

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**



Molekulární biologie a biochemie organismů

**Jan Macek**

Modifikace chromatinu a malé regulační RNA v souvislosti s intergenerační a transgenerační  
stresovou pamětí rostlin: experimenty na rostlinách vystavených suchu  
Chromatin modifications and small regulatory RNA in plant intergenerational and  
transgenerational stress memory: experiments in plants subjected to drought

Bakalářská práce

Doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Praha, 2024

### *Poděkování*

Rád bych poděkoval svojí školitelce docentce Daně Holé za její skvělé rady a úžasnou spolupráci při psaní a opravování této bakalářské práce.

### **Prohlášení:**

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

V Praze, 25.4. 2024

Podpis

## **Abstrakt**

Voda je nezbytná pro mnoho životně důležitých procesů a při jejím nedostatku jsou rostliny stresovány. Pokud rostliny stres suchem přežijí, mohou být na následná období sucha lépe přizpůsobeny. Toto přizpůsobení je definováno jako stresová paměť, která se udrží po určitou dobu po zažití stresu, a může být přenášeno i do potomstva, které je pak na nepříznivé podmínky lépe adaptováno. V tom případě se jedná o tzv. inter- nebo transgenerační paměť, která je zřejmě zprostředkována pomocí modifikací chromatinu nebo nekódujícími RNA. V této práci jsem shrnul a diskutuji původní studie zabývající se molekulární podstatou tohoto jevu u suchem stresovaných rostlin, zejména s ohledem na různé metodické aspekty. Je zřejmé, že způsoby, jakými jsou chromatinové modifikace udržovány napříč generacemi, jsou komplexní. Informací k tomuto tématu je ale v současnosti málo, týkají se téměř výhradně pouze metylace DNA, jsou neúplné a rozporné. Do budoucna bude pro pochopení tohoto tématu třeba nejenom vylepšit metody analýzy epigenetických modifikací (a věnovat se i histonovým modifikacím), ale i zlepšit celkový design experimentů (hodnocené generace pěstované v stresových/kontrolních podmínkách, ověření sucha, počet opakování) a cíleně se věnovat i analýze faktorů, které stresovou paměť rostlin mohou ovlivnit (studované druhy a jejich genotypy, způsob simulace/trvání/načasování sucha, vývojové stádium, pletivo pro získání vzorků atp.).

## **Klíčová slova**

Intergenerační paměť; malé nekódující RNA; metodické aspekty experimentů; metylace DNA; stresová paměť rostlin; sucho; transgenerační paměť

## **Abstract**

Water is important for many vital processes, and a lack of water in plants causes drought stress. In case plants survive drought, they can be better adapted for subsequent drought periods. This is defined as stress memory, which will last for a certain period after the stress ended, and can even be transmitted to offspring to help it deal with stressful environment. In such case it is called an inter- or transgenerational stress memory and is probably mediated by chromatin modifications or non-coding RNAs. In this thesis, I collected and discussed original papers dealing with the molecular basis of this phenomenon in drought-stressed plants, focusing mostly on various methodical aspects. It is evident that the maintenance of chromatin modifications across generations is quite a complex process. Currently available information is still scarce, concerns mostly DNA methylation, is incomplete and conflicting. To better understand this topic in the future, the methods of analysis of these modifications need to be adjusted (and focus also on histone modifications), the general design of the experiments has to be improved (analysed generations subjected to stress/control conditions, drought verification, number of replicates) and some factors that can affect plant stress memory should be purposefully examined (plant species and genotypes, way/duration/time of drought simulation, developmental stage, sampled tissue, etc.).

## **Keywords**

DNA methylation; drought; intergenerational memory; methodical aspects of experiments; plant stress memory; small noncoding RNAs; transgenerational memory

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Intergenerační a transgenerační paměť rostlin v souvislosti se suchem .....	4
2.1. Intergenerační stresová paměť <i>sensu stricto</i> .....	5
2.2. Intergenerační klonální stresová paměť .....	11
2.3. Transgenerační stresová paměť .....	15
3. Diskuze .....	23
4. Závěr .....	29
5. Seznam literatury .....	30

# 1. Úvod

Rostliny, na rozdíl od většiny živočichů, žijí přisedle, a všechny zdroje, které potřebují, získávají na místě, kde se zakořenily. Mezi látky, které rostliny přijímají, patří i voda, která je nezbytná pro většinu biochemických procesů nutných k životu. Voda je nutná například pro fotosyntézu, dýchání a udržení normálního osmotického tlaku v těle rostliny, a za normálních podmínek tvoří voda 80-95 % váhy rostliny. V případě nepříznivých podmínek se obsah vody v těle rostliny snižuje, což způsobuje stres.

Sucho patří mezi abiotické stresory, a výrazně ovlivňuje všechna vývojová stadia rostliny, od klíčení po tvorbu semen. Stres suchem bývá často spojen i se stresem z horka, kdy se rostliny snaží šetřit vodou, ale zároveň musí chladit listy transpirací, aby přežily. Mezi hlavní účinky sucha patří snížení obsahu vody v těle rostliny, což vede k snížení osmotického tlaku, snížení intenzity fotosyntézy, narušení expanze a dělení buněk, denaturaci proteinů v buňkách a poškození membrán. Stres suchem rovněž způsobuje problémy v biochemických procesech, kde nedostatečný přísun vody může vést ke zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů. Tyto radikály jsou za normálních podmínek zneškodňovány antioxidanty, ale při nadměrné produkci poškozují různé buněčné složky, což vede k buněčné smrti. U dostatečně intenzivního stresu může toto poškození vést až ke smrti rostliny (Hasanuzzaman et al., 2013).

Pro člověka je stres suchem nejvýznamnější v sektoru zemědělství, kde sucho způsobuje každoročně největší škody – např. až 34 % veškerých zemědělských ztrát v Africe mezi lety 2008-2019 (FAO, 2021). Intenzivní sucho zpomaluje růst plodin a snižuje jejich výtěžky, což může v budoucnu způsobit rozsáhlé hladomory. Na výnosy zemědělských plodin má stres suchem různý vliv, obecně jej snižuje mezi 30-92 % (Hussain et al., 2019). Např. při 40% snížení obsahu vody se snížil výnos pšenice o 20,6 %, zatímco u kukuřice to bylo o 39,3 % (Daryanto et al., 2016).

Dlouhodobý intenzivní stres suchem působí rostlinám nenávratné škody, které vedou k jejich smrti, ale většina rostlin zažívá spíše kratší pulzy sucha, na které se mohou adaptovat/aklimovat. Existují tři hlavní strategie, jak se rostliny mohou adaptovat nebo aklimovat na sucho. Některé rostliny mají velmi rychlé životní cykly právě proto, aby se vyhnuly nejhorším suchům („drought escape“). Jiné rostliny zvyšují efektivitu využívání vody díky zvětšení kořenového systému, snížení transpirace, případně snížení velikosti nadzemních částí rostliny („drought avoidance“). Třetí strategie spočívá ve zvýšené tvorbě osmoprotektantů a jiných molekul chránících proteiny, a upravení osmotické rovnováhy („drought resistance“) (Kooyers, 2015)

V přírodě je poměrně běžné, že se rostliny setkávají s nedostatkem vody během svého života opakovaně. V případě opakovaného stresu pak rostliny někdy reagují lépe na další stresové události po prvotním stresu, což je definováno jako stresová paměť. Řada studií stresové paměti rostlin se věnuje tzv. somatické stresové paměti. Ta je dědičná mitoticky, ale vydrží maximálně do konce života stresovaného organismu (Bilichak & Kovalchuk, 2016; Sadhukhan et al., 2022). Při somatické stresové paměti se mohou uplatňovat různé metabolity obsažené v buňkách, např. osmolyty (prolin, sacharidy, atp.), nebo fytohormony, jako např.

kys. abscisová (Lagiotis et al., 2023; Sadhukhan et al., 2022). S tímto typem stresové paměti může souviset např. i zvýšení a udržení zvýšené hladiny antioxidantů v listech a kořenech, jak bylo popsáno např. u cukrové třtiny při opakovaném stresu suchem (Marcos et al., 2018).

Somatická stresová paměť může být v rostlině zprostředkována také regulací exprese tzv. paměťových genů, které podle informací z dřívější stresové události reagují na další období stresu. Tyto paměťové geny se dělí podle reakce na první a opakovaný stres do čtyř skupin. Expese tzv. [+ , +] genů se indukuje víc a víc po každé stresové události; u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* L. je čtvrtina těchto genů asociována s odpovědí na abiotické stresory a kyselinu abscisovou. Tzv. [+ , -] geny mají silnou odpověď na první stres, ale při dalších stresových událostech se jejich odpověď snižuje; u *A. thaliana* často kódují membránové proteiny. Tzv. [- , -] geny mají sníženou expresi již u prvního stresu, a další stresové události jejich expresi dále snižují. U *A. thaliana* se často jedná o geny kódující ribosomální a chloroplastové proteiny. Poslední skupina, tzv. [- , +] geny mají sníženou expresi u prvního stresu, ale zvýšenou u dalších stresových událostí. U *A. thaliana* tyto geny často souvisí s funkcí chloroplastů a membrán (Ding et al., 2013).

Expresi paměťových genů mohou regulovat chromatinové modifikace, které takto mohou zprostředkovat stresovou paměť a tudíž být považovány za epigenetické. Mezi tyto modifikace patří například metylace DNA a histonové modifikace. Tyto modifikace fungují na úrovni transkripce, kde způsobují rozvolnění či kompakci chromatinu, což napomáhá či brání transkripčnímu aparátu, aby provedl samotnou transkripci. Kromě toho se na vzniku stresové paměti nejspíš účastní i nekódující RNA (ncRNA) účinkující jak na transkripční, tak na posttranskripční úrovni např. při procesu RNA interference (Bilichak & Kovalchuk, 2016; Sadhukhan et al., 2022).

Metylace DNA je v jaderném genomu rostlin téměř vždy na páté pozici cytosinu, a je svým účinkem závislá na kontextu, tedy není vždy jednoznačné, jestli metylace na daném místě bude aktivovat nebo reprimovat transkripci. Metylace se v rostlinách vyskytuje ve třech sekvenčních kontextech: CG, CHG a CHH, kdy H je A, C, nebo T (Sadhukhan et al., 2022; Zhang et al., 2018) Metylace jaderného genomu je udržována pomocí DNA metyltransferáz. U *A. thaliana* je CG metylace udržována metyltransferázou MET1, CHG metylace vzniká a je udržována CMT3 nebo CMT2 a metylace na CHH pomocí DRM2 společně s tzv. RdDM (RNA-dependentní DNA metylace) dráhou (Bewick & Schmitz, 2017). Studie Wang et al. (2011) zjistila, že sucho u dvou kultivarů rýže způsobilo průměrně změnu 12,1 % metylovaných pozic, přičemž změny metylace závisely na genotypu, vývojovém stadiu a dokonce i orgánu rostliny. 29 % změn metylace bylo zachováno i po přechodu na normální vodní režim rostlin. Mezi nejčastěji používané metody měření metylace DNA u rostlin patří např. (obvykle celogenomová) bisulfitová konverze následovaná většinou sekvenováním, nebo také různé modifikace AFLP („amplified fragment length polymorphism“) techniky, využívající metylačně citlivé restriční endonukleázy (restriktázy). Existují však i další možnosti analýzy DNA, ať už na úrovni celého genomu nebo ve specifických místech (Agius et al., 2023; Meudt & Clarke, 2007; Sun & Zhu, 2022).

Dalším epigenetickým mechanismem jsou modifikace histonů, mezi které patří například metylace, acetylace, fosforylace, nebo ubikvitinylace. Tyto modifikace se nejčastěji vyskytují

na lysinu nebo argininu N-koncových částí histonů H2A, H2B, H3, případně i H4, a jsou velmi důležité pro rozvolnění či kompakci chromatinu. U *A. thaliana* jsou např. modifikace H3K4me3 (trimetylace lysinu 4 na histonu H3) a H3K9ac (acetylace lysinu 9 na histonu H3) prokazatelně korelovány s aktivací genů během stresu suchem (Kim et al., 2008). Značka H3K9ac byla po rehydrataci rostlin velmi rychle odstraněna, ale H3K4me3 přetrvávala i 5 hodin po rehydrataci, tudíž by tato modifikace mohla u *A. thaliana* fungovat jako paměťová značka (Kim et al., 2012). Studie Ding et al. (2012) tuto hypotézu testovala na opakovaně stresovaných rostlinách *A. thaliana*. Na paměťových genech těchto rostlin se zachovávala určitá hladina H3K4me3 i během rehydratace, a během třetí rehydratace byla hladina H3K4me3 srovnatelná s hladinou během prvního stresu suchem. Na genech, které nemají paměťovou funkci, se hladina H3K4me3 postupně nezvyšovala, což podle autorů potvrdilo význam modifikace histonů na paměťových genech (Ding et al., 2012). Mezi metody měření histonových modifikací patří například využití specifických protilátek, nebo různé varianty hmotnostní spektrometrie (Villar-Garea & Imhof, 2006).

Do poslední skupiny hlavních epigenetických mechanismů patří ncRNA. Tato skupina RNA nekóduje žádné proteiny, ale ovlivňuje různými způsoby genovou expresi jak na úrovni transkripce, tak na posttranskripční úrovni. Při stresové paměti rostlin zřejmě mohou hrát důležitou roli lncRNA, což jsou >200 nt dlouhé molekuly se specifickou regulační funkcí, dále miRNA, což jsou obvykle 21-24 nt krátké molekuly, které jsou vytvářeny z delších vláskovitých transkriptů, a možná i siRNA, což jsou podobně krátké molekuly, které jsou vytvářeny z dsRNA a u rostlin fungují např. jako primární ochrana proti virovým infekcím (Gelaw & Sanan-Mishra, 2021). Příkladem lncRNA uplatňující se při stresu suchem je například DRIR u *A. thaliana*. Mutant se zvýšenou expresí DRIR byl více rezistentní vůči stresu suchem, a v případě oddělení listu od rostliny tento mutant schnul pomaleji než kontrola (Qin et al., 2017) miRNA mohou být v odezvě rostlin na sucho rovněž důležité. Studie Akdogan et al. (2016) zkoumala, jak se mění exprese miRNA u pšenice při stresu suchem simulovaném aplikací polyetylénglykolu (PEG) po dobu 24 hodin. Microarray RNA analýza ukázala, že 285 miRNA mělo jinou expresi oproti kontrole v listech a 244 miRNA v kořenech. Nejvíce miRNA jak v listech, tak v kořenech, mělo funkci v metabolických drahách a v biosyntéze sekundárních metabolitů (Akdogan et al., 2016). Kromě microarray analýz se k analýze ncRNA u rostlin např. běžně používají i metody sekvenování nové generace, případně lze využít i tzv. „ribosome profiling“ (Liu et al., 2017).

Při meióze se většina epigenetických značek smaže, ale některé ji přežijí a přenesou se do další generace. Mechanismus, jakým tento přenos funguje, ani které modifikace jsou přeneseny a které jsou smazány, není zatím znám. Tomuto způsobu dědičnosti se říká intergenerační nebo transgenerační paměť (Bilichak & Kovalchuk, 2016; rozdíl mezi těmito dvěma typy stresové paměti viz dále). Zatímco v případě somatické stresové paměti u rostlin vystavených během jejich života opakovanému suchu již bylo provedeno poměrně dost experimentů zaměřených na studium možných molekulárních/biochemických mechanismů tohoto jevu (viz např. přehledové články Bäurle, 2018; Bäurle & Trindade, 2020; Bruce et al., 2007; Lämke & Bäurle, 2017), v případě intergenerační nebo transgenerační paměti je k dispozici dosud jen poměrně málo informací. Studie, které tento typ paměti u rostlin stresovaných nedostatkem vody popisují, se často zaměřují jen na popis morfologických a



fyziologických znaků, ale ne na možné molekulární mechanismy (např. Alsdurf et al., 2013; Hatzig et al., 2018; Herman et al., 2012; Kambona et al., 2023; Nosalewicz et al., 2016; Racette et al., 2020; Tabassum et al., 2017; Wijewardana et al., 2019). Tato bakalářská práce má tedy za cíl shrnout současný stav informací o modifikacích chromatinu a malých regulačních RNA právě v souvislosti s intergenerační a transgenerační stresovou pamětí rostlin (se zaměřením pouze na stres suchem), a kriticky rozebrat různé aspekty příslušných experimentů.

