2 Kutikula

Rostlinná kutikula je tenký povlak chránící rostlinu před vysycháním a slouží také jako bariéra mezi atmosférou a povrchem rostliny. Je to složitá struktura, která se skládá především z molekul kutinu a lipidů, kterým se říká vosk a mají hydrofobní vlastnosti. Kutin patří mezi polyestery a tvoří 40-80% hmotnosti kutikuly. Kutin je skládán z C16 a C18 dlouhých řetězců, které jsou transportovány ven z buňky do buněčné stěny, kde jsou následně modifikovány. Kutinová vrstva leží na vnější straně epidermální buněčné stěny. Složení kutinu a tím pádem i vlastnosti kutikuly se liší podle požadavků konkrétního pletiva nebo rostlinného druhu (Heredia & Domí, 2015).

Důležitou složkou kutikuly je také vosková složka, která se skládá především z dlouhých řetězců mastných kyselin, které jsou syntetizovány v plastidech rostlinné buňky. Vosková složka zahrnující také aldehydy, alkeny, primární a sekundární alkoholy, estery a ketony (Shepherd et al. 2006).



Obr.1: Převzato a upraveno z (Yeats & Rose, 2013)
Struktura rostlinné kutikuly

Na obrázku A je schematické znázornění rostlinné kutikuly a její hlavní součásti. Do schématu je také zahrnuta první vrstva buněk ležící pod kutikulou. Na obrázku B je řez epidermální a kutikulární vrstvou listu *Arabidopsis thaliana*. Fotka je pořízena pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (měřítko je 5 μ m). Obrázek C představuje fotografii z elektronového transmisního mikroskopu a je na ní také řez epidermální a kutikulární vrstvou listu *Arabidopsis thaliana* (měřítko je 500nm).

2.1.3 Funkce kutikuly

Kutikula je spojovaná především s ochranou rostliny před ztrátami vody a nekontrolovanou výměnou plynů. Tato její funkce je pro rostlinu samozřejmě velice důležitá. Kutikula hlídá výměnu vody mezi epidermálními buňkami vnější buněčné stěny a okolním atmosférickým prostředím (Heredia & Domí, 2015). Kutikula má kromě toho také mnoho dalších sekundárních funkcí jako je ochrana rostliny před UV zářením, patogeny nebo čištění listu od nečistot, které cloní fotosynteticky aktivní záření a umožňují lepší přichycení patogenů (hub nebo bakterií) k povrchu rostliny (Isaacson et al., 2009).

V této části práce bych se chtěl zaměřit především na souvislosti mezi kutikulou a vodou v rostlině. Voda se dostává přes kutikulu pomocí prosté difuze ve směru gradientu vodního potenciálu. Rychlost difuze je ovlivněna propustností kutikulární vrstvy, která je druhově specifická. Je zajímavé, že propustnost kutikuly nesouvisí vždy s její tloušťkou. Jak je zmíněno výše, kutikula je nehomogenní složitá struktura, která je složena z dlouhých vláken polysacharidů a mastných kyselin, které tvoří ve vrstvě kutikuly složitou mozaiku. V kutikulární vrstvě se nachází místa, kde jsou voskové řetězce v těsné vazbě a tvoří krystalickou zónu. V těchto místech je průchod difundujících částic nemožný. Tato hlavní část difuzní bariéry se nachází v úzkém pruhu na vnější části kutikulární vrstvy. Prostupnost této vrstvy je limitujícím faktorem pro difuzi skrz kutikulární vrstvu. To je důvod, proč není většinou pro úspěšnost difuze rozhodující tloušťka kutikuly. Voda a jiné difundující částice musí najít cestu skrz toto „bludiště“ (Kerstiens, 1996).

2.1.4 Kutikula a voda

Souvislost mezi kutikulou a vodou v rostlině (především jejím transportem) je popsána na následujících řádcích. Byly provedeny studie, které tento vztah jasně dokazují. Rostliny vystavené osmotickému stresu způsobenému nedostatkem vody zvýšily produkci kutikulárních vosků na svém povrchu. Při pokusu prováděném na tabáku (*Nicotiana glauca*) došlo ke kutikulární změně již po první periodě sucha. Na abaxiální i adaxiální straně listu docházelo k rovnoměrnému formování epikutikulárních voskových krystalů, s výjimkou

svěracích buněk, kde se jejich hustota znatelně snižovala. Rostliny, které byly vystaveny periodám vyschnutí častěji, měly hustotu krystalů větší. Také množství kutikulárních vosků korelovalo s počtem period sucha, kterým byla rostlina vystavena (Kimberly et al., 2006).

Podobný pokus byl provedený také na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Na konci několika-denní suché periody byl relativní obsah vody v rostlině snížen přibližně na 60%. Množství kutikulárního vosku na jednotku listové plochy se naopak zvýšilo oproti kontrole o 75% (Parsons et al. 2009). Mnoho pokusů souvisejících s rostlinnou kutikulou se provádí na plodech rajčat (*Solanum lycopersicum*). Důvodem je bohatá vrstva kutikuly na povrchu plodu. V jednom z pokusů byla sledová linie s mutací *cd1* (cutin deficient1), která měla na svých plodech přibližně 5-10% kutikuly linie, s níž bylo měření porovnáváno. To mělo za důsledek, že jedinec *cd1* byl extrémně citlivý ke ztrátám vody a k napadení patogeny (Yeats et al., 2012).

2.2 Anatomické parametry listu ovlivňující stomatární transpiraci

Stomatární transpirace je fyziologický odpar, který zahrnuje odpar z listových průduchů a může být regulována pomocí pohybu průduchů (Miao et al., 2015). Odpar z listových průduchů je také ovlivněn jejich hustotou, tvarem průduchů, velikostí průduchů a jejich rozmístěním na povrchu rostliny.

Rychlá reakce rostlin na suché podmínky probíhá prostřednictvím zavření průduchů a s tím související sníženou transpirací vody do okolí. Pokud je rostlina vystavena suchým podmínkám delší dobu, reaguje na to změnou průduchové morfologie nových listů. Průduchy na nových listech jsou zastoupeny s menší hustotou a nebo jsou menší. Adaptace velikosti průduchů a jejich hustoty je jednou z hlavních dlouhodobých odpovědí listu na stres způsobený nedostatkem vody (Doheny-adams et al., 2012).

2.2.1 Hustota průduchů

Hustota průduchů je výsledkem působení mnoha vnitřních i vnějších faktorů, z nichž mnohé zůstávají dosud neznámé. Za regulaci hustoty průduchů na listech *Arabidopsis thaliana* je například zodpovědný EPIDERMAL PATTERNING FACTOR (EPF), negativní regulátor hustoty průduchů, který náleží do rodiny malých peptidů. Při snížení exprese EPF1, který je exprimován svěracími buňkami mladých průduchů, dochází k výraznému zvýšení hustoty průduchů na povrchu listu. Stejný efekt na hustotu listových průduchů má i další člen

rodiny EPF, EPF2. Tento malý peptid je exprimován v dřívějších fázích vývoje listového průduchu než EPF1 a snížení jeho exprese vede také k zvýšení hustoty průduchů. Na druhou stranu při nadměrné expresi EPF1 i EPF2 dochází k nápadnému snížení hustoty průduchů (Hara et al., 2009). Dalším proteinem zodpovědným za regulaci hustoty průduchů u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* je transkripční faktor GT-2 like 1 (GTL1). U mutantů v GTL1 dochází ke snížení hustoty průduchů na abaxiální straně listu, která je zapříčiněna zvýšenou expresí jiného regulátoru, STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION1 (SDD1). GTL1 interaguje s promotorovou oblastí SDD1 čímž zvyšuje jeho expresi. Důsledkem snížení hustoty průduchů dochází ke zvýšení WUE, které je způsobeno sníženou úrovní transpirace. Zároveň u GTL1 mutantů nedochází ke snížení fixace oxidu uhličitého, proto mají zvýšenou úroveň okamžité WUE (asimilace/transpirace) (Yoo et al., 2010).

Je zajímavé, že pokud se nám podaří snížit vodivost průduchů u *Arabidopsis thaliana* vlivem snížení jejich hustoty, podaří se nám také zvýšit efektivitu využití vody (WUE) a to dokonce bez většího snížení fotosyntetické kapacity. Menší hustota průduchů je spojená s větší efektivitou využití vody a naopak větší hustota souvisí s menší efektivitou využití vody. Jak je uvedeno výše regulace hustoty průduchů je možná pomocí EPF a dalších faktorů. Genové modifikace právě v oblasti EPF by mohly být v budoucnu cestou, která by mohla vést ke zvýšení efektivity využití vody u rostlin (Franks et al., 2015).

