



MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Oddělení genetiky a molekulární
biologie



Molekulární mechanismy adaptace rostlin k abiotickým stresům

Bakalářská práce

Lubomír Smrža

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Radim Čegan, Ph.D.

Brno 2014

Bibliografický záznam

Autor: Lubomír Smrža
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Molekulární mechanismy adaptace rostlin k abiotickým stresům

Studijní program: Experimentální biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika

Vedoucí práce: Ing. Radim Čegan, Ph.D.

Akademický rok: 2013/2014

Počet stran: 38

Klíčová slova: adaptace, molekulární mechanismy, vyšší rostliny, abiotický stress

Bibliographic Entry

Author: Lubomír Smrža
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Molecular Mechanisms of Plant Adaptation to Abiotic Stress

Degree Programme: Experimental Biology

Field of Study: Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Ing. Radim Čegan, Ph.D.

Academic Year: 2013/2014

Number of Pages: 38

Keywords: adaptation, molecular mechanisms, higher plants, abiotic stress

Abstrakt

Tato bakalářská práce pojednává o adaptaci vyšších rostlin k abiotickým stresům se zaměřením na molekulární podstatu tohoto problému. Popisuje zejména známé prvky adaptace pozorované u jednotlivců a nastiňuje také jak probíhá proces adaptace celého druhu. Stresy, na které je práce zaměřena jsou stres z vyšších koncentrací těžkých kovů v půdě, vodní stres a teplotní stres.

Abstract

This bachelor thesis discusses adaptation of higher plants to abiotic stress with focus on the molecular basis of the problem. In particular it describes known features of adaptation observed in individual plants and also outlines how the process of adaptation of the whole species works. The stresses highlighted in this paper are stress of higher concentrations of heavy metals in soil, water stress and temperature stress.



Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Student: **Lubomír Smrža**
Studijní program: **Experimentální biologie**
Studijní obor: **Molekulární biologie a genetika**
Studijní směr: **Molekulární biologie a genetika**

Ředitel Ústavu experimentální biologie PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s tématem:

Molekulární mechanismy adaptace rostlin k abiotickým stresům

Molecular mechanisms of plant adaptation to abiotic stress

Oficiální zadání:

Vyšší rostliny postrádají schopnost aktivně se přesouvat a unikat tak z dosahu nepříznivých vlivů. Díky tomu jsou nuceny vytvářet adaptační mechanismy k široké škále stresů, což jim umožňuje přežít v extrémních podmínkách.

Literatura:

Poltronieri P., Bonsegna S., De Domenico S., Santino A. 2011: Molecular Mechanisms in Plant Abiotic Stress Response. Field Veg. Crop Res. 48: 15-24.

Jazyk závěrečné práce: český

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Radim Čegan, Ph.D.

Podpis vedoucího práce:

.....
Radim Čegan.....

Konzultant: RNDr. Roman Hobza, Ph.D.

Datum zadání bakalářské práce: listopad 2013

V Brně dne 14.11.2013

Jan Šmarda
prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
ředitel Ústavu experimentální biologie

Zadání bakalářské práce převzal dne 14.11.2013:

Lubomír Smrža
Podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli, panu Ing. Radimu Čeganovi, Ph.D., za neocenitelnou pomoc při vedení mé bakalářské práce. Díky patří také panu RNDr. Romanu Hobzovi, Ph.D. za jeho připomínky a rady.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 14. 5. 2014



.....

Lubomír Smrža

Obsah:

1. Úvod	9
2. Těžké kovy	10
2.1. Rezistence	11
Vnější rezistence	11
Tolerance	11
2.2. Fyziologie	12
2.2.1. Vnější rezistence – omezení příjmu	12
Buněčná stěna	12
Kořen	13
Chelatace	13
2.2.2. Vnitřní rezistence – tolerance	15
Příjem kovů	15
Prostup přes plazmatickou membránu	16
Transport kovů uvnitř rostliny	17
Uskladnění kovů	17
2.3. Rozdělení rostlin	20
Vylučovače	20
Indikátory	20
Akumulátory	20
2.4. Genetika rezistence ke kovům	21
3. Vodní stres	22
3.1. Reakce rostlin	23
Kyselina abscisová	23
Osmoprotektanty	25
3.2. Genetika	25
4. Teplotní stres	26
4.1. Adaptace	26
Membrány	26
Heat shock proteins	28
5. Závěr	29
6. Literatura	31
7. Příloha	36

1. Úvod

Vyšší rostliny mají značně omezené schopnosti pohybu z místa na místo – lokomočního pohybu. Nemohou se tedy vyhnout působení rozmanitých stresů a aby přežily, musí se umět přizpůsobit podmínkám panujícím v místě, kde rostou.

Tyto rostlinné stresy se dají rozdělit na stresy biotické a abiotické. Biotické stresy jsou způsobené jinými organismy, např. parazity, houbami apod. Abiotické stresy, kterým se budu ve své práci věnovat, jsou důsledkem působení neživých faktorů, které negativně ovlivňují zdraví a vývoj rostliny. Mezi tyto nepříznivé neživé faktory v prostředí patří nedostatek vody, vysoká salinita, záření, příliš vysoké či příliš nízké teploty, nebo také vyšší koncentrace těžkých kovů v půdě aj.

Rostliny se k životu ve stresových podmínkách přizpůsobují prostřednictvím úpravy své morfologie, fyziologie, či metabolismu, tak aby minimalizovaly vznikající škody. Tyto přizpůsobení vznikají v rámci ontogeneze jedince přímo v reakci na vystavení stresu a díky dědičnosti se přenášejí do dalších generací a přispívají tak k adaptaci druhu.

Mnohé z konkrétních adaptací jedince mají svůj základ na úrovni molekul. Také adaptace v rámci druhu probíhá na molekulární úrovni předáváním genů, které představují selekční výhodu, do dalších generací.

Ve své bakalářské práci se zaměřím na adaptace rostlin ke stresu z vyšších koncentrací těžkých kovů v půdě, vodnímu stresu a teplotnímu stresu. Popsány budou hlavně modifikace fyziologie a metabolismu, ale také genetická stránka tohoto problému.

Pochopení molekulární stránky adaptace rostlin k různým stresům, ať už biotickým či abiotickým, má pro člověka velký význam z hlediska zvýšení výnosů v zemědělství (abiotické stresy se uvádí jako hlavní důvod snížených výnosů), protože umožní tvorbu odolnějších plodin. Z hlediska ekologie je znalost adaptace ke stresům také důležitá, protože může pomoci udržovat stabilní ekosystémy v neustále se zhoršujícím životním prostředí. A konečně, využitím znalosti rezistence rostlin k těžkým kovům může být uplatnění tolerantních rostlin při fytoremediaci.

2. Těžké kovy

V této kapitole se budeme zabývat adaptací rostlin na nežádoucí vysoký obsah těžkých kovů (TK) v půdě. Jedná se o různé strategie přežití zprostředkované různými rezistenčními mechanismy.

TK jsou skupina chemických prvků, která zahrnuje přechodné prvky, kovy, metaloidy, lanthanoidy a aktinoidy s hustotou vyšší než 5 g.cm^{-3} . Dle ekotoxikologie patří mezi TK zejména měď, zinek, kadmium, rtuť, bór, molybden, kobalt, olovo, chrom, nikl, mangan, železo a polokovy selen a arsen. Pokud však chceme uvažovat TK ve vztahu k životu rostlin, měli bychom se zaměřit zejména na některé z této skupiny, konkrétně tzv. mikroelementy, protože právě ty jsou biologicky významné. Patří mezi ně měď, bór, železo, mangan, molybden, nikl, zinek a kobalt. Jmenované prvky jsou pro rostlinu (stejně jako pro mnohé další organismy) esenciální – tzn. jsou pro správný vývoj nezbytně nutné – ve vyšších koncentracích se však stávají toxickými a mohou až úplně inhibovat růst a způsobit smrt rostliny.

Levitt (1980) uvádí, že kontaminované prostředí působí na rostliny jako stresový faktor, způsobující fyziologické změny vedoucí ke zpomalení nebo úplnému zastavení růstu a prospívání rostliny. TK se v nízkých koncentracích běžně vyskytují v každé půdě. Proto kontaminovaným prostředím rozumíme prostředí, kde koncentrace jmenovaných prvků přesahují běžné hodnoty. Podle Ernsta (1974) nekontaminované půdy obsahují Zn, Cu, Pb, Ni, Cd a Cr v koncentraci 0,0001-0,065 %, Mn a Fe v koncentraci 0,002-10,0 %. Obecně platí, že koncentrace TK (s výjimkou Fe) v půdě přesahující 0,1 % se stávají toxickými (Bothe, 2011). Avšak tyto prahové koncentrace mohou být pro různé rostliny pochopitelně různé.