## **2. Intergenerační a transgenerační paměť rostlin v souvislosti se suchem**

Práce Lämke & Bäurle (2017) navrhla definici intergenerační paměti jako paměti první generace potomstva nezasazené stresem, a transgenerační paměti jako paměti alespoň druhé stresem nezasazené generace potomstva, přičemž stres působil na původní rodičovskou generaci (Lämke & Bäurle, 2017). V případě intergenerační paměti by efekty pozorované u potomstva mohly být vyvolané modifikacemi chromatinu, ale mohly by vzniknout např. i v důsledku maternálních efektů nesouvisejících s chromatinovými značkami. V případě transgeneračních efektů se dají předpokládat čistě epigenetické vlivy. Bohužel tato definice není univerzální a mnoho článků používá různé definice, z nichž nejčastější bývá ta, že veškerá stresová paměť alespoň přes jednu generaci (tj. jiná než somatická) je automaticky nazývána transgenerační. Mnoho článků použitých v této práci má titul „Transgenerational“ i přesto, že se ve skutečnosti o pravou transgenerační paměť nejedná, a i proto jsou v této práci využity jiné definice pojmů „transgenerační“ a „intergenerační.“ V této práci je intergenerační paměť definována jako paměť, která je vytvořena stresem v první generaci (G0) a v další generaci (G1) se měří zachování této paměti (resp. chromatinových modifikací nebo exprese ncRNA) na nestresovaných rostlinách potomstva. Transgenerační paměť je definována jako paměť, která je vytvořena buď opakovaným stresováním několika generací rostlin za sebou a příslušným měřením u poslední generace potomstva, nebo stresováním rostlin generace G0 a měřením modifikací alespoň ob jednu generaci (tedy minimálně G2). Speciálním případem je klonální paměť, kdy se rostliny nerozmnožují pohlavně, ale nepohlavně. V tomto případě se klony (oddělené od původní mateřské rostliny a znovu vysazené) dají považovat za další generaci potomstva, ale chybí meióza, která by epigenetické značky vymazala.

V následujícím textu shrnuji výsledky příslušných studií s ohledem na to, zda se jednalo o paměť intergenerační (případně intergenerační klonální) či transgenerační, a dále s ohledem na experimentální design související jak s celkovým uspořádáním experimentů, tak s měřením změn metylace DNA či exprese ncRNA. Podle toho jsou uspořádány i další části této práce. Hlavní experimentální aspekty příslušných studií jsou vždy shrnuty ve formě tabulek (Tab. 1-3), výsledky a případně další důležité aspekty prací a závěry autorů jsou komentovány v textu.

## 2.1. Intergenerační stresová paměť *sensu stricto*

Jedná se o pět studií lišících se jak hodnocenými epigenetickými mechanismy, tak řadou dalších experimentálních aspektů. Ve všech případech vzniklo hodnocené G1 potomstvo pohlavním rozmnožováním rostlin G0 generace.

**Tab. 1.** Hlavní metodické aspekty původních studií věnujících se epigenetickým modifikacím jako možným mechanismům intergenerační stresové paměti rostlin *sensu stricto* (tj. paměti spojené s pohlavním rozmnožováním / tvorbou gamet) v souvislosti se stresem suchem. Ve sloupci „Rostlina“ je uveden studovaný druh i údaje o použitém genotypu/ekotypu apod. Ve sloupci „Generace“ jsou uvedeny údaje o generačním designu experimentů: generacích potomstva odvozených z původní rodičovské G0 generace a o tom, zda byly vystaveny stresovým (S) nebo kontrolním (K) podmínkám; varianty, u nichž byla stanovena metylace DNA nebo exprese ncRNA (nebo na ně bylo působeno demetylačním agens), jsou vždy vyznačeny silně a červeně. Ve sloupci „Pěstování/sucho“ jsou uvedeny konkrétní údaje o pěstování pokusných rostlin a to, zda byl nějak ověřen vodní stav stresovaných pokusných rostlin. Ve sloupci „Vzorky“ jsou uvedeny konkrétní údaje o stáří pokusných rostlin, orgánu/pletivu, v němž byly měřeny epigenetické modifikace, a počtu biologických opakování pro stanovení metylace DNA nebo exprese ncRNA. Ve sloupci „Epigenetika“ jsou údaje o tom, zda a jakou metodou byla měřena metylace DNA, případně změny v expresi ncRNA. *MS-AFLP ... metylačně citlivá AFLP analýza, PCR ... polymerázová řetězová reakce.*

Rostlina	Generace	Pěstování/sucho	Vzorky	Epigenetika	Studie
<i>Arabidopsis thaliana</i> L.; ekotyp Landsberg(er)	<b>G0 (S) → G1 (K nebo S) → z varianty G1 (S) → G2 (K); popis v kap. 2.3</b>  G0 (K) → <b>G1 (K) → G2 (K); popis v kap. 2.3</b>	Rostliny pěstovány v růstových komorách (16/8 h fotoperioda, ozáření 450 μmol/m <sup>2</sup> /s, teplota 21-23 °C)  Simulace sucha sníženou relativní vlhkostí vzduchu v komoře (cca 45 % u suchem stresovaných rostlin a cca 65 % u kontroly) po celou dobu růstu G0 rostlin. Potomstvo pěstováno buď v kontrolních podmínkách nebo též simulace sucha  Ověření vodního stavu rostlin žádné	U potomstva celá nadzemní část ve stadiu prvního pravého listu, u rodičů celá nadzemní část včetně dospělých listů  3 opakování experimentu, v každém extrakce DNA z cca 12 rostlin	Metylace DNA: bisulfitová konverze následovaná PCR (2 konkrétní amplikony)  Expres malých ncRNA: microarray analýza	Tricker et al., 2013
<i>Boechera stricta</i> (Graham) Al-Shehbaz; 5 populací z USA (Black Hills, Severní Dakota)	G0 (S1 nebo S2; viz <i>vedlejší sloupec</i> ) → <b>G1 (K nebo S1)</b>  G0 (K) → <b>G1 (K nebo S1)</b>	Rostliny pěstovány v růstové komoře, v květináčích (16/8 h fotoperioda, 100 W a 1500 mA žárovky, teplota 24/19 °C)  Simulace sucha u G0 rostlin buď pouze ve stadiu bazální listové růžice (S1), nebo ve stadiu bazální růžice a během rozmnožování (S2), a to menším a méně častým zaléváním (přesnější údaje neuvedeny; sledováno vážením rostlin a sledováním rychlosti růstu) Potomstvo pěstováno buď v kontrolních podmínkách nebo též za simulace sucha (pouze během stadia bazální rozety = S1)  Ověření vodního stavu rostlin rodičů v této studii žádné, u potomstva měřena efektivita využití vody jako diskriminace izotopu C <sup>13</sup> (+ hmotnost sušiny rostlin a rychlost růstu)	Listy, stáří rostlin neuvedeno  2 opakování pro každou variantu, v každém extrakce DNA z 15-20 rostlin	Metylace DNA: MS-AFLP	Alsdurf et al., 2016

Tab. 1 - pokračování

Rostlina	Generace	Pěstování/sucho	Vzorky	Epigenetika	Studie
<i>Polygonum persicaria</i> L.; 12 geneticky odlišných linií z 5 populací z USA	G0 (S) → <b>G1 (S)</b>  G0 (K) → <b>G1 (S)</b>	Rostliny G0 pěstovány ve skleníku v květináčích, vlhkost zeminy nejprve 100 % maximální polní kapacity, poté simulace sucha (42 % polní kapacity/kontrola 84 %) po celý zbytek pěstování. G1 potomstvo pěstováno v růstové komoře (14/10 h fotoperioda, ozáření 500 μmol/m <sup>2</sup> /s, teplota 25/18 °C) při polní kapacitě zeminy cca 40 %  Ověření vodního stavu přímo na rodičovských rostlinách žádné, u potomstva pouze stanovení některých morfologických parametrů	<i>Methylace DNA/ncRNA neměřeny</i> , morfologické parametry stanoveny v celé nadzemní části; stáří rostlin 21 dní	Methylace DNA/ncRNA neměřeny, pouze na polovinu semen G0 (tj. G1 generaci potomstva) aplikován 45 μM zebularin (demetylační agens)	Herman & Sultan, 2016
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>durum</i> (Desf.) Husn.; 2 kultivary – DBA Aurora, L6	G0 (S) → <b>G1 (K)</b>  G0 (K) → <b>G1 (K)</b>	Rostliny pěstovány ve skleníku v květináčích s písčitém substrátem (u G0 12/12 h fotoperioda, teplota 22/12 °C, u G1 16/8 h fotoperioda, teplota 24/18 °C)  Simulace sucha v G0 generaci omezením zalévání (obsah vody substrátu 6 % = poloviční polní kapacita) od začátku metání do dospělosti + ve stadiu kvetení též stres vysokou teplotou (37/27 °C po dobu 1 dne). Údaje o vlhkosti substrátu u potomstva neuvedeny  Ověření vodního stavu rostlin v této studii žádné, v předchozí studii měřen relativní obsah vody v listech a vodivost průduchů	Celá nadzemní část; stáří rostlin 12 dní  Počet opakování neuveden	Analýza miRNA: sekvenování	Liu et al., 2020
<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>durum</i> (Desf.) Husn.; 2 kultivary – DBA Aurora, DBA Artemis	G0 (S) → <b>G1 (K nebo S)</b>  G0 (K) → <b>G1 (K nebo S)</b>	Rostliny pěstovány ve skleníku v květináčích s písčitém substrátem (12/12 h fotoperioda, teplota 22/12 °C)  Simulace sucha omezením zalévání (obsah vody v substrátu 6 % = poloviční polní kapacita; kontrola 12 %, tj. plná polní kapacita) od začátku metání do dospělosti + ve stadiu kvetení též stres vysokou teplotou (37/27 °C po dobu 1 dne)  Ověření vodního stavu rodičovských rostlin v této studii žádné, v předchozí studii měřen relativní obsah vody v listech a vodivost průduchů, v této studii u potomstva měřena rychlost transpirace	Praporcový list a vyvíjející se semena; rostliny 5 dnů po začátku fáze kvetení  Počet opakování neuveden	Analýza miRNA: sekvenování	Liu et al., 2021

Práce **Tricker et al. (2013)** je zařazena jak do této části, tak (stručně) do části věnované transgenerační paměti. Věnovala se metylaci DNA ve dvou konkrétních genech v rostlinách *A. thaliana* pěstovaných v podmínkách nízké relativní vzdušné vlhkosti, a měřila ji jak v první generaci potomstva (G1; popsáno v této kapitole) tak v následující (G2; popsáno v kapitole 2.3). Produkt prvního z těchto genů, *SPEECHLESS (SPCH)*, reguluje u *A. thaliana* první asymetrické dělení při vzniku průduchů (MacAlister et al., 2007). Produkt druhého genu, *FAMA*, reguluje u *A. thaliana* diferenciaci buněk na průduchy (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006). Práce navazuje na předchozí práci ze stejné laboratoře (Tricker et al., 2012), která studovala hypermetylaci DNA na stejných dvou genech, která byla rovněž indukována stresem nízkou relativní vlhkostí, ale pouze v rámci jedné generace (tedy se jednalo o somatickou paměť). Metylace způsobená stresem byla v této první studii na obou genech zprostředkována RdDM, ale na každém genu byla hypermetylace asociována s jinými siRNA. Na *SPCH* byla metylace asociována s indukcí 24 nt siRNA na transponovatelných elementech downstream od tohoto genu, zatímco na *FAMA* byla asociována s 21 nt siRNA. Pro zhodnocení intergenerační, resp. transgenerační dědičnosti (Tricker et al., 2013) byly vybrány na základě první studie dva genové úseky u obou genů, u genu *FAMA* to byly úseky *FAMAA* (část genu asociovaná s 21 nt siRNA a úsek, kde začínala stresem indukovaná metylace) a *FAMAB* (část genu obsahující počátek transkripce a zhruba 90 bp dlouhý úsek upstream). Oba tyto úseky byly u stresovaných rostlin hypermetetylované. U *SPCH* to byly úseky *SPCHA* (počátek transkripce) a *SPCHB* (downstream od *SPCHA*). *SPCHA* byl u stresovaných rostlin hypometetylovaný, ale *SPCHB* byl hypermetetylovaný. U nestresovaných potomků stresovaných rodičů se míra metylace u všech čtyř úseků příliš nezměnila (tedy by bylo možné prohlásit, že se z rodičů zdědila do potomstva), ale zatímco u obou úseků *SPCH* byla nízká tzv. míra entropie, vyjadřující to, zda metylace potomstva může být předpovězena na základě metylace rodičů, u obou úseků *FAMA* tomu tak nebylo (v tomto případě tedy nebylo možné říct, jestli metylace *FAMA* byla zděděná od stresovaných rodičů). V případě, že bylo potomstvo stresovaných rodičů rovněž stresované, tak se situace obrátila: *FAMA* byl metetylovaný na místech, na kterých byli metetylovaní i stresovaní rodiče, zatímco u *SPCHB* byla metylace nepředvídatelná. Autoři stanovili i expresi obou genů na úrovni jejich mRNA. V porovnání s nestresovanými rostlinami byla exprese *SPCH* i *FAMA* u potomků stresovaných rodičů snižena v případě, kdy potomci nebyli stresovaní, ale zase naopak zvýšená v případě, že byli stresovaní. U všech typů rostlin byla analyzována i exprese malých ncRNA (sRNA). Pokud byla libovolná generace stresována poprvé, stres vedl ke zvýšené expresi sRNA oproti kontrole, ale tato exprese byla nižší, pokud byl stres intergenerační (zde se týkala pouze 24 nt dlouhých sRNA, nikoli 21 nt dlouhých sRNA) a sRNA byly téměř nedetekovatelné u stresovaných potomků se stresovanými rodiči. Exprese siRNA asociovaných se *SPCH* byla pozitivně korelována s metylací DNA a negativně s expresí *SPCH*. Žádná taková korelace se ale nevyskytovala u *FAMA*. Práce (Tricker et al., 2013) tedy dokázala, že metylace DNA způsobená stresem spojeným s nízkou relativní vlhkostí vzduchu může být dědičná, ale záleží na konkrétním genu a jeho částech. Autoři se domnívají, že existuje více mechanismů, jakými tato dědičnost může být způsobena (metylace DNA, sRNA). Tyto různé mechanismy podle autorů společně přispívají k transkripční flexibilitě odpovědi rostlin na stres suchem. Transgenerační aspekt této studie (tj. změny v metylaci DNA v generaci G2) je zmíněn v kapitole 2.3 (Tricker et al., 2013).

I práce **Alsdurf et al. (2016)** navazovala na předchozí práci z příslušného pracoviště (Alsdurf et al., 2013), která se zabývala limity rozšíření brukvovité rostliny *Boechea stricta* ((Graham) Al-Shehbaz). Tato práce zjistila, že rozšíření této horské byliny je limitováno dvěma faktory, a to predací a suchem. V případě, že by se rostliny měly rozšířit do nižších poloh, potřebovaly by vyšší koncentrace glukosinolátů, aby se ubránily před herbivory. Na to, aby se rozšířily mimo limity svých populací, ale nepotřebují jenom glukosinoláty, ale i ochranu proti suchu, protože prostředí, ve kterém rostou, je relativně suché. Oba faktory by mohly být podle autorů v *B. stricta* pravděpodobně regulovány epigeneticky, nejvýznamněji nejspíše pomocí DNA metylace (Alsdurf et al., 2013). Cílem navazující studie bylo tedy zjistit, do jaké míry je produkce těchto faktorů epigeneticky ovlivněna a do jaké míry ovlivňují epigenetické faktory rozšíření populací této rostliny. Autoři měřili metylaci DNA v nestresovaném i stresovaném G1 potomstvu stresovaných G0 rodičů pomocí MS-AFLP („methylation sensitive AFLP“) Analýza MS-AFLP dat ukázala, že metylace DNA stresovaných rodičů se zřejmě do jisté míry přenáší i na potomstvo, přičemž byly rozdíly podle toho, ve kterém vývojovém stadiu / jak dlouho byli rodiče stresováni suchem, a rozdíly mezi metylací DNA u potomstva stresovaných versus nestresovaných rodičů byly výraznější v případě, že potomstvo bylo nestresované (tedy pravá intergenerační dědičnost) než když bylo stresované. Byl rovněž identifikován konkrétní lokus, který je podle autorů významný ve vzájemné regulaci sucha a ochrany proti herbivorům. Methylace tohoto lokusu, pojmenovaného lokus 314 (autorům se bohužel nepodařilo jej dále analyzovat a zjistit jeho sekvenci), měla opačný trend u jedinců s vysokou hladinou glukosinolátů a jedinců s vyšší efektivitou využívání vody. Lokus 314 by tedy mohl být u *B. stricta* významným koregulátorem obrany proti suchu a herbivorům (Alsdurf et al., 2016). Podle autorů by se teoreticky dalo očekávat, že by epigenetické modifikace mohly napomáhat se zvětšováním limitů rozšíření populací tím, že je přenesou přes limitující faktory, ale v této práci bylo zjištěno, že *Boechea stricta* je v dalším rozšíření epigenetickými faktory zřejmě limitována kvůli koregulátorům, jakým je např. lokus 314 (Alsdurf et al., 2016).

