

GENETICKY MODIFIKOVANÉ ROSTLINY ODOLNÉ K SUCHU A ZASOLENÍ

Genetically Modified Plants Resistant to Drought or Salinity

ZDENĚK OPATRNÝ, JANA NEDĚLOVÁ, VĚRA ČÍŽKOVÁ, Univerzita Karlova,
Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin zdenek.
opatrny@natur.cuni.cz, Janina.Nedelova@seznam.cz, vera.cizkova@natur.cuni.cz

Abstract

During their evolution, plants have developed a number of mechanisms to resist biotic and abiotic stressors. Evolution is an endless process, which continues, of course, even today. In the case of crop plants, however, evolution's original contingency is replaced by targeted breeding. This is based on the same natural processes – mutagenesis, hybridization and selection. However, the classical techniques are now significantly complemented by genetic engineering methods. Based on knowledge of the molecular basis of plant stress resistance mechanisms, these processes are subsequently used to obtain new, practically-useful genotypes.

The present paper is therefore aimed at explaining the biological effects of drought or salinity from the molecular level to the complex reactions of the whole organism. Subsequently, the paper illustrates various opportunities for using transgenic techniques (gene modifications, GM) for the construction of crops resistant to these stressors, explains their gene background and illustrates, in selected examples, both the history of partial research strategies, their present status and also their prospects. In addition, the paper briefly informs about a new technique of gene editing (GE) based on the mechanisms of natural repair of the plants' own genes. This precise mutagenesis has also found practical, revolutionary, applications both in human gene therapy and in effective “nature-close” breeding and plant protection.

Klíčová slova

Rostliny, stres, voda, sucho, zasolení, šlechtění rostlin, rostlinné biotechnologie, genetické modifikace

Keywords

Plants, stress, water, drought, salinity, plant breeding, plant biotechnology, genetic modifications

ÚVOD

Růst a vývoj rostlin jsou průběžně ovlivňovány faktory okolního prostředí, kterými jsou především dopadající sluneční energie, teplota, dostupnost vody a minerálních látek či interakce s ostatními živými organizmy. Do určité hranice považujeme takové působení za „normální, fyziologické“. Významnější změna dávky či délky však může vyvolat stav, který označujeme jako **stres** a jeho induktory jako **stresory**.

Stresory obvykle dělíme na **abiotické** (fyzikální či chemické povahy) a **biotické** (biologické povahy). Mezi abiotické stresory řadíme nadměrnou či nedostatečnou ozářenost, extrémní teploty (vysoké i nízké), nedostatek vody, či naopak zaplavení vodou vedoucí k nedostupnosti kyslíku. Řadíme sem dále nedostatek základních minerálních prvků v půdě či nadbytek iontů v půdním roztoku způsobený zasolením půd, příliš vysoké či nízké pH půdy nebo přítomnost toxických látek. Mezi účinky biotických stresorů patří především působení patogenů nebo konkurenčních druhů rostlin a poškození rostliny způsobené živočišnými herbivory.

Prvořadým abiotickým stresorem současnosti se v důsledku klimatických změn i lidských zásahů stává nedostatečná dostupnost vody. Sucho či salinita v lepším případě redukuje růst rostlin a způsobují masivní ztráty na výnosech, v horším způsobují až úplný zánik vegetace. Zhruba jedna třetina zemského povrchu je považována za aridní nebo semiaridní, tedy takovou, v níž je úhrn srážek trvale nižší než vsak a výpar. Je tedy víceméně nevyužitelnou pro významnější pěstování kulturních rostlin. Odhady klimatologů předpovídají další zhoršení tohoto stavu již v blízké budoucnosti (Pokorná et al., 2018).

Zemědělství odborníci spatřují výraznější pomoc v zavedení kvalitativně nových pěstitelských, zvláště pak šlechtitelských strategií založených zejména na moderních poznacích molekulární biologie rostlin. Z nich mimo jiné vychází technologie transgenoz, jejímž produktem jsou organismy (v našem případě rostliny) geneticky modifikované (genetically modified – GM). Blíže o nich, způsobu jejich přípravy a také jejich praktickém využití zvláště v ochraně rostlinné produkce proti biotickým stresorům (patogenům, škůdcům či plevelům) pojednává např. práce Andrové et al. (2016) uveřejněná ve 2. čísle 25. ročníku (2016) tohoto časopisu.

V zemědělské praxi začaly být GM plodiny využívány již před dvaceti lety a celosvětové statistiky dokládají trvalý vzestup rozsahu jejich pěstebních ploch. Na tomto faktu nic nemění ani rozsáhlé politicky motivované restriktce zejména v rámci EU. Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo především při přípravě plodin odolných vůči různým hmyzím škůdcům (Insect Resistant – IR) a plodin tolerantních vůči totálním herbicidům (Herbicide Tolerant – HT), které už jsou v současnosti pěstovány na desítkách milionů hektarů. Nikoliv přehnaně se tak staly úvodní etapou „GMO revoluce“ (Halford, 2006, Grunewald and Bury, 2016).

Příprava GM plodin odolných vůči stresorům abiotickým, tedy v prvé řadě proti různým typům vodních deficitů, není zdaleka tak pokročilá. Hlavní příčinou je složitost a komplexita procesů podmiňujících biologické pozadí této odolnosti. Vzhledem k jejich nesmírnému, jak ekologickému tak ekonomickému významu lze však očekávat zásadní posílení tohoto zájmu.