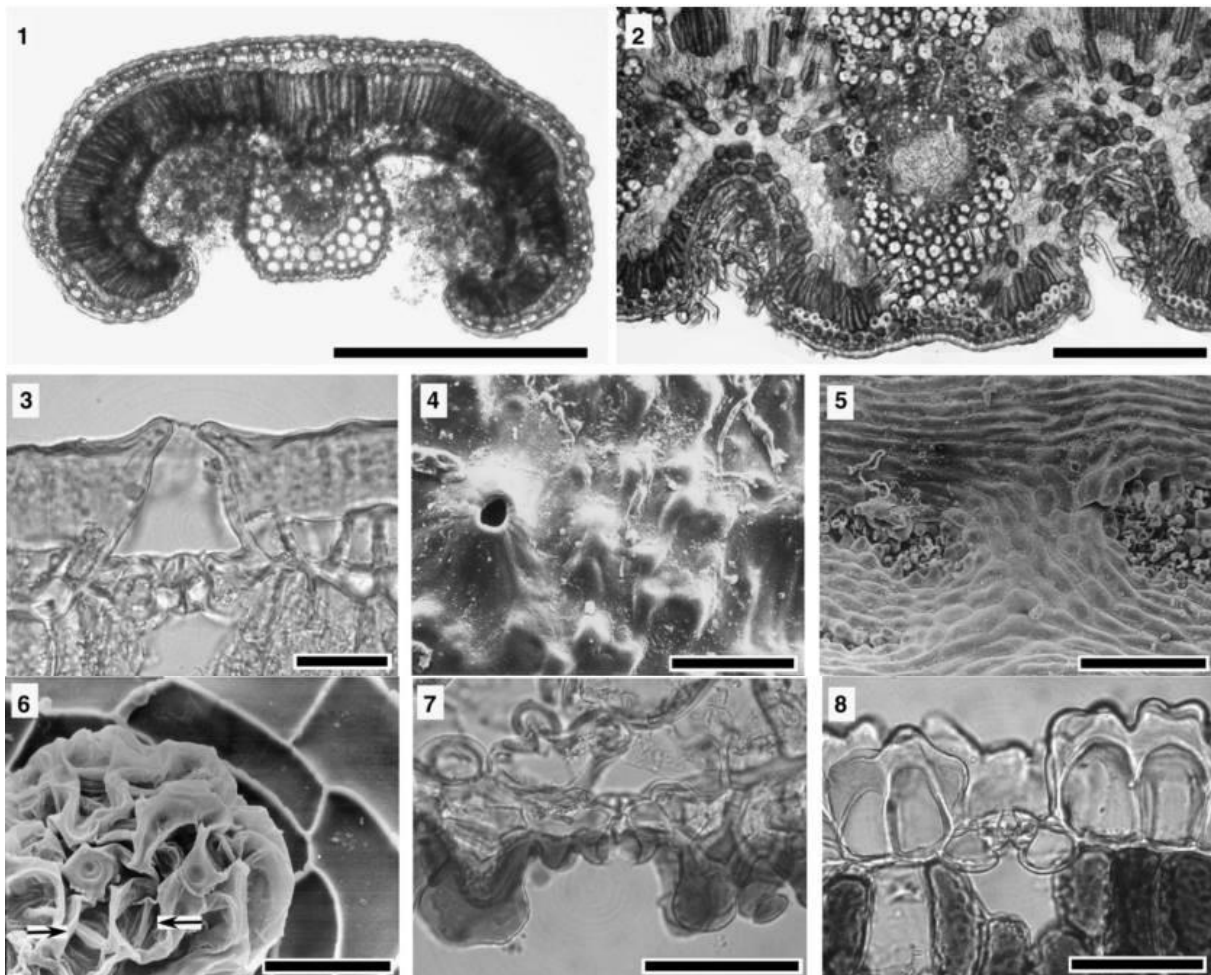
2.2.2 Velikost průduchů

Odpar z listových průduchů a jejich celková vodivost nejsou ovlivněny pouze jejich hustotou. Stejně důležitým faktorem jako hustota průduchů je i jejich velikost. Tyto dva faktory jsou v úzkém vztahu a vzájemně se ovlivňují. Velikost průduchů a velikost svěřacích buněk je negativně ovlivněna jejich hustotou. Listy, které mají vysokou hustotu malých průduchů, odpařují vodu ze svého povrchu rychleji než listy s malým množstvím velkých průduchů. Tento jev je způsobený větším aktivním povrchem průduchu vůči jeho objemu. Tyto průduchy jsou také schopné reagovat rychleji na okolní změny v porovnání s průduchy většími (Drake et al., 2013).

2.2.3 Poloha průduchů

Dalším faktorem, který také ovlivňuje transpiraci je architektura a poloha průduchu (viz obr.2). Jednou z rostlinných adaptací na sucho je zanoření průduchů pod povrch listu,

nebo jejich umístění do takzvaných krypt. Zanořené průduchy mají nižší transpiraci v důsledku snížené vodivosti, ta je způsobena nižší rychlostí proudění vzduchu v těsném okolí průduchu. Problémem, který musí rostliny vyřešit je, že při snížení transpirace dochází také ke snížení vstupu oxidu uhličitého, který je jedním z klíčových substrátů fotosyntézy. Samotná anatomie průduchu a jeho okolí může být velice pestrá a druhově specifická. Například oleandr obecný (*Nerium oleander*) má v kryptě v okolí průduchu trichomy, které napomáhají v jeho okolí udržet vzdušnou vlhkost. Právě tato schopnost vytvořit si v oblasti průduchové štěrbině mikroklima se zvýšenou vlhkostí umožňuje rostlině nechat průduchy déle otevřené a umožnit oxidu uhličitému delší dobu vstupu do listu. Vlhkost v okolí nezanořeného průduchu se pohybuje někde okolo 60%, zatímco vlhkost v okolí zanořeného přesahuje 70% (Rot et al., 2007).



Obr.2: Převzato a upraveno z (Jordan et al., 2008).

Ochrana průduchů

Na obrázcích 1-8 je zobrazeno několik strategií ochrany průduchů. Obrázky 1-3 a 7-8 jsou pořízeny pomocí světelného mikroskopu a obrázky 4-6 jsou pořízeny pomocí elektronového skenovacího mikroskopu. 1) Příčný řez listem *Banksia ericifolia* na němž je vidět úzce ohnutý okraj s hustě rostoucími trichomy. 2) Příčný řez listem *Grevillea striata*, který ukazuje dvě rýhy s průduchy vyplněné trichomy. 3) Příčný řez listem *Hakea lissosperma* na kterém je vidět samotná krypta.

4) Pohled na vnější povrch listu *Hakea lissosperma*. 5) Vnější abaxiální strana listu *Banksia quercifolia*, je na něm možno vidět dvě průduchové jámy vyplněné trichomy. 6) Vnitřní povrch abaxiální kutikuly listu *Banksia quercifolia* na obrázku je vidět kulovitý útvar ve kterém jsou uloženy průduchy (zvýrazněné šipkou). 7) Příčný řez listem *Telopea truncata* ukazující jamku s papilami. To samé můžeme vidět i na obrázku 8, tentokrát na listu rostliny *Leucadendron pubescent*. Měřítko: obr. 1 = 500 μ m, obr. 2,5 = 200 μ m, obr. 3,4,6,7,8 = 50 μ m.

2.2.4 Primární regulace transpirace

Transpirace je regulována především průduchy, které se nacházejí majoritně na povrchu listů. Průduchové štěrby jsou obklopeny svěracími buňkami, které jsou svým původem epidermální (specializované). Umožňují výměnu plynů mezi rostlinou a atmosférou: oxid uhličitý vstupuje průduchem do rostliny (je využit při fotosyntéze) a v opačném směru dochází k transpiraci, při které se vody vypařuje průduchy ven.

Regulace transpirace „pouze“ pomocí pohybu průduchů je možná a je řízena mnoha mechanismy. Při stresu způsobeném nedostatkem vody dochází rychle ke snížení vodivosti průduchů (změna toku oxidu uhličitého) a s tím související snížení rychlosti fotosyntézy. Při pokusu provedeném na sóje (*Glycine max*), byla rostlina vystavena suchým podmínkám po dobu pěti dní. Během této doby byla u rostliny měřena úroveň fotosyntetické aktivity, která byla na konci měření o 70% nižší než u kontrolních plně zavlažovaných jedinců (Atkin & Macherel, 2009, Ribas-carbo et al., 2005).

Turgor

Jedním z faktorů regulující pohyby svěracích buněk je turgor. Turgor je hydrostatický tlak působící na vnitřní stranu buněčné stěny. Pokud mají rostlinné buňky dostatek vody je turgor ve svěracích buňkách velký a průduchy jsou otevřené. To umožňuje rostlině přijímat potřebné množství oxidu uhličitého nutného pro fotosyntézu a zároveň dochází k transpiraci. Na druhou stranu, pokud je v buňkách vody nedostatek a rostlina strádá, nebo by v budoucnu strádat mohla, turgor ve svěracích buňkách je nízký a průduchy jsou zavřené. Tento jednoduchý mechanismus umožňuje rostlině účinně regulovat odpar vody ze svého těla (Kim et al., 2010).

Oxid uhličitý

Dalším přímým vnějším faktorem, který ovlivňuje pohyby svěracích buněk, je koncentrace atmosférického oxidu uhličitého v okolí rostliny a jeho následný průchod

průduchy. Právě tento faktor se dostává v poslední době do popředí zájmu. Důvodem je globálně vzrůstající koncentrace oxidu uhličitého v posledních desítkách let. Současná koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře přesahuje 400 ppm a stále roste. Zvýšená koncentrace atmosférického oxidu uhličitého vede sekundárně ke zvýšení koncentrace v mezibuněčných prostorech, což způsobuje snižování vodivosti průduchů a s tím související zvyšování okamžité WUE. Tento faktor nepůsobí pouze na rostlinu jako jedince, ale jeho dopad může působit na celou krajinu. Vlivem snížení vodivosti průduchů dochází k poklesu evapotranspirace, která hraje důležitou roli při termoregulaci krajiny. Problém to může způsobit i rostlině jako jedinci, protože snížení vodivosti průduchů vede ke zvyšování teploty v listech, což způsobuje teplotní stres, který vede ke snížení rostlinného výnosu (Hu et al., 2010; Medlyn et al., 2001).