V práci **Herman & Sultan (2016)** byla rodičovská (G0) generace rdesna *Polygonum persicaria* (L.) stresována suchem, a na G1 potomstvu se sledoval účinek sucha po cílené demethylaci jejich DNA (ošetření zebularinem, což je demetylační agens). Přesto, že to není studie splňující pravou definici intergenerační stresové paměti (potomstvo bylo pěstováno pouze ve stresových podmínkách), a navíc nebyly bohužel měřeny změny metylace DNA jako takové, pro úplnost ji zde rovněž zahrnuji. Tři hypotézy autorů této práce byly: 1) pokud zvýšená investice do semen zprostředkovává intergenerační odpověď na suchu, potomstvo suchem stresovaných rodičů by mělo mít větší semena než u jedinců pěstovaných za normálních podmínek. 2) Pokud DNA metylace zajišťuje adaptaci na suchu, demetylování potomci by neměli mít žádné adaptace na suchu způsobené stresem v rodičovské generaci, a zároveň by demethylace neměla výrazně ovlivnit ani potomstvo rodičovských rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách. 3) Pokud jsou vzorce metylace DNA různé u různých genotypů, adaptace potomstva na suchu bude různá u různých genetických linií. Zkoumáním hmotnosti a velikosti semen bylo zjištěno, že suchu nemělo u *P. persicaria* žádný vliv na zvýšenou investici parentální generace do semen, ale potomstvo suchem stresovaných rodičů mělo průměrně o 20 % delší kořenové systémy, o 23 % větší plochu listů a o 16 % více

biomasy než stresované potomstvo nestresovaných rodičů. V případě, že bylo potomstvo stresovaných rodičů ošetřeno zebularinem, bylo jeho přizpůsobení se na sucho horší, než u potomstva nestresovaných rodičů, přičemž ošetření rostlin zebularinem neprodloužilo klíčení, takže rostliny nebyly časově znevýhodněny (nebo na ně nepůsobily případné škodlivé efekty zebularinu déle). Podle jedné z původních hypotéz autorů by demetylace měla odstranit adaptace potomků vytvořené stresem v parentální generaci (tedy by demetylované stresované potomstvo stresovaných rodičů mělo mít podobné fenotypy jako stresované potomstvo rodičů pěstovaných za normálních podmínek). Demetylace DNA ale měla u potomstva stresovaných rostlin větší účinky a demetylované rostliny byly hůře adaptované na stres suchem, což tuto hypotézu vyvrací. Podle autorů tento efekt může být způsoben přílišnou metylační kompenzací parentálního sucha, což paradoxně rostliny potomstva po demetylaci oslabí. Sucho v rodičovské generaci rovněž ovlivnilo každý genotyp různě, v 11 liniích bylo průměrné zvýšení biomasy u semenáčků o 5,8-48,8 %, u 12. linie byla biomasa snížena o 4,7 %. V liniích, kde bylo pozorováno vyšší zvýšení biomasy u rostlin bez aplikace zebularinu to bylo často korelováno s vyšším snížením biomasy u rostlin s aplikací zebularinu. Každý genotyp tedy nejspíš využil pro adaptaci na sucho v rodičovské generaci jinou míru metylace svého genomu, přičemž nejvíce citlivé rostliny pravděpodobně měly nejvíce metylovaný genom, zatímco tolerantním rostlinám stačilo pro adaptaci pouze málo epigenetických modifikací (Herman & Sultan, 2016).

Poslední dvě původní studie týkající se možných molekulárních mechanismů intergenerační paměti na stres suchem se nevěnují metylaci DNA, ale expresi ncRNA. Práce **Liu et al. (2020)** se zabývala vlivem kombinace stresu suchem a vysokou teplotou v parentální generaci na klíčení a vitalitu potomstva. Rostliny tedy byly vystaveny dvěma stresům, které mohou velmi pravděpodobně působit na rostliny v přírodě (buď současně, nebo jeden za druhým). Tato analýza byla provedena na dvou kultivarech pšenice *Triticum turgidum* L. ssp *durum* ((Desf.) Husn) (dále jen *T. durum*). Prvním kultivarem byla komerčně dostupná DBA Aurora, která je tolerantní vůči stresu suchem a vysokou teplotou, zatímco druhý kultivar, L6, je na oba tyto stresory citlivý. Kromě vlivem kombinace stresů na fyziologické a morfologické znaky se práce zabývala i vlivem na expresi ncRNA, konkrétně miRNA a siRNA. Stres v parentální generaci pozitivně působil na potomstvo u obou kultivarů, měly průměrně vyšší hmotnost i délku kořenů a větší hmotnost nadzemních částí rostlin. Potomci DBA Aurory ale byli oproti potomkům L6 lepší téměř ve všech měřených morfologických a fyziologických parametrech, ať už pocházeli z rodičů pěstovaných v kontrolních podmínkách, nebo ze stresovaných rostlin. Autoři našli více než 1300 diferencně exprimovaných miRNA (rozdíly mezi potomstvem stresovaných a kontrolních rostlin + rozdíly mezi oběma kultivary). U potomstva stresovaných rostlin kultivaru DBA Aurora byla exprese většiny miRNA zvýšená oproti potomstvu kontrolních rostlin (275 více exprimovaných, 181 méně), u L6 tomu bylo naopak (153 více exprimovaných miRNA, 242 méně exprimovaných miRNA). miRNA tedy mohou být mechanismem intergenerační stresové paměti, ale změny jejich exprese a jejich konkrétní typy závisí na genotypu příslušného rostlinného druhu. Autoři Liu et al. (2020) v souvislosti i s jinými studiemi uvádějí, že jedním z důvodů rozdílné exprese miRNA u obou kultivarů by mohla být přirozená tolerance na stresy u kultivaru DBA Aurora, který tedy nemusí příliš omezovat svoje buněčné procesy pro přežití stresu. Analýza diferencně

exprimovaných miRNA pomocí Gene Ontology (GO) zjistila, že cílové geny pro tyto miRNA v kategorii biologických procesů souvisely nejvíc s regulací transkripce, replikace, fosforylací proteinů, redoxními procesy, transmembránovým transportem a signalizací. V kategorii buněčných komponent souvisely nejvíce s plazmatickou membránou, cytoplazmou, a chloroplasty. V kategorii molekulárních funkcí souvisely nejvíce s vazbou proteinů, ATP, DNA a kovových iontů (Liu et al., 2020).

Práce **Liu et al. (2021)** navazuje na práci Liu et al. (2020) ze stejné laboratoře, která je shrnuta výše. Tato práce se rovněž věnuje vlivu intergeneračního stresu kombinace sucha a vysokých teplot na fyziologické vlastnosti a schopnosti potomstva dvou komerčně dostupných kultivarů *T. durum*, a to opět DBA Aurora a DBA Artemis, který je tolerantní vůči stresu způsobenému vysokou teplotou. Kromě znaků jako obsah chlorofylu, rychlost transpirace, výška rostlin a obsah proteinů a škrobu v semenech zde byl pomocí celogenomového sekvenování opět analyzován miRNAom, a byly identifikovány páry miRNA-mRNA, které mohou být asociovány s intergenerační stresovou pamětí. Analýza miRNA v praporcovém listu a ve vyvíjejících se semenech zjistila, že exprese miRNA v listu byla více ovlivněná u potomstva pocházejícího ze stresovaných rodičů (buď rovněž stresovaného nebo nestresovaného), zatímco u miRNA z vyvíjejících se semen zjistila přesný opak (exprese byla více ovlivněná u potomstva nestresovaných rodičů). Exprese miRNA byla rovněž ovlivněna více u potomstva, které samo bylo vystavené stresu, ať už pocházelo ze stresovaných nebo nestresovaných rodičů. Genová analýza zjistila, že exprese strukturálních genů jak v praporcovém listu, tak ve vyvíjejících se semenech byla více ovlivněna u potomstva stresovaných rodičů (ve srovnání s potomstvem nestresovaných rodičů) a potomstva jakýchkoli rodičů pěstovaného v kontrolních podmínkách (ve srovnání se stresovaným potomstvem), tedy přesný opak oproti miRNA. Podobně jako u miRNA byla u potomstva stresovaných rodičů větší tkáňová specifita genové exprese. Analýza miRNA-mRNA párů s antagonistickými vzory (snížená miRNA exprese proti zvýšené mRNA expresi nebo naopak) ukázala, že u potomstva nestresovaných rodičů bylo 100 antagonistických miRNA-mRNA párů v praporcovém listu a 359 párů ve vyvíjejících se semenech. U potomstva stresovaných rostlin to bylo 400 párů v praporcovém listu a 344 ve vyvíjejících se semenech. Pomocí KEGG databáze bylo zjištěno, že u potomstva kontrolních rostlin souvisely mRNA v rámci těchto párů v praporcovém listu nejčastěji s biosyntézou aminoacyl-tRNA, fotosyntézou, endocytózou a metabolismem glyoxylátů a dikarboxylátů; ve vyvíjejících se semenech souvisely páry nejčastěji se zpracováváním proteinů v endoplazmatickém retikulu. U potomstva stresovaných rostlin souvisely páry v praporcovém listu s metabolismem glyoxylátů a dikarboxylátů, fixací uhlíku a s interakcí rostlin a patogenů, zatímco ve vyvíjejících se semenech souvisely nejčastěji s transportem RNA. Výrazné změny v expresi miRNA podle autorů naznačují, že se nejspíš jedná o důležitý mechanismus pro adaptaci rostlin na mezigenerační stres. Konkrétní miRNA-mRNA páry identifikované v této studii potom mohou být důležité body pro regulaci odpovědi na stres, nicméně mohou být různé v závislosti na tom, o jaký orgán se jedná a zda je i potomstvo původně stresovaných rostlin vystavené stresu nebo ne (Liu et al., 2021).

## 2.2. Intergenerační klonální stresová paměť

Jedná se o čtyři studie pocházející ze stejné laboratoře a provedené na stejném druhu rostliny: jetelu *Trifolium repens* L. S výjimkou studie González et al. (2018) zbylé tři práce sledovaly pouze různé morfologické znaky u klonálního potomstva rostlin G0 generace vystavených demetylačnímu činidlu 5-azacytidinu, nikoliv přímo změny metylace DNA nebo expresi ncRNA. Existují ještě studie Münzbergová et al. (2019) a Kosová et al. (2022), kde byly podobným způsobem podrobeny ošetření 5-azacytidinem rostliny *Festuca rubra* L. pocházející ze „suchých“ a „vlhkých“ klimatických podmínek (v kombinaci s podmínkami vyšší/nízké teploty), ale protože u populací ze „suchých“ podmínek nelze striktně říct, že skutečně byly suchem stresovány, tyto studie jsem do své bakalářské práce nezařadil.

**Tab. 2.** Hlavní metodické aspekty původních studií věnujících se epigenetickým modifikacím jako možným mechanismům klonální intergenerační stresové paměti rostlin v souvislosti se stresem suchem. Ve sloupci „Rostlina“ je uveden studovaný druh i údaje o použitém genotypu/ekotypu apod. Ve sloupci „Generace“ jsou uvedeny údaje o generačním designu experimentů: generacích potomstva odvozených z původní rodičovské G0 generace a o tom, zda byly vystaveny stresovým (S) nebo kontrolním (K) podmínkám; varianty, u nichž byla stanovena metylace DNA nebo na ně bylo působeno demetylačním agens, jsou vždy vyznačeny silně a červeně. Ve sloupci „Pěstování/sucho“ jsou uvedeny konkrétní údaje o pěstování pokusných rostlin a to, zda byl nějak ověřen vodní stav stresovaných pokusných rostlin. Ve sloupci „Vzorky“ jsou uvedeny konkrétní údaje o stáří pokusných rostlin, orgánu/pletivu, v němž byly měřeny epigenetické modifikace, a počtu biologických opakování pro stanovení metylace DNA nebo exprese ncRNA. Ve sloupci „Epigenetika“ jsou údaje o tom, zda a jakou metodou byla měřena metylace DNA, případně změny v expresi ncRNA. *MS-AFLP ... metylačně citlivá AFLP analýza*

Rostlina	Generace	Pěstování/sucho	Vzorky	Epigenetika	Studie
<i>Trifolium repens</i> L.; 1 genotyp z ČR	<b>G0 (S1-S4 nebo K) → G1 (K)</b>	Rostliny pěstovány na tácech se směsí písku, kompostu a rašeliny ve skleníku (16/8 h fotoperioda, teplota 22/15 °C). Po měsíci pěstování v normálních podmínkách G0 rostliny rozděleny na kontrolu a 4 stresové režimy (S1-S4).  Sucho simulováno v pulsech – vždy, když rostliny začaly vadnout, byly zality cca 200 ml vody. Režim S1 = intenzivní dlouhodobé sucho (23 pulzů sucha po dobu 4 měsíců), režim S2 = intenzivní krátkodobé sucho (9 pulzů sucha po dobu 2 měsíců), režim S3 = dlouhodobé středně silné sucho (12 pulzů sucha po dobu 4 měsíců), režim S4 = krátkodobé středně silné sucho (5 pulzů sucha po dobu 2 měsíců).  Po skončení stresových režimů rostliny ponechány v normálních podmínkách 14 dní, poté z nich odebrány odnože (G1 potomstvo) a transplantovány na nové tácy  Ověření vodního stavu rostlin pouze vizuální (rostliny byly mezi pulsy sucha povadlé).	<i>Methylace DNA/ncRNA neměřeny, morfologické parametry stanoveny v celé nadzemní části rostlin starých 2 měsíce od transplantace</i>  15 rostlin od každé varianty = opakování	Methylace DNA/ncRNA neměřeny, pouze na polovinu rostlin G0 aplikován 50 µM 5-azacytidin (demetylační agens) každé 4 dny (poslední aplikace při skončení simulace sucha)	González et al., 2016



Tab. 2 - pokračování

Rostlina	Generace	Pěstování/sucho	Vzorky	Epigenetika	Studie
<i>Trifolium repens</i> L.; 4 genotypy (blíže neurčené) ze stejného místa v ČR, ale rodičovské rostliny odebrány ve vzdálenosti alespoň 100 m od sebe	<b>G0 (S nebo K) → G1 (K nebo S)</b>	<p>Rostliny pěstovány na tácech se směsí písku, kompostu a rašeliny ve skleníku (16/8 h fotoperioda, teplota 22/15 °C). Po měsíci pěstování v normálních podmínkách G0 rostliny rozděleny na kontrolu a stres</p> <p>Sucho simulováno v pulsech – vždy, když rostliny začaly vadnout, byly zality cca 200 ml vody. G0 rostliny zažily 14 pulsů sucha, po skončení stresu byly pěstovány dalších 20 dní v kontrolních podmínkách, poté z nich odebrány odnože (G1 potomstvo) a transplantovány na nové tácy. G1 byly po 14 dnech pěstování v normálních podmínkách udržovány v parentálním nebo neparentálním vodním režimu, přičemž stresované G1 rostliny zažily 7 pulsů sucha.</p> <p>Ověření vodního stavu rostlin pouze vizuální (rostliny byly mezi pulzy sucha povadlé).</p>	<p><i>Metylace DNA/ncRNA neměřeny</i>, morfologické parametry stanoveny v celé nadzemní části rostlin starých 2 měsíce od transplantace</p> <p>7 rostlin od každé varianty = opakování</p>	<p>Metylace DNA/ncRNA neměřeny, pouze na polovinu rostlin G0 aplikován 50 μM 5-azacytidin (demetylační agens) každé 4 dny (poslední aplikace při skončení simulace sucha)</p>	González et al., 2017
<i>Trifolium repens</i> L.; 5 genotypů (blíže neurčených) ze stejného místa v ČR	G0 (S1-S4 nebo K) → <b>G1 (K)</b>	<p>Rostliny pěstovány na tácech se směsí písku, kompostu a rašeliny ve skleníku (16/8 h fotoperioda, teplota 22/15 °C?). Po měsíci pěstování v normálních podmínkách G0 rostliny rozděleny na kontrolu a 4 stresové režimy (S1-S4).</p> <p>Sucho simulováno v pulsech – vždy, když rostliny začaly vadnout, byly zality cca 200 ml vody. Režim S1 = intenzivní dlouhodobé sucho (23 pulsů sucha po dobu 4 měsíců), režim S2 = intenzivní krátkodobé sucho (9 pulsů sucha po dobu 2 měsíců), režim S3 = dlouhodobé středně silné sucho (12 pulsů sucha po dobu 4 měsíců), režim S4 = krátkodobé středně silné sucho (5 pulsů sucha po dobu 2 měsíců).</p> <p>Po skončení stresových režimů rostliny ponechány v normálních podmínkách 14 dní, poté z nich odebrány odnože (G1 potomstvo) a transplantovány na nové tácy</p> <p>Ověření vodního stavu rostlin pouze vizuální (rostliny byly mezi pulsy sucha povadlé).</p>	<p>2 plně vyvinuté listy z nejmladší a nejstarší rostliny potomstva příslušné varianty; rostliny staré 2 měsíce</p> <p>5 rostlin od každé varianty = opakování</p>	<p>Metylace DNA: MS-AFLP</p>	González et al., 2018