Nejspíš právě díky tomu, že nemohou aktivně „utéci“ od hrozícího nebezpečí v podobě kontaminované zeminy, vyvinuly vyšší rostliny řadu rezistenčních mechanismů, které jim umožňují přežít i na stanovištích prokazujících silné znečištění. Metalofyty disponují v podstatě třemi strategiemi, jejichž uplatnění jim pomáhá vypořádat se s vyšší než žádoucí koncentrací těžkého kovu v půdě. Dají se tedy dělit na tzv. vylučovače, které udržují ve své nadzemní části nízkou koncentraci TK, indikátory, které řídí transport TK tak, aby udržovaly jejich koncentraci stejnou jako v prostředí a konečně akumulátory (případně hyperakumulátory), které, jak napovídá název, akumulují vyšší koncentraci TK než se nachází v prostředí (Baker, 1981). V případě tolerance stejné koncentrace jako v prostředí a v případě akumulace (tedy pokud obsahuje větší množství těžkého kovu, než potřebuje) musí rostlina

aktivně chránit vlastní struktury před negativními vlivy těchto prvků – detoxifikovat. Rostliny schopné vypořádat se s vyšší koncentrací TK v půdě mají v ekosystémech velmi důležitou úlohu, protože např. díky akumulátorům a jejich zvýšenému příjmu TK se půda, kde rostou, stává přívětivější pro rostlinné druhy, které na takto zamořených půdách růst nedokáží. Bez těchto rostlin by půdy s přebytkem TK zůstaly holé a neobyvatelné pro jiné rostliny (Mehes-Smith *et al.*, 2013). Tohoto fenoménu využívá i člověk při cílené fytoremediaci. Mezi nejvíce studované druhy patří *Thlaspi caerulescens*, *Arabidopsis halleri* a *Silene vulgaris*. Fotografie těchto tři druhů k nalezení v příloze (Obr. 3-6).

2.1. Rezistence

Mehes-Smith *et al.* (2013) popisují rezistenci rostlin vůči TK jako schopnost uniknout působení těchto prvků, nebo jej tolerovat. Velmi zjednodušeně jsou metalofyty adaptovány k životu v kovem kontaminovaných prostředích dvěma způsoby: buď schopností zabránit vstupu kovů do nadzemních částí rostliny, nebo dokonalejší schopností příjmu a akumulace kovů (s čímž je spojena samozřejmě eliminace toxického působení vyšších koncentrací TK).

Rezistenční mechanismy jsou dědičné a jejich vyvíjením v nepříznivém prostředí získávají rostliny selekční výhodu, která pak vede k adaptaci druhu. (Mehes-Smith *et al.*, 2013).

Vnější rezistence

Někdy má rostlina možnost úplně zabránit kontaktu s TK – např. v případě, že půda je zamořena nerovnoměrně a rostlina má možnost expandovat kořeny do méně zamořených částí půdy (Mehes-Smith *et al.*, 2013). Nebo mohou rostlině pomoci symbiotické houby, jejichž hyfy jsou schopné čerpat potřebné živiny a poskytovat je rostlině z okruhu až o několik desítek metrů přesahujícím rozsah kořenů (Dahlberg, 1997).

Když se kořeny dostanou do kontaktu s toxickými TK, rostlina je nejprve chráněna mechanismy vnější rezistence, které zejména udržují ionty TK mimo cytoplazmu, kde nejsou škodlivé. Buněčná stěna a jiné rostlinné struktury mohou omezovat příjem TK (Mganga *et al.*, 2011).

Tolerance

Pokud rostlina nemá možnost zabránit kontaktu s ionty TK a tyto vstoupí ve vysokých koncentracích do jejích buněk, ale rostlina přesto přežije, mluvíme o toleranci. Baker (1987)

uvádí, že tolerantní rostliny jsou ty, jež jsou vnitřně chráněny před stresy, které představují kovy vstoupivší do buněčné cytoplazmy. Tato vnitřní ochrana je důsledkem souhry různých rezistenčních mechanismů včetně mechanismů detoxifikačních a vyčleňujících.

2.2. Fyziologie

Jak bylo uvedeno, rezistenční mechanismy fungují buď jako vnější ochrana před samotným vstupem těžkého kovu do cytoplazmy, nebo jako vnitřní tolerance umožňující vypořádat se s vyšší koncentrací uvnitř buňky. Tyto rezistenční mechanismy často spočívají v modifikaci fyziologie příjmu a zpracování kovů. Podívejme se tedy na nejdůležitější z těchto fyziologických procesů a na molekulární stránku některých z nich. Uvedeny budou také příklady z fyziologie konkrétních rostlinných druhů a rozdíly mezi nimi, které vznikly jako výsledek adaptace různých druhů uplatňujících různé strategie pro přežití.

2.2.1. Vnější rezistence – omezení příjmu

Před vstupem do cytoplazmy musí kovové ionty nejprve projít skrz buněčnou stěnu a plazmatickou membránu. Tyto dvě struktury tedy fungují jako bariéra a mohou omezit příjem těžkého kovu do cytoplazmy (Mehes-Smith *et al.*, 2013). Dále lze snížit příjem TK změnou vazebné kapacity buněčné stěny, modifikací iontových kanálů nebo prostřednictvím kořenových výměšků (Tong *et al.*, 2004). Níže si představíme buněčné struktury a mechanismy, které se na omezování příjmu podílejí.

Buněčná stěna

Buněčná stěna se podílí na rezistenci vůči TK, protože jednoduše funguje jako bariéra chránící buňku před jejich vstupem. Nicméně se ukázalo, že buněčná stěna je také místem akumulace mnoha kovových prvků, a tak rovněž snižuje jejich příjem do cytoplazmy. Dvojvazné a trojvazné kovy se mohou k buněčné stěně vázat díky přítomnosti funkčních skupin jako $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ a $-\text{SH}$ (Mehes-Smith *et al.*, 2013). Nosičem karboxylové skupiny jsou tzv. pektiny – lineární polysacharidy vápenato-hořečnaté soli kyseliny galakturonové.

Colzi *et al.* (2011) uvádí, že některé rostlinné druhy v kontaminovaném prostředí zvyšují vazebnou kapacitu buněčné stěny zvyšováním produkce polysacharidů, např. právě pektinů. Tímto způsobem se zvyšuje akumulace TK na buněčné stěně, a tedy snižuje jejich průnik do cytoplazmy. Konkrétně pektiny v buněčných stěnách v kořenu se ukázaly být

důležité pro vázání a akumulaci mědi u kapradiny *Lygodium japonicum* a mechu *Scopelophyla cataractae*. (Konno *et al.*, 2010). Na druhou stranu, tolerantní *Silene paradoxa* rostoucí ve vyšších koncentracích mědi snižuje vazebnou kapacitu své buněčné stěny buď metylací pektinů, nebo přímo snížením jejich zastoupení v buněčné stěně (Colzi *et al.*, 2012).

Kořen

Kořen jako orgán zajišťující výživu rostliny nabízí rovněž možnosti regulace příjmu TK. K této regulaci dochází např. prostřednictvím tzv. kořenových výměšků. Jedná se o organické látky, které ovlivňují chemické prostředí v okolí kořene. Tyto výměšky na sebe váží kovy a zabraňují jim tak ve vstupu do cytoplazmy (Colzi, 2011). Konkrétně u pšenice (*Triticum aestivum*) byla nalezena spojitost mezi kořenovými výměškami fytochelatinů, malátů a citrátů a vylučováním mědi u neakumulujících populací (Yang *et al.*, 2005).

Také modifikace morfologie kořene (konkrétně zvětšení jeho biomasy, nebo větší množství kořenových vlásků) byly nalezeny u rostlin rostoucích na půdách s větší koncentrací zinku v porovnání s rostlinami z půd s nižší koncentrací (Whiting *et al.*, 2000). Avšak tyto změny kořene nemusí být nutně spojeny s regulací příjmu kovů.

Hyperakumulátor kadmia a zinku *T. caerulescens* se vyznačuje modifikací anatomie kořene, kdy tento obsahuje peri-endodermální vrstvu buněk s nerovnoměrně ztlustlými buněčnými stěnami, které jsou navíc impregnovány ligninem (Zelko *et al.*, 2008). Tyto buňky tvoří druhotný válec, který začíná u kořenové špičky a obaluje endodermis kořene. Ačkoli přesný význam této specifické vrstvy buněk není znám, je pravděpodobné, že hraje roli v rezistenci vůči TK, protože u příbuzné neakumulující *Thlaspi arvense* nebyla nalezena (Bothe, 2011). Bothe (2011) dále uvádí, že podobná struktura nebyla doposud nalezena ani u jiných metalofytů, ale je pravděpodobné, že existuje.

Chelatace

Chelatace obecně znamená navázání dvou- či vícevazného ligandu – většinou kovů. Fytotoxické působení volných iontů TK může být eliminováno právě chelatací specifickými vysoce afinitními ligandy (Yong & Ma, 2002). Z hlediska rezistence rostlin se jedná o velmi důležitý proces, který usnadňuje omezení příjmu kovů, nebo umožňuje transport chelatovaných kovů v xylému rostliny (Mehes-Smith *et al.*, 2013). Zmíněné chelatující ligandy se dělí podle charakteristických elektron-donorových oblastí. Rozlišujeme sírové ligandy, kyslíkové ligandy a dusíkové ligandy.