ZÁKLADNÍ TERMINOLOGIE STRESOVÉ FYZIOLOGIE

Na působení **stresorů** reaguje rostlina, obdobně jako všechny živé organizmy, aktivací různých obranných či ochranných reakcí. **Stresová reakce** (odpověď) má obvykle několik **fází**. První fáze se nazývá **poplachová**. V ní organizmus registruje působení stresoru na základě odchylek v metabolické aktivitě a narušení funkcí a struktur buněk. Pokud intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň, následuje fáze **restituční**. Během ní může rostlina získat zvýšenou odolnost (rezistenci). Ve fázi **rezistence** pak toleruje působení stresoru a přežívá. Úspěšný průchod rostliny dílčími stresovými fázemi může vyústit v její dlouhodobou stresovou **aklimaci (otužování)**. Proces aktuálního získávání tolerance (ustavování nového rovnovážného stavu odpovídajícího změněným podmínkám) je reverzibilní. Příkladem tolerance je hromadění osmoticky aktivních látek či zavírání průduchů při nedostatku vody.

Aklimace je často spojena se zvýšenou spotřebou energie na úkor jiných životních funkcí. Při dlouhodobém a intenzivním stresu může tedy dojít k **fázi vyčerpání**, vedoucí k chronickému poškození rostlinných buněk a následnému úhynu rostliny. Trvalou součástí rostlinné evoluce je však také **adaptace** na různé stavy resp. situace vodního deficitu. Její hlavní molekulární podstatou jsou změny/mutace relevantních genů, výměna těchto genů v průběhu pohlavního rozmnožování rostlin a průběžná selekce úspěšných nových genotypů.

Vycházejíc z původních genových zdrojů sleduje tento cíl již více jak deset tisíc let zprvu empirické, poté klasické a nyní molekulární šlechtění.

HLAVNÍ PŘÍČINY A PŘÍZNAKY STRESU VYVOLANÉHO VODNÍM DEFICITEM

Nedostatečné zásobení rostliny vodou může mít různé příčiny. Voda je v první řadě nedostupná v důsledku skutečného deficitu vody v půdě – **sucha**. Další příčinou může být **zasolení půdy**. Vodní deficit vyvolává také vysoká transpirace, která není dostatečně kompenzována, např. během horkých dnů či vysoké větrnosti. Vysoké teploty zvyšují ztrátu vody i v důsledku evaporace (odpařování). Její nedostatek může být způsoben i mrazy, při nichž voda sublimuje. Všechny tyto situace vedou ke vzniku tzv. **osmotického stresu**.

Odtokem vody z buněk klesá turgor, rostliny vadnou. Postupně dochází k plazmolýze, jež způsobuje zmenšení protoplastu a oddělení plazmatické membrány od buněčné stěny. Zpomaluje se dlouhivý růst buněk, klesá frekvence dělení. Při chronickém deficitu vody buňky postupně ztrácejí svoji integritu i další membránové komplexy v cytoplazmě a organelách. Na poškození struktury proteinů se začínají významně podílet různé reaktivní formy kyslíku (ROS – Reactive Oxygen Species). Na původní, pouze osmotický stres tak navazuje **stres oxidační**. V této fázi jsou již značně zasaženy i klíčové metabolické procesy a funkce mnoha buněčných struktur. Oba tyto stresové stavy se vyskytují jak v situaci sucha, tak zasolení. V druhém případě ovšem přistupuje navíc i fenomén **iontové toxicity**.

Rostliny se během evoluce různým způsobem adaptovaly na určité lokální podmínky. Ty odolné k vysoké koncentraci iontů v půdním roztoku se nazývají **halofyty**, rostliny citlivé k zasolení se označují jako **glykofyty**. Příčiny salinity půd mo-

hou být jak přírodní, kdy dochází k nahromadění solí v důsledku jejich vysokého obsahu v matečném materiálu či podzemní vodě, tak antropogenní, které spočívají především v nevhodných zavlažovacích postupech, např. zavlažování vodou bohatou na soli či nedostatečné odvodňování.

Růst rostlin je solným stresem ovlivněn ve dvou fázích. Osmotický efekt nastupuje rychle, bezprostředně po zvýšení koncentrace solí kolem kořenů a inhibuje růst především mladých listů. Iontová toxicita se projevuje až po několika dnech, např. v podobě předčasného opadávání starších listů (předčasná senescence) (Munns and Tester, 2008).

Na salinitě prostředí se projevují jak kationty Na^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} , tak i anionty Cl^- , SO_4^{2-} a HCO_3^- . Za nejvýznamnější jsou však kvůli negativnímu dopadu na rostliny a nejrozšířenějšímu výskytu považovány ionty Na^+ a Cl^- . Pro většinu druhů rostlin jsou nejvíce toxické Na^+ ionty, ale některé, jako je sója, citrusy či vinná réva, jsou citlivější vůči Cl^- iontům. Vysoký obsah solí v cytosolu narušuje strukturu proteinů a metabolické procesy. Obsah některých iontů může být specificky toxický, např. vysoká koncentrace Na^+ může vytěsňovat Ca^{2+} z membrán a narušovat jejich funkci, sodné ionty mohou nahrazovat roli draselných iontů.