Fytohormony

Velká většina všech možných procesů v rostlině je řízena rostlinnými růstovými regulátory (někdy též označované jako fytohormony), které slouží jako signální molekuly a jejich koncentrace v rostlině jsou nízké (řádově 10^{-6} až 10^{-9} molární). Mezi růstové regulátory podílející se na regulaci pohybu svěřacích buněk patří především oxid dusnatý a kyselina abscisová. Oxid dusnatý je jedním z rostlinných růstových regulátorů, který se podílí na zavírání průduchů a dokáže ovlivnit odolnost rostliny proti suchu. Hlavním fytohormonem regulujícím pohyby, především zavírání svěřacích buněk, je kyselina abscisová (ABA). Účastní se rostlinné odpovědi na stres způsobený suchem, vysokou teplotou nebo zasolením. Při nedostatku vody v okolí kořene dochází v kořeni k zvýšení syntézy kyseliny abscisové, která slouží jako signál pro svěřací buňky. Z kořene až ke svěřacím buňkám je signál ve formě kyseliny abscisové transportován pomocí xylému.

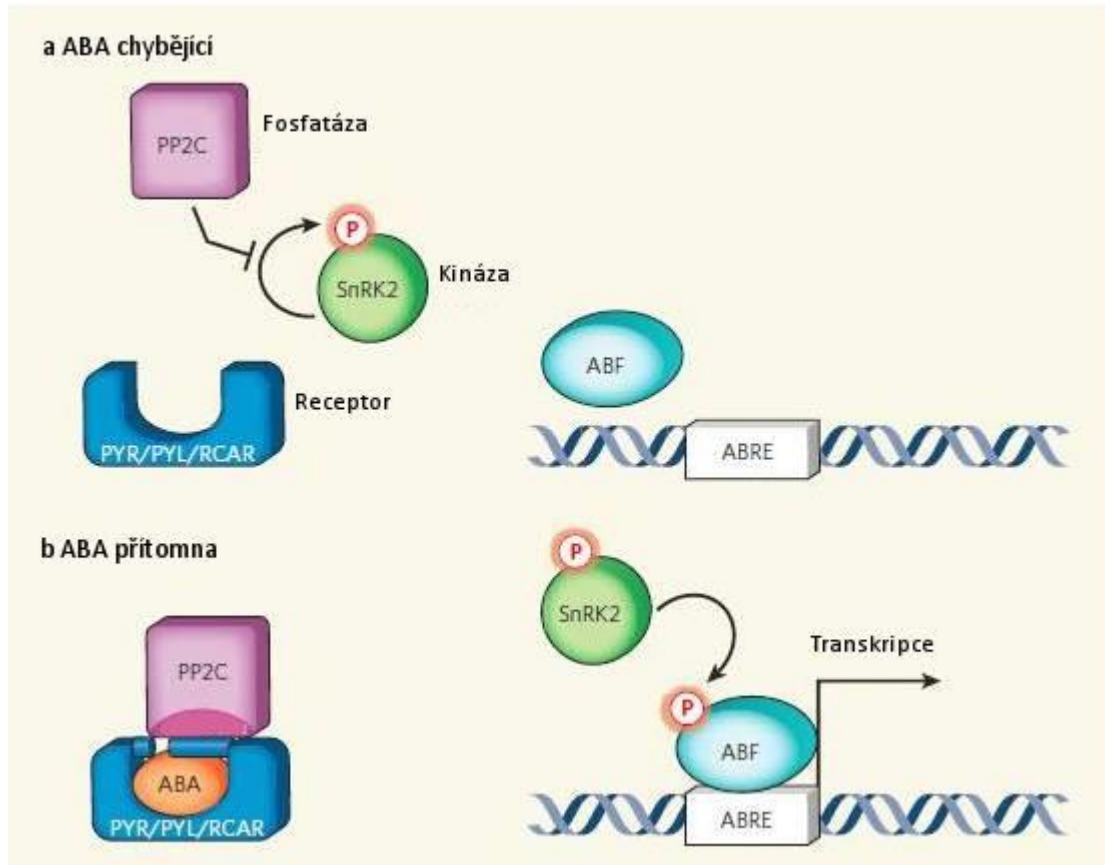
Kyselina abscisová se řadí mezi terpeny, má vliv na ztrátu turgoru a zavírání průduchů (Marguerit et al., 2012; Sauter et al. 2001). Kyselina abscisová je syntetizována poměrně složitou dráhou z karotenoidu zeaxantinu přes violaxantin až po výsledný produkt. Biosyntéza kyseliny abscisové probíhá také v plastidech buněk přilehlých k floému a v chloroplastech svěřacích buněk. Tato lokalizace je výhodná pro rychlý transport tohoto fytohormonu po rostlině. Pro transport kyseliny abscisové přes plasmatickou membránu využívá rostlina ABC proteiny, které jsou mezi organismy široce zastoupeny od bakterií až po člověka, ale nejhojněji jsou zastoupeny právě mezi rostlinami. ABC proteiny fungují jako přenašeče, které pro svou aktivitu využívají ATP. Dnes je známo 129 ABC transportérů, které jsou rozděleny do 9-13 podskupin. Pro rostliny je významná podskupina G, která zahrnuje 40 členů. Pro

transport kyseliny abscisové je významný ABCG25 přenašeč, který byl lokalizován podél cévních svazků v kořenech a listech a zajišťuje export kyseliny abscisové do apoplastu, odkud se difuzí dostanou až k transportéru ABCG40. Na plasmatické membráně svěřacích buněk se nachází transportér ABCG40, který má na starost vtok kyseliny abscisové do buňky (Merilo et al. 2015).

Receptory pro kyselinu abscisovou byly dlouhou dobu neznámé. Byly objeveny jako jedny z posledních „hlavních“ fytohormonálních receptorů (viz. Obr. 3). Dnes se ví, že kyselina abscisová vyvolává rostlinou odpověď pomocí rozpustných proteinů: PYR (Pyrabactin resistance), PYL(PYR-like), RCAR (Regulatory components of ABA receptors). Tyto proteiny tvoří čtrnáctičlennou rodinu. Všechny tyto proteiny (vyjma PYL13) jsou schopné odpovídat na signál kyseliny abscisové transkripcí příslušných genů (Fujii & Zhu, 2009). Proteiny PYR a PYL tvoří díky své konformaci kapsu, do které se kyselina abscisová naváže. Na dokončení signálního řetězce je potřeba aktivita navázané PP2C fosfatázy a SnRK2 proteinkináza, které se podílejí na aktivaci transkripce ABA responzivních genů (Park et al., 2010). Při absenci kyseliny abscisové zůstává fosfatáza PP2C nenavázaná a může utlumit autofosforylaci kinázy SnRK2, která je nutná pro aktivaci transkripce. Pokud se ale kyselina abscisová nachází v okolí PYR/PYL/RCAR receptorů, naváže se do konformační kapsy a tlumí aktivitu fosfatázy PP2C. Tímto se fosfatáze PP2C znemožní inhibice autofosforylace kinázy SnRK2 a ta může aktivovat pomocí transkripčního faktoru ABF transkripci příslušných genů (Sheard & Zheng, 2009).

Způsob jakým ovlivňuje kyselina abscisová WUE je následující: Kyselina abscisová ovlivňuje funkci iontových kanálů, které se podílejí na regulaci vodního potenciálu svěřacích buněk. Tím se mění turgor, který ovlivňuje pohyby svěřacích buněk. Vlivem snížení turgoru ve svěřacích buňkách dochází k jejich zavření, čímž se snižuje úroveň transpirace. Efektem snížení transpirace je zvýšení WUE, které ovlivňuje spotřebu vody. Zajímavé je, že různé rostliny jsou různě citlivé na zvýšenou koncentraci kyseliny abscisové a citlivost rostliny na kyselinu abscisovou modifikuje jejich odpověď. Různá citlivost rostlin ke kyselině abscisové byla studována na rostlině *Impatiens capensis* z čeledi netykavkovitých. Pokus byl proveden na imbredních liniích *Impatiens capensis*, které byly k tomuto pokusu vyšlechtěny ve dvou populacích suché a zavlažované. Rostliny ze suché populace vykazovaly výrazně vyšší citlivost ke kyselině abscisové, která u nich vedla k vyšší WUE, v porovnání s populací zavlažovanou. I přes sníženou vodivost průduchů nedošlo u této populace ke snížení hodnot asimilovaného oxidu uhličitého. Z výsledků experimentu vyplývá, že zvýšení WUE u suché populace bylo pravděpodobně způsobeno vyšší citlivostí rostlin ke kyselině abscisové spíše

než její větší koncentrací. Při měření se také zjistila větší životaschopnost jedinců citlivých ke kyselině abscisové při stresových podmínkách způsobených nedostatkem vody. Z toho vyplývá, že ovlivňování citlivosti rostlin ke kyselině abscisové by se dalo využít pro zvyšování WUE (M.Shane Heschel et al., 2016).



Obr.3 : Převzato a upraveno z (Sheard & Zheng, 2009)

Základní dráhy signalizace kyseliny abscisové

Na schématu A není přítomna kyselina abscisová a z toho důvodu může fosfatáza PP2C tlumit aktivaci kinázy SnRK2. Tím je zabráněno transkripci příslušných genů. Na schématu B je kyselina abscisová přítomna a zachycena receptorem PYR/PYL/RCAR. Na tento komplex se naváže fosfatáza PP2C které je tím zabráněno inhibici kinázy SnRK2. Kináza poté aktivuje transkripci pomocí transkripčního faktoru ABF. ABRE je ABA-responsive promotor elements.

