

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Iva Jelénková

Vnitrodruhová variabilita v antioxidačních systémech rostlin v souvislosti s odolností vůči
suchu

Intraspecific variability in plant antioxidant systems and its impact on drought tolerance

Bakalářská práce

RNDr. Marie Kočová, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 6.5.2011

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Marii Kočové, CSc. za její ochotu a čas, který