Sírové ligandy

Sírové ligandy – ligandy, u nichž elektron poskytuje síra, patří do proteinové rodiny tzv. metallothioneinů – nízkomolekulárních proteinů bohatých na cystein. Metallothioneiny jsou přímým produktem translace mRNA strukturálních genů (Yong & Ma, 2002) a jsou k nalezení jak u zvířat a rostlin, tak i u mikroorganismů (Huang & Wang, 2010). Funkce těchto proteinů jsou různé a pro organismy velmi důležité: např. detoxifikace Cu, Cd a Hg sekvestrací (Palmiter, 1998), nebo vychytávání volných kyslíkových radikálů (Wong *et al.*, 2004). Metallothioneiny se dělí do tří tříd. První dvě třídy se liší uspořádáním cysteinových residuí – metallothioneiny první třídy typické pro obratlovce jsou složeny z dvaceti vysoce konzervovaných cysteinových residuí, druhá třída má uspořádání poněkud volnější a nachází se u rostlin, hub a bezobratlých (Mehes-Smith *et al.*, 2013). Třetí třída obsahuje tzv. fytochelatinu.

Fytochelatinu jsou malé kov vázající peptidy syntetizované z tripeptidu glutathionu (γ -Glu-Cys)₂₋₁₁-Gly), na rozdíl od metallothioneinů tedy nejsou produktem translace mRNA, ale jsou syntetizovány enzymem fytochelatin-syntázou (Yong & Ma, 2002). Jejich produkce je spojena s akumulací TK v rostlinných pletivech (Pal & Raj, 2010) a zvyšuje se v přímé a bezprostřední reakci na kontakt s TK (Maitani *et al.*, 1996).

Kyslíkové ligandy

Aniony karboxylových kyselin jako citrát, malát, malonát nebo oxalát dokáží s dvojjaznými nebo trojjaznými kovovými ionty tvořit velmi stabilní komplexy. Uplatňují se díky tomu při mechanismech zajišťujících omezení příjmu TK nebo jejich detoxifikaci. Konkrétně jsou zapojeny při bránění vstupu TK do cytoplazmy, jejich vylučování z buněk kořene či při akumulaci a transportu kovů v rostlině (Mehes-Smith *et al.*, 2013).

Pšenici (*Triticum aestivum*) produkované citráty a maláty tvoří komplexy s Cu, a takto tento kov imobilizují v rhizosféře a zabraňují tak průniku do cytoplazmy (Yong & Ma, 2002). Na druhou stranu, vazba s těmito anionty organických kyselin může průnik do cytoplazmy a tedy i akumulaci usnadňovat či zprostředkovávat. Např. ionty zinku jsou při vstupu do buňky navázány na malát a v komplexu transportovány do vakuoly, kde se Zn váže na konečného příjemce. Malát je tedy uvolněn a může zprostředkovávat transport dalších iontů Zn (Yong & Ma, 2002). Yong & Ma (2002) také uvádí, že příjem niklu přes plazmatickou membránu je zprostředkován vazbou na citrát či malát. Volné ionty niklu (stejně jako ostatních kovů) nejsou schopné prostoupit plazmatickou membránou (Still & Williams, 1980).

Dusíkové ligandy

Tato skupina sestává z aminokyselin a jejich derivátů, které mají poměrně vysokou afinitu k určitým kovům (Mehes-Smith *et al.*, 2013).

Nejdůležitější z nich je pravděpodobně histidin. Krämer *et al.* (1996) uvádí, že tato aminokyselina je zapojena v toleranci a transportu niklu u hyperakumulátoru *Alyssum lesbiacum*. Dále bylo objeveno, že většina zinku v kořenech hyperakumulátoru *T. caerulescens* se nacházela v komplexu s histidinem (Salt *et al.*, 1999). Chelatace histidinem může napomáhat i při omezování příjmu kovů. Wenzel *et al.* (2003) objevili, že rostliny histidinem chelatují nikl v rhizosféře a zabraňují tak jeho vstupu do cytoplazmy.

2.2.2. Vnitřní rezistence – tolerance

Tolerancí TK rozumíme zapojení mechanismů vnitřní rezistence, které umožňují potlačovat negativní působení iontů TK uvnitř cytoplazmy. Hlavní úlohu zde hrají nejspíše mechanismy detoxifikační a vyčleňující, které přímo eliminují rizika spojená s mechanismy toxického působení TK. Podívejme se však i na ostatní fyziologické pochody spojené s tolerancí, jako zvýšený příjem, nebo skladování kovů v buňkách.

Příjem kovů

Příjem TK je zajímavý z hlediska akumulátorů i neakumulujících druhů. Tyto dvě skupiny rostlin se často liší právě v řízení tohoto fyziologického pochodu. Míra příjmu TK závisí na jejich dostupnosti a pohyblivosti v rhizosféře. Dostupností je zde myšlena biologická dostupnost, tzn. kov se nachází ve formě pro rostlinu přijatelné. Tato vlastnost se pro jednotlivé kovy v rhizosféře velmi liší a je ovlivněna chemickými vlastnostmi prostředí. Záleží na různých faktorech, např. na pH, nebo na přítomnosti jak anorganických, tak organických látek v prostředí. Metalofyty jsou přizpůsobeny tak, aby tento příjem optimalizovaly.

Rhizosféry akumulujících rostlin obsahují více půdních mikroorganismů než rostliny neakumulující (Mehes-Smith *et al.*, 2013). Půdní bakterie ovlivňují dostupnost kovů např. snižováním pH, nebo produkcí antibiotik, hormonů či organických kyselin (Wenzel *et al.*, 2003). Xiong *et al.* (2008) uvádí, že mikroorganismy v rhizosféře znatelně zvyšují příjem Cd, Zn a Pb u *Sedum alfredii* a také zvyšují růst kořenů.

Dále mohou metalofyty upravovat chemické prostředí v rhizosféře vylučováním kořenových výměšků. Tyto látky zahrnující organické kyseliny, histidin, polysacharidy aj.

hrají roli v mobilizaci a příjmu kovů. Z anorganických látek je důležitý např. dusík, jehož chemická forma v rhizosféře ovlivňuje příjem Cd a Zn u *T. caerulescens* (Xie *et al.*, 2009).

Prostup přes plazmatickou membránu

Kromě dostupnosti v rhizosféře je příjem TK ovlivněn také jejich prostupem přes plazmatickou membránu. Ta je pro volné ionty kovů neprostupná a příjem je tedy zprostředkováván a řízen specifickými transportéry a iontovými kanály. Příjem, akumulace a potažmo tolerance TK může být tedy ovlivněna modifikací počtu či aktivity těchto membránových transportérů (Zhou *et al.*, 2012). Metalofyty v tomto ohledu opět prokazují adaptaci na zvýšený či snížený příjem kovových prvků, který je jim vlastní.

Prostup TK přes plazmatickou membránu je zprostředkován proteinovými rodinami transportérů kovů. Tyto transportéry byly původně objeveny v souvislosti s homeostází železa a zinku, ale ukázalo se, že přenašeče esenciálních kovů mohou přenášet také kovy neesenciální, např. Cd (Zhou *et al.*, 2012), což je nejspíše důsledkem podobných chemických a fyzikálních vlastností kovových prvků.

Mezi nejdůležitější membránové přenašeče patří rodina proteinů ZRT/IRT-like Proteins – ZIP (ZRT = zinc regulated transporter, IRT = iron regulated transporter) a P_{1B}-typ z rodiny ATPáz P-typu (Baxter *et al.*, 2003). Některé z těchto přenašečů u metalofytů nesou známky adaptace spojené s tolerancí TK.

Proteiny z rodiny ZIP jsou přenašeče kovů schopné přenášet různé kationy včetně Zn, Fe, Mn a Cd. Pence *et al.* (2000) uvádí, že přirozeně zvýšená exprese ZNT1 (patří do ZIP) v kořenech *T. caerulescens* má za následek příjem zinku vyšší než u příbuzného druhu *T. arvense*. U neakumulujících druhů nastává zřetelná exprese ZNT1 pouze v přítomnosti Zn, kdežto u *T. caerulescens* je tato exprese zvýšená neohledě na obsah cíleného kovu. ZNT1 je také zprostředkovatelem méně specifického příjmu Cd (Pence *et al.*, 2000).

Transportéry typu P_{1B} z rodiny ATPáz P-typu se rovněž podílí na toleranci a udržování homeostáze kovových iontů. Za využití energie získané rozkladem ATP fungují jako odtokové pumpy, zprostředkovávají transport kovových iontů z cytoplazmy do xylému (Mehes-Smith *et al.*, 2013). Důkazem funkce těchto ATPáz při adaptaci může být fakt, že gen AtHMA4 (kóduje ATPázu) z *Arabidopsis thaliana* přenesený do kvasinek zvýšil jejich odolnost vůči Cd (Mills, 2003).

Transport kovů uvnitř rostliny

Další důležitou fyziologickou funkcí spojenou s tolerancí TK je transport těchto prvků uvnitř rostliny, zejména pak transport z kořene do stonku. Vylučovače tento proces limitují v případě esenciálních kovů a úplně inhibují v případě kovů neesenciálních. U akumulátorů je transport z kořene do stonku zprostředkováván xylémem a je naopak zvýšen (Mehes-Smith *et al.*, 2013). Významnou roli zde hrají chelátory (viz výše), které značně usnadňují, případně přímo umožňují transport TK v rostlině.