Mechanismus pohybu svěracích buněk

Důležitou součástí regulace pohybu svěracích buněk jsou vápenaté a draslíkové ionty. Tyto ionty se do buňky a z buňky dostávají pomocí iontových kanálů, které se nacházejí na plasmatické membráně svěracích buněk a umožňují regulaci toku příslušných iontů ve směru koncentračního gradientu. Aktivita iontových kanálů na povrchu plasmatické membrány svěracích buněk je ovlivňována kyselinou abscisovou. Pro přenos iontů v opačném směru, tedy proti směru koncentračního gradientu slouží různé přenašeče, které pro svou činnost používají energii z ATP. Tyto přenašeče fungují často jako symportéry nebo antiportéry. Při

otevírání průduchu dochází k výtoku vodíkových protonů z buňky přes H⁺ ATPázu. Tím dochází k hyperpolarizaci membrány a vtoku draselných iontů draselnými kanály. V buňce dochází sekundárně ke snížení osmotického potenciálu, což vede ke zvýšení turgoru, který souvisí s otevřením průduchu. Během zavírání průduchů je zastavena aktivita H⁺ ATPázy vlivem signalizace kyseliny abscisové a dochází k otevření vápenatého kanálu, kterým se do buňky pasivně dostávají vápenaté ionty. To vede k depolarizaci membrány, která zapříčiňuje výtok draselných iontů z buňky. V důsledku toho dochází ke zvýšení osmotického potenciálu k poklesu turgoru a zavření průduchu (Macrobbie, 2006).

3 Známé geny ovlivňující WUE

V následující kapitole se budu věnovat vybraným třem genům, u kterých změna v expresi ovlivňuje WUE : ERECTA, ALX8 a HARDY. Tímto výběrem bych chtěl poukázat na pestrost mechanismů ovlivňující WUE.

Pro rostliny je životně důležité dokázat reagovat na změny v okolním prostředí, které mohou pocházet z biotického nebo abiotického zdroje. O změnách okolního prostředí jsou rostliny informovány pomocí různých receptorů a signálních proteinů. Nejčastěji zastoupeným signálním proteinem v eukaryotických buňkách jsou protein kinázy, které jsou například u člověka kódovány 2,5 % genů. Obecně u eukaryotických buněk se procentuální zastoupení genů kódujících protein kinázy pohybuje mezi 1 a 4%. Jednou ze skupin jsou protein kinázy sloužící jako buněčné povrchové receptory, označované jako Receptor like kinase (RLK), které mají často mimobuněčnou doménu. Podskupinou RLK skupiny je speciální rodina kináz, které obsahují doménu bohatou na leucin (LRR). A právě tato LRR-RLK kináza u *Arabidopsis thaliana* je proteinovým produktem kódovaným geny ERECTA, nejvýznamnějším známým regulátorem WUE u rostlin (Zantenet et al., 2009).

Další možností genového ovlivnění WUE je mutace genů pro askorbátperoxidázu 2 (APX2), která je součástí antioxidantních mechanismů, jejichž úkolem je chránit rostlinnou buňku před reaktivními formami kyslíku (ROS) a umožnit jí normální fungování metabolických procesů. Pokud je u rostlin překročena fotochemická kapacita v důsledku přebytku sluneční energie, dochází u nich k porušení rovnováhy mezi produkcí a schopností odstraňovat reaktivní formy kyslíku. V důsledku toho dochází u rostlin k oxidačnímu stresu. Zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku nemusí být způsobena pouze nadbytkem světelné energie, ale i vlivem sucha, zasolení, kumulací těžkých kovů nebo změnou teploty.

Mutací genů pro APX2 u *Arabidopsis thaliana* vzniká mutant alx8, který má zvýšenou odolnost proti suchu (Rossel et al., 2006).

Následujícím genem, který také ovlivňuje WUE je gen HARDY. Transkripty tohoto genu ovlivňují tvorbu biomasy i regulaci transpirace. Z toho vyplývá, že efekt na WUE není zanedbatelný. Hlavním faktorem měnícím vlastnosti rostlin mutovaných v genu HARDY jsou anatomicko-morfologické změny na úrovni listu a kořene rostliny (Karaba et al. 2007).

3.1 Gen ERECTA

Při mutaci genu ERECTA dochází u *Arabidopsis thaliana* k charakteristickému fenotypovému projevu. Typický je malý vzrůst s těsně u sebe položenými kvítky a zkrácenými, úzkými internodii. Mutanti v ERECTA genu mají také kratší hypokotyl a menším kulaté listy s krátkými řapíky.

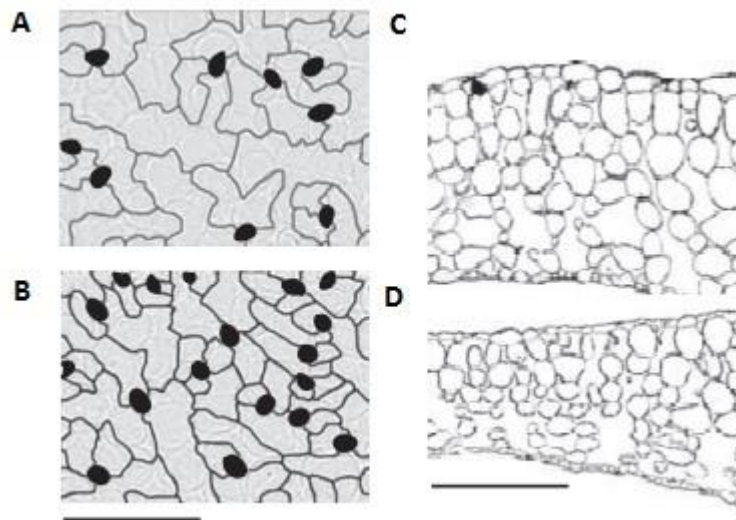
ERECTA patří mezi geny, které regulují efektivitu transpirace (efektivita transpirace je množství transpirované vody nutné na vytvoření určitého množství nadzemní biomasy), která velice úzce souvisí s efektivitou využití vody. ERECTA je u *Arabidopsis thaliana* umístěn na druhém chromosomu a účastní se regulace hustoty průduchů, dělení mezofylových buněk, expanze epidermálních buněk a zvětšuje plochu povrchu, která je v kontaktu s ostatními buňkami. Důkazem, který dokládá spojitost mezi ERECTA a efektivitou transpirace je pokus, který byl proveden na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Měření bylo provedené na mutantní linii Coler105. Tento mutant je charakteristický tím, že neobsahuje žádné transkripty genu ERECTA. V důsledku toho je efektivita transpirace u této linie přibližně o 20% nižší než u rostlin obsahujících tyto transkripty. Výsledky těchto měření jasně dokazují, že ERECTA je přímo zapojen do regulace efektivitu transpirace (Masle et al. 2005).

3.1.1 Vliv genu ERECTA na rostlinu

Je mnoho mechanismů, kterými ERECTA ovlivňuje vlastnosti listů a tím transpiraci. Jedním z nich je vodivost průduchů. Mutantní linie např. výše zmíněná Coler105, mají výrazně vyšší vodivost průduchů než jedinci mutací neovlivnění. Tato zvýšená vodivost je pravděpodobně způsobena jejich zvýšenou hustotou na povrchu listu. Dále ERECTA ovlivňuje fotosyntetickou kapacitu rostliny, která souvisí s fixací oxidu uhličitého. Asimilace oxidu uhličitého je omezena karboxylační schopností enzymu RUBISCO (Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxyláza-oxygenáza) a také jeho schopností regenerace. Měření ukázala, že právě karboxylační obrat (z angl. Turnover) RUBISCO je u mutantních jedinců snížen a tím se

snižuje efektivita transpirace (viz definice výše). Ke snížení karboxylačního obratu dochází vlivem snížení parciálního tlaku oxidu uhličitého v mezibuněčných prostorech (Masle et al., 2005). Fotosyntéza není u mutantů ovlivněna pouze v Calvinově cyklu, ale také v oblasti elektron transportního řetězce, jehož efektivita je také snížena. Výše uvedené mechanismy ukazují důležitost genu ERECTA pro regulaci fotosyntetického i průduchového aparátu rostlin.

ERECTA se také podílí na vývoji vegetativních orgánů, především listů. Zajímavé je, že se mutace nevztahuje funkčně pouze na fyziologii, ale mění i morfologii a anatomii listů. Mutovaní jedinci mají výrazně zvýšenou hustotu průduchů, což může souviset s jejich větší vodivostí. Hustota průduchů je regulována především změnami na úrovni epidermálních buněk. V důsledku toho také nacházíme u těchto jedinců nezanedbatelně zmenšené buňky epidermální. Další anatomickou změnou listu je výrazně nižší úroveň vývoje mezofylových buněk a s tím souvisejících mezibuněčných prostor v listu. Omezení mezibuněčných prostor listu vede ke snížení parciálního tlaku oxidu uhličitého v mezibuněčných prostorech, což snižuje fotosyntetickou kapacitu.



Obr.4: Převzat a upraven z (Masle et al., 2005)

Porovnání anatomie listu mutantních a nemutantních rostlin *A. thaliana* v genu ERECTA.