HLAVNÍ MECHANIZMY AKTIVNÍ OCHRANY ROSTLINNÝCH STRUKTUR A FUNKCÍ V PODMÍNKÁCH EXTRÉMNÍHO VODNÍHO DEFICITU

Jakým způsobem reaguje rostlina na nástup osmotického či oxidačního stresu, jak na průvodní fenomén iontové toxicity? Na jedné straně nastupuje

přímá rychlá **ochrana klíčových buněčných struktur** podílejících se buď přímo v procesech vodního transportu či vnitrobuněčného uchovávání, nebo ve **stabilizaci** zejména **proteinové složky membrán** resp. organel. V podstatě současně se však spouštějí **aktivace různých regulačních genů** (např. transkripčních faktorů) s často pleiotropním (jeden gen ovlivňuje více fenotypových projevů) účinkem.

Specifické odpovědi na buněčné úrovni

V reakci na postupné sucho či zasolení půdy produkují rostlinné buňky tzv. **kompatibilní soluty** neboli **kompatibilní osmolyty**. Jedná se o vysoce rozpustné nízkomolekulární organické látky, které se během osmotického stresu hromadí ve vysokých koncentracích především v cytoplasmě, aniž by poškodily hydratační obal okolo proteinů a membrán (na rozdíl od anorganických iontů). Kompatibilní soluty mají hlavní úlohu v osmotickém přizpůsobení, ale mohou se také podílet na stabilizaci bílkovin a buněčných struktur či na odstraňování reaktivních forem kyslíku. Při nižších koncentracích mají osmolyty pravděpodobně jinou roli, stabilizují terciární strukturu bílkovin a fungují tedy i jako osmoprotektivní molekuly neboli osmoprotektanty (Munns and Tester, 2008).

Mezi kompatibilní soluty řadíme některé aminokyseliny (prolin, kyselina γ -aminomáselná/gama-aminobutyric acid/GABA), kvartérní amonné soli (glycinbetain), některé cukry (trehalóza, rafinóza, fruktany) a cukerné alkoholy (manitol, sorbitol, pinitol). Jednotlivé druhy rostlin se většinou liší množstvím i typem produkovaných kompatibilních solutů.

LEA proteiny – Late Embryogenesis Abundant

Tyto proteiny byly nazvány podle svého výskytu a následné zevrubné analýzy ve zrajících embryích

řady rostlin. Dnes již ale víme, že se vyskytují také u bakterií, hub, či dokonce i bezobratlých živočichů (Muvunyi et al., 2018). V semenech mají chránit buněčné struktury dozrávajícího a posléze vysychajícího embrya. Obdobně zřejmě fungují i v buňkách různých meristémů. Známé je jich několik desítek, dělí se do několika skupin a obvykle se rozlišují LEA 1 až LEA 5. Proteiny ze skupiny LEA 2 jsou známy i pod názvem **dehydriny**. Fungují jako chaperony – zabezpečují správné skládání proteinů v průběhu jejich syntézy, jejich údržbu, či naopak odstranění proteinů poškozených. Stabilizují membránové struktury, účastní se odstraňování volných radikálů, vázání různých iontů i vázání molekul vody. Jejich specifická syntéza je vyvolávána jak v různých fázích rostlinné ontogeneze, tak v odpovědi na působení zejména abiotických stresorů, včetně sucha, zasolení, nízkých teplot či těžkých kovů.

Proteiny tepelného či chladového šoku

Jejich funkci opět ilustruje již sám název. Lze je také nalézt téměř ve všech živých organizmech, kde fungují zejména jako molekulární chaperony. Blíže sdělení o nich by přesáhlo rámec této práce.

Akvaporiny (Aquaporins, APQ)

Proteiny, které se nejčastěji vyskytují jako integrální stavební a transportní složka membránových vodních kanálů, zvyšují propustnost membrán nejen pro vodu, ale i pro nejrůznější malé molekuly včetně různých neutrálních solutů, plynů či kovových iontů. Lze je nalézt u všech živých organizmů. Obecně tvoří velkou genovou rodinu tzv. MIP (major intrinsic proteins) s více jak 800 členy. Právě u rostlin se však vyskytují v největším počtu a diverzitě. Jejich různé homology vykazují rozličnou vnitrobuněčnou lokalizaci a specifitu v pro-

poštění různých solutů. Mají opět různé funkce v rostlinném růstu a vývoji a hrají významnou roli v obranných reakcích jak vůči biotickým, tak abiotickým stresorům. Velmi četné jsou akvaporiny vázané v plasmatické membráně a tonoplastu, mající funkci zejména v transportech vody. Akvaporiny blízké svojí strukturou sojovému proteinu nodulinu zřejmě hrají významnou roli mimo jiné i v transportu těžkých kovů, metaloidů (např. křemíku) či reaktivních forem kyslíku (ROS).

Komplexní odpovědi na úrovni organismu

Rostlinný organizmus reaguje postupně na vodní deficit celým souborem změn svých struktur a funkcí. Ovlivněny jsou procesy fotosyntézy, dýchání a transpirace s následnými důsledky v růstu a morfogenezi rostliny. Na jejich počátku stojí např. aktivace (přepis, exprese) genů vysoce specificky reagujících právě na podmínky „sucha“ (drought responsive genes – DREBs). Vzhledem k jejich funkci je řadíme mezi tzv. transkripční faktory (TF). Tyto geny mohou být ale indukovatelné také chladem, světlem či různými rostlinnými **hormony/fytohormony**. Jmenujme **tři klíčové** – **kyselina abscisová (ABA)**, **cytokininy a gibereliny**. K nim se ovšem porůznu přidávají i další – **auxin, etylén**, ale také i **jasmonáty** – blíže viz např. moderní učebnice Taiz et al. (2016). Povězme si něco alespoň o těch třech klíčových.