Uskladnění kovů

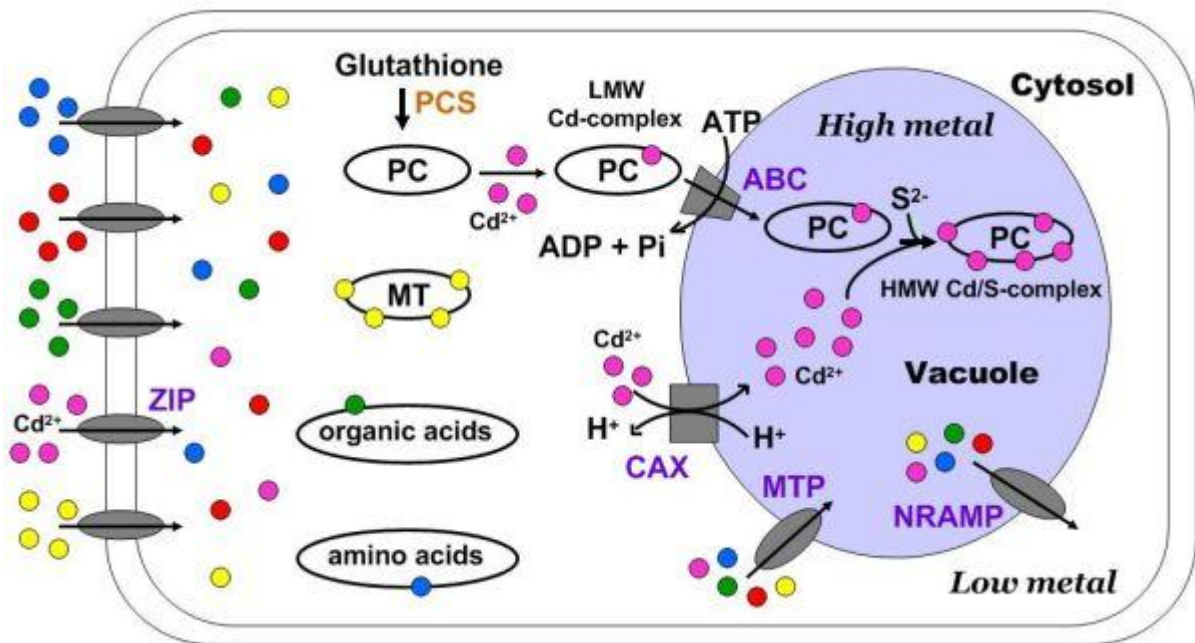
Akumulace TK je umožněna schopností rostliny uskladnit tyto ve svých orgánech a zabránit tak jejich toxickému působení. Kovy jsou po transportu xylémem do nadzemní části rostliny redistribuovány floémem anebo apoplasticky do rostlinných orgánů nebo buněčných organel (např. vakuola), kde neprobíhají žádné citlivé metabolické procesy a kovy tak nenapáchají škodu (Ernst, 1974). Tomuto ději se říká sekvestrace – vyčlenění. Během transportu kovů floémem a jejich uskladnění se uplatňují detoxifikační mechanismy.

Byla identifikována skupina transmembránových proteinů YSL (Yellow-stripe-like), které přenášejí kovy přivedené xylémem do okolních pletiv a podílí se tak na jejich vyčlenění. Gendre *et al.* (2007) uvádí, že geny pro tyto YSL proteiny prokazují u hyperakumulátoru *T. caerulescens* vysokou expresi v okolí cév, což odpovídá funkci příslušných bílkovin. Naproti tomu u neakumulující *A. thaliana* k tak vysoké expresi odpovídajících genů nedochází.

Sekvestrace, vyčlenění

Sekvestrace neboli vyčlenění přebytku TK se děje v různých místech nadzemní části rostliny jako např. v trichomech, ve vakuolách buněk mezofylu, nebo ve vakuolách buněk epidermis listu (Mehes-Smith *et al.*, 2013).

Broadhurst *et al.* (2004) uvádí, že u pěti různých ekotypů/druhů rodu *Allysum* byla po kultivaci na půdě bohaté na Ni vždy nalezena největší koncentrace tohoto prvku buď ve vakuolách epidermálních buněk, nebo v bazální části trichomů. Obsah Ni v trichomech dosahoval 15–20 % hmotnosti sušiny, což je jedna z nejvyšších naměřených hodnot u zdravého rostlinného pletiva. U dalších akumulátorů *A. halleri* a *T. caerulescens* se většina obsahu Zn nachází ve vakuolách, u *A. halleri* ve vakuolách buněk mezofylu, u *T. caerulescens* ve vakuolách epidermálních buněk. Sekvestrace ve vakuole je ilustrována na obrázku (Obr. 1).



Obrázek 1
Schéma sekvestrace těžkých kovů ve vakuole rostlinné buňky

Ionty TK (např. Cd^{2+}) jsou do buňky přijaty některým z membránových transportérů (např. ZIP). Vstup těchto iontů do cytoplasmy indukuje syntézu fytochelatinů (PC) z glutathionu za pomoci fytochelatin syntázy (PCS). Fytochelatiny pak spolu s ionty kovu tvoří nízkomolekulární komplex (LMW), který je za pomoci ATP-binding-cassete (ABC) transportován do vakuoly. Ve vakuole pak LMW tvoří vysokomolekulární komplex (HMW) spolu s dalšími ionty kovu, které mohou vstoupit do vakuoly skrze cation/proton exchangers (CAX). Transportéry typu metal tolerance protein (MTP) či natural resistance associated macrophage protein (NRAMP) lokalizované v tonoplastu zprostředkovávají transport kovů pro opětovnou mobilizaci a jiné využití. Další chelátory jako metalothioneiny (MT), aminokyseliny a organické kyseliny na sebe váží ionty kovů a udržují tak nízkou koncentraci volných iontů kovů v cytoplasmě.

Obrázek a jeho popis převzat z Towards Understanding Plant Response to Heavy Metal Stress, In: Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations (viz literatura).

Detoxifikace

Detoxifikace je rovněž velmi důležitý prvek rostlinné tolerance TK. Podívejme se na mechanismy toxicity TK a na detoxifikační mechanismy.

Mechanismy toxicity TK

Toxicita TK je dána jejich chemicko-fyzikálními vlastnostmi a existují tři mechanismy jejich negativního působení v cytoplazmě rostlinných buněk:

- 1) Mohou zvýšit tvorbu volných kyslíkových radikálů jako O_2^{*-} , OH^* , H_2O_2 , 1O_2 . Tyto kyslíkové radikály vznikají buď Fentonovou reakcí nebo Haber-Weissovou reakcí (Bothe, 2011).

Fentonova reakce: $H_2O_2 + M^{2+} \rightarrow OH^* + OH^- + M^{3+}$, kde M je jakýkoli dvojvalentní kov.

Haber-Weissova reakce: $O_2^{*-} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow OH^* + H_2O + O_2$, přičemž rychlost této reakce je zvýšena přítomností kationů TK.

- 2) Mohou se vázat na funkčně nenahraditelné SH-skupiny v enzymech a tak je deaktivovat (Bothe, 2011).
- 3) Mohou substituovat funkční prvky prostetických skupin enzymů a tím je deaktivovat. Konkrétně kadmium často nahrazuje zinek v proteinech. (Bothe, 2011).

Detoxifikace volných kyslíkových radikálů probíhá za pomoci antioxidantních ochranných mechanismů, které zahrnují aktivitu enzymatických a neenzymatických antioxidantů (Mehes-Smith *et al.*, 2013).

Mezi enzymy antioxidantní ochrany patří superoxid dismutáza (SOD), kataláza (CAT), askorbát peroxidáza a enzymy askorbát-glutathionového cyklu. Neenzymatické antioxidanty zahrnují askorbát, glutathion a atocoperol (Kachout *et al.*, 2009). Bez těchto ochranných molekul by v rostlině mohlo dojít k oxidativnímu poškození působením kyslíkových radikálů. Tolerance stresů způsobených TK je přímo spojena se zvýšenou aktivitou a kapacitou těchto detoxifikačních mechanismů (Kachout *et al.*, 2009).

2.3. Rozdělení rostlin

Uvedené modifikace ve fyziologii rostlin jsou u různých druhů zastoupeny v různé míře a nabízí nám možnost charakterizovat rostliny podle toho, jak reagují na zvýšený obsah TK ve svém prostředí.

Baker (1981) rozdělil rostliny do tří skupin. Každá skupina rostlin uplatňuje souhrn některých výše uvedených rezistenčních mechanismů, která vyhovuje jejich strategii přežití.

Vylučovače

První skupinou rostlin jsou tzv. excluders, což se dá přeložit jako vylučovače. Jejich strategií je udržovat ve své nadzemní části nižší koncentraci TK než v okolním prostředí, čehož dosahují omezením transportu kovů z kořene do stonku. S tím souvisí fakt, že u vylučovačů byly v kořenech naměřeny vysoké koncentrace těchto prvků (Baker & Walker, 1990). Příkladem mohou být tyto rostliny: *Oenothera biennis*, *Commelina communis*, *Silene maritime*, *Agrostis stolonifera* L. a z dřevin: *Salix*, *Populus* a *Pinus radiata* (Mehes-Smith *et al.*, 2013)

Indikátory

Rostliny, které prostřednictvím do určité míry zvýšeného příjmu a akumulace udržují ve své nadzemní části stejnou koncentraci TK jako v půdě, se nazývají indikátory (indikují totiž úroveň znečištění). Pokud by akumulovaly větší koncentraci než v půdě, zemřely by (Mehes-Smith *et al.*, 2013). Tyto rostliny jsou ekologicky a biologicky významné, protože kromě indikace znečištění také do určité míry akumulují polutanty a čistí půdu (Mganga *et al.*, 2011).