A,B – porovnání vlivu ERECTA na velikost epidermálních buněk a hustotu průduchů. Na obrázku B je mutantní rostlina. C,D – příčný řez listem a ukázka redukovaného mezofylu u mutantního jedince na obr.D. A,B - měřítko 155μm, C,D - měřítko 150μm.

3.1.2 Možnosti genu ERECTA

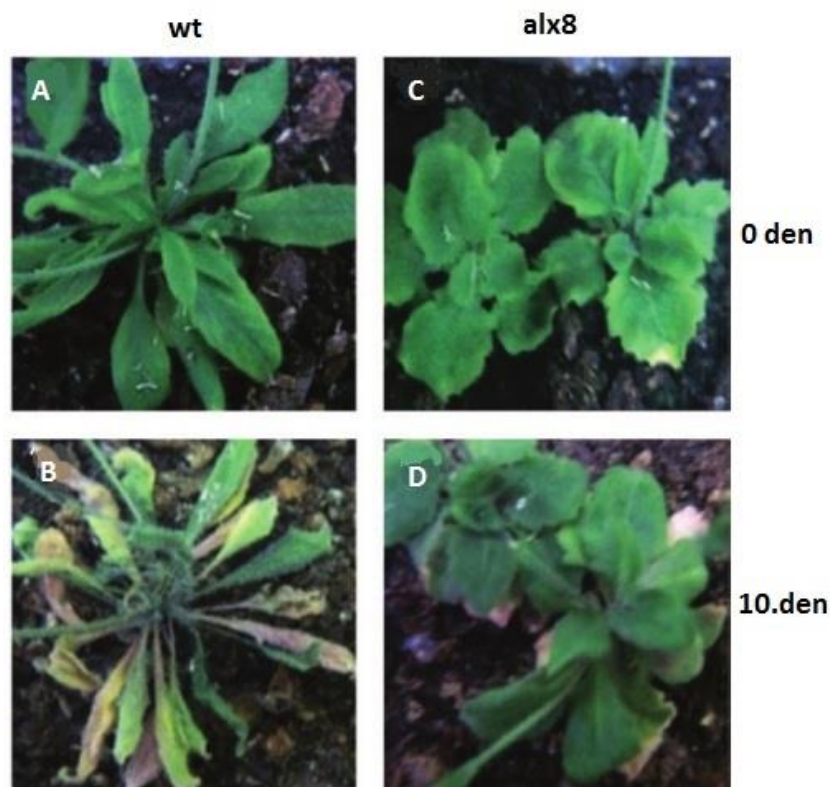
Pozitivní vliv genu ERECTA na efektivitu transpirace při optimálních klimatických podmínkách je očividný. Z ekologického a možná i hospodářského pohledu, je ovšem zajímavé jak ovlivňuje ERECTA transpiraci při neoptimálních podmínkách, především při suchu. I při tomto pokusu došlo k naměření nízkých hodnot efektivity transpirace u mutantních jedinců a podobného výsledku bylo dosaženo i při měření WUE. Při měření WUE byl rozdíl mezi jedinci mutovanými v genu ERECTA a jedinci nemutovanými více než 1 gram sušiny na 1 gram použité vody, což není zanedbatelný rozdíl (Masle et al., 2005)

Gen ERECTA je gen, který ukazuje souvislost mezi transpirací, fotosyntézou a efektivitou transpirace. Možnost manipulovat s tímto genem by mohla v budoucnu významně pomoci při šlechtění plodin. Na jedné straně můžeme zvyšovat efektivitu transpirace, což by mohlo najít uplatnění především v suchých oblastech. Na straně druhé máme možnost průduchové manipulace, která by mohla umožnit zvýšit výnosy v oblastech s dobrou dostupností vody (Shpak et al., 2004). Výzkum vztahující se k manipulacím v genu ERECTA u hospodářsky využitelných rostlin je teprve na začátku. V posledních letech probíhá výzkum, který pracuje s proteiny teplotního šoku (z angl. heat shock proteins, HSPs) u rajčat a rýže. Aktivita těchto proteinů je ovlivněna právě genem ERECTA. Rajčata se zvýšenou aktivitou HSPs jsou až o 50% odolnější k teplotnímu šoku oproti WT a dokážou tedy lépe přečkat teplotně nepříznivá období. Toto je pouze ukázka toho, že se dnes s genem ERECTA pracuje i v souvislosti hospodářsky významnými rostlinami (Shen et al. 2015).

3.2 Gen ALX8

Fenotypový projev u mutantů *alx8* není tak výrazný jako u mutantních rostlin v genu ERECTA. Mutanti *alx8* mají oproti divokému typu (WT) jiný tvar listu a také u nich dochází k pomalejšímu růstu. Mají také zvýšenou aktivitu askorbátperoxidázy 2 (APX2), která se podílí na degradaci ROS.

Mutanti *alx8* byli testováni na rezistenci k různým abiotickým stresům jako zasolení, herbicidy (methyl viologen) a sucho. Reakce *alx8* na zasolení nebo herbicid nebyly nijak významně odlišné od WT. Za povšimnutí ovšem stojí reakce na sucho. Pokud vystavíme WT a *alx8* stejným podmínkám nedostatku vody zjistíme, že tolerance *alx8* na sucho je významně vyšší (viz. Obr. 5).



Obr. 5: Převzato a upraveno z (Rossel et al., 2006)

Na obrázku je vidět porovnání vlivu sucha na WT a alx8. Rostlinám byla odepřena voda po dobu deseti dní. Okolní teplota byla 21 °C a poměr dne a noci 18h/8h. Na obrázku A vidíme WT na začátku experimentu a na obrázku B vidíme tu samou rostlinu po deseti dnech. Na obrázku C a D vidíme to samé, ale u alx8.

3.2.1 Alx8 a efektivita využití vody

Byla provedena měření, jejichž cílem bylo zjistit důvod zvýšené tolerance alx8 na sucho. Při ozáření alx8 a WT stejným množstvím světla mají obě linie stejný bod fotosyntetické saturace (bod maximálního využití ozáření). Také efektivita transportu elektronů v elektron transportním řetězci a fotosyntetická kapacita je totožná. Největším rozdílem mezi WT a alx8 je, že WT má o 39% vyšší účinnost fixace oxidu uhličitého než alx8. U alx8 byl zjištěn o 12% nižší tlak oxidu uhličitého v mezibuněčných prostorech listu a především měl o 56% nižší vodivost průduchů. Kombinace nízké účinnosti fixace oxidu uhličitého společně s výrazně sníženou vodivostí průduchů přesto vede u alx8 ke zvýšení WUE (Rossel et al., 2006). Ve mnou studované literatuře jsem nenarazil na článek zabývající se genem Alx8 v souvislosti s hospodářsky využitelnými plodinami.

3.3 Gen HARDY (HRD)

V případě linie *Arabidopsis thaliana* u které dochází k nadprodukcí HRD, můžeme sledovat charakteristický fenotyp, který se projevuje užšími listy s výraznou mezofylovou vrstvou se zvýšeným obsahem chloroplastů. Zvýšený obsah chloroplastů v parenchymatických buňkách mezofylové vrstvy způsobuje tmavší zelené zbarvení listů. Další anatomickou změnou u mutantu HRD je hojné zastoupení sekundárních a terciárních kořenů v kořenovém systému. Tento gen souvisí s regulací WUE, a podílí se také na odolnosti rostlin proti suchu a zasolení. Vlivem anatomických změn na listech dochází u jedinců s nadprodukcí HRD k rychlejšímu nárůstu biomasy. Je to způsobeno především zvýšenou rychlostí fixace oxidu uhličitého a efektivnější činnosti fotosystému II. Na zvýšení WUE má také zásluhu snížená vodivost průduchů, díky které dochází k poklesu transpirace. Důvod snížení vodivosti průduchů nebyl u tohoto pokusu uveden. Zajímavostí u genu HRD je, že jeho mutace již byla vyzkoušena na rostlinách rýže a její efekt se téměř shoduje s účinkem na *Arabidopsis thaliana*. U transformantů rýže došlo k výraznému růstu listů, které mají také tmavší zelenou barvu (způsobenou zvýšeným obsahem chloroplastů) jako u *Arabidopsis*. Zastoupení mezofylových buněk v listu se oproti kontrole nemění. Nicméně dochází k zvětšení počtu buněk ve vrstvě sousedící s xylémem. Tyto buňky vytváří ochrannou fotosyntetizující vrstvu v těsné blízkosti xylému a tím umožňují efektivnější asimilaci. U pokusných rostlin rýže došlo stejně jako u *Arabidopsis* k poklesu transpirace. Vlivem těchto faktorů se okamžitá WUE zvýšila o 65% (Karaba et al. 2007).