Kyselina abscisová (ABA)

Identifikována byla v roce 1960 u bavlíku jako látka související s opadem (abscisí) jeho plodů. Současně byla zjištěna její úloha v regulaci dormance (přechodné zastavení nebo omezení fyziologických procesů) pupenů. Později se však ukázalo, že je to vlastně hormon senescenční (řídí vývojový proces programované degradace vedoucí ke smr-

ti) a že se jeho hladina zvyšuje i v případě zasažení rostlin různými stresory – vedle dehydratace také salinitou či teplotními extrémy. Často proto bývá přímo označována jako stresový hormon.

Změny ABA biosyntézy, případně její redistribuce (z kořenů do nadzemní části, zejména listů), patří k nejrychlejším rostlinným odpovědím na abiotický stres. Její koncentrace v listech rostliny, jejíž kořeny zaznamenaly nástup půdního sucha, se velmi rychle zvýší až padesátkrát a vzápětí vede k uzavření průduchů a tím i k zásadnímu snížení transpirace. ABA se ovšem výrazně uplatňuje i v řadě dalších, zejména vývojových procesů. S její fyziologickou úlohou resp. změnami její hladiny ovšem následně interagují i fytohormony některých dalších skupin. Za takové antagonisty jsou v prvé řadě pokládány cytokininy.

Cytokininy

V interakci zejména s hlavním „rostlinným architektem“ auxinem se průběžně podílejí na dynamickém utváření rostlinného habitu. Účastní se v procesech tzv. apikální dominance či jejich odchylek jak v nadzemní, tak kořenové části rostliny. Změnami auxin/cytokininové rovnováhy je určeno mj. větvení různých orgánů a tím i jejich celková hmotnost a funkčnost. Obecně mají cytokininy také účinek antisenescenční, tedy zpomalující či zastavující procesy stárnutí vyvolané nejen samotným „věkem“ buněk, pletiv či orgánů, ale také různými abiotickými stresory. Nejen stárnutí různých orgánů, ale také celých rostlinných organizmů lze omezit postřikem – vhodnou dávkou vhodných cytokininů – a dokonce tak zvyšovat obvyklý výnos. Významným producentem cytokininů jsou některá pletiva kořene. Na druhé straně paradoxně právě rozvoj kořenového systému je stoupající hladinou přirozených cytokininů potlačován. Tyto meziorganové korelace se pak mohou zásadním

způsobem odrazit ve funkčnosti kořenového systému rostlin postižených vodním deficitem, a tím i jejich celkové odolnosti.

Gibereliny

Jsou společně s ABA považovány za „primární determinanty“ dormance (preventivní zastavení růstu v nepříznivém období roku) a následného klíčení semen. Tyto interakce je pak nutno brát v potaz i v situacích, kdy do daného vývojového fenoménu nějakým způsobem zasáhne i stresor typu vodního deficitu.

TECHNIKY GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ VE ŠLECHTĚNÍ ROSTLIN NA ODOLNOST VŮČI SUCHU ČI SALINITĚ

Klasické šlechtění rostlin na odolnost k abiotickým vlivům vnějšího prostředí vždy bylo a je velmi komplikované a časově náročné. Obecně se jedná o kvantitativně založený znak s komplexním fenotypovým projevem, který se vyznačuje nízkou dědivostí a vysokou interakcí genotypu a prostředí. Účinnou alternativu představují **techniky genového inženýrství**, tedy konstrukce rostlin geneticky modifikovaných (GM). Nelze od nich očekávat kompletní přestavbu současných kulturních zemědělských plodin na typy ryze suchomilné. Ale konvenční zemědělská produkce, zejména v kontextu výrazných a hůře odhadnutelných globálních klimatických změn, je „vděčná“ i za jakkoliv zvýšenou toleranci plodin k dočasným obdobím vodního deficitu. Vítané jsou také možnosti závlahy polí nikoliv zcela sladkou vodou, ale do určitého stupně i brakickou.

Během bezmála dvacetiletého úsilí o konstrukci v praxi využitelných „sucho-“ či „slanovzdor-

ných“ GM rostlin byly již ověřovány účinky přenosu doslova desítky různých genů. Výsledky v mnohém napomohly našemu pochopení mechanismů odolnosti rostlin vůči suchu či salinitě. Jen některé však již vedly i k praktickému použití. Uvedeme si zde proto jen zásadní příklady, ilustrující současně i historii daného typu výzkumu ve členění odpovídajícím struktuře kapitoly 3.

Přenosy genů strukturálních, zodpovědných za jednotlivé buněčné funkce

Zvýšení hladiny osmolytů

Příkladem mohou být geny pro enzymy účastníci se biosyntézy glycinbetainu z cholinu, které byly vloženy do rostlin *Arabidopsis*, tabáku a rýže. Zdrojem genů byly buď bakterie (*Escherichia coli*, *Arthrobacter globiformis*), nebo rostliny přirozeně akumulující glycinbetain (špenát, řepa) (Sakamoto and Murata, 2000). I přes nízkou hladinu glycinbetainu vykazovala řada transgenních rostlin zvýšenou toleranci vůči různým abiotickým stresům. Důvodem byla zřejmě nejen jeho schopnost regulace osmotického stresu, ale také schopnost chránit a stabilizovat proteiny či zmírňovat oxidativní poškození indukci exprese genů pro enzymy odstraňující ROS (Chen and Murata, 2011).