Tab. 2 - pokračování

Rostlina	Generace	Pěstování/sucho	Vzorky	Epigenetika	Studie
<i>Trifolium repens</i> L.; 3 genotypy (blíže neurčené) ze stejného místa v ČR, ale rodičovské rostliny odebrány ve vzdálenosti alespoň 50 m od sebe	<b>G0 (S1-S4 nebo K) → G1 (K)</b>	<p>Rostliny pěstovány na tácech se směsí písku, kompostu a rašeliny ve skleníku (12/12 h fotoperioda, teplota 23/18 °C). Po prvních 14 dnech pěstování v normálních podmínkách G0 rostliny rozděleny na kontrolu a 4stresové režimy (S1-S4)</p> <p>Sucho simulováno v pulzech – vždy, když rostliny začaly vadnout, byly zality cca 200 ml vody (rostliny průměrně zažily 10 pulzů sucha). Kontrola zalévána dvakrát častěji a vždy čtyřikrát větším množstvím vody. Režim S1 = osmitýdenní skupina (rostliny byly vystaveny suchu ihned a 8 týdnů před transplantací rostlin potomstva začaly být opět normálně zalévány), režim S2 = šestitýdenní skupina (simulace sucha trvala stejně dlouho, ale začala o 2 týdny později než v S1 a byla ukončena 6 týdnů před transplantací rostlin potomstva), režim S3 = čtyřtýdenní skupina (simulace sucha trvala stejně dlouho, ale začala o 2 týdny později než v S2 a byla ukončena 4 týdny před transplantací rostlin potomstva) a režim S4 = dvoutýdenní skupina (simulace sucha trvala stejně dlouho, ale začala o 2 týdny později než v S3 a byla ukončena 2 týdny před transplantací rostlin potomstva).</p> <p>Po skončení stresových režimů rostliny vždy ponechány v normálních podmínkách, poté z nich odebrány odnože (G1 potomstvo) a transplantovány na nové tácy, na nichž pěstovány dva a půl měsíce</p> <p>Ověření vodního stavu rostlin pouze vizuální (rostliny byly mezi pulzy sucha povadlé).</p>	<p><i>Methylace DNA/ncRNA neměřeny, morfologické parametry stanoveny v celé nadzemní části rostlin starých 10 týdnů</i></p> <p>Počet opakování neuveden</p>	<p>Methylace DNA/ncRNA neměřeny, pouze na polovinu rostlin G0 generace aplikován 100 μM 5-azacytidin (demetylační agens) každé 4 dny (začátek na začátku S1 režimu, celkem aplikován 32krát)</p>	Quan et al., 2022

V práci **González et al. (2016)** byly parentální rostliny vystaveny pěti různým režimům simulace sucha během jejich růstu, a některé byly rovněž vystaveny 5-azacytidinu (demetylační agens). Účinky těchto různých režimů pěstování rodičovských rostlin byly poté sledovány na morfologických parametrech rodičů a klonálního potomstva. Na růst rostlin v parentální generaci měly některé stresové režimy velký vliv, největší negativní vliv na růst mělo dlouhodobé středně silné sucho. Při aplikaci 5-azacytidinu na G0 rostliny byl vliv sucha

na růst ještě výraznější, avšak právě kromě režimu dlouhodobé středně silné sucha, kde 5-azacytidin neměl už na růst žádný další negativní efekt. Biomasa hlavní odnože (považované za rodičovskou generaci) byla u většiny režimů zvýšená. Počet odnoží, tedy klonálního potomstva, byl stresovým režimem ovlivněn: u krátkodobého středně silného sucha byl zvýšen, u ostatních režimů byl buď stejný nebo nižší než u kontroly. Celková biomasa potomstva byla rovněž změněna stresovými režimy, nejnižší byla u rostlin s parentálním režimem krátkodobého intenzivního sucha, zatímco největší biomasa byla u rostlin s parentálním režimem krátkodobého středně silného sucha. Oba tyto efekty ale zmizely po aplikaci 5-azacytidinu, který biomasu potomstva všech stresových režimů vyrovnával. Podle autorů souvisí efekty stresových režimů s fenoménem otužování rostlin vůči stresům, tedy formou somatické stresové paměti spojenou s odpovědí rostlin na mírně nebo středně intenzivní stres. Mírně nebo středně intenzivní stres je pro rostliny signál nadcházejícího silného stresu, proto tedy mají rostliny tendenci se při mírném nebo středním stresu epigeneticky přizpůsobit. Intenzivní stres ale poškozuje fyziologii rostliny, která pak nemá možnost zapojit svoje epigenetické dráhy do ochrany před stresem (González et al., 2016).

Práce **González et al. (2017)** navazovala na předchozí práci ze stejné laboratoře, která je shrnuta výše. Tato práce zkoumala vliv intergeneračního stresu suchem na morfologické znaky čtyř blíže neurčených genotypů *T. repens*. Podobně jako v předchozí práci byl na některé rostliny aplikován 5-azacytidin (demetylační agens). Na rozdíl od předchozí práce ze stejné laboratoře byly ale sledovány rozdíly na potomstvu, které bylo rovněž stresované (potomstvo bylo vystaveno parentálnímu, nebo neparentálnímu vodnímu režimu). V druhé části práce byl sledován intergenerační vliv exogenní aplikace kyseliny jasmonové, ale tato část není pro moji bakalářskou práci relevantní. U třech genotypů zvýšil stres suchem biomasu, zatímco u čtvrtého genotypu stres suchem biomasu snížil. Pokud byla rodičovská generace vystavena suchu, zvýšilo to průměrné množství odnoží, které vytvořilo její potomstvo, to ale bylo rovněž ovlivněno vodním režimem, kterému potomstvo bylo vystaveno, a genotypem: u jednoho genotypu pozitivně, u ostatních třech negativně. Průměrná biomasa potomstva se rovněž lišila mezi potomstvem zažívající parentální či neparentální vodní režim: výrazné zmenšení, pokud byli rodiče vystaveni suchu a potomstvo bylo pěstováno v kontrolních podmínkách. Rodičovský vodní režim naopak neměl vliv na průměrnou biomasu potomstva, pokud bylo potomstvo vystaveno stresu suchem. Aplikace 5-azacytidinu na rodičovské rostliny průměrně snížila růst jejich odnoží, tedy G1 klonálního potomstva. Aplikace 5-azacytidinu také snížila rozdíly v biomase způsobené parentálním vodním režimem. Stresované potomstvo mělo v tom případě menší celkovou biomasu oproti nestresovanému, ale tento efekt byl snížen tehdy, pokud potomstvo zažívalo stejný vodní režim jako rodiče. Podle autorů je zajímavé, že biomasa potomstva stresovaných rodičů byla velmi podobná v případech, kdy bylo potomstvo stresováno i nestresováno. Podle autorů to poukazuje na určitou limitaci fenotypové plasticity, která by mohla rostlinám ublížit v případě, že by extrémně reagovala na dočasné změny v prostředí. Rostliny musí „zvažovat“, jestli případné stresové podmínky budou přetrvávat i do dalších generací, a podle toho vytvořit epigenetické modifikace. Přílišná reaktivita by rostlině ublížila ve stabilním prostředí, zatímco nedostatečná by jí ublížila v měnícím se prostředí (González et al., 2017).

Práce **González et al. (2018)** navazovala na předchozí práce ze stejné laboratoře, které jsou shrnuty výše, přičemž experimenty byly postaveny stejně jako ve studii González et al. (2016), ale bez aplikace 5-azacytidinu. Naopak ale byla stanovena přímo metylace DNA, a to pomocí metody MS-AFLP. Druhá část práce, věnovaná vlivu různých stresorů na intergenerační paměť potomstva, vůbec nesouvisí s molekulárními epigenetickými mechanismy a zde ji proto nerozebírám. MS-AFLP analýza zjistila pouze to, že metylační profil rostlin potomstva, jehož rodiče byli stresováni krátkodobým středně intenzivním suchem, se výrazněji lišil od kontroly a ostatních stresových režimů (González et al., 2018).

Práce **Quan et al. (2022)** rovněž navazovala na předchozí práce shrnuté výše v této kapitole. V této studii byl sledován vliv různě načasovaného stresu suchem u rodičovské generace třech genotypů *T. repens* na intergenerační stresovou paměť potomstva, přičemž polovina parentálních rostlin byla opět ošetřena 5-azacytidinem. Podobně jako v předchozích studiích ze stejné laboratoře se tato práce zaměřuje pouze na morfologické účinky rodičovského stresu suchem. Hypotézy v této práci byly: 1) Stres suchem pozmění růst rodičovské generace (sníží biomasu nebo počet odnoží). 2) Tato stresem indukovaná změna způsobí změnu fenotypu v potomstvu, síla této odezvy ale bude záležet na době uplynuté od konce stresu, který zažila parentální generace. 3) Tato stresová paměť se přenáší do potomstva pomocí DNA metylace, tudíž se bude lišit potomstvo rostlin ošetřených a neošetřených 5-azacytidinem. Biomasa rodičovských rostlin se skutečně lišila jak mezi genotypy, tam mezi variantami načasování stresu (rostliny měly větší biomasu, pokud zažily stres dříve). Počet vytvořených odnoží (tj. G1 klonálního potomstva) byl vyšší v případě, že byla parentální generace zasažena suchem než pokud suchu vystavena vůbec nebyla (nezávisle na začátku/konci sucha, ale závisle na genotypu). Aplikací 5-azacytidinu byla zvýšena průměrná biomasa a byl snížen počet odnoží u potomstva, efekt 5-azacytidinu ale závisel na genotypu v kombinaci s efektem načasování sucha u rodičů (tj. u každého genotypu byl největší efekt pokaždé pozorován u jiného režimu načasování sucha) (Quan et al., 2022).

### 2.3. Transgenerační stresová paměť

S výjimkou studie Morgado et al. (2017) vlastně žádná z prací popsaných v této kapitole nespĺňuje striktní definici transgenerační paměti podle Lämke & Bäurle (2017), protože v nich sice byly sledovány modifikace chromatinu, resp. exprese ncRNA, v pozdějších generacích potomstva než G1, ale mezigenerace potomstva původně stresovaných rostlin byly vždy znovu vystaveny simulaci sucha. V pracích Zheng et al. (2013, 2014, 2017) navíc nebyly ekvivalentním způsobem připraveny pozdější generace potomstva nestresovaných rostlin G0 generace. Ani práce Morgado et al. (2017) však úplně nevyhovuje, protože potomstvo v ní studované vzniklo apomiktickým rozmnožováním. Přesto jsem všechny tyto studie zařadil do této kapitoly, protože to jsou jediné dostupné práce věnující se transgenerační paměti u rostlin v souvislosti se suchem alespoň v hrubším smyslu.

**Tab. 3.** Hlavní metodické aspekty původních studií věnujících se epigenetickým modifikacím jako možným mechanismům transgenerační stresové paměti rostlin v souvislosti se stresem suchem. Ve sloupci „Rostlina“ je uveden studovaný druh i údaje o použitém genotypu/ekotypu apod. Ve sloupci „Generace“ jsou uvedeny údaje o generačním designu experimentů: generacích potomstva odvozených z původní rodičovské G0 generace a o tom, zda byly vystaveny stresovým (S) nebo kontrolním (K) podmínkám; varianty, u nichž byla stanovena metylace DNA nebo exprese ncRNA, jsou vždy vyznačeny silně a červeně. Ve sloupci „Pěstování/sucho“ jsou uvedeny konkrétní údaje o pěstování pokusných rostlin a to, zda byl nějak ověřen vodní stav stresovaných pokusných rostlin. Ve sloupci „Vzorky“ jsou uvedeny konkrétní údaje o stáří pokusných rostlin, orgánu/pletivu, v němž byly měřeny epigenetické modifikace, a počtu biologických opakování pro stanovení metylace DNA nebo exprese ncRNA. Ve sloupci „Epigenetika“ jsou údaje o tom, zda a jakou metodou byla měřena metylace DNA, případně změny v expresi ncRNA. Studie Tricker et al. (2013) zde již není znovu zařazena, její metodické aspekty jsou popsány v Tab. 1. *MS-AFLP ... metylačně citlivá AFLP analýza, RNA-seq ... sekvenování RNA*

Rostlina	Generace	Pěstování/sucho	Vzorky	Epigenetika	Studie
<i>Arabidopsis thaliana</i> L.; ekotyp Columbia (nebo C24? z údajů v práci není zřejmé)	G0 (S) → <b>G1 (S) → G2 (K nebo S)</b>  G0 (K) → <b>G1 (K) → G2 (K)</b>	Rostliny pěstovány v půdě, pravděpodobně v růstové komoře (12/12 h fotoperioda, ozáření 100 μmol/m <sup>2</sup> /s, teplota 22 °C)  Simulace sucha vždy zastavením zalévání od 7. do 30. dne po vyklíčení  Ověření vodního stavu rostlin žádné	Listy; 21 dní staré rostliny  3 opakování pro každou variantu	Methylace DNA: cytosine-extension assay	Boyko et al., 2010
<i>Oryza sativa</i> L.; kultivary II-32B, Huhan-3	<b>G0 (S) →</b> G1 (S) → G2 (S) → G3 (S) → G4 (S) → G5 (S) → <b>G6 (K nebo S)</b>  <b>G0 (K)</b>	Rostliny G0-G5 pěstovány za polních podmínek do stádia odnožování před koncem vegetativní fáze. Poté simulace sucha až do stádia plnění semen (zastavením zalévání? není zřejmé!). Vždy sebrána semena a toto opakováno po následujících 5 generací až do vytvoření semen pro G6. Rostliny G0 a G6 poté pěstovány v růstové komoře (12/12 h fotoperioda, ozáření 200 μmol/m <sup>2</sup> /s, teplota 29/21 °C, relativní vlhkost vzduchu 75-80 %), u rostlin G6 navíc simulace sucha pomocí aplikace 20% PEG 6000 na 3 týdny staré rostliny po dobu 1 týdne.  Ověření vodního stavu rostlin žádné	Listy (všechny?); 28 dní staré rostliny  3 opakování pro každou variantu (v každém izolaci DNA z 8 rostlinek), ale vzorky ze všech opakování smíchány	Methylace DNA: MS-AFLP	Zheng et al., 2013