4 Biotechnologie zaměřené na zvyšování WUE

Na celé planetě dochází vlivem sucha k obrovským hospodářským ztrátám a tato situace se v nejbližší době vzhledem ke klimatickému trendu poslední doby samovolně nezlepší. Důležitosti celého problému nahrává i fakt, že lidská populace stále roste a v blízké době bude třeba nasýtit několika násobně více lidí, než v současnosti (Oshunsanya, 2016). Nedostupnost vody je velkým problémem, kterým se bude muset společnost zabývat. Norman Borlaug, držitel Nobelovy ceny míru řekl: „Jak můžeme pokračovat ve zvětšování produkce jídla pro stále rostoucí populaci, když jsme limitováni dostupností vody? Řešením je, že lidstvo potřebuje Modrou revoluci, která by měla být doplňkem k Zelené revoluci. Věda a

technologie budou vyzvány, aby nám ukázaly cestu“ (Zhang et al. 2009). Je mnoho cest, kterými je možno zlepšit produktivitu a při tom ušetřit vodu. V současné době se mnoho výzkumných skupin vydává cestou zvyšování WUE, jako jednou z cest, kterou by se mohl tento vývoj ubírat (Zheng-bin Zhang et al., 2007). V dnešní době je snaha používat metody, které jsou součástí tzv. „bio-watersaving“. „Bio-watersaving“ je komplexní zemědělská strategie, která se snaží zohledňovat eko-environmentální pohled na problematiku WUE a k šetření vody využívá genetický a fyziologický potenciál samotné rostliny. Zahrnuje mnoho vědních disciplín od meteorologie, přes ekologii, až po odvětví zabývající se půdní biologií. Jeho cílem je snížit znehodnocování vody a půdy, omezit vysychání a biologické vyčerpávání půdy a také se snaží o zvýšení WUE (Zhengbin Zhang et al., 2009).

4.1 Biotechnologie a WUE

U rostlin můžeme rozdělit tři stupně WUE, které pro nás mohou být určující i při šlechtění nebo jiném „vylepšování“ rostlin. Na první úrovni se WUE vztahuje k toleranci a rezistenci rostliny na suchu. Rostlina využívá vodu velice efektivně, ale při větším suchu se u ní snižuje produkce biomasy a výnos. Tato rostlina dokáže přežít v extrémních podmínkách, ale není příliš vhodná pro hospodářské účely v běžných podmínkách. Druhou úrovní je vztah WUE vztahující se k šetření vody s poměrně vysokou efektivitou jejího využití. Rostliny s touto úrovní WUE jsou středně odolné k suchu a i jejich výnos je střední nebo lehce vyšší v porovnání s předchozí úrovní. Na třetí úrovni dochází k maximálnímu využití vody a také k vysokým výnosům. Na této úrovni je však pro vysoký výnos nutné rostliny dotovat poměrně velkým množstvím vody (Wang et al., 2010). Z výše uvedeného vyplývá, že při šlechtění rostlin odolných proti suchu je nutno dosáhnout kompromisu mezi výnosem a WUE. Protože vysoké WUE neznámá vždy také vysoký výnos a naopak.

WUE je regulována mnoha geny, které je potřeba znát, rozumět jim a chápat je v kontextu celé rostliny pokud chceme zvyšovat WUE u kulturních plodin cestou genové manipulace. Další možností jak ovlivňovat WUE je měnit chromosomovou ploidii rostlin. V dnešní době jsou pěstovány kultivary pšenice, které jsou hexaploidní a jejich WUE je vyšší než WUE diploidních kultivarů. Efektivita využití vody v podmínkách optimální závlahy u sledovaných kultivarů pšenice stoupala s jejich ploidií, od diploidních přes tetraploidní až po hexaploidní. Pokus provedený na odrůdách pšenice (*Triticum*) sledoval vztah úrovně WUE mezi hexaploidními, tetraploidními a diploidními jedinci při zavlažování a suchých podmínkách. V zavlažovaných podmínkách byl trend jednoznačně vzrůstající od diploidních přes tetraploidní až po hexaploidní jedince. K zajímavému výsledku se došlo při měření WUE

v suchých podmínkách. V suchých podmínkách byla největší WUE naměřena u tetraploidních jedinců, kde byl výsledek téměř shodný s jedinci hexaploidními a nejhůře z tohoto měření vyšli jedinci diploidní. Při zvyšování ploidie u pšenice docházelo ke zvětšování velikosti průduchů, ale jejich hustota výrazně klesala. Výsledným efektem je snížení vodivosti průduchů, fotosyntetického a transpiračního obratu. Také docházelo ke snížení parciálního tlaku oxidu uhličitého v mezibuněčných prostorech listu. Vlivem efektivní průduchové regulace nebyl pokles fotosyntetického obratu tak výrazný jako pokles obratu transpiračního (Zhengbin & Lun, 1998).

Mezi dnes již známé a poměrně dobře prozkoumané geny patří *ERECTA*, *ALX8* i *HARDY*. Gen *ERECTA* se u *Arabidopsis thaliana* nachází na druhém chromozomu a kóduje LRR-RLK (více v kapitole 3.). Specialistou na suché podmínky je mutant *alx8*, který má výrazně zvýšenou WUE (více o *alx8* v kapitole 3.). Naděje vkládané do výzkumu genu *HARDY* na rýži jsou také velké. Vliv těchto genů na WUE je dnes známý a při vývoji kulturních rostlin se zvýšenou WUE se s nimi již pracuje (*ERECTA*, *HARDY*) (Rossel et al., 2006).

4.2 Možnosti modifikací

V blízké budoucnosti budou jistě objeveny a lépe prozkoumány další skupiny genů, které se podílejí na regulaci WUE. Již dnes je známo několik kandidátů, kteří ovlivňují toleranci rostlin k suchu a na jejichž poznání se usilovně pracuje. Jedním z nich je *HVA1*, jehož exprese se zvyšuje při přestavbě aktinových filament, v důsledku působení stresových podmínek. Tento jev byl pozorován u na sucho adaptovaných kultivarů ječmene (*Hordeum*), které měly sníženou expresi genů zodpovědných za tvorbu aktinových filament a naopak se u nich zvýšila exprese genu *HVA1*. Produkt tohoto genu slouží rostlině především pro signalizaci sucha v listech a je pravděpodobně součástí signální dráhy nezávislé na kyselině abscisové. Gen *HVA1* se sice nepodílí přímo na regulaci WUE, ale jeho signalizační funkce je pro reakci rostliny v suchých podmínkách významná (Sniegowska et al., 2016).

Dalším kandidátem je transkripční faktor *ASR1*, jehož nadprodukce vede ke zvýšení aktivity fosfoenolpyruvatkarboxylázy, která prefixuje při fotosyntéze u C4 rostlin oxid uhličitý. Měření provedené na liniích kukuřice (*Zea mays*) nadprodukcujících *ASR1* ukazuje nárůst sušiny o 20%. U těchto cisgenních jedinců kukuřice (*Zea mays*) dochází také ke snížení hustoty průduchů, což vede ke snížení jejich vodivosti. Větší nárůst biomasy a snížení transpirace má za efekt zvýšení WUE (Jeanneau et al. 2002).

Třetím genem, který je studován ve spojení s regulací WUE je *MRP5-1*. Tento gen

kóduje iontové kanály na plasmatické membráně svěřacích buněk, kterými je možno regulovat otvírání a zavírání průduchů. U *mrp5-1* mutantů je také zvýšená citlivost ke kyselině abscisové, která se podílí na zavírání průduchů. To u rostlin s pozměněnou funkcí *mrp5-1* zvyšuje WUE (Grob et al., 2009).

Dalším z mnoha zkoumaných kandidátů je transkripční faktor DREB1A, který se také podílí na zvýšení WUE. Tento transkripční faktor byl přenesen pomocí *Agrobacterium tumefaciens* z *Arabidopsis thaliana* do podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*). Při optimální závlaze měla transgenní rostlina sníženou vodivost průduchů. Pokud byly transgenní rostliny vystaveny suchým podmínkám došlo u nich až k 40% nárůstu efektivity transpirace oproti jedincům netransformovaným. Tento nárůst efektivity transpirace samozřejmě také pozitivně ovlivňuje WUE (Vadez & Kiran, 2007).



Obr. 6: Převzato a upraveno z (Vadez & Kiran, 2007)

Na obrázku můžeme porovnat reakci WT jedince a transgenního DREB1A jedince na dvanácti denní periodu sucha.

Výše uvedení kandidáti jsou pouze malou ukázkou možností, které jsou v současné době k dispozici. Dnes je známo více než 200 modifikací, kterými by bylo možné zlepšovat rostlinnou WUE nebo pozitivně ovlivňovat reakci rostlin na různé abiotické stresy. V příštích letech bude prozkoumáno více a více genů přímo ovlivňujících WUE a s tím související

toleranci k suchým podmínkám. S velkou pravděpodobností bude snaha tyto geny přenést do ekonomicky významných plodin a tím zvýšit jejich výnos. Geneticky upravené rostliny najdou své využití v mnoha prostředích, od míst dobře zásobených vodou až po ta suchá (Zhengbin Zhang et al., 2009).