LEA proteiny

První úspěšné výsledky s přenosem jejich genů lze datovat již do doby před dvaceti lety. Tak gen *HVA1* z ječmene, kódující protein ze skupiny LEA3, byl zaveden do pšenice (Sivamani et al., 2000) či rýže (Babu et al., 2004). V současnosti již známe desítky prací zaměřených na přípravu a charakteristiku

různých „LEA – GM“ rostlin. Víme, že LEA proteiny různých skupin se v rostlinách účastní reakcí na různé abiotické stresory – od sucha po zasolení, od extrémně vysoké teploty až po chlad (Liu et al., 2016, Muvunyi et al., 2018).

Akvaporiny

Úvodní fázi těchto studií představovaly samy identifikace, izolace a charakteristiky akvaporinových genů u nejrůznějších typů živých organismů, od bakterií po rostliny (viz. Afzal et al., 2016). Cílem bylo vedle obecně biologického studia jejich funkcí také ověření možnosti jejich praktického použití.

Studie Zhou et al. (2012) charakterizovala akvaporinový gen *TaAQP7* z pšenice a přenesla jej do pokusných tabáků. Když byl gen exprimován pod vhodným promotorem (regulační gen), zesílil jejich schopnost příjmu vody za podmínek jejího půdního deficitu. Transgenní rostliny nadto vykazovaly i nižší akumulaci volných kyslíkových radikálů ROS a poškození membrán prostřednictvím vyšší aktivity antioxidantů.

Velmi slibné výsledky obsahuje publikace Wang et al. (2017) referující o vlastnostech GM bramboru transformovaného akvaporinovým genem *StPIP-1*. Ten byl sice také „bramborového původu“, ale v tomto případě trvale exprimovaný pod klasickým „konstitutivním“ (trvale účinkujícím) promotorem CaMV35S. Získané GM klony vykazovaly za stresových podmínek (sucho) proti kontrolám zlepšenou vodní bilanci, vodivost průduchů, průběh fotosyntézy i tvorbu hlíz. To vše bylo ověřeno opakovanými polními pokusy, tedy s velkou nadějí na praktické využití v podmínkách vodního deficitu.

Proteiny chladového či tepelného šoku

Zřejmě největšího praktického úspěchu však zatím nesporně dosáhl tým firmy MONSANTO, jehož výsledky byly prvně souborně publikovány již před jedenácti lety (Castiglioni et al., 2008). Konstitutivní exprese bakteriálních proteinů chladového šoku (Cold Shock Proteins neboli CSPs), konkrétně CspA z *Escherichia coli* a CspB z *Bacillus subtilis*, výrazně zvýšila toleranci hybridní kukuřice vůči sezonnímu suchu, pravidelně se vyskytujícímu např. v „kukuřičných státech“ středozápadní části USA.

Kukuřice MON 87460, nabízená společností Monsanto pod značkou DroughtGard™, je tak od roku 2013 první komerčně dostupnou transgenní plodinou tolerantní k suchu.

Přenosy genů regulačních, spouštějících komplexní odpovědi organismu

Do skupiny „regulačních strategií“ můžeme řadit zejména práce věnované problematice dvou antagonistických fytohormonů, tedy ABA a cytokininů. Uvádíme jen několik typických příkladů z této oblasti.

Kyselina abscisová (ABA)

Naprosto zásadním regulátorem vodního výparu rostliny je míra otevřenosti jejích průduchů, neboť cestou transpirace může rostlinný organizmus ztratit až 90 % této klíčové tekutiny. Podstatnou roli v tomto reverzibilním procesu hrají jednak změny v samotné aktuální hladině ABA, jednak v citlivosti různých receptorů na její přítomnost. Díky klasickým mutačním analýzám je známé široké spektrum genů, jejichž přítomností je tato citlivost podmíněna. Série jejich inserčních mutantů dlouhodobě

využívá např. kanadský tým, studující mechanismy „suchovzdornosti“ zejména u řepky olejky (Wang et al., 2009). Zjistil, že pokud byly tyto geny umístěny pod „suchem – indukovatelným“ promotorem, vykazovala transgenní řepka výrazně vyšší ABA citlivost. Rostliny se v suchých podmínkách vyznačovaly také nižší vodivostí průduchů, nižší transpirací a vyšší tolerancí vůči suchu oproti kontrole. Za podmínek mírného sucha v období kvetení vykazovala transgenní řepka oproti kontrole významně vyšší výnos semen.

Li et al. (2013) např. identifikovali v genomu *Arabidopsis* 14 takových genů z rodiny PYR/PYL/RCAR. Zhao et al. (2016) sledovali funkci jednoho z nich (PYL 9) v transgenních rostlinách kukuřice. Zjistili jeho overexpresi (výrazně vyšší tvorbu dotyčného proteinu v buňce) pod ABA – indukovatelným promotorem a následně výraznou odolnost těchto rostlin k suchu, současně ale také zvýšené stárnutí jejich listů.