Tab. 3 - pokračování

Rostlina	Generace	Pěstování/sucho	Vzorky	Epigenetika	Studie
<i>Oryza sativa</i> L.; kultivar Huhan-3	<b>G0 (S)</b> → G1 (S) → G2 (S) → G3 (S) → G4 (S) → G5 (S) → <b>G6</b> <b>(K)</b>	Rostliny G0-G5 pěstovány za polních podmínek do stádia odnožování před koncem vegetativní fáze, stres suchem poté simulován až do stádia plnění semen ( <i>zastavením zalévání? není zřejmé!</i> ). Vždy sebrána semena a toto opakováno po následujících 5 generací až do vytvoření semen pro G5. Rostliny G0 a G6 poté pěstovány v růstové komoře (12/12 h fotoperioda, ozáření 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , teplota 29/21 °C, relativní vlhkost vzduchu 75-80 %).  Ověření vodního stavu rostlin vizuální (maximální rolování listů) a měřením relativního obsahu vody v listech (u stresovaných rostlin nižší než 70 %).	Listy ( <i>všechny?</i> ); rostliny ve vývojovém stadiu třetího nebo čtvrtého listu (21 a 28 dní staré rostliny)  3 opakování pro každou variantu (v každém izolaci DNA z 8 rostlin), ale vzorky ze všech opakování smíchány	Metylase DNA: MS-AFLP	Zheng et al., 2014
<i>Oryza sativa</i> L.; kultivary II-32B, Huhan3	<b>G0 (S)</b> → G1 (S) → G2 (S) → G3 (S) → G4 (S) → G5 (S) → → G6 (S) → G7 (S) → G8 (S) → G9 (S) → <b>G10 (K nebo S)</b> → z obou variant <b>G11 (K nebo S)</b>  <b>G0 (K)</b>	Rostliny všech generací až do G10 pěstovány v polních podmínkách (skleníkový kryt před deštěm u stresované varianty). Rostliny G0, G10 a G11 generací poté pěstovány v růstové komoře? ( <i>bez další specifikace</i> ) v PVC válcích (100×20 cm) naplněných směsí písku a zeminy.  Simulace sucha v generacích G0 až G10 udržováním obsahu vody v půdě na 30-45 % maximální polní kapacity od stádia odnožování před koncem vegetativní fáze do stádia plnění semen. Rostliny pěstované v PVC válcích buď pravidelně zalévány nebo od stádia odnožování umožněno vodě ze substrátu ve válcích odtékat  Ověření vodního stavu pouze u rostlin pěstovaných v růstové komoře měřením relativního obsahu vody v listech (u stresovaných rostlin nižší než 70 %)	Listy ( <i>neuvedeno které</i> ); rostliny ve stadiu čtvrtého listu (28 dní staré rostliny)  2 opakování pro každou variantu, každé tvořeno jednou rostlinou	Metylase DNA: bisulfitová konverze následovaná sekvenováním	Zheng et al., 2017

Tab. 3 - pokračování

Rostlina	Generace	Pěstování/sucho	Vzorky	Epigenetika	Studie
<i>Arabidopsis thaliana</i> L.; ekotyp Columbia	G0 (S) → G1 (S) → G2 (S) → G3 (S) → G4 (S) → <b>G5 (S)</b>  G0 (K) → G1 (K) → G2 (K) → G3 (K) → G4 (K) → <b>G5 (K)</b>	Rostliny všech generací pěstovány v zemině, v růstové komoře nebo ve skleníku? (12/12 h nebo 16/8 h fotoperioda, ozářenost 100-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , teplota 20 $\pm$ 0,5 °C, relativní vlhkost vzduchu 50-60 %)  Simulace sucha ve dvou fázích: v první fázi bylo zastaveno na dva týdny zalévání u týden starých rostlin, poté byly tyto rostliny 5 dní zalévány normálně, a poté v druhé fázi bylo zastaveno zalévání na 12 dní. Dále už rostliny rostly za normálního vodního režimu  Ověření vodního stavu rostlin žádné	Celé listové růžice; 28 dní staré rostliny  5-6 opakování pro každou variantu	Metylace DNA: bisulfitová konverze následovaná sekvenováním	Ganguly et al., 2017
<i>Arabidopsis thaliana</i> L.; ekotyp Columbia	G0 (S) → G1 (S) → G2 (S) → <b>G3 (K nebo S)</b>  G0 (K) → G1 (K) → G2 (K) → <b>G3 (K nebo S)</b>	8 dní po vyklíčení rostlinky všech generací přesunuty na Phenoscope platformu, kde pěstovány 21 dní (8/16 h fotoperioda) na rašeliníkovém substrátu  Simulace sucha probíhala na Phenoscope: během prvního týdne snižován obsah vody v substrátu (na 30 % u stresovaných rostlin, 60 % u kontroly). Tento obsah vody byl udržován až do 29. dne, kdy byly rostliny přesunuty do růstové komory, kde pěstovány v podmínkách dlouhého dne a normálního zalévání až do vytvoření semen  Ověření vodního stavu rostlin žádné	Semenáčky; 10 dní staré rostliny  5 opakování pro každou variantu (každé z více rostlin)	Metylace DNA: bisulfitová konverze následovaná sekvenováním	Van Dooren et al., 2020
<i>Taraxacum officinale</i> G.H. Weber ex Wiggers	G0 (S) → G1 (K) → <b>G2 (K)</b>  G0 (K) → G1 (K) → <b>G2 (K)</b>  Potomstvo vzniklé apomixií!	Rostliny všech generací pěstovány v růstové komoře (14/10 h fotoperioda, teplota 18/14 °C, relativní vlhkost vzduchu 60 %).  Simulace sucha v G0 generaci začala u 4 týdnů starých rostlin: po dobu dalších 4 týdnů 10 krátkých období, kdy rostliny nezalévány tak dlouho, dokud 80 % rostlin nemělo zvadlé listy. Poté 5 týdnů vernalizace (4 °C; 16/8 h fotoperioda), poté přesun do skleníku a po dalších 6 týdnech sběr semen. V dalších generacích totéž, ale bez simulace sucha.  Ověření vodního stavu rostlin žádné	1 mladý a 1 plně vyvinutý list; 5 týdnů staré rostliny  4 opakování pro každou variantu (každé jedna rostlina)	Analýza malých ncRNA: RNA-seq	Morgado et al., 2017

Práce **Boyko et al. (2010)** se věnovala transgeneračnímu vlivu několika různých abiotických stresorů (stres suchem, zaplavením, vysokou a nízkou teplotou, UVC zářením, a stres vysokou koncentrací solí) na frekvenci homologní rekombinace (HRF) a metylaci DNA u *A. thaliana*. Oproti ostatním abiotickým stresorům somatický stres suchem způsobil méně homologních rekombinací, a transgenerační HRF byla rovněž nižší než u ostatních stresů a dokonce i než u kontroly. U druhé suchem stresované generace potomstva byla HRF přibližně stejná jako u první suchem stresované generace, ale rostliny G2, které byly po první stresové generaci pěstovány v kontrolních podmínkách, měly velmi podobnou HRF jako kontrola. Úroveň metylace DNA v celém genomu byla analyzována pomocí tzv. „cytosine extension assay“, což je opět metoda využívající metylačně citlivé restriční endonukleázy. Oproti ostatním abiotickým stresorům sucho způsobilo sníženou hladinu 5-metylcytosinů (5-mC) zhruba o 15 % oproti kontrole, zatímco u ostatních stresorů byla hladina 5-mC oproti kontrole o 10-12 % zvýšená. Transgenerační stres způsobil další snížení hladiny 5-mC, i když ne příliš výrazné. Tato práce ukazuje důležitost porovnávání různých abiotických stresorů, a rozdílů mezi nimi. Stres suchem se v tomto porovnání ukazuje jako relativně unikátní, s rozdíly převážně v trendech HRF a metylace DNA (Boyko et al., 2010).

Transgenerační část práce **Tricker et al. (2013)** navazovala na intergenerační část popsanou v kapitole 2.1. Po intergeneračním sledování metylace DNA genů *SPCH* a *FAMA* byla v transgenerační části sledována již pouze metylace DNA úseku *SPCHb*. Míra entropie na *SPCHb* v G2 generaci byla vysoká, tedy nebylo možné říct, jestli byla metylace DNA *SPCHb* zděděna od stresovaných rostlin G0 nebo G1 generace (Tricker et al., 2013).

Práce **Zheng et al. (2013)** se zabývala vlivem šesti, resp. sedmi generací stresu suchem na metylaci DNA u dvou kultivarů rýže (*Oryza sativa* L.). První, II-32B (*O. sativa* ssp. *indica*), je citlivý na sucho, zatímco druhý, Huhan-3 (*O. sativa* ssp. *japonica*), je na sucho rezistentní. Rostliny byly po dobu šesti nebo sedmi generací vystavovány suchu od stádia odnožování na konci vegetativní fáze vývoje po stádium plnění semen, což jsou vývojové fáze, kdy podle autorů má sucho největší vliv na výnos této plodiny. Čtyři hlavní otázky, které si autoři této studie kladli, byly: 1) Vyskytuje se při stresu suchem po dobu více generací u metylace DNA kumulativní efekt? 2) Je DNA metylace u stresovaných rostlin náhodná, nebo jsou v ní nějaké trendy? 3) Jsou změny v metylaci způsobené suchem v rodičovské generaci přenášeny až do šesté generace potomstva? 4) Budou mezi kultivary s rozdílnou citlivostí na sucho nějaké změny v metylaci DNA? Methylace DNA byla analyzována metodou MS-AFLP. Výsledky ukázaly, že DNA metylace byla na CCGG motivech (což jsou motivy rozeznávané příslušnými metylačně citlivými restriktázami) větší u II-32B (zhruba 44 %) než u Huhan-3 (zhruba 35 %). V G0 byla celková metylace u II-32B zhruba 39 % a u Huhan-3 přibližně 31 %, v G6 to bylo u II-32B za kontrolních podmínek zhruba 32 % a po simulaci sucha cca 39 %, zatímco u Huhan-3 byla metylace DNA za kontrolních podmínek i při stresu u G6 potomstva zhruba stejná jako v G0. II-32B rovněž měla více různě metylovaných lokusů (402) oproti Huhan-3 (84). Změny v metylaci se většinou objevily u nestresovaných rostlin potomstva G6 generace, u II-32B to bylo zhruba 75 % různě metylovaných lokusů, zatímco u Huhan-3 to bylo zhruba 43 %. Z různě metylovaných lokusů bylo u II-32B 27,6 % přímo indukováno stresem, zatímco u Huhan-3 to bylo 48,8 %. Z těchto lokusů indukovaných stresem byla podle autorů u II-32B velmi pravděpodobně transgeneračně přenosná metylace



DNA u 13 lokusů, zatímco u Huhan-3 to bylo u 25 lokusů. Analýza náhodných různě metylovaných lokusů (92 z II-32B a 55 z Huhan-3) z obou kultivarů v BLAST zjistila, že většina genů souvisí s katalytickou, hydrolázovou nebo transferázovou aktivitou. GO analýza objevila 18 genů z II-32B a 6 z Huhan-3, které souvisely s odpovědí na abiotické a biotické stresory nebo obecně vnější podněty. Podle autorů měl kultivar Huhan-3 celkově slabší odpověď na stres než II-32B, což odpovídá výsledkům ostatních prací porovnávajících transgenerační metylaci, protože kultivary tolerantnější vůči stresu nepotřebují na rozdíl od citlivých kultivarů při stresu příliš měnit svoji genovou expresi pro přežití daného stresu. Přirozená tolerance kultivaru Huhan-3 vůči suchu tedy znamená, že jeho metylom je při stresu suchem stabilnější než u citlivého kultivaru II-32B (Zheng et al., 2013).

Práce **Zheng et al. (2014)** navazuje na výše popsanou předchozí práci ze stejné laboratoře. Tato práce se opět věnovala studiu vlivu více generací stresu suchem na DNA metylom, tentokrát u rostlin rýže ve dvou vývojových stádiích (tři, resp. čtyři plně vyvinuté listy, tj. 21, resp. 28 dní po vyklíčení rostlin), ale pouze u jednoho kultivaru (Huhan-3) tolerantního ke stresu suchem. Pomocí 256 párů MS-AFLP primerů bylo identifikováno 4744 CCGG lokusů. Cca 65 % z těchto lokusů bylo nemetylovaných, zatímco metylovaných bylo cca 35 %. Celková úroveň DNA metylace byla 31,4-32,1 %, přičemž tato úroveň se lišila mezi měřeními vývojovými stadii rostlin (o 0,7 % v G0 a 0,4 % v G6). Ve stadiu tří listů byla úroveň metylace vyšší v G0 generaci, zatímco ve stadiu čtyř listů byla úroveň metylace vyšší v G6 generaci. Ze 4744 lokusů byly variace v DNA metylaci mezi generacemi nebo vývojovými stadii pozorovány u 190 lokusů. Z těchto 190 lokusů vykazovalo 44, resp. 48, rozdíly v metylaci DNA mezi G0 a G6 ve vývojovém stadiu tří, resp. čtyř listů. 132, resp. 171 lokusů vykazovalo rozdíly v metylaci DNA mezi rostlinami ve vývojovém stadiu V3 a V4 v G0, resp. G6 generacích. V G6 ve stadiu tří listů bylo oproti rodičům demetylováno cca 59 % a remetylováno 29,5 % lokusů, zatímco ve stadiu čtyř listů bylo demetylováno 37,5 % a remetylováno cca 48 % lokusů. V obou zkoumaných generacích byla v průběhu vývoje rostlin (tj. změna ze stádia tří listů do stádia čtyř listů) častější demetylace DNA, přičemž G0 měla více demetylace a méně remetylace než G6. Většina ze 190 různě metylovaných lokusů se vztahovala k vývoji rostlin (cca 58 %), tedy nelišily se mezi generacemi, ale mezi vývojovými stadii. Cca 42 % lokusů bylo naopak stejných mezi vývojovými stadii, ale různých mezi generacemi. GO analýza na těchto kategoriích zjistila, že lokusy vztahující se k vývoji rostlin souvisely s procesy jako je tRNA syntéza, syntéza rostlinných vláken a embryonální a postembryonální vývoj. Produkty lokusů vztahující se k rozdílům mezi generacemi měly podobné funkce, ale některé geny souvisely i se stresovou odpovědí. V této studii se nezanedbatelně měnily úrovně metylace DNA nejenom mezi generacemi rostlin, ale i podle vývojového stádia, což poukazuje na velmi širokou a komplikovanou regulační síť, která ovlivňuje i transgenerační stresovou paměť. Při měření modifikací chromatinu souvisejících s transgenerační stresovou pamětí nezáleží tedy jenom na tom, zda / jak moc je rodičovská rostlina stresovaná, ale i na tom, ve kterém vývojovém stadiu jsou vzorky odebrány (Zheng et al., 2014).

Práce **Zheng et al. (2017)** navazovala na dvě předchozí práce ze stejné laboratoře, které jsou shrnuté výše. Autoři pracovali opět se dvěma kultivary rýže (Huhan3 a II-32B) vystavenými stresu suchem po dobu jedenácti nebo dvanácti generací. Pomocí celogenomové bisulfidové

konverze následované sekvenací DNA byly vytvořeny mapy metylomů, na kterých byly studovány epimutace způsobené stresem suchem. Mezi sledované typy epimutací patřily diferenčně metylované pozice (DMP = rozdíly v síle metylace DNA mezi různými variantami), diferenčně metylované regiony (DMR = totéž, ale shluky DMP) a jednonukleotidové metylační polymorfismy (SMP = rozdíly v tom, zda určité místo vůbec bylo nebo nebylo metylováno). Kromě metylace DNA byly sledovány i biochemické, resp. fyziologické parametry vypovídající o stresu rostlin, ale to bylo v úplně jiných podmínkách simulace sucha (aplikace PEG), takže tím se zde nezabývám. Analýza shluků epimutací zjistila, že G10 a G11 generace potomstva jsou si v trendech epimutací velmi blízko, zatímco G0 generace je od nich relativně vzdálená, tedy epimutace mají určité trendy, které jsou evidentní při analýze různě od sebe časově vzdálených stresovaných generací. Množství epimutací se ale nezvyšovalo lineárně v čase, mezi G0 až G10 bylo zjištěno zhruba 313 tisíc DMP, zatímco mezi G10 až G11 bylo identifikováno zhruba 275 tisíc DMP. Epimutace způsobené transgeneračním stresem se vyskytovaly v „hot spotech“, např. u Huhan3 bylo identifikováno 3,76 % hypometylovaných a 6,45 % hypermetylovaných DMP, které se mezi generacemi objevily alespoň dvakrát. Distribuční analýza epimutací, které se objevily alespoň třikrát, zjistila, že hypometylované DMP se většinou vyskytovaly v CG a CHG kontextech a byly hlavně lokalizovány v mezigenových oblastech, zatímco hypermetylace se v Huhan3 vyskytovala hlavně v CHH kontextu a byla lokalizována v transponovatelných elementech. U II-32B se ale hypermetylace vyskytovala v CG a CHG kontextech a vyskytovala se v tělech genů. Až 68,5 % DMP indukovaných suchem u Huhan3 a cca 71 % u II-32B v G0 zachovávalo svůj změněný status i v generacích potomstva, zatímco u SMP zachovávalo změněný status cca 45 % u Huhan3 a cca 48,5 % u II-32B. Přímo transgeneračně dědičných DMP bylo u Huhan3 cca 9,5 % a u II-32B to bylo 7,5 % DMP, z toho přibližně 70 % a 85 % byly hypermetylované DMP. Transgeneračně dědičných SMP bylo u Huhan3, resp. II-32B cca 15 %, resp. 15,5 %, přičemž zhruba 59 % a 71 % z nich bylo demetylovaných. Transgeneračně dědičných DMR bylo u Huhan3 a II-32B 28 % a 24,5 %. GO analýza strukturních genů, v nichž byly zjištěny změny metylace DNA, zjistila, že produkty těchto genů souvisí např. s přenosem signálu, vývojem rostliny, rozmnožováním a odpovědí na biotické a abiotické stresory. S odpovědí na stres souviselo 14-19 % těchto genů, u genů souvisejících s transgeneračními epimutacemi to bylo 15-26,5 %. Autoři rovněž poukázali na fakt, že celková metylace Huhan3 rostlin byla více stabilní než u II-32B, což je stejný výsledek jako u předchozích studií ze stejné laboratoře (Zheng et al., 2017).