Akumulátory

Konečně akumulátory jsou rostliny, které zvýšeným příjmem a transportem udržují ve své nadzemní části vyšší koncentraci, než která se nachází v půdě. Tyto koncentrace v nadzemní části mohou přesahovat i koncentraci v kořenu (Kachout *et al.*, 2009) a bývají až stokrát vyšší než koncentrace kovů v nadzemních částech neakumulujících druhů rostoucích ve stejných podmínkách. Některé rostliny dokáží akumulovat pouze jeden určitý kov, ale některé i více (Mganga *et al.*, 2011).

V roce 2010 bylo známo přes 400 akumulujících rostlinných druhů, z nichž většina patří do *Brassicaceae* (Pal & Raj, 2010). Nejlépe prozkoumaní zástupci jsou např. *A. halleri* a

členové rodů *Allysum* a *Thlaspi*. Druhy *Thlaspi* jsou známé pro svou schopnost akumulovat ve své nadzemní části více než 3 % Zn, 0,5 % Pb a 0,1 % Cd. Druhy *Allysum* akumulují přes 1 % Ni a *A. halleri* je schopná dosahovat více než 1% obsahu Zn a Cd (Di Baccio *et al.*, 2011). Druhy známé pro schopnost akumulace různých TK hrají důležitou roli v čištění půdy od těchto polutantů v přírodě a také jsou předmětem výzkumu zaměřeného na jejich využití v cílené fytořemediaci (čištění půdy či vody za využití rostlin).

2.4. Genetika rezistence ke kovům

V závěru kapitoly se zaměříme na genetickou stránku rezistence vůči TK. Na příkladech z fyziologie byly popsány známé adaptace pozorované u jedinců různých druhů. V genetice pak můžeme hledat odpověď na otázku, jak se jednotlivé přizpůsobení dědí, a tak pohánějí proces adaptace celého druhu.

Dědičnost rezistence vůči kovům je podmíněna geny kódujícími složky rezistenčních mechanismů a adaptace druhu probíhá v souladu s přírodním výběrem, kdy jsou zvýhodněny fenotypy a tedy i genotypy disponující rezistenčními mechanismy.

Zajímavé je, že se tolerance určitých kovů vyvinula několikrát nezávisle na sobě u různých druhů v populacích netolerantních předků (Schat *et al.*, 2000). Z pohledu genetiky je růst na kontaminovaných půdách velkou selekční silou – pouze rostliny s tolerantním genotypem dokáží přežít. Vzniká tedy tzv. bottleneck, kdy pouze pár rostlin z netolerantní populace přežije, rozmnožuje se a dává vzniknout nové tolerantní populaci. Díky tomu se tyto populace vyvíjí velmi rychle (Mehes-Smith *et al.*, 2013). Nutno dodat, že menší část rostlin z netolerantní populace dokáže přežít díky tomu, že geny pro toleranci se vyskytují i v těchto populacích, avšak v mnohem menší míře (Gartside & McNeilly, 1974).

Genů zapojených v toleranci kovů existuje celá řada. Jejich identifikace a lokalizace však není snadná. Tolerance je často výsledkem úpravy fyziologie a geny v ní zapojené jsou tedy většinou součástí složitých genetických systému kvantitativních znaků. Účinnou metodou pro hledání těchto genů je mapování tzv. quantitative trait loci (QTL, česky lokus kvantitativního znaku), které umožňuje studovat komplexní adaptivní znaky, určit počet zapojených genů a také jejich efekt a vazby (Willems *et al.*, 2007).

Po nalezení QTL, který obsahuje velké množství genů, přichází na řadu další metody. Příkladem může být práce Roosense *et al.* (2008), kteří pomocí microarray čipu analyzovali rozdíly v QTL u tolerantního druhu *A. halleri* a u příbuzné netolerantní *A. thaliana*. Bylo nalezeno 11 genů s odlišnou expresí. Jedním z nich je gen zvaný HMA4 (Heavy Metal

ATPase 4) kódující ATPázu P-typu, což je molekulární pumpa zajišťující výtok kovových iontů z cytoplazmy do xylému za využití energie z ATP.

Roli tohoto genu zkoumali také Hanikenne *et al.* (2008). Zjistili, že pokud je umlčen (pomocí RNA interference), sníží se množství zinku transportovaného z kořene do nadzemní části rostliny. Navíc při expresi tohoto genu v *A. thaliana* (neakumulující druh) došlo ke zvýšení množství transportovaného zinku.

3. Vodní stres

Voda tvoří u nedřevnatých rostlin 80–90 % biomasy a je centrální molekulou většiny fyziologických pochodů v rostlině, je transportním médiem živin a metabolitů (Lisar *et al.*, 2012). Zároveň má voda v rostlině úlohu dalo by se říci stavební, jelikož tzv. turgor (vnitřní tlak vody na buněčnou stěnu) napíná rostlinná pletiva a udržuje rostlinu vzpřímenou. Nízký turgor má za následek vadnutí rostliny.

Vodním stresem pro rostliny je tedy zejména nedostatek vody, ale také např. vysoká salinita půdního roztoku. Je zřejmé, že tento nedostatek vody nastává v případě sucha, kdy voda v půdě jednoduše není. Což už však tolik zřejmé být nemusí, je to, že tzv. fyziologické sucho není nutně zapříčiněno pouze nedostatkem vody v půdě, ale může nastat naopak i při zatopení (vodní potenciál v půdě nižší než v rostlině), nebo vysoké salinitě v půdě (sůl rovněž ovlivňuje vodní potenciál). Fyziologické sucho je tedy jednoduše stav, kdy rostlina nemůže vodu přijímat (Lisar *et al.*, 2012).

Sucho nastává pravidelně či nepravidelně na mnoha stanovištích, a přestože je tato situace pro rostliny, jak bylo uvedeno, silně problematická, dokáží se s ní velmi často vyrovnat. Rostliny se totiž dokázaly adaptovat a vyvinuly řadu ochranných mechanismů. Za největší milník v adaptaci na nedostatek vody by se dal považovat přechod rostlin z moře na souš.

V této podkapitole se budeme zabývat adaptací rostlin k vodnímu stresu.

3.1. Reakce rostlin

Reakce rostlin na vodní stres jsou různé a mohou zahrnovat zapojení různých ochranných mechanismů či modifikaci morfologie, fyziologie nebo dokonce životního cyklu.

Modifikací morfologie v reakci na vodní stres může být např. zvětšení kořenového systému (tak se zvětší kapacita příjmu vody). Životní cyklus může být upraven tak, aby jej rostlina stihla dokončit ještě před tím, než sucho nastane. Pokud však není možnost takto se stresu ze sucha vyhnout, nemá rostlina jinou možnost než tento stres tolerovat.

Tolerance sucha je dosažena mimo jiné souhrou signalizačních drah, které umožňují buď vypnout, nebo naopak zvýšit expresi určitých genů, a tak ovlivnit fyziologii rostliny (Osakabe *et al.*, 2011). Jednou z nejdůležitějších molekul ve stresové signalizaci je kyselina abscisová (ABA), která působí jako rostlinný hormon.

ABA je nejlépe prozkoumaným spouštěčem kaskády signalizace při vodním stresu (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Proto se dále budeme věnovat hlavně tomuto hormonu a jeho působení při reakci na vodní stres.