V nedávné práci He et al. (2018) je publikována rozsáhlá analýza výskytu PYL genů v genomu kukuřice a následně charakteristika jejich funkcí v transgenních rostlinách *Arabidopsis*. Některé z nich způsobily zvýšenou citlivost rostlin k aplikaci ABA, jiné GM vyšší resistenci k suchu. Poznatky mohou být obratem využity jak v konvenčním, tak v molekulárním šlechtění „suchovzdorné“ kukuřice a možná i jiných plodin.

V kapitole 3 jsme se zmínili také o biologických funkcích tzv. DREBs genů. Tým Wei et al. (2016) publikoval rozsáhlou studii o účincích přenosu genu DREB1A/CBF3 z *Arabidopsis* do léčivky *Salvia miltiorrhiza* (šalvěj červenokořená). V podmínkách sucha vykazovaly transgenní rostliny podstatně vyšší fyziologickou odolnost a vyšší byla i hladina „zájmových“ léčivých/bioaktivních látek.

Cytokininy

Jak již bylo zmíněno, je většina přirozených cytokininů běžně považována za inhibitory růstu a větvení rostlinného kořenového systému. Výjimku tvoří jen některé jejich syntetické alternativy. Vzhledem k důležitosti plné funkce kořenů pro odolnost rostliny k vodnímu deficitu je tedy jednou z „antistresových strategií“ snaha o specifické snížení aktuální hladiny cytokininů. Lze jej dosáhnout přenosem genu pro cytokinin oxidázu/dehydrogenázu (CKX), což je enzym degradující cytokinin (Werner et al., 2010). U rostlin *Arabidopsis* a tabáku vedl tento postup k tvorbě většího kořenového systému (elongace primárního kořene, větvení), kořenová biomasa byla v transgenních rostlinách vyšší až o 60 %. Skutečně byla pozorovaná vyšší tolerance vůči suchu či vyšší obsah minerálních prvků v listech. Významné je to, že růst a vývoj nadzemních orgánů nebyl přitom negativně ovlivněn.

Cytokininy na straně druhé oddalují nástup listové senescence a zpomalují její průběh. Transgenní rostliny tabáku exprimující gen pro „CK syntetický“ enzym izopentyltransferázu (IPT) z *Agrobacterium tumefaciens* pod kontrolou stresem a maturací indukovaného promotoru se vyznačovaly oddálenou senescencí listů a lepší tolerancí vůči suchu.

Velmi komplexní práci týkající se mimo jiné cytokininové funkce v rostlinách jabloně v podmínkách sucha publikovali Liao et al. (2017). Na jejím počátku izolovali jeden z DREB - genů z *Malus sieversii*. V transgenních rostlinách *Malus sieversii x domestica* vyvolala overexprese tohoto genu zvýšenou expresi jednoho z genů zodpovědných za katabolismus cytokininů, tedy pokles jejich hladiny v určitých fyziologických situacích. Výsledkem byl mimo jiné změněný poměr mezi růstem nadzemních částí a kořenů u transgenů. Mladé sazenice byly sice menší (což u této podnože jinak nevadí),

ale měly oproti kontrolám v podmínkách sucha bohatší kořenový systém. Nižší hladina cytokininů vedla ke snížení otevřenosti listových průduchů i jejich počtu (snížená transpirace). Analýzy prokázaly také změněnou expresi dvou akvaporinových genů. Tedy opět lze výsledky, obdobně jako v případě výše uvedených „šalvějových“, již považovat za velmi blízké praktickému použití v pěstování kulturních rostlin v podmínkách ať již historických, či současných aridních oblastí.

GM NEBO GE?

Tři desetiletí studia a praktického využívání GM technik prokázaly jejich unikátní přednosti a současně vzbudily nekončící diskusi o možných rizicích, provázejících jejich používání. Jednou z typických námitek je mantra o „nepřirozenosti“ samotného procesu horizontálního genového přenosu (komentář k ní viz mj. Opatrný, 2018) či možných rizicích exprese cizorodých genů v takto modifikovaném organismu (blíže Grunewald and Burry, 2016). Tuto výtku zcela eliminují alternativní techniky tzv. „genové editace (GE)“. V jejich případě se totiž jedná **nikoliv o vkládání „nových“ genů, ale o pouhou změnu těch původních**. Tedy v podstatě o precizní mutagenézi, nikoliv však s pomocí klasických mutagenů fyzikálních (radiace, rentgenovo záření) či chemických (nitrososloučeniny, alkylační látky).

Technika odvozená z přirozených opravných procesů poškozené DNA využívá komplexy endonukleáz a naváděcích RNA a je s více jak 95% přesností schopna změnit či zaměnit cílové geny až v počtu několika desítek najednou. Nabízí mutace navracející mimo jiné moderním velice výkonným odrudám některé vlastnosti jejich dávných předků, poztráčené během tisíců let domestikace, včetně původních stresových odolností.

V průběhu posledních zhruba pěti let již byla tato technika široce použita i pro šlechtění kulturních plodin. Jedním z takových příkladů jsou publikace výzkumného týmu firmy DuPont Pioneer, zaměřené na toleranci k suchu u kukuřice (Shi et al., 2017). S využitím speciální editační techniky CRISPR-Cas9 bylo dosaženo změny genů podílejících se na citlivosti rostliny k účinkům etylénu. Ten se také vedle již výše zmíněných fytohormonů účastní v reakci kukuřice na podmínky vodního deficitu. Takto genově editované varianty vykazovaly oproti kontrolám zvýšenou toleranci vůči suchu a vyšší výnos zrna. Očekává se jejich brzké komerční využití.

Podrobný přehled příkladů obdobného využití GE technik v přípravě stres-tolerantních plodin podává review Jaganathan et al. (2018).

ZÁVĚR

Geneticky modifikované rostliny používá zemědělská praxe celosvětově již více jak dvacet let. V případě některých potravinářských plodin (kukuřice, řepka) či technických plodin (bavlník) představují naprostou většinu jejich celkové produkce. Evropa je sice nadále prakticky odmítá, ale jejich komodity, zejména krmiva pro svoji živočišnou výrobu, masivně dováží. Bez nich by se neobešla.

V našich učebnicích biologie pro střední školy a gymnázia je dosud této problematice věnována jen zcela okrajová pozornost. A to navzdory názoru poučených odborníků jak ze základního výzkumu, tak praxe, že se budoucí ekonomicky únosné a přírodě vstřícné zemědělství bez jejich aplikace neobejde. Náš příspěvek měl za cíl zprostředkovat základní relevantní informace o problematice jak středoškolským pedagogům, tak jejich žákům.

Poděkování – Vznik tohoto textu byl podpořen MŠMT ČR v rámci projektu NPUI LO1417.

Literatura

- ANDROVÁ, J., OPATRŇÝ, Z., ČÍŽKOVÁ, V. Transgenní plodiny I. *Biologie, chemie, zeměpis*, 2016, 25 (2): 62-68.
- AFZAL, Z., HOWTON, T. C., SUIN, Y., SHAHID MUKHTAR, M. (2016). The role of aquaporins in plant stress responses. *J. Dev. Biol.* 4: 1-23. <https://doi.org/10.3390/jdb4010009>
- BABU, R. C., ZHANG, J., BLUM, A., HO, T. - H. D., WU, R., NGUYEN, H. T. (2004). HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryzasativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science* 166: 855–862. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.023>
- CASTIGLIONI, P., WARNER, D., BENSON, R. J., ANSTROM, D. C., HARRISON, J., STOECKER, M., ABAD, M., KUMAR, G., SALVADOR, S., D'ORDINE, R., NAVARRO, S., BACK, S., FERNANDES, M., TARGOLLI, J., DASGUPTA, S., BONIN, C., LUETHY, M. H., HEARD, J. E. (2008). Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiology* 147: 446–455. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118828>
- CHEN, T. H. H., MURATA, N. (2011). Glycine betaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell and Environment* 34: 1–20.
- GRUNEWALD, W., BURY, JO (2016). The GMO revolution. LannooCampusPubLeuven, Belgium. ISBN 978 94 014 3219 1. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02232.x>

- HALFORD, N., ed. (2006). Plant biotechnology. Current and future applications of genetically modified crops. John Wiley and Sons Ltd. ISBN 0-470-02181-0 <https://doi.org/10.1002/0470021837>
- HE, Z., ZHONG, J., SUN, X., WANG, B., TERZAGHI, W., DAI, M. (2018). The maize ABA receptors ZmPYL8,9 and 12 facilitate plant drought resistance. *Front Plant Sci* 9: 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00422>
- JAGANATHAN, D, RAMASAMY, K, SELLAMUTHU, G., JAYABALAN, S., VENKATARAMAN, G. (2018). CRISPR for crop improvement: An update review *Front.PlantSci.* 9: 1-17.
- LI, W., WANG, L., SHENG, X., YAN, C., ZHOU, R., HANG, J. et al. (2013). Molecular basis for the selective and ABA – independent inhibition of PP2CA by PYL 12. *Cell Res.* 23: 1369-1379. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.143>
- LIAO, X., GUO, X., WANG, Q., WANG, Y., ZHAO, D., YAO, L., WANG, S., LIU, G., LI, T. (2017). Overexpression of *MsDREB6.2* results in cytokinin-deficient developmental phenotypes and enhances drought tolerance in transgenic apple plants. *Plant J.* 89: 510-526. <https://doi.org/10.1111/tpj.13401>
- LIU, Y., LIANG, J., SUN, L., YANG, X., LI, D. (2016). Group 3 LEA protein, ZmLEA 3, is involved in protection from low temperature stress. *Front Plant Sci.* 7: 1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01011>
- MUNNS, R., TESTER, M. (2008). Mechanism of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- MUVUNYI, B. P., YAN, Q., WU, F., MIN, X., YAN, Z. Z., KANZANA, G., WANG, Y., ZHANG, J. (2018). Mining late embryogenesis abundant (LEA) family genes in *Cleistogenes songorica*, a xerofyte perennial desert plant. *Int.J.Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms19113430>
- MURPHY, D. J. (2007). People, plants and genes. Oxford University Press. ISBN 978-0-19-920713-8. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199207145.001.0001>
- NEDĚLOVÁ, J. (2014). Geneticky modifikované rostliny ve vztahu k řešení problematiky globálních klimatických změn. Diplomová práce, PšF UK.
- OPATRNÝ, Z. (2018). Trofim Denisovič a horizontální genový přenos. In: Kyša, L., Zlatník, Č. Věda kontra iracionalita. Academia, 2018. ISBN 978-80-200-2868-6.
- POKORNÁ, L., KUČEROVÁ, M., HUTH, R. (2018). Annual cycle of temperature trends in Europe, 1961–2000, Global and Planetary Change, 170: 146-162. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2018.08.015>
- SAKAMOTO, A., MURATA, N. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 51 (342): 81–88. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.342.81>
- SHI, J., GAO, H., WANG, H., LAFITTE, R., ARCHIBALD, R. L., YANG, M., HAKIMI, S. M., MO, H., HABBEN, J. E. (2017). ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol.J.* 15: 207-216. <https://doi.org/10.1111/pbi.12603>
- SIVAMANI, E., BAHIELDIN, A., WRAITH, J. M., AL-NIEMI, T., DYER, W. E., HO, T.-H. D., QU, R. (2000). Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barely *HVA1* gene. *Plant Science* 155: 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00247-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00247-2)
- TAIZ, L., ZEIGER, E., MOLLER, I. M., MURPHY, A. (2016). Plant physiology and development. Sixth edition. Sinauer Associates Inc, Maryland, USA. ISBN 978-1-60535-255-8.
- WANG, J.-M., FAN, Z.-Y., LIU, Z.-B., XIANG, J.-B., CHAI, L., LI, X.-F., YANG, Y. (2011). Thylakoid-bound ascorbate peroxidase increases resistance to salt stress and drought in *Brassica napus*. *African Journal of Biotechnology* 10(41): 8039–8045. <https://doi.org/10.5897/AJB11.857>

- WANG, Y., BEAITH, M., CHALIFOUX, M., YING, J., UCHACZ, T., SARVAS, C., GRIFFITHS, R., KUZMA, M., WAN, J., HUANG, Y. (2009). Shoot-specific down-regulation of protein farnesyltransferase (α -subunit) for yield protection against drought in canola. *Molecular Plant* 2 (1): 191–200. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn088>
- WANG, L., LIU, Y., FENG, S., YAQNG, J., LI, D., ZHANG, J. (2017). Role of plasmalemma aquaporin gene *StPIP1* in enhancing drought tolerance in potato. *Front Plant Sci* 8: 1–22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00616>
- WEI, T., DENG, K., LIU, D., GAO, Y., LIU, Y., YANG, M., ZHANG, L., ZHENG, X., WANG, CH., SONG, W., CHEN, CH., ZHANG, Y. (2016). Ectopic expression of DREB transcription factor, AtDREB1A, confers tolerance to drought in transgenic *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Cell Physiol* 57: 1593–1609. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw084>
- WERNER, T., NEHNEVAJOVA, E., KÖLLMER, I., NOVÁK, O., STRNAD, M., KRÄMER, U., SCHMÜLLING, T. (2010). Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and *Tobacco*. *The Plant Cell* 22: 3905–3920. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072694>
- ZHAO, Y., CHAN, Z., GAO, J., XING, L., CAO, M., YU, CH., HU, Y., YOU, J., SHI, H., ZHU, Y., GONG, Y., MU, Z., WANG, H., DENG, X., WANG, P., BRESSAN, N. A., ZHU, J. K. (2016). ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and Leaf senescence. *PNAS* 113: 1949–1954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522840113>
- ZHOU, S., HU, W., DENG, X., MA, Z., CHEN, L., HUANG, C., WANG, C., WANG, J., HE, Y., YANG, G., HE, G. (2012). Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PLoS ONE* 7 (12): e52439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052439>
- ZOU, J., LIU, C., LIU, A., ZOU, D., CHEN, X. (2012). Overexpression of OsHsp17.0 and OsHsp23.7 enhances drought and salt tolerance in rice. *Journal of Plant Physiology* 169: 628–635. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.12.014>

Drobnosti

Univerzita 3. věku a Antické živly z pohledu chemie.

Karel Kolář, Kateřina Chroustová, Katedra chemie a didaktiky chemie, Pedagogická fakulta UK
Katedra chemie a didaktiky chemie Pedagogické fakulty Univerzity Karlovy dlouhodobě participuje na programu Univerzity 3. věku. Od počátku do současnosti je duší programu doc. RNDr. Karel Holada, CSc., který není jen svědomitým organizátorem jednotlivých akcí, ale především autorem většiny

námětů a konkrétní podoby jejich realizace v praxi. Názorným příkladem spoluúčasti katedry na programu Univerzity 3. věku je téma Antické živly. Každému dílčímu tématu (země, voda, oheň, vzduch) je věnován úvodní referát, který představuje vstupní informaci. Posluchači následně zpracují čtyři koreferáty, které jsou zaměřeny na čtyři aspekty – tezaurus, energie, literatura, hudba. Činí tak často originálním způsobem. Téma oheň – energie je prezentováno například prostřednictvím historie střelného prachu. Neméně zajímavé je hledání v oblasti umění. Téma voda – hudba je dokumentováno například díly Bedřicha Smetany (Vltava) a Georga Friedricha Händla (Vodní hudba). Nelze v této souvislosti nevzpomenout na cyklus *Živly*, dílo Mikoláše Alše.

Aktivity katedry v rámci Univerzity 3. věku se těší dlouhodobě značné oblibě účastníků, za což patří díky především doc. RNDr. Karlu Holadovi, CSc. ale i dalším pracovníkům katedry a fakulty prof. PhDr. Martinu Bílkovi, Ph.D., Mgr. Jitce Benešové, Janě Fiřtové a Ing. Miloši Kauckému. K tématu byla v letošním roce vydána publikace *Antické živly nejen pohledem chemie*, která obsahuje texty koreferátů jednotlivých účastníků.