Práce **Ganguly et al. (2017)** se zabývala vlivem transgeneračního stresu suchem na rostlinu *A. thaliana*. Na rozdíl od předchozích prací, které popisují existenci transgeneračních efektů stresu suchem v souvislosti s metylací DNA, v této práci naopak autoři tvrdí, že transgenerační efekty sucha na metylaci DNA byly minimální. V prvotních experimentech byly zhodnoceny i efekty somatického stresu suchem na metylaci DNA, kde bylo zjištěno, že DNA metylom je relativně netečný ke stresu suchem, a analýza zhruba 3800 DMR ukázala, že exprese pouze čtyř genů (ze zhruba 4400) korelovala s DMR asociovanými se stresem. V hlavním transgeneračním experimentu nebyly mezi suchem stresovanými a nestresovanými rostlinami rozdíly v růstu napříč generacemi. Zkoumáním dormance semen byl zjištěn negativní transgenerační efekt sucha na klíčení další generace. Analýza DNA metylomů

suchem stresovaných rostlin generace G5 zjistila, že pod vlivem transgeneračního sucha v rostlinách nevznikly žádné epitypy, tedy žádné úseky nebyly asociovány se stresovou odpovědí způsobenou metylací DNA. Při analýze genových oblastí souvisejících s odpovědí na stres bylo zjištěno, že např. geny související se signální drahou kyseliny abscisové neměly příliš rozdílnou metylaci DNA v G5 potomstvu stresovaných a nestresovaných rostlin (pouze 4,5 % rozdíl). U lokusů *SPCH* a *FAMA*, zmíněných výše v souvislosti s intergenerační pamětí u *A. thaliana* (Tricker et al., 2013), rovněž nebyla výrazně pozměněná DNA metylace v souvislosti s transgeneračním stresem. Autoři pro toto pozorování měli dvě vysvětlení: 1) Regulace DNA metylomu může být specifická i podle způsobu, jakým jsou rostliny stresovány, nejenom podle typu stresu. 2) Různé ekotypy mohou mít jinou stresem indukovanou regulaci DNA metylomu (Tricker et al., 2013, pracovali s ekotypem Landsberg(er), zatímco v této studii byl analyzován ekotyp Columbia). V této práci se tedy ukázalo, že pouze investice do semen působí jako skutečně transgenerační, zatímco metylace DNA je mezigeneračně stabilní a do dalších generací se pravděpodobně nedědí (Ganguly et al., 2017).

Práce **Van Dooren et al. (2020)** se zabývala vlivem mírného vodního deficitu na transgenerační paměť *A. thaliana*. V této práci, podobně jako ve výše zmíněné studii Ganguly et al. (2017), transgenerační efekty DNA metylace téměř nebyly zjištěny, případně byly jenom velmi mírné, nebo nesouvisející s transgeneračním stresem. Na rozdíl od Ganguly et al. (2017) ale autoři pozorovali v některých souvislostech (morfo-fyziologické parametry) intergenerační stresovou paměť. DNA metylom byl analyzován pouze v G3 generaci, přičemž úroveň DNA metylace byla podobná u kontrolních i stresovaných rostlin. Celková úroveň metylace ale byla vyšší než v předchozích studiích na stejném ekotypu tohoto rostlinného druhu; v této studii to bylo 8,6-9 %, v předchozích cca 6,7 % (podle autorů to může být způsobeno různou metodou či různými použitými orgány pro analýzu). Van Dooren et al. (2020) identifikovali 286 DMP (methylace DNA pouze v CG kontextech) a 1360 DMR (methylace DNA převážně v CHH kontextech). Většina DMP byla v tělech genů, zatímco většina DMR byla na sekvencích transponovatelných elementů, byla nenáhodná a byla asociována s 18 rodinami transponovatelných elementů, jako např. LTR-retrotranspozonovou rodinou *COPIA78*, která je citlivá na biotický a abiotický stres. Většina DMR rovněž souvisela s RdDM dráhami a tudíž DNA metyltransferázou DRM2. Žádné známé geny související s DNA (de)methylací podle autorů nebyly stresem suchem ovlivněny. Při analýze DNA metylomu G3 generace nebyly nalezeny žádné konzervované DMR, tedy u DNA metylace nebyl zjištěn žádný transgenerační efekt. Podle autorů tato studie ukazuje, že inter- a transgenerační efekty nejsou u rostlin tak časté, jako tomu napovídaly předchozí studie o těchto efektech. Rostliny se proti stresu suchem nejspíše chrání hlavně somatickou změnou genové exprese, v případě stresu během rozmnožování se může efekt stresu promítnout i do semen, která pak budou na stres lépe adaptovaná (Van Dooren et al., 2020).

Konečně práce **Morgado et al. (2017)** se věnovala vlivem stresu suchem nebo aplikace kyseliny salicylové (fytohormon zprostředkující např. obranu před patogeny) v prarodičovské generaci *Taraxacum officinale* G.H. Weber ex Wiggers na změny exprese malých RNA (sRNA) potomstva (tedy po dvou generacích). Práci jsem zařadil do této kapitoly i přesto, že se rostliny rozmnožovaly apomikticky, tedy z neoplozených vajíček. Tento způsob

rozmnožování mohl podle autorů částečně obejít přeprogramování epigenetické paměti, které se děje u pohlavního rozmnožování. V předchozích pracích na apomiktických *T. officinale* byly u potomstva stresem postižených rodičů (jednalo se o jiné typy stresů než sucho) zjištěny změny fenotypů a metylace DNA, ale nebyly sledovány změny exprese sRNA (Verhoeven et al., 2010; Verhoeven & van Gurp, 2012). Morgado et al. (2017) nyní zjistili, že sucho v G0 generaci u *T. officinale* snížilo expresi 24 nt sRNA u G2 potomstva. U anotovaných transkriptů strukturních genů se asociace s 24 nt sRNA vyskytovaly hlavně na 5' a 3' koncích příslušných genů, tyto sRNA tedy mohou nejspíše ovlivňovat promotory nebo mezigenové oblasti. 21 nt sRNA naopak ovlivňovaly spíše oblasti v samotných tělech genů. Pomocí GO analýzy bylo poté zjištěno, že příslušné geny souvisely hlavně s obecnou stresovou odpovědí, změny sRNA v reakci na stres kyselinou salicylovou ve srovnání se stresem suchem nebyly po dvou generacích bez stresu příliš odlišné (Morgado et al., 2017).

### 3. Diskuze

Molekulární mechanismy inter- a transgenerační paměti rostlin na stres suchem jsou ještě relativně neprobádané. V této práci jsem se pokusil shrnout poznatky ze všech dosud existujících původních studií zabývajících se touto problematikou, ale ne všechny se věnovaly pouze těmto molekulárně biologickým mechanismům. Mnoho studií spřáhlo molekulárně biologickou část s fyzio- a morfologickou částí, která u některých studií byla pro autory důležitější než poznání molekulárně biologické podstaty pozorovaných efektů přenosu paměti rostlin na sucho mezi rodiči a jejich potomky (např. González et al., 2016, 2017, 2018; Herman & Sultan, 2016; Quan et al., 2022). Fenomén inter- či transgenerační stresové paměti je ale pro správné pochopení všech fenotypových účinků nutné studovat nejenom na fyzio- a morfologické úrovni, ale právě i na úrovni molekulární.

U většiny analyzovaných studií byly nějaké projevy generační stresové paměti na sucho na úrovni metylace DNA nebo exprese ncRNA nalezeny, ale dvě analyzované studie (Ganguly et al., 2017; Van Dooren et al., 2020) nenalezly žádné takové efekty a v řadě dalších studií se konkrétní změny na úrovni těchto dvou možných epigenetických mechanismů lišily či závisely na různých (v dané studii zahrnutých) faktorech. Tyto rozporuplné výsledky mohou být zčásti způsobeny velice rozdílnou metodikou analyzovaných prací, přičemž konkrétních důvodů může být mnoho.

Jedním z důležitých faktorů s neznámým, ale potenciálně rozsáhlým účinkem na epigenetické efekty v souvislosti s generační stresovou pamětí je studovaný druh rostliny. V dosud existujících studiích bylo celkem zkoumáno 7 rostlinných druhů, které mají pro lidstvo různé významy (např. modelový organismus - *A. thaliana*, zemědělská plodina – pšenice, rýže, atp.). Efekt inter- či transgenerační stresové paměti může být u různých druhů určitě velmi rozdílný, ale bohužel se žádná práce nezabývala přímo mezidruhovými rozdíly, takže v tomto okamžiku jde pouze o spekulaci. Naopak prokázané rozdíly byly zjištěny u různých genotypů téhož druhu (např. ve studiích Herman & Sultan, 2016; Liu et al., 2021; Quan et al., 2022; Van Dooren et al., 2020; Zheng et al., 2013) - je tedy zřejmé, že vnitrodruhová variabilita může při přenosu paměti na sucho mezi generacemi rodičů a jejich potomstva hrát

významnou roli. V některých případech tyto rozdíly ve stresové paměti mezi studovanými genotypy zřejmě mohly souviset přímo s jejich konkrétní odolností/citlivostí k suchu (Liu et al., 2020; Zheng et al., 2013; 2017), ale nemusí tomu tak být zřejmě vždycky (Alsdurf et al., 2016; González et al. 2017; Herman & Sultan, 2016; Liu et al. 2021; Quan et al., 2022). Obecně se zatím zdá, že DNA metylom nebo exprese ncRNA u genotypů odolných vůči suchu většinou vykazuje větší stabilitu během přenosu z rodičů do potomstva.

Dalším důležitým faktorem ovlivňující výsledky těchto studií může být způsob simulace sucha. Způsobů simulace sucha bylo ve studiích mnoho, a jejich účinek na rostliny je určitě rozdílný, což opět může (ale nemusí, efekty rozdílných způsobů simulace sucha opět nebyly v žádné práci přímo cíleně prozkoumány) ovlivnit projev inter- nebo transgenerační stresové paměti. Mezi způsoby simulace sucha ve studiích zahrnutých do této bakalářské práce patřilo například snížení relativní vlhkosti vzduchu v růstových komorách (Tricker et al., 2013), úplné zastavení zalévání rostlin (Boyko et al., 2010), zalévání rostlin menším množstvím vody nebo méně často než u kontrol (Alsdurf et al., 2016; Herman & Sultan, 2016; Liu et al., 2020; 2021; Van Dooren et al., 2020; Zheng et al., 2017), úplné zastavení zalévání rostlin, ale přerušené periodou zalévání bez ohledu na stav rostlin (Ganguly et al., 2017), zalévání opakovaně vždy pouze při povadání rostlin (González et al., 2016, 2017, 2018; Morgado et al., 2017; Quan et al., 2022), nebo simulace stresu suchem pomocí PEG (Zheng et al., 2013). Tyto různé způsoby simulace sucha mohou způsobit jinou intenzitu (v případě PEG i jinou formu) stresu, která může transgenerační efekty zesílit, ale i zeslabit. Dokonce byly někdy způsoby simulace sucha i kombinovány v různých generacích - např. Zheng et al. (2013) použili zřejmě zastavení zalévání rostlin v generacích G0 až G5, ale v generaci G6, v níž měřili metylaci DNA, simulovali sucho pomocí PEG. Délka, případně načasování sucha u rodičů může mít také vliv na potomstvo, jak ukázaly práce González et al. (2016; 2018).

Rostliny také nemusely být stresovány pouze suchem. V některých studiích byly úmyslně stresovány kombinací sucha a vysoké teploty (Liu et al., 2020, 2021). V jiných studiích ale mohly kvůli případnému špatnému designu experimentů být rostliny stresovány jinak neúmyslně (pokud nebylo např. kontrolované osvětlení při pěstování ve skleníku nebo ve venkovních podmínkách, mohly některé rostliny být stresovány nadměrným nebo nedostatečným zářením nebo rovněž vysokou teplotou, další roli mohla hrát např. velikost pěstebních nádob, typ pěstebního substrátu atp.). Kombinace různých stresorů pak může mít na rostliny nepředvídatelné účinky, proto je důležité pro pochopení účinků kombinace stresorů nejdříve pochopit efekty těchto stresorů jednotlivě. Sucho přitom může při přenosu stresové paměti do dalších generací mít úplně opačné efekty než jiné stresory, jak ukázala práce Boyko et al. (2010), takže případná (byť neúmyslná) kombinace stresorů by mohla výsledky zcela zkreslit. Obecně se dá říci, že s ohledem na celkový způsob pěstování rostlin se 16 studií zpracovaných v této práci velmi lišilo (venkovní/polní pokusy např. u Zheng et al., 2013, 2014, 2017, skleníkové pokusy např. u González et al., 2016; 2017; 2018; Herman & Sultan, 2016; Liu et al., 2020; 2021; Quan et al., 2022, pěstování v růstových komorách s relativně přesně definovanými parametry prostředí např. u Alsdurf et al., 2016; Boyko et al., 2010; Ganguly et al. 2017; Morgado et al., 2017; Tricker et al., 2013, nebo pěstování na speciální platformě Phenoscope např. v práci Van Dooren et al., 2020). I v tomto případě občas autoři kombinovali různé způsoby pěstování, zejména u transgeneračních studií, kdy

rodičovská generace a většina dalších generací potomstva byla pěstována (a vystavena suchu) v jedné podmínce prostředí a poslední generace potomstva v jiných podmínkách prostředí (Zheng et al., 2013; 2014; 2017).

Značným nedostatkem téměř všech existujících studií věnujících se generační paměti rostlin stresovaných suchem je to, že jejich autoři nijak neověřovali reálný vodní stav svých experimentálních rostlin. Pouze v některých studiích ověřovali autoři účinek simulace sucha na rostliny skutečně pomocí některého z parametrů vodního režimu, např. stanovením relativního obsahu vody (např. Zheng et al., 2014; 2017). U jiných autorů bylo ověření stresu rostlin pouze vizuální (González et al., 2016, 2017, 2018) a u mnoha studií nebyl vliv sucha na rostliny vůbec ověřen (např. Boyko et al., 2010; Ganguly et al., 2017; Morgado et al., 2017; Tricker et al., 2013; Van Dooren et al., 2020; Zheng et al., 2013). To by mohlo také znamenat, že i když rostliny skutečně stresované byly (na základě měření např. různých „typických stresových“ morfo-fyziologických parametrů), mohlo to být ve skutečnosti způsobeno jinými důvody než nedostatkem vody (viz předchozí odstavec). Skutečnost, že všechny tyto studie byly přitom publikovány obvykle s názvem výslovně zaměřeným na stres suchem (aniž by recenzenti vyžadovali ověření vodního stavu rostlin) je, mírně řečeno, zarážející. Navíc se mohlo také neúmyslně stát, že vodním stresem trpěly i kontrolní rostliny, alespoň v mírné podobě (s tím je možné se bohužel setkat u celé řady publikovaných prací zaměřených na různé aspekty stresu suchem).