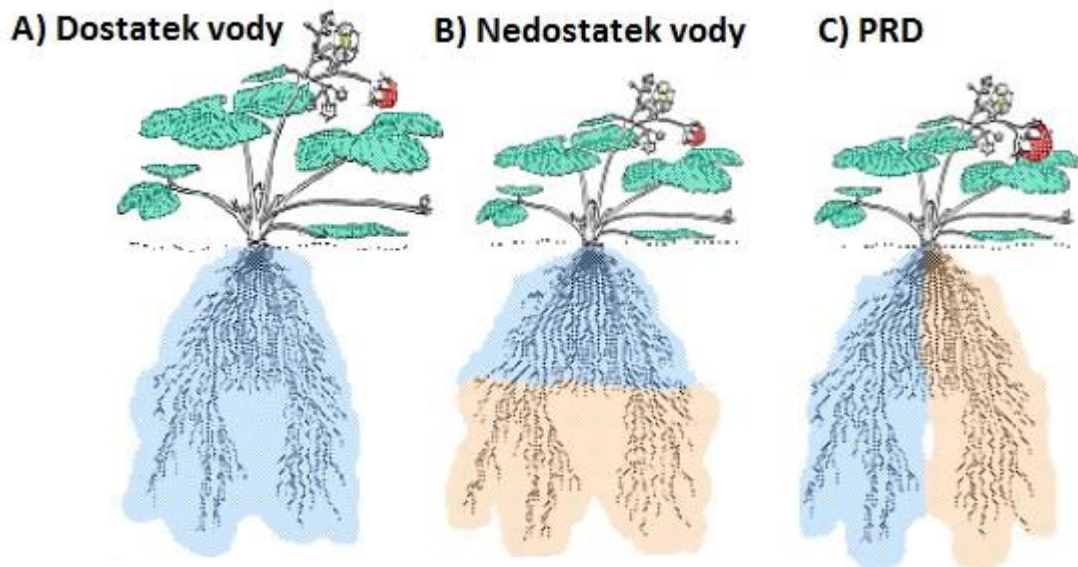
4.3 Šlechtění zaměřené na WUE

Odrůdy z dobře zavlažovaných oblastí s vysokým výnosem a vysokým WUE jsou často kříženy s odrůdami přizpůsobenými na sucho, které mají ovšem nízký výnos. Cílem tohoto křížení je dosáhnout jedné odrůdy, která ponese geny pro vysoký výnos, vysoké WUE a bude také odolná proti suchu. Většina šlechtitelských programů je zacílena spíše na vysoký výnos, což nemusí být úplně slučitelné se snahou vyšlechtit rostlinu, která je také odolná k suchu. Rostliny vyšlechtěné pro vysoký výnos se vyplácejí především v oblastech se střední až dobrou dostupností vody (Passioura, 2007). Je zajímavé, že pokud porovnáme odolnost proti suchu u dnešních moderních odrůd pšenice a u původních nebo středověkých odrůd zjistíme, že odolnost původních je vyšší. Nicméně WUE a výnos je u těchto rostlin oproti moderním odrůdám výrazně nižší. Rostlina s vysokým WUE nemusí mít automaticky vysokou odolnost proti suchu. Dnešní plodiny jsou vyšlechtěny především pro vysoký výnos při optimálních podmínkách, což může být při měření WUE zavádějící. Tyto rostliny totiž stále potřebují poměrně velké množství vody, aby těchto vysokých výnosů dosáhly. Jejich výnosy jsou ovšem tak vysoké, že při porovnání jejich WUE s plodinami k suchu odolným odrůd vyjde jejich WUE vyšší. Snaha o dosažení vysokého výnosu a odolnosti proti suchu by i přesto mohla jít cestou šlechtění zaměřeného na zvýšení WUE. Protože právě WUE je prvek, který sjednocuje požadavky na vysoký výnos a nízkou spotřebu vody i odolnost proti suchu. Ideální by bylo vytvořit genotyp, který by byl odolný proti suchu v obdobích nedostatku vody a během dešťových období by dokázal vodu využít co nejefektivněji. Výhodou by také bylo, kdyby dokázal během vegetačního období rychle nashromáždit co nejvíce biomasy (Tambussi et al. 2007).

5 Nepřímé ovlivnění WUE

Efektivita využití vody je ovlivněna mnoha faktory, které jsou v mnoha případech ovlivnitelné a regulovatelné přímo rostlinou. V následujících ukázkách nepřímého ovlivnění WUE se bude pracovat s integrovanou WUE. Existují ještě další způsoby jak zvýšit WUE, kromě již zmiňovaných genetických manipulací. Největší ztráty vody při zavlažování jsou způsobené odparem z půdy, tj. evaporací. Tato voda se odpaří ještě dříve, než může být využita rostlinou a to je problém, který výrazně snižuje efektivitu jejího využití. Řešením tohoto problému je dostat vodu co nejefektivněji a s co nejmenšími ztrátami až ke kořenům rostliny. Často využívanou metodou splňující tyto požadavky je tzv. kapkové zavlažování. Při kapkovém zavlažování dochází k zavlažování každé rostliny individuálně, přičemž jsou zavlažovány pouze kořeny nebo těsné okolí rostliny. Díky tomu nedochází k zbytečnému odpařování vody a dochází k úspoře až dvou třetin vody oproti klasické závlivce (Alarcón et al. 2016). V současné době se kapkové závlahy využívají především v sušších oblastech, například ve Španělsku došlo v posledních letech k výraznému nárůstu kapkových závlah. V letech 2004-2014 bylo 90% nově zavlažovaných ploch zavlažováno právě touto metodou. Kapkové závlahy by určitě našly uplatnění i v oblastech s dobrou dostupností vody, ale jejich nevýhodou je poměrně vysoká pořizovací cena (Alarcón et al., 2016).

Další zajímavou metodou jak ušetřit vodu a zvýšit WUE je částečné vysychání kořenů (z angl. partial root dessication, PRD). V posledních letech se dostává tato metoda do popředí zájmu vědců v suchých oblastech, kteří hodnotí PRD jako velice efektivní způsob šetření vody v zemědělském i zahradnickém odvětví. PRD je metoda, při které je kořenový systém rostliny zaléván pouze částečně. Polovina kořenového systému roste v suché půdě a druhá polovina roste v zavlažené půdě a tyto poloviny jsou samozřejmě střídány. Celý postup zavlažování záleží na druhu rostliny, typu půdy, vegetačním období a obecně na potřebách rostliny. V suché části kořenového systému dochází ke zvýšené produkci kyseliny abscisové, která je xylémem transportována do nadzemní části rostliny, kde se podílí na regulaci fyziologických procesů (především pohybu svěracích buněk). Právě toto je jedním z efektů PRD, ze suché části kořenového systému dostává rostlina signál, aby šetřila vodou (snížila vodivost průduchů) a zároveň přijímá z druhé strany dostatečné množství vody (Hamid et al. 2010).



Obr. 7: Převzato a upraveno z (Davies & Hartung 2004)

Na obrázku je schematické zobrazení dostupnosti vody pro kořenový systém při různém stupni zavlažení. Modře je oblast dostatečně zavlažená, červeně oblast suchá.

PRD je metoda, při které je možno ušetřit až 50% vody (při srovnání s běžnou zálivkou) a především u ní není zaznamenán pokles výnosu. Nicméně množství ušetřené vody, kvalita a množství výnosu záleží na druhu plodiny, typu půdy a dalších vlastnostech. Ideální je kombinovat PRD s běžnou častější zálivkou v obdobích růstu, kdy je rostlina citlivější (Sepaskhah & Ahmadi, 2010).

6 Závěr

Dostupnost vody a způsob jak s ním rostlina hospodaří, je velice podstatná otázka ne jen pro vědce, ale především pro zemědělce na celém světě. Její důležitost stoupá v oblastech, kde není vody dostatek a je nutné s ní šetřit. Právě zacílení na efektivitu využití vody (WUE) současně s vysokým výnosem a odolností k suchu je odpovědí na tuto otázku. Efektivita využití vody u rostlin je téma, kterým se věda zabývá již mnoho let, ale až v posledních letech nám dochází, jak užitečné by pro nás bylo porozumět vztahu mezi WUE, výnosem a rezistencí rostliny k suchu. Ve své práci jsem se pokusil shrnout současné poznatky o této problematice. Velká část práce je věnovaná regulaci transpirace, která podstatně ovlivňuje efektivitu využití vody a má velký význam pro porozumění celého problému. Výzkum v tomto odvětví postupuje kupředu a díky tomu dnes víme, jak je efektivita využití vody regulována a kterými mechanismy je ovlivněna. Dokonce jsou již známy i některé konkrétní

geny, které přímo ovlivňují efektivitu využití vody. Pokud pochopíme genovou podstatu regulace efektivitu využití vody, otevře se v oblasti biotechnologii brána, která nám umožní nejen zvýšit výnos v oblastech s dobrou dostupností vody, ale také pěstovat plodiny na místech, kde to dříve z důvodu sucha možné nebylo. Toto může být jedna z cest, kterou by se mohlo lidstvo vydat při snaze nasýtit stále rostoucí populaci. Tímto výzkumem se zabývá mnoho vědeckých skupin, především v Číně, a proto jsem zvědavý, čeho budeme v příštích letech svědky. Domnívám se ovšem, že vzhledem k postoji západní společnosti (především Starého světa) ke genové manipulaci bude stále hojně využívanou metodou klasické šlechtění. Důležitou strategií při zvyšování efektivitu využití vody jsou také různé metody zavlažování, které se významně podílejí na úspoře vody a které jsou dnes nedílnou součástí zemědělské výroby v mnoha oblastech světa. Jedním z možných přístupů by také mohl být zmiňovaný bio-watersaving, který kombinuje celé spektrum přístupů a klade velký důraz na udržitelnost.

7 Použitá literatura:

- Abbate, P.E. et al., 2004. Climate and Water Availability Effects on Water-Use Efficiency in Wheat. *Crop Science*, 44(2), pp.474–483.
- Alarcón, J., Garrido, A. & Juana, L., 2016. Modernization of irrigation systems in Spain : review and analysis for decision making. *International Journal of Water Resources Development ISSN:*, 0627(5).
- Atkin, O.K. & Macherel, D., 2009. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany*, 103(4), pp.581–597.
- Brewer, C.A. & Smith, W.K., 1991. Functional interaction between leaf trichomes , leaf wettability and the optical properties of water droplets. *Plant, Cell and Environment*, 14 (6), pp.955–962.
- Davies, W.J. & Hartung, W., 2004. Has extrapolation from biochemistry to crop functioning worked to sustain plant production under water scarcity ? *www.cropscience.org.au*, pp.1–14.
- Doheny-Adams, T. et al., 2012. Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size , plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *The Royal Society*, 367, pp.547–555.
- Drake, P.L., Froend, R.H. & Franks, P.J., 2013. Smaller , faster stomata : scaling of stomatal size , rate of response , and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), pp.495–505.
- Franks, P.J. et al., 2015. Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytologist*, 207 (1), pp.188-195.