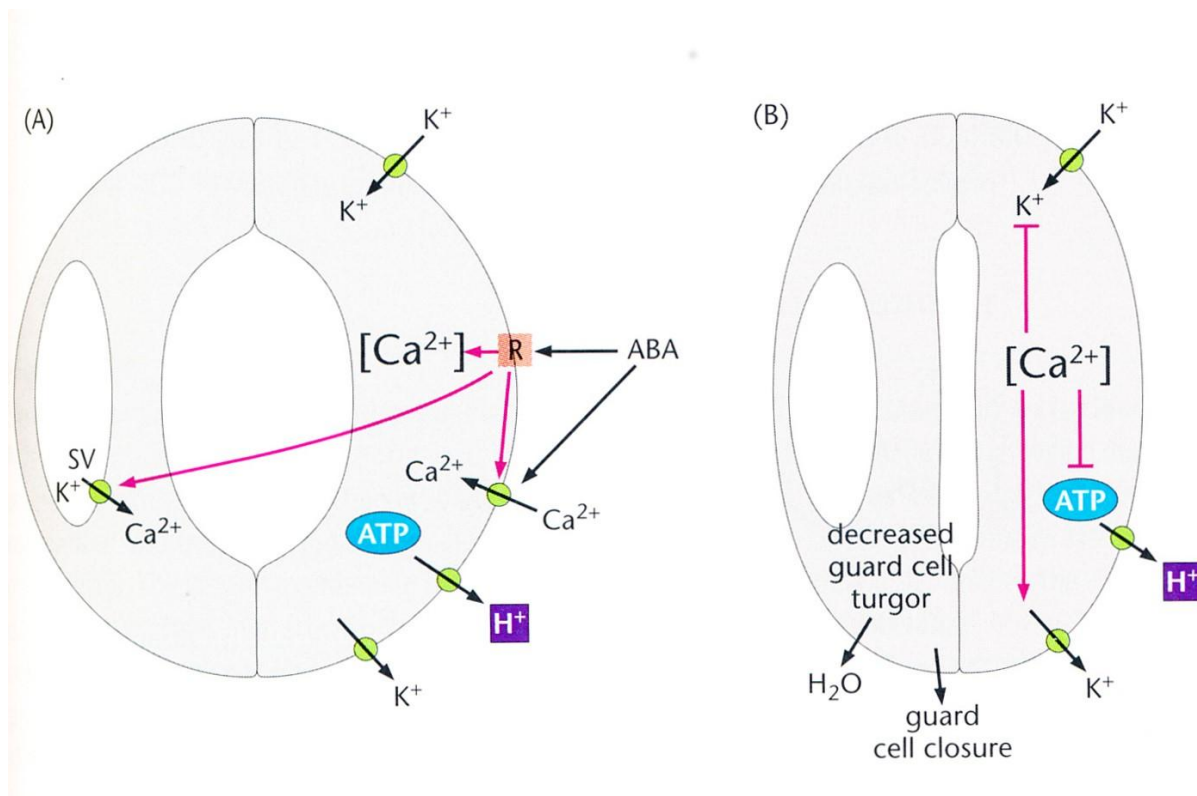
Kyselina abscisová

Ve stresových podmínkách je signalizací pomocí ABA spouštěna exprese celé řady genů, kódujících transkripční faktory a enzymy. Činností těchto enzymů je zejména tvorba osmoprotektantů. Kromě transkripčních faktorů a enzymů indukuje ABA také tvorbu vlastních pozitivních a negativních regulátorů (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013), což se dá považovat za mechanismus zpětné vazby ve tvorbě tohoto hormonu.

Iuchi *et al.* (2001) uvádí, že vnitřní koncentrace kyseliny abscisové se při suchu zvyšují díky indukci genů pro její biosyntézu. Např. u *Arabidopsis* byl objeven enzym 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenáza 3 (NCED3), jehož genová exprese je výrazně indukována suchem. Tento enzym katalyzuje klíčový krok v syntéze ABA (Iuchi *et al.*, 2001). Kromě *Arabidopsis* byla zjištěna suchem indukovaná nadprodukce zmíněného enzymu také u jiných druhů: např. u kukuřice (Tan *et al.*, 1997) a fazolu (Qin & Zeevart, 1999).

Jak bylo uvedeno, signalizace pomocí ABA při vodním stresu zprostředkovává úpravu metabolismu rostliny: např. tvorbu enzymů či osmoprotektantů. Kromě toho ABA způsobuje jednu z prvních odpovědí na nedostatek vody – zavírání průduchů (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Průduchy jsou tvořeny svěracími buňkami. Tyto svěrací buňky jsou zodpovědné za jejich otevírání a zavírání. V závislosti na změnách turgoru bobtnají nebo se naopak smršťují. Kyselina abscisová působí přímo na svěrací buňky, kde indukuje výtok

kationů draslíku a tedy i pasivní výtok vody (Schroeder *et al.*, 2001). To vede k poklesu turgoru, smrštění svěrací buňky a tedy uzavření průduchu a snížení ztrát vody respirací. Proces uzavírání průduchů je ilustrován na obrázku (Obr. 2).



Obrázek 2
Mechanismus zavírání průduchu spouštěný za pomoci ABA.

- A) Receptor svěrací buňky (R) rozpoznává ABA, tím je spuštěn výtok Ca²⁺ z vakuoly do cytoplazmy skrze vakuolární kanály (SV) a také vtok Ca²⁺ do buňky skrze Ca kanály v plazmatické membráně.
- B) Zvýšená cytosolická koncentrace Ca²⁺ inhibuje vtok K⁺ do buňky a také inicializuje jeho výtok. Vyšší koncentrace Ca²⁺ rovněž inhibuje funkci H⁺ ATPázy v plazmatické membráně, kterou tak depolarizuje. Výtok K⁺ indukuje pasivní výtok vody. Tyto změny vedou k poklesu turgoru a zavření průduchu.

Obrázek a popisek převzat z Plant biology, Garland Science (viz literatura).

Osmoprotektanty

Tvorba osmoprotektantů, které rostlinu chrání zejména při vysoké salinitě v půdě, je rovněž indukována pomocí ABA. Vysoký obsah solí (případně jiných osmoticky aktivních látek) v půdním roztoku je pro rostlinu problémem z hlediska příjmu vody. Tento vysoký obsah osmolytů totiž snižuje vodní potenciál v půdě, a tak komplikuje až znemožňuje příjem vody, který běžně probíhá po koncentračním spádu.

Osmoprotektanty jsou osmoticky aktivní látky tvořené rostlinou, aby pomohaly vyrovnat rozdíl koncentrací roztoků uvnitř a vně buňky. Tím se sníží vodní potenciál v rostlině, což vede k pasivnímu příjmu vody z půdy.

Z hlediska chemie se dají osmoprotektanty rozdělit do tří skupin: 1) betainy a příbuzné sloučeniny, 2) polyoly a cukry a 3) aminokyseliny (McNeil *et al.* 1999).

Betainy jsou deriváty aminokyselin, u nichž je atom dusíku plně metylován. Tři nejlépe prozkoumané rostlinné betainy jsou betainu glycinu, betainu prolinu a betainu β -alaninu (DMSP) (McNeil *et al.* 1999).

3.2. Genetika

Jak bylo uvedeno, zvýšení tolerance k vodnímu stresu je dosaženo mimo jiné úpravou genové exprese ve stresových podmínkách. K této modifikaci dochází na úrovni transkripční, prostřednictvím transkripčních faktorů i post-transkripční (epigenetické).

V odpovědi na stresovou situaci je zapojeno velké množství genů. Většina z těchto genů při stresu prokazuje zvýšenou expresi, některé však naopak sníženou. Působením transkripčních faktorů je zvýšena např. exprese genů pro zmíněné osmoprotektanty, aquaporiny, signální molekuly (sem se dá zařadit zmíněná ABA) a další transkripční faktory. Vyšší exprese transkripčních faktorů hraje zvláště důležitou úlohu, protože ty působí jako hlavní spouštěče exprese dalších genů, které přispívají ke tvorbě stresového fenotypu rostliny (Bartels & Souer, 2004). Zmíněnou kaskádu exprese transkripčních faktorů, které indukují mimo exprese funkčních proteinů také další transkripční faktory, spouští mimo jiné právě ABA.

Mezi geny se sníženou expresí patří např. geny zapojené do normálních fyziologických procesů růstu, a to nejspíše protože během stresové zátěže nemusí být rostlina schopna udržovat běžný růst.

4. Teplotní stres

Většina důležitých fyziologických procesů probíhajících v rostlině (metabolismus, růst) má vymezené teplotní optimum. Teplotní stres nastává v případě odchylek od těchto optimálních teplot a jeho účinky bývají pro rostlinu devastující (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

Zheng *et al.* (2011) uvádí, že klimatické stresy, které zahrnují působení příliš vysokých nebo příliš nízkých teplot jsou jedním z hlavních faktorů omezujících geografickou distribuci rostlin. Teplotní stres rovněž limituje výnosy kulturních plodin.

Můžeme rozlišit stres z vysoké teploty a stres z nízké teploty, jehož zvláštním případem je stres z mrazu. Stres z vysoké teploty je definován jako zvýšení teploty nad kritickou hodnotu, trvající dostatečně dlouho na to, aby nevratně poznamenal růst a vývoj rostliny (Wahid, 2007). Stres z nízké teploty je důsledkem vystavení rostliny teplotám dost nízkým na to, aby způsobily zranění, aniž by vznikaly krystalky ledu, zatímco stres z mrazu je spojen právě se zraněními vzniklými v důsledku tvorby ledových krystalů uvnitř rostlinných buněk (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

4.1. Adaptace

Výkyvy teplot ať už mírné, nebo drastické, jsou všudypřítomné a nevyhnutelné. Rostliny se k této situaci adaptovaly vyvinutím různých strategií, které jim umožňují teplotní stresy přežít bez poškození a narušení metabolických drah a fyziologických procesů.

Levitt (1980) uvádí, že tyto strategie mohou zahrnovat např. změny v morfologii, nebo preference různých mikrostanovišť a úpravy vlastní rostlinné fyziologie a biochemie.

Je zřejmé, že mechanismů adaptace rostlin k teplotnímu stresu je celá řada, podívejme se však konkrétně na změny probíhající v rámci buněčných membrán. Z hlediska ochrany fyziologie a biochemie má klíčový význam právě udržování integrity a tekutosti membrán, zejména membrány plazmatické a chloroplastové (Levitt, 1980).

Membrány

Buněčné membrány jsou složeny z glycerolipidů, jejichž vlastnosti se s měnící se teplotou rovněž mění. V reakci na změnu teploty mohou rostliny upravovat vlastnosti glycerolipidů, aby udržely integritu a optimální fluiditu (tekutost) svých biomembrán (Zheng *et al.*, 2011), a tak chránily metabolismus a fyziologii svých buněk.

Tyto dvě důležité vlastnosti membrán se mimo jiné odvíjí od tzv. stupně nenasycenosti glycerolipidů v membráně. Tímto stupněm nenasycenosti se rozumí poměr mezi nenasycenými a nasycenými glycerolipidy. Že je glycerolipid nenasycený znamená, že jeho zbytek mastné kyseliny obsahuje alespoň jednu dvojnou vazbu (nenasycená mastná kyselina). Vyšší podíl dvojných vazeb v jednotlivých glycerolipidech zvyšuje tekutost membrány.