Správná, resp. určitá simulace sucha a ověření toho, že skutečně o stres suchem jde, není ale jediným důležitým faktorem, který by mohl ovlivnit epigenetické modifikace. Výběr vývojového stadia rostlin a orgánu/pletiva pro odběr vzorků pro měření modifikací, stejně jako výběr metody měření mohou být rovněž klíčové. Vzorky pro studium epigenetických modifikací byly u většiny prací odebrány z rostlin mladších než jeden měsíc. U některých studií bylo uvedeno pouze obecné vývojové stadium, ve kterém byly vzorky odebrány (např. Liu et al., 2021; Tricker et al., 2013), u jiných autoři uvedli stáří rostlin, ale ne vývojové stadium (např. Boyko et al., 2020; Ganguly et al., 2017; González et al., 2018; Herman & Sultan, 2016; Liu et al., 2020; Morgado et al., 2017; Van Dooren et al., 2020; Zheng et al., 2013), ve studii Alsdurf et al. (2016) to není uvedeno vůbec. Správně by mělo být vždy uvedeno jak stáří rostlin, tak jejich vývojové stadium, jako např. ve studiích Zheng et al. (2014; 2017). Právě práce Zheng et al. (2014) přitom jasně ukázala, že na vývojovém stadiu rostlin, z nichž jsou odebírány vzorky pro analýzu modifikací chromatinu/ncRNA velmi záleží (i tak malý vývojový rozdíl jako mezi rostlinami ve stadiu třetího a čtvrtého plně vyvinutého listu hrál důležitou úlohu).

Většina studií využila na měření modifikací chromatinu listy rostlin, někdy poměrně dobře definované (González et al., 2018; Liu et al., 2021; Morgado et al., 2017), jindy nedefinované, ale zřejmě konkrétní jednotlivé (např. Alsdurf et al., 2016; Boyko et al., 2010; Zheng et al., 2017). Často se však jednalo o případy, kdy autoři použili pro izolaci DNA všechny listy z dané rostliny, případně celé semenáčky (např. Ganguly et al., 2017; Liu et al., 2020, Tricker et al., 2013; Van Dooren et al., 2020; Zheng et al., 2013, 2014). To může hrát také důležitou roli, zejména pokud bylo sucho u potomstva (viz dále) simulováno krátkodobě nebo střídavě se zaléváním – některé listy se mohly vyvíjet ještě před suchem, jiné při něm či po něm, a

použití jejich směsi nebo celé rostliny tedy není příliš vhodné. Zvláště v kombinaci s nedostatečnými údaji o vývoji rostlin to může zkomplikovat vyvození závěrů ze získaných výsledků. Modifikace chromatinu v kořenech rostlin nebyly s ohledem na inter- či transgenerační paměť rostlin stresovaných suchem dosud analyzovány vůbec - i toto lze považovat za nedostatek při studiu tohoto fenoménu, protože řada genů souvisejících s odpovědí rostlin na sucho se exprimuje pouze (nebo jinak než v nadzemní části) v kořenech a epigenetické modifikace jejich expresi mohou značně ovlivnit. V jediné studii (Liu et al., 2021) byla porovnávána situace v praporcovém listu a ve vyvíjejících se semenech rostlin G1 potomstva pšenice a výsledky jasně ukázaly, že situace s expresí miRNA v souvislosti s intergenerační pamětí je v těchto dvou typech orgánů diametrálně odlišná. Semena G1 potomstva původně stresovaných G0 rostlin jsou již vlastně třetí generací (G2), takže to pak ovlivní i transgenerační paměť.

Počet biologických opakování je rovněž velmi důležitý, u většiny studií ale bylo velmi těžké určit, kolik opakování měření epigenetických modifikací autoři skutečně provedli (např. Boyko et al., 2010; Ganguly et al., 2017; Liu et al., 2020, 2021). Někdy dokonce autoři sami uvedli, že měli např. 3 biologická opakování, každé reprezentované několika rostlinami, ale pro analýzu modifikací chromatinu všechny vzorky smíchali (Zheng et al. 2013, 2014). Navíc je známo, že epigenetické modifikace mohou být výrazně rozdílné i u dvou jednotlivých rostlin stejného druhu, genotypu a pěstovaných ve stejných podmínkách. I to může v případě inter- či transgenerační paměti rostlin na sucho ovlivnit to, co bude pozorováno třeba u potomstva konkrétní rostliny.

Generační design experimentů sám o sobě je důležitý přímo extrémně. I když podle definice intergenerační paměti stačí, když G1 potomstvo je pěstováno pouze v kontrolních podmínkách, domnívám se, že pěstování potomstva opět i v podmínkách stresu suchem a analýza epigenetických modifikací jak u rodičů, tak u potomků za obou podmínek pěstování dokáže zpřesnit informace o způsobu přenosu intergenerační paměti na molekulární úrovni. V ideálním případě by tedy při studiu intergenerační stresové paměti měly být rostliny rodičovské generace (G0) vystaveny suchu a k tomu by měla existovat reprezentativní kontrola (obě skupiny zastoupeny dostatečným počtem rostlin), v obou skupinách by z jednotlivých rostlin měla být sebrána semena (tj. G1 generace) a z nich vyrostlé rostliny by opět měly být pěstovány jak v kontrolních podmínkách, tak (pro jistotu) v podmínkách stresu suchem. Porovnávání by pak měly být modifikace chromatinu / exprese ncRNA v 6 variantách (dvakrát G0, čtyřikrát G1). Z existujících studií se k tomuto asi nejvíce přiblížila práce Liu et al. (2021), i když neanalyzovala G0 generaci. U některých studií byl ale účinek intergeneračního stresu suchem zkoumán třeba pouze na stresovaném potomstvu bez odpovídající kontroly (např. Herman & Sultan, 2016), což může výrazně ovlivnit výsledky. To, zda analyzovat epigenetické modifikace v původních G0 rostlinách, nebo zda vzít semena pro G0 generaci a znovu je vysít tak, aby mohly příslušné rostliny být analyzovány úplně zároveň s G1, je otázkou: obě volby mají svá pro i proti (původní G0 rostliny jsou ty, z nichž skutečně potomstvo vzniklo - ale mohly být vystaveny přece jen mírně odlišným podmínkám a měření pravděpodobně proběhlo v jiném čase než u jejich G1 potomstva, nově/zároveň vyšetě G0 rostliny budou pěstovány a měřeny v naprosto stejných podmínkách jako G1, ale nejsou to přesně ty, z nichž G1 potomstvo vzniklo).

V případě transgenerační paměti by uvedený postup/design měl být opakován v dalších generacích a analyzovaných variant by tak mělo být více. V části této bakalářské práce věnující se transgeneračním efektům sucha tomuto žádné studie nevyhovují (tzn. žádné takové studie zatím neexistují); autoři místo toho většinou vystavovali po několik generací rostliny jen stresu, přičemž až v poslední generaci byly stresované rostliny rozděleny zase na stres a kontrolu (někdy ani to ne) a epigenetické modifikace byly zkoumány až v této poslední generaci (Ganguly et al., 2017; Zheng et al., 2013; 2014; 2017). U tohoto generačního designu se pozorovaná stresová paměť dá těžko považovat za transgenerační, protože se z takto provedených experimentů nedá zjistit, zda sucho v každé generaci vyvolalo nové účinky na DNA metylom stresovaných rostlin, nebo zda se nějaké změny metylace DNA postupně přenášely mezi generacemi. To, zda/jaké jsou kumulativní účinky transgeneračního stresu suchem (jestli má vůbec cenu stresovat rostliny např. po dobu jedenácti generací, nebo by stejný účinek transgeneračního stresu byl pozorován už třeba u páté stresované generace) není příliš známo. Zheng et al. (2017) se v tomto směru pokusili alespoň o nějaké porovnání, ale srovnávali dvě relativně blízké generace potomstva (G10, G11) a k tomu G0 generaci, přičemž výsledky neumožnily udělat nějaký jasný závěr. Vzdálenější generace (G10 či G11 versus G0) se epimutacemi lišily více než bližší generace (G11 versus G10), ale trend neukazoval na jednoznačný nárůst nebo naopak pokles stupně metylace DNA.

Potomstvo suchem stresovaných rostlin ve studiích rozebraných v této práci vznikalo různými způsoby, což také nejspíš mělo vliv na pozorované epigenetické změny. Nejčastěji potomstvo vznikalo regulérním pohlavním rozmnožováním (byť se většinou nedá zjistit, zda se rostliny rozmnožovaly autogamně nebo šlo o opylení pylem z jiného jedince). Pohlavní rozmnožování spojené s meiózou má vliv na přenos modifikací chromatinu do dalších generací. Při meióze se může určité množství chromatinových značek smazat, tedy epigenetické modifikace vzniklé během života rostliny se při pohlavním rozmnožení přenáší do další generace nejspíš pouze částečně. Ve studii Morgado et al. (2017) se rostliny rozmnožovaly gametofytní apomixií, což je způsob rozmnožování, při kterém se potomstvo vyvine z vajíčka s neredukovaným počtem chromozómů (u jiných typů apomixie může proběhnout meióza, u tohoto typu neprobíhá). Na rozdíl od klonálního rozmnožování ale pořád jde o pohlavní buňky, i přesto, že rozmnožování je vlastně nepohlavní. Kvůli absenci meiózy se tedy epigenetické značky nejspíš více zachovávají mezi generacemi, přičemž epigenetické regulace při apomixii určitě hrají významnou roli; srovnáním pohlavně se rozmnožujících a apomikticky se rozmnožujících linií některých rostlinných druhů bylo prokázáno, že rozdíl je právě na úrovni genové exprese regulované RdDM dráhou a tedy související s metylací DNA a tvorbou specifických malých ncRNA (Xu et al., 2022). U klonálního rozmnožování (v případě studií González et al., 2016, 2017, 2018; Quan et al., 2022) potomstvo vzniká z vegetativní části těla rodiče, má tedy plně totožný genotyp a pravděpodobně i epigenetické modifikace jako jeho rodič. V tomto případě se tedy epigenetické značky nejspíš přenáší (téměř) úplně a určitě se mohou uplatnit i při tomto způsobu rozmnožování (Duhovnikoff & Dodd, 2015).

Metody měření modifikací chromatinu / exprese ncRNA jsou samozřejmě dalším důležitým faktorem, který může výsledky ovlivnit. Pro analýzu metylace DNA byly v dostupných studiích využity různé metody jako např. „cytosine extension assay“ (Boyko et al., 2010),



metylačně-citlivá AFLP analýza (MS-AFLP; Alsdurf et al., 2016, González et al., 2018, Zheng et al., 2013, 2014), nebo bisulfitová konverze následovaná PCR (Tricker et al., 2013) či v pozdějších studiích celogenomovým sekvenováním (Ganguly et al. 2017, Van Dooren et al., 2020, Zheng et al., 2017). Tyto metody jsou rozdílné a mají, co se týče analýzy metylace DNA, různé výhody a nevýhody. Pro analýzu metylace celého genomu může být vhodná např. bisulfitová konverze následovaná sekvenováním; jedná se o konverzi nemetylovaných cytosinů na uracily, což umožní přesnou detekci metylovaných cytosinů v celém genomu, bez ohledu na to, kde jsou a zda jsou či nejsou součástí rozpoznávacích míst pro nějaké metylačně citlivé restriční endonukleázy. Nevýhodou této metody je nutnost mít nepoškozenou a dobře purifikovanou DNA, aby byla konverze nemetylovaných cytosinů úplná. MS-AFLP spočívá v rozštěpení DNA pomocí metylačně citlivých restriktáz, které štěpí/neštěpí DNA jen v případě, že cytosiny v jejich rozpoznávacích sekvencích jsou/nejsou metylovány (často se jedná např. o kombinaci restriktáz HpaII nebo MspI), a následně amplifikaci vzniklých fragmentů PCR a detekci jejich délkových polymorfismů. Nevýhodou této metody je to, že je zaměřená pouze na příslušná restriční místa. „Cytosine extension assay“ je rovněž metoda využívající metylačně citlivé restriční endonukleázy, po jejichž působení vznikají specifické 5'-G přesahy v restričním místě, které jsou pak prodlouženy DNA polymerázou a detekovány (po inkorporaci radioaktivního C). Tato metoda může ale být problematická v regionech bohatých na cytosiny.

Ačkoli ve většině prací autoři skutečně měřili v příslušných generacích rodičů a potomstva změny metylace DNA jako takové, v několika dalších pracích souvisejících s inter- či transgenerační pamětí bylo na rostliny aplikováno nějaké činidlo, které vyvolává demetylaci DNA (např. zebularin, 5-azacytidin), ale pak autoři hodnotili pouze různé morfologické parametry, ale neměřili již přímo metylaci DNA (González et al., 2016, 2017, Herman & Sultan 2016, Quan et al., 2022). Takové studie jsou nepochybně také užitečné, ale přesto by bylo lepší stanovit přímo stupeň metylace DNA (což nabízí např. kombinace studií González et al. 2016 a 2018, které využily stejný experimentální design a zřejmě pracovaly s těmi samými rostlinami).

Prací zabývajících se změnami exprese ncRNA bylo celkově méně a většinou využívaly metodu celogenomového sekvenování RNA (Liu et al., 2020, 2021; Morgado et al., 2017), což je metoda dnes obecně upřednostňovaná, i když starší práce Alsdurf et al. (2013) použila microarray analýzu. Analýzou histonových modifikací se dosud v souvislosti s generační pamětí rostlin na sucho nezabýval vůbec nikdo – to je další výrazný nedostatek, který by rozhodně měl být napraven.

Na zvolené metodě a na tom, do jakých detailů umožní analyzovat epigenetické značky v různých částech genomu, samozřejmě výsledky studií také výrazně závisí. Některé analyzované studie se zaměřily na analýzu metylace celého genomu (např. Boyko et al., 2010; Zheng et al., 2013, 2014, 2017), zatímco jiné se zaměřily spíše na specifické geny související s odpovědí na stres suchem (Ganguly et al., 2017; Tricker et al., 2013). Oba tyto přístupy jsou velmi důležité, protože inter- či transgenerační stres suchem může mít vliv nejenom na specifické geny (a tento vliv je třeba důkladně prozkoumat zejména u konkrétních genů, u nichž se ví, že jejich produkty specificky souvisejí s odpovědí rostlin na nedostatek vody), ale

i na celkovou genovou expresi rostliny (geny související s dalšími fyziologickými procesy, transponovatelné elementy, jejichž aktivace může mít mnoho různých účinků na genovou expresi a strukturu genomu, apod.). Epigenetické modifikace související s inter- či transgenerační stresovou pamětí jsou rovněž vysoce kontextově specifické a je často těžké předvídat jejich konkrétní dopady na genovou expresi. Kupříkladu u metylace DNA nejenom že hypo- či hypermethylace mohou u různých genů způsobit jak sníženou, tak zvýšenou expresi, ale může se to lišit i mezi úseky jednotlivých genů, jak bylo ukázáno např. ve studii Tricker et al. (2013). Nejenom že dva geny zmíněné v této studii měly různé vzory metylace DNA, ale i úseky těchto genů byly nejspíš metylací jinak regulovány. Ve studiích Morgado et al. (2017), Van Dooren et al. (2020) a Zheng et al. (2017) byl aspoň částečně zkoumán vliv metylace DNA a exprese sRNA v souvislosti s regulací různých genových či negenových oblastí u transgeneračně suchem stresovaných rostlin. Výsledky naznačily, že tato regulace je velmi komplexní a určitě by měla být důkladněji prozkoumána.

## 4. Závěr

Tato bakalářská práce se věnovala inter- či transgenerační paměti rostlin na stres suchem s ohledem na epigenetické modifikace zasažených rostlin, resp. případný přenos těchto modifikací do dalších generací spojený s možností lepšího přizpůsobení se potomstva původně stresovaných rostlin na sucho. Analýza 16 dnes existujících studií věnujících se tomuto tématu odhalila, že způsob, jakým jsou tyto modifikace udržovány napříč generacemi, je zřejmě neskutečně komplexní a rozhodně se zatím nedají vyvodit nějaké jednoznačné závěry. To je důsledkem velké metodické variability studií, spojené bohužel často i s řadou závažných či méně závažných metodických nedostatků. V současnosti dostupné informace k tomuto tématu jsou neúplné, útržkovité, a dokonce i protichůdné. Pro skutečné pochopení tohoto nesmírně komplikovaného tématu bude do budoucna třeba nejenom zlepšit a rozšířit metody analýzy těchto stresem způsobených epigenetických modifikací (aby bylo možné se např. zaměřit na různé části genomu či genů), výrazně vylepšit celkový experimentální design (ověření stresu suchem přímo na rostlinách, z nichž jsou odebírány vzorky, hodnocené generace potomstva v kombinaci s variantami pěstování, počet opakování atp.) a provádět tyto analýzy s ohledem na různé biologické faktory, které mohou inter- či transgenerační stresovou paměť rostlin ovlivnit (analyzované rostlinné druhy a jejich genotypy, způsob a načasování či délka simulace sucha, vývojové stádium rostlin, typ orgánu/pletiva pro získání vzorků atp.).