- Fujii, H. & Zhu, J.-K., 2009. Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(20), pp.8380–8385.
- Fujita, Y., Fujita, M. & Shinozaki, K., 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res* (2011), pp.509–525.
- Grob, H. et al., 2009. The Arabidopsis ATP-binding Cassette Protein AtMRP5 / AtABCC5 Is a High Affinity Inositol Hexa kis phosphate Transporter Involved in Guard Cell Signaling and Phytate Storage. *The journal of biological chemistry*, 284(48), pp.33614–33622.
- Hamid, S. et al., 2010. Effects of irrigation strategies and soils on field-grown potatoes : Gas exchange and xylem [ABA]. *Agricultural Water Management*, 97(10), pp.1486–1494.
- Hara, K. et al., 2009. Epidermal Cell Density is Autoregulated via a Secretory Peptide , EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis Leaves. *Plant Cell Physiol.*, 50(6), pp.1019–1031.
- Heredia, A. & Domı, E., 2015. Plant cutin genesis : unanswered questions. *Cell Press*, 20(9), pp.551–558.
- Hu, H. et al., 2010. Carbonic Anhydrases are Upstream Regulators in Guard Cells of. *Cell*, 12(1), pp.1–18.
- Huntington, T.G., 2006. Evidence for intensification of the global water cycle : Review and synthesis. *Journal of Hydrology*, 319, pp.83–95.
- Isaacson, T. et al., 2009. Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties , but not transpirational water loss. *The Plant Journal*, 60, pp.363–377.
- Jeanneau, M. et al., 2002. Improvement of drought tolerance in maize : towards the functional validation of the Zm-Asr1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4 – PEPC. *Biochimie*, 84, pp.1127–1135.
- Jordan, G.J. et al., 2008. The evolutionary relations of sunken, covered and encrypte stomata to dry habitats in proteaceae 1. *American Journal of Botany*, 95(5), pp.521–530.
- Karaba, A. et al., 2007. Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 140 (11), pp.15270-15275.
- Kassas, M., 1995. Desertification : a general review. *Academic Press Limited*, 30, pp.115–128.
- Kerstiens, G., 1996. Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany*, 47(305), pp.1813–1832.
- Kim, T.-H. et al., 2010. Guard cells signal transduction network: advances in understanding abscisic acid CO₂, and Ca²⁺ signalling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, pp.561–591.
- Kimberly, D., Mark, A. & Lawrence, B., 2006. Increased Accumulation of Cuticular Wax and

- Expression of Lipid . *Plant Physiology*, 140 (1), pp. 176-183.
- Li, J. et al., 1993. Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to. *The Plant cell*, 5(2), pp.171–179.
- Lopes, M. & Mullan, D., 1990. Chapter 6 . Carbon isotope discrimination. *Physiological Breeding II*, pp.28–30.
- Macrobbie, E.A.C., 2006. Control of Volume and Turgor in Stomatal Guard Cells. *Membrane Biology*, 142, pp.131–142.
- Marguerit, E. et al., 2012. Rootstock control of scion transpiration and its acclimation to water deficit are controlled by different genes. *New Phytologist*, 194(2), pp.416–429.
- Masle, J., Gilmore, S.R. & Farquhar, G.D., 2005. The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in Arabidopsis. *Nature*, 436(August), pp.866-870.
- Mateos, L. & Araus, J.L., 2016. Hydrological, engineering, agronomical, breeding and physiological pathways for the effective and efficient use of water in agriculture. *Agricultural Water Management*, 164, pp.190–196.
- Medlyn, B.E. et al., 2001. Stomatal conductance of forest species after long-term exposure to elevated CO₂ concentration : a synthesis. *New Phytologist*, 149 (11), pp. 247- 264.
- Miao, Q. et al., 2015. Modeling water use, transpiration and soil evaporation of spring wheat-maize and spring wheat-sunflower relay intercropping using the dual crop coefficient approach. *Agricultural Water Management*, 165, pp.211–229.
- Oshunsanya, S.O., 2016. Soil & Tillage Research Alternative method of reducing soil loss due to harvesting of sweet potato : A case study of low input agriculture in Nigeria. *Soil & Tillage Research*, 158, pp.49–56.
- Park, S. et al., 2010. Abscisic acid inhibits PP2Cs via the PYR/PYL family of ABA- binding START proteins. *Science*, 324(5930), pp.1068–1071.
- Parsons, E.P. et al., 2009. The Impact of Water Deficiency on Leaf Cuticle Lipids. *Plant Physiology*, 151(December), pp.1918–1929.
- Passioura, J., 2007. The drought environment : physical , biological and agricultural perspectives. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), pp.113–117.
- Polley, H.W., 2002. Implications of atmospheric and climatic change for crop yield and water use efficiency. *Crop Science*, 42(1), pp.131–140.
- M.Shane Heschel. et al., 2016. Population Differentiation for Abscisic Acid Responsiveness in *Impatiens capensis* Author: M . Shane Heschel and Neil J . Hausmann Source : *International Journal of Plant Sciences* , 162 (6), pp . 1253-1260.
- Ribas-carbo, M. et al., 2005. Effects of Water Stress on Respiration in Soybean Leaves 1. *Plant Physiology*, 139(September), pp.466–473.
- Rossel, J.A.N.B. et al., 2006. A mutation affecting ASCORBATE PEROXIDASE 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance. *Plant, Cell and Environment*, pp.269–281.

- Rot, N.I.T.A. et al., 2007. Computer-based Studies of Diffusion through Stomata of Different Architecture. *Annals of Botany*, (1998), pp.23–32.
- Sauter, A. et al., 2001. The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant : the fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany*, 52(363), pp.1991–1997.
- Sepaskhah, A.R. & Ahmadi, S.H., 2010. A Review on Partial Root-Zone Drying Irrigation. *International Journal of Plant Production*, 4(4).
- Sheard, L.B. & Zheng, N., 2009. NEWS & VIEWS Signal advance for abscisic acid. *nature*, 462(December), pp.3–5.
- Shen, H. et al., 2015. Overexpression of receptor-like kinase ERECTA improves thermotolerance in rice and tomato. *Nature Biotechnology*, 33(9), pp.1–11.
- Shepherd, T., Shepherd, T. & Griffiths, D.W., 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171 (5), pp.469–499.
- Shpak, E.D. et al., 2004. Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls Arabidopsis organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *The company of biologist*, 10 (12) pp.1491–1501.
- Sniegowska-, K., Dubas, E. & Rapacz, M., 2016. Actin microfilaments are involved in the regulation of HVA1 transcript accumulation in drought-treated barley leaves. *Journal of Plant Physiology*, 193, pp.22–25.
- Tambussi, E. a., Bort, J. & Araus, J.L., 2007. Water use efficiency in C3 cereals under Mediterranean conditions: A review of physiological aspects. *Annals of Applied Biology*, 150(3), pp.307–321.
- Temocico, G. & Alecu, I.N., 2015. Harvest index at maize in different growing conditions. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(6), pp.10951–10960.
- Vadez, V. & Kiran., 2007. Stress-inducible expression of At DREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L .) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. *Plant Cell Physiol.*, 26, pp.2071–2082.
- Wallace, J.S., 2000. Increasing agricultural water use efficiency to meet future food production. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 82, pp.105–119.
- Wang, Y. et al., 2013. Field Crops Research The effects of nitrogen supply and water regime on instantaneous WUE , time-integrated WUE and carbon isotope discrimination in winter wheat. *Field Crops Research*, 144, pp.236–244.
- Wang, Y.B. et al., 2010. The Optimization for Crop Planning and Some Advances for Water-Saving Crop Planning in the Semiarid Loess Plateau of China. *Agronomy & Crop Science*, 196, pp.55–65.
- Waters, E.R., 2003. Molecular adaptation and the origin of land plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, pp.456–463.
- Yeats, T.H. et al., 2012. The identification of cutin synthase : formation of the plant polyester cutin. *Nature America*, 8(may), pp.8–11.

- Yeats, T.H. & Rose, J.K.C., 2013. Topical Review on Cuticle Synthesis and Function The Formation and Function of Plant Cuticles 1. *Plant Physiology*, 163(September), pp.5–20.
- Yoo, C.Y. et al., 2010. The Arabidopsis GTL1 transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of SDD1. *The Plant cell*, 22(December), pp.4128–4141.
- Zanten, M. Van et al., 2009. The many functions of ERECTA. *Cell Press*, (March), pp.214–218.
- Zhang, Z. et al., 2009. Focus on agricultural biotechnology : Prospective for bio-watersaving theories and their applications in the semi-arid and arid areas. *African Journal of Biotechnology*, 8(12), pp.2779–2789.
- Zhang, Z., Shao, H. & Xu, P., 2007. On evolution and perspectives of bio-watersaving. *Biointerfaces* , 55, pp.1–9.
- Zhengbin, Z. & Lun, S., 1998. Comparison study on water use efficiency of wheat flag leaf. *Chinese Academy of science*, 43 (14), pp.1205-1211.