Za adaptaci rostlin k teplotnímu stresu tedy můžeme považovat cílené upravování tohoto poměru mezi nenasycenými a nasycenými glycerolipidy v membránách. Jedná se o aktivní proces zprostředkovaný enzymy, který vyžaduje přísun energie.

Odpovědí na nízké teploty je zvýšení stupně nenasycenosti membránových glycerolipidů díky uplatnění komplexních biosyntetických pochodů (Harwood, 1998). Rostliny přizpůsobené k životu v chladných podmínkách mají v membránách vysoký obsah nenasycených lipidů, které vyrovnávají chladem sníženou tekutost membrány. Např. u pšenice roustoucí na chladných stanovištích činí obsah nenasycených lipidů až 80 % všech lipidů v membránách (Murakami *et al.*, 2000).

Miquel *et al.* (1993) uvádí, že *Arabidopsis* potřebuje ve svých membránách nenasycené glycerolipidy, aby byla schopná růstu a vývoje v nižších teplotách. Mutantní rostliny s nižším obsahem nenasycených lipidů, ač při kultivaci ve 22°C vykazovaly velmi podobné vlastnosti jako divoký typ, nedokázaly prodlužovat stonek při 12°C a při 6°C dokonce trpěly odumíráním listů.

Reakcí rostlin na vyšší teploty je naopak snížení nenasycenosti stavebních jednotek membrán (Zheng *et al.*, 2011). Úbytkem dvojných vazeb v lipidech je snižována tekutost membrány, která je působením vysokých teplot zvýšena.

Desaturace je děj, při kterém se za vzniku dvojných vazeb z nasycených mastných kyselin stávají nenasycené. Tento proces je zprostředkován enzymy desaturázami, které se nachází v endoplazmatickém retikulu a chloroplastech (Buchanan *et al.*, 2002). Opačný proces saturace, tedy změny mastných kyselin z nenasyceného do nasyceného stavu není ještě příliš prozkoumán.

Uvedená adaptace prostřednictvím změny stupně nenasycenosti lipidů v membráně má význam pouze při dlouhodobém přizpůsobení rostliny na chladné či horké stanoviště, nikoli při vyrovnávání se s krátkodobými výkyvy teploty (např. rozdíl teplot ve dne a v noci). Jak ukázali Zheng *et al.* (2011) na několika rostlinných druzích včetně *A. thaliana*, v reakci na krátkodobé výkyvy teplot sice dochází ke strukturálním změnám v rámci glycerolipidů, avšak stupeň nenasycenosti bývá udržován na stejné hladině. Důvodem je nejspíše fakt, že

desaturace nebo saturace vyžadují přísun energie a pro rostlinu by bylo nevýhodné tyto procesy provádět příliš často.

Heat shock proteins

Za další důležité přizpůsobení rostlin k vysokým teplotám může být považována syntéza tzv. heat shock proteinů (HSP). HSP jsou skupina bílkovin, které se kromě rostlin nacházejí i u většiny jiných organismů. Jejich hlavní funkcí je úloha molekulárních chaperonů – molekul, které svým působením zajišťují správnou strukturu a funkci jiných důležitých proteinů. HSP hrají roli při stresu ze zvýšené teploty, ale také za normálního fyziologického stavu.

Zvýšená produkce HSP je indukována zvýšenou teplotou, přičemž u každého druhu může být tato prahová teplota jiná a odvíjí se od normální teploty, ve které rostlina žije (např. u tropických obilnin dochází ke zvýšené produkci HSP při teplotě kolem 45 °C, zatímco u běžných druhů tato nastává už při teplotách kolem 35 °C) (Smith *et al.*, 2009). Syntéza těchto proteinů v reakci na teplotní šok je řízena především transkripčně a to konkrétně tzv. heat shock faktorem (HSF). HSF se ve stresových podmínkách váže na tzv. heat shock elementy (HSE) v promotoru genu pro HSP a tímto tento gen aktivuje k transkripci.

Regulace samotného HSF je velmi zajímavá. Zjednodušeně se dá říci, že úloha HSF je v normálních podmínkách potlačena vazbou tohoto faktoru na HSP, aby nemohl indukovat transkripci. Při stresu, když je zásoba HSP spotřebována při ochraně proteinů, se uvolněný HSF váže na HSE a indukuje tak transkripci a zvýšenou produkci HSP (Smith *et al.*, 2009).

5. Závěr

Adaptace rostlin k životu v prostředích s vyšší koncentrací těžkých kovů má značný význam z hlediska ekologie i zemědělství.

Ekologický význam spočívá hlavně v obsazování kontaminovaných stanovišť rezistentními druhy, které pak mohou těžké kovy akumulovat, snižovat jejich koncentraci v půdě, a tak zpřístupňovat dané stanoviště i druhům, které rezistencí nedisponují. Vysoký obsah kovových prvků v půdě může být přírodního původu, v poslední době však v důsledku industrializace lidské společnosti takto kontaminované půdy vznikají spíše uměle, např. jako pozůstatky těžby nebo průmyslové výroby.

Fytoremediace je cílené čištění kontaminovaných půd za pomoci rostlin, které nežádoucí prvky akumulují a imobilizují ve svých nadzemních částech a umožňují tak jejich eliminaci z prostředí v průběhu „sklizně“ těchto rostlin. Znalost mechanismů příjmu, akumulace a detoxifikace těžkých kovů a hlavně genů, které tyto procesy podmiňují může mít pro člověka velký význam. Umožňuje totiž upravovat již známé akumulující metalofyty, nebo geny pro akumulaci vnášet do jiných rostlin a tvořit tak ideální kandidáty pro fytoremediaci.

V zemědělství mohou být tyto poznatky využity naopak ke snížení akumulace těžkých kovů kulturními plodinami, protože vyšší koncentrace těchto prvků jsou rovněž pro člověka nezdavé.

Znalosti týkající se adaptace rostlin k těžkým kovům jsou pouze špičkou ledovce. Jedná se o velmi složitý proces, který stojí za další prozkoumání, protože skýtá mnoho možností využití, jak bylo uvedeno.

Znalost adaptace rostlin k vodnímu stresu je rovněž důležitá, a to zejména v zemědělství. Sucha se uvádí jako jeden z hlavních důvodů drastického snížení výnosu kulturních plodin a tedy i hladomor. Odolnost vůči nedostatku vody pozorovaná u některých divokých druhů, může být díky znalostem genetické stránky tohoto problému přenesena do kulturních plodin. Odolné kulturní plodiny by pak mohly být pěstovány i v místech, kde často nastává sucho, např. v některých rozvojových zemích.

A konečně odolnost rostlin vůči teplotnímu stresu má rovněž význam v zemědělství. V důsledku globální změny klimatu tento význam ještě roste, vznikají totiž čím dál víc extrémní teplotní podmínky. K udržení stávajících výnosů kulturních plodin, nebo k jejich vylepšení je nutné pochopení adaptace rostlin k neoptimálním teplotám a také znalost genetické stránky tohoto problému.

Na závěr bych chtěl uvést, že znalost odpovědi rostlin na rozmanité biotické či abiotické stresy obecně je velmi důležitá hlavně v zemědělství, ale i v jiných odvětvích. Člověk svou činností velmi mění přírodní podmínky panující na Zemi a zejména v posledním desetiletí se současný vývoj situace ukazuje jako neudržitelný z hlediska využívání obnovitelných i neobnovitelných přírodních zdrojů. V tomto neustále se zhoršujícím životním prostředí je třeba znát schopnost adaptace rostlin ke stále silnějším stresům, aby se alespoň stávající ekosystémy daly udržet.

6. Literatura

- Baker A. J. M.** 1981. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3. 643-654.
- Baker A. J. M.** 1987. Metal tolerance. *New Phytol.* 106. 93-111.
- Baker A. J. M. & Walker P. L.** 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants: Heavy metal uptake by tolerant plants. In: *Heavy Metal Tolerance in plants: Evolutionary Aspects.* CRC Press. Boca Raton. USA.
- Bartels D. & Souer E.** 2004. Molecular responses of higher plants to dehydration. In: *Plant Responses to Abiotic Stress.* Springer-Verlag. Berlin. Germany.
- Baxter I., Tchieu J., Sussman M., Boutry M., Palmgren M., Gribskov M., Harper J., Axelsen K.** 2003. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 132. 618-628.
- Bothe H.** 2011. Plants in heavy metal soils. In: *Detoxification of heavy metals.* *Soil Biology* 30. 35-57.
- Broadhurst C., Chaney R., Angle J., Maugel T., Erbe E., Murphy C.** 2004. Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes. *Environ. Sci. Technol.* 38. 5797-5802.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R.** 2002. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* John Wiley & Sons. Rockville. USA.
- Colzi I., Doumett S., Del Bubba M., Fornaini J., Arnetoli M., Gabbrielli R., Gonnelli C.** 2011. On the role of the cell wall in the phenomenon of copper tolerance in *Silene paradoxa* L. *Environ. Exp. Bot.* 72. 77-83.
- Colzi I., Arnetoli M., Gallo A., Doumett S., Del Bubba M., Pignattelli S., Gabbrielli R., Gonnelli C.** 2012. Copper tolerance strategies involving the root cell wall pectins in *Silene paradoxa* L. *Environ. Exp. Bot.* 78. 91-98.
- Dahlberg A.** 1997. Population ecology of *Suillus variegatus* in old Swedish Scots pine forests. *Mycol. Res.* 101. 47–54.
- Daszkowska-Golec A. & Szarejko I.** 2013. The Molecular Basis of ABA-Mediated Plant Response to Drought. In: *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture.* InTech. ISBN 978-953-51-1024-8.
- Di Baccio D., Galla G., Bracci T., Andreucci A., Barcaccia G., Tognetti R., Sebastiani L., Moshelion M.** 2011. Transcriptome analyses of *Populus x euramericana* clone I-214 leaves exposed to excess zinc. *Tree Physiol.* 31. 1293-1308
- Ernst W. H. O.** 1974. *Schwermetallvegetation der Erde.* *Geobotanica selecta.* Gustav Fischer. Stuttgart. Germany.