## 5. Seznam literatury

Hvězdičkou jsou označeny přehledové články nebo kapitoly v knihách.

Šestnáct „hlavních“ původních studií, které jsou v této práci podrobně rozebírány a diskutovány, je vyznačeno silným písmem.

- \* Agius, D. R., Kapazoglou, A., Avramidou, E., Baranek, M., Carneros, E., Caro, E., Castiglione, S., Ciatelli, A., Radanovic, A., Ebejer, J. P., Gackowski, D., Guarino, F., Gulyás, A., Hidvégi, N., Hoenicka, H., Inácio, V., Johannes, F., Karalija, E., Lieberman-Lazarovich, M., Martinelli, F., Maury, S., Mladenov, V., Morais-Cecílio L., Pecinka A., Tani, E., Testillano, P. S., Todorov, D., Villedor, L., Vassileva, V. (2023). Exploring the crop epigenome: a comparison of DNA methylation profiling techniques. *Frontiers in Plant Science* 14, 1181039. doi: 10.3389/fpls.2023.1181039
- Akdogan, G., Tufekci, E. D., Uranbey, S., & Unver, T. (2016). miRNA-based drought regulation in wheat. *Functional and Integrative Genomics*, 16 (3), 221–233. doi: 10.1007/s10142-015-0452-1
- Alsdurf, J., Anderson, C., & Siemens, D. H. (2016). Epigenetics of drought-induced trans-generational plasticity: Consequences for range limit development. *AoB PLANTS*, 8, plv146. doi: 10.1093/aobpla/plv146**
- Alsdurf, J. D., Ripley, T. J., Matzner, S. L., & Siemens, D. H. (2013). Drought-induced trans-generational tradeoff between stress tolerance and defence: consequences for range limits? *AoB PLANTS*, 5, plt038. doi: 10.1093/aobpla/plt038
- \* Bäurle, I. (2018). Can't remember to forget you: chromatin-based priming of somatic stress responses. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 83, 133–139. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.09.032
- \* Bäurle, I., & Trindade, I. (2020). Chromatin regulation of somatic abiotic stress memory. *Journal of Experimental Botany* 71 (17), 5269–5279. doi: 10.1093/jxb/eraa098
- \* Bewick, A. J., & Schmitz, R. J. (2017). Gene body DNA methylation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 36, 103–110. doi: 10.1016/j.pbi.2016.12.007
- \* Bilichak, A., & Kovalchuk, I. (2016). Transgenerational response to stress in plants and its application for breeding. *Journal of Experimental Botany* 67 (7), 2081–2092. doi: 10.1093/jxb/erw066
- Boyko, A., Blevins, T., Yao, Y., Golubov, A., Bilichak, A., Ilnytsky, Y., Hollander, J., Meins, F., & Kovalchuk, I. (2010). Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of dicer-like proteins. *PLoS ONE*, 5 (3), e9514. doi: 10.1371/journal.pone.0009514**
- \* Bruce, T. J. A., Matthes, M. C., Napier, J. A., & Pickett, J. A. (2007). Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science* 173 (6), 603–608. doi: 10.1016/j.plantsci.2007.09.002
- Daryanto, S., Wang, L., & Jacinthe, P. A. (2016). Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. *PLoS ONE*, 11 (5), e0156362. doi: 10.1371/journal.pone.0156362

- Ding, Y., Fromm, M., & Avramova, Z. (2012). Multiple exposures to drought “train” transcriptional responses in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 3, 740. doi: 10.1038/ncomms1732
- Ding, Y., Liu, N., Virilouvet, L., Riethoven, J.-J., Fromm, M., & Avramova, Z. (2013). Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 13, 229. doi: 10.1186/1471-2229-13-229
- \* Douhovnikoff, V., & Dodd, R.S. (2015). Epigenetics: a potential mechanism for clonal plants success. *Plant Ecology* 216: 227-233. doi: 10.1007/s11258-014-0430-z
- FAO (2021). The impact of disasters and crises on agriculture and food security: 2021. FAO, Rome, ISBN 978-92-5-134071-4, doi: 10.4060/cb3673en.
- Ganguly, D. R., Crisp, P. A., Eichten, S. R., & Pogson, B. J. (2017). The *Arabidopsis* DNA methylome is stable under transgenerational drought stress. *Plant Physiology*, 175 (4), 1893–1912. doi: 10.1104/pp.17.00744**
- \* Gelaw, T. A., & Sanan-Mishra, N. (2021). Non-coding RNAs in response to drought stress. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (22), 12519. doi: 10.3390/ijms222212519
- González, A. P. R., Dumalasoová, V., Rosenthal, J., Skuhrovec, J., & Latzel, V. (2017). The role of transgenerational effects in adaptation of clonal offspring of white clover (*Trifolium repens*) to drought and herbivory. *Evolutionary Ecology*, 31 (3), 345–361. doi: 10.1007/s10682-016-9844-5**
- González, A. P. R., Chrtek, J., Dobrev, P. I., Dumalasoová, V., Fehrer, J., Mráz, P., & Latzel, V. (2016). Stress-induced memory alters growth of clonal offspring of white clover (*Trifolium repens*). *American Journal of Botany*, 103 (9), 1567–1574. doi: 10.3732/ajb.1500526**
- González, A. P. R., Preite, V., Verhoeven, K. J. F., & Latzel, V. (2018). Transgenerational effects and epigenetic memory in the clonal plant *Trifolium repens*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1677. doi: 0.3389/fpls.2018.01677**
- \* Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Gill, S., & Fujita, M. (2013). Drought stress responses in plants, oxidative stress, and antioxidant defense. In: Tuteja, N., Gill, S. S. (eds.): Climate change and plant abiotic stress tolerance. New York: John Wiley & Sons Ltd., pp. 209-250. doi: 10.1002/9783527675265.ch09
- Hatzig, S. V., Nuppenau, J. N., Snowdon, R. J., & Schießl, S. V. (2018). Drought stress has transgenerational effects on seeds and seedlings in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *BMC Plant Biology*, 18 (1), 297. doi: 10.1186/s12870-018-1531-y
- Herman, J. J., & Sultan, S. E. (2016). DNA methylation mediates genetic variation for adaptive transgenerational plasticity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283, 20160988. doi:10.1098/rspb.2016.0988**
- Herman, J. J., Sultan, S. E., Horgan-Kobelski, T., & Riggs, C. (2012). Adaptive transgenerational plasticity in an annual plant: grandparental and parental drought stress enhance performance of seedlings in dry soil. *Integrative and Comparative Biology*, 52 (1), 77–88. doi: 10.1093/icb/ics041
- \* Hussain, S., Hussain, S., Qadir, T., Khaliq, A., Ashraf, U., Parveen, A., Saqib, M., & Rafiq, M. (2019). Drought stress in plants: an overview on implications, tolerance mechanisms and agronomic mitigation strategies. *Plant Science Today* 6 (4): 389-402. doi: 10.14719/pst.2019.6.4.578

- Kambona, C. M., Koua, P. A., Léon, J., & Ballvora, A. (2023). Intergenerational and transgenerational effects of drought stress on winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiologia Plantarum*, 175 (4), e13951. doi:10.1111/ppl.13951
- Kim, J. M., To, T. K., Ishida, J., Matsui, A., Kimura, H., & Seki, M. (2012). Transition of chromatin status during the process of recovery from drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 53 (5), 847–856. doi: 10.1093/pcp/pcs053
- Kim, J. M., To, T. K., Ishida, J., Morosawa, T., Kawashima, M., Matsui, A., Toyoda, T., Kimura, H., Shinozaki, K., & Seki, M. (2008). Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 49 (10), 1580–1588. doi: 10.1093/pcp/pcn133
- \* Kooyers, N. J. (2015). The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant Science* 234, 155–162. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.02.012
- Kosová, V., Latzel, V., Hadincová, V., & Münzbergová, Z. (2022). Effect of DNA methylation, modified by 5-azaC, on ecophysiological responses of a clonal plant to changing climate. *Scientific Reports* 12: 17262. doi: 10.1038/s41598-022-22125-z
- \* Lagiotis, G., Madesis, P., & Stavridou, E. (2023). Echoes of a stressful past: abiotic stress memory in crop plants towards enhanced adaptation. *Agriculture* 13 (11), 2090. doi: 10.3390/agriculture13112090
- \* Lämke, J., & Bäurle, I. (2017). Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biology* 18, 124. doi: 10.1186/s13059-017-1263-6
- \* Liu, D., Mewalal, R., Hu, R., Tuskan, G. A., & Yang, X. (2017). New technologies accelerate the exploration of non-coding RNAs in horticultural plants. *Horticulture Research* 4, 17031. doi: 10.1038/hortres.2017.31
- Liu, H., Able, A. J., & Able, J. A. (2020). Transgenerational effects of water-deficit and heat stress on germination and seedling vigour - new insights from durum wheat microRNAs. *Plants*, 9 (2), 189. doi: 10.3390/plants9020189**
- Liu, H., Able, A. J., & Able, J. A. (2021). Small RNAs and their targets are associated with the transgenerational effects of water-deficit stress in durum wheat. *Scientific Reports*, 11, 3613. doi: 10.1038/s41598-021-83074-7**
- MacAlister, C. A., Ohashi-Ito, K., & Bergmann, D. C. (2007). Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*, 445 (7127), 537–540. doi: 10.1038/nature05491
- Marcos, F. C. C., Silveira, N. M., Mokochinski, J. B., Sawaya, A. C. H. F., Marchiori, P. E. R., Machado, E. C., Souza, G. M., Landell, M. G. A., & Ribeiro, R. V. (2018). Drought tolerance of sugarcane is improved by previous exposure to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, 223, 9–18. doi: 10.1016/j.jplph.2018.02.001
- \* Meudt, H. M., & Clarke, A. C. (2007). Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science*, 12 (3), 106–117. doi: 10.1016/j.tplants.2007.02.001
- Morgado, L., Preite, V., Oplaat, C., Anava, S., De Carvalho, J. F., Rechavi, O., Johannes, F., & Verhoeven, K. J. F. (2017). Small RNAs reflect grandparental environments in apomictic dandelion. *Molecular Biology and Evolution*, 34 (8), 2035–2040. doi: 10.1093/molbev/msx150**

- Münzbergová, Z., Latzel, V., Šurinová M., & Hadincová, V. (2019). DNA methylation as a possible mechanism affecting ability of natural populations to adapt to changing climate. *Oikos* 128: 124–134, doi: 10.1111/oik.05591
- Nosalewicz, A., Siecińska, J., Śmiech, M., Nosalewicz, M., Wiącek, D., Pecio, A., & Wach, D. (2016). Transgenerational effects of temporal drought stress on spring barley morphology and functioning. *Environmental and Experimental Botany*, 131, 120–127. doi: 10.1016/j.envexpbot.2016.07.006
- Ohashi-Ito, K., & Bergmann, D. C. (2006). Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *Plant Cell*, 18 (10), 2493–2505. doi: 10.1105/tpc.106.046136
- Qin, T., Zhao, H., Cui, P., Albeshier, N., & Xionga, L. (2017). A nucleus-localized long non-coding RNA enhances drought and salt stress tolerance. *Plant Physiology*, 175 (3), 1321–1336. doi: 10.1104/pp.17.00574
- Quan, J., Münzbergová, Z., & Latzel, V. (2022). Time dynamics of stress legacy in clonal transgenerational effects: a case study on *Trifolium repens*. *Ecology and Evolution*, 12 (5), e8959. doi: 10.1002/ece3.8959**
- Racette, K., Zurweller, B., Tillman, B., & Rowland, D. (2020). Transgenerational stress memory of water deficit in peanut production. *Field Crops Research*, 248, 107712. doi: 10.1016/j.fcr.2019.107712
- \* Sadhukhan, A., Prasad, S. S., Mitra, J., Siddiqui, N., Sahoo, L., Kobayashi, Y., & Koyama, H. (2022). How do plants remember drought? *Planta* 256 (1): 7. doi: 10.1007/s00425-022-03924-0
- \* Sun, R., & Zhu, P. (2022). Advances in measuring DNA methylation. *Blood Science* 4 (1), 8–15. doi: 10.1097/BS9.0000000000000098
- Tabassum, T., Farooq, M., Ahmad, R., Zohaib, A., & Wahid, A. (2017). Seed priming and transgenerational drought memory improves tolerance against salt stress in bread wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 362–369. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.07.007
- Tricker, P. J., Gibbings, J. G., Rodríguez López, C. M., Hadley, P., & Wilkinson, M. J. (2012). Low relative humidity triggers RNA-directed *de novo* DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *Journal of Experimental Botany*, 63 (10), 3799–3814. doi: 10.1093/jxb/err313
- Tricker, P. J., Rodríguez López, C. M., Gibbings, G., Hadley, P., & Wilkinson, M. J. (2013). Transgenerational, dynamic methylation of stomata genes in response to low relative humidity. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (4), 6674–6689. doi: 10.3390/ijms14046674**
- Van Dooren, T. J. M., Silveira, A. B., Gilbault, E., Jiménez-Gómez, J. M., Martin, A., Bach, L., Tisné, S., Quadrana, L., Loudet, O., & Colot, V. (2020). Mild drought in the vegetative stage induces phenotypic, gene expression, and DNA methylation plasticity in *Arabidopsis* but no transgenerational effects. *Journal of Experimental Botany*, 71 (12), 3588–3602. doi: 10.1093/jxb/eraa132**
- Verhoeven, K. J. F., Jansen, J. J., van Dijk, P. J., & Biere, A. (2010). Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *New Phytologist*, 185 (4), 1108–1118. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03121.x

- Verhoeven, K. J. F., & van Gurp, T. P. (2012). Transgenerational effects of stress exposure on offspring phenotypes in apomictic dandelion. *PLoS ONE*, 7 (6), e38605. doi: 10.1371/journal.pone.0038605
- \* Villar-Garea, A., & Imhof, A. (2006). The analysis of histone modifications. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1764 (12), 1932–1939. doi: 10.1016/j.bbapap.2006.08.009
- Wang, W. S., Pan, Y. J., Zhao, X. Q., Dwivedi, D., Zhu, L. H., Ali, J., Fu, B. Y., & Li, Z. K. (2011). Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 62 (6), 1951–1960. doi: 10.1093/jxb/erq391
- Wijewardana, C., Raja Reddy, K., Jason Krutz, L., Gao, W., & Bellaloui, N. (2019). Drought stress has transgenerational effects on soybean seed germination and seedling vigor. *PLoS ONE*, 14 (9), e0214977. doi: 10.1371/journal.pone.0214977
- \* Xu, Y, Jia, H, Tan, Ch., Wu, X, Deng, X., & Xu, Q. (2022). Apomixis: genetic basis and controlling genes, *Horticulture Research*, 9, uhac150. doi: 10.1093/hr/uhac150
- \* Zhang, H., Lang, Z., & Zhu, J. K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 489–506. doi: 10.1038/s41580-018-0016-z
- Zheng, X., Chen, L., Li, M., Lou, Q., Xia, H., Wang, P., Li, T., Liu, H., & Luo, L. (2013). Transgenerational variations in DNA methylation induced by drought stress in two rice varieties with distinguished difference to drought resistance. *PLoS ONE*, 8 (11), e80253. doi: 10.1371/journal.pone.0080253**
- Zheng, X., Chen, L., Xia, H., Wei, H., Lou, Q., Li, M., Li, T., & Luo, L. (2017). Transgenerational epimutations induced by multi-generation drought imposition mediate rice plant's adaptation to drought condition. *Scientific Reports*, 7, 39843. doi: 10.1038/srep39843**
- Zheng, X., Chen, L., Lou, Q., Xia, H., Li, M., & Luo, L. (2014). Changes in DNA methylation pattern at two seedling stages in water saving and drought-resistant rice variety after drought stress domestication. *Rice Science*, 21 (5), 262–270. doi: 10.1016/S1672-6308(13)60194-8**