- Gartside D.W. & McNeilly T.** 1974. The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants II. Copper tolerance in normal populations of different plant species. *Heredity* 32. 335–348.
- Gendre D., Czernic P., Conejero G., Pianelli K., Briat J., Lebrun M., Mari S.** 2007. TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator *T. caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. *Plant J.* 49. 1-15.
- Hanikenne M., Talke I. N., Haydon M. J., Lanz C., Nolte A., Motte P., Kroymann J., Weigel D., Krämer U.** 2008. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature.* 453. 391-395.
- Harwood J. L.** 1998. *Plant Lipid Biosynthesis: Fundamentals and Agricultural Applications.* Cambridge University Press. New York. USA.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M.** 2013. Extreme Temperature Responses, Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants. In: *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture.* InTech. ISBN 978-953-51-1024-8.
- Huang G. & Wang Y.** 2010. Expression and characterization analysis of type 2 metallothionein from grey mangrove species (*Avicennia marina*) in response to metal stress. *Aquat. Toxicol.* 99. 86-92.
- Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27. 325-333.
- Kachout S. S., Ben Mansoura A., Leclerc J.C., Mechergui R., Rejeb M.N., Ouerghi Z.** 2009. Effects of heavy metals on antioxidant activities of *Atriplex hortensis* and *A. rosea*. *J. Food Agric. Environ.* 7. 938-945.
- Konno H., Nakashima S., Katoh K.** 2010. Metal-tolerant moss *Scopelophila cataractae* accumulates copper in the cell wall pectin of the protonema. *J. Plant Physiol.* 167. 358-364.
- Krämer U., Cotter-howells J., Charnock J., Baker A., Smith J.** 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature.* 379. 635-638.
- Levitt J.** 1980. *Responses of Plants to Environmental Stresses: Water, radiation, salt and other stresses.* Academic Press. New York. USA.
- Lisar S. Y. S., Motafakkerzad R., Hussain M. M., Rahman I. M. M.** 2012. Water Stress in Plants: Causes, Effects and Response. In: *Water Stress.* InTech. ISBN: 978-953-307-963-9.
- Maitani T., Kubota H., Sato K., Yamada T.** 1996. The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.* 110. 1145-1150.
- McNeil S. D., Nuccio M. L., Hanson A. D.** 1999. Betaines and Related Osmoprotectants. Targets for Metabolic Engineering of Stress Resistance. *Plant Physiol.* 120. 945-949.

- Mehes-Smith M., Nkongolo K., Cholewa E.** 2013. Coping Mechanisms of Plants to Metal Contaminated Soil. In: Environmental Change and Sustainability. InTech. ISBN: 978-953-51-1094-1.
- Mganga N. Manoko M. L. K., Rulangaranga Z. K.** 2011. Classification of plants according to their heavy metal content around north mara gold mine, Tanzania: Implication for phytoremediation. Tanzania J. Sci. 37. 109-119.
- Miquel M., James D., Dooner H., Browse J.** 1993. Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. P. Natl. Acad. Sci. USA. 90. 6208–6212.
- Mills R., Krijger G., Baccarini P., Hall J., Williams L.** 2003. Functional expression of AtHMA4, a ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. Plant J. 35: 164-176.
- Murakami Y., Tsuyama M., Kobayashi Y., Kodama H., Iba K.** 2000. Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. Science. 287. 476-479
- Osakabe Y., Kajita S., Osakabe K.** 2011. Genetic engineering of woody plants: current and future targets in a stressful environment. Plant Physiol. 142. 105-117.
- Pal R. & Raj J. P. N.** 2010. Phytochelatins: peptides involved in heavy metal detoxification. Appl. Biochem. Biotech. 160. 945-963.
- Palmiter R.** 1998. The elusive function of metallothioneins. P. Natl. Acad. Sci USA. 95. 8428-8430.
- Pence N., Larsen P., Ebbs S., Letham D., Lasat M., Garvin D., Eide D., Kochian L.** 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. P. Natl. Acad. Sci USA. 97. 4956-4960.
- Qin X. & Zeevaart J.** 1999. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. P. Natl. Acad. Sci USA. 96. 15354-15361.
- Roosens N. H. C. J., Willems G., Godé C., Courseaux A., Saumitou-Laprade P.** 2008. The use of comparative genome analysis and syntenic relationships allows extrapolating the position of Zn tolerance QTL regions from *Arabidopsis halleri* into *Arabidopsis thaliana*. Plant Soil. 306. 105–116.
- Salt D., Prince R., Baker A. J. M., Raskin I., Pickering I.** 1999. Zinc ligands in the metalhyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. Environ. Sci. Technol. 33. 713-717.
- Schat, H, Mercè, L, & Bernhard, R.** 2000. Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and nonhyperaccumulating metallophytes. In: Phytoremediation of Contaminated Soil and Water. CRC Press. Boca Raton. 171-188.
- Schroeder J. I., Kwak J. M., Allen G. J.** 2001. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. Nature. 410. 327-30.

- Smith A. M., Coupland G., Dolan L., Harberd N., Jones J., Martin C., Sablowski R., Amey A.** 2009. *Plant biology*. Garland Science. New York. USA.
- Still E. R. & Williams R. J. P.** 1980. Potential methods for selective accumulation of nickel (II) ions by plants. *J. Inorg. Biochem.* 13. 35-40.
- Tan B. C., Schwartz S. H., Zeevaart J. A., McCarty D. R.** 1997. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *P. Natl. Acad. Sci USA.* 94. 12235–12240.
- Tong Y., Kneer R., & Zhu Y.** 2004. Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends Plant Sci.* 9. 7-9
- Wahid A.** 2007. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *J. Plant Res.* 120. 219-228.
- Wenzel W., Bunkowski M., Puschenreiter M., Horak O.** 2003. Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environ. Pollut.* 123. 131-138.
- Whiting S. N., Leake J. R., McGrath S. P., Baker A. J. M.** 2000. Positive responses to Zn and Cd by roots of the Zn and Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.* 145. 199-210
- Willems G., Dräger D. B., Courbot M., Godé C., Verbruggen N., & Saumitou-laprade P.** 2007. The Genetic Basis of Zinc Tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): An Analysis of Quantitative Trait Loci. *Genetics.* 176. 659-674.
- Wong H., Sakamoto T., Kawasaki T., Umemura K., Shimamoto K.** 2004. Downregulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiol.* 135. 1447-1456.
- Xie H. L., Jiang R. F., Zhang F. S., McGrath S. P., Zhao F. J.** 2009. Effect of nitrogen form on the rhizosphere dynamics and uptake of cadmium and zinc by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil.* 318. 205-215.
- Xiong J., He Z., Liu D., Mahmood Q., Yang X.** 2008. The role of bacteria in the heavy metals removal and growth of *Sedum alfredii* Hance in an aqueous medium. *Chemosphere.* 70. 489-494.
- Yang X., Feng Y., He Z., Stoffella P.** 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Bio.* 18. 339-353
- Yang Z. & Chu C.** 2011. Towards Understanding Plant Response to Heavy Metal Stress. In: *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. InTech. ISBN: 978-953-307-394-1.
- Yong C., & Ma L. Q.** 2002. Metal tolerance, accumulation and detoxification in plants with emphasis on arsenic in terrestrial plants. In: *Biogeochemistry of Environmentally Important Trace Elements*. American Chemical Society.

- Zelko I., Lux A., Czibula K.** 2008. Difference in the root structure of hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and non-hyperaccumulator *Thlaspi arvense*. *Int. J. Environ. Pollut.* 33. 123–132.
- Zheng G., Tian B., Zhang F., Tao F., Li W.** 2011. Plant adaptation to frequent alterations between high and low temperatures: remodelling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels. *Plant Cell Environ.* 34. 1431-1442.
- Zhou Z. S., Zeng H. Q., Liu Z. P., Yang Z. M.** 2012. Genome-wide identification of *Medicago truncatula* microRNAs and their targets reveals their differential regulation by heavy metal. *Plant Cell Environ.* 35. 86-99.

7. Příloha



Obrázek 3 – *Arabidopsis halleri*
Autor fotografie: Hermann Schachner



Obrázek 4 – *Thlaspi caerulescens*
Převzato z Elektronického herbáře Jaroslava Racka (<http://www.e-herbar.net>)



Obrázek 5 – *Silene vulgaris*
Autor fotografie: Michael Gasperl



Obrázek 6 – *Silene vulgaris* rostoucí na měďové haldě
Autor fotografie: Mgr. Zdeněk Kubát, Ph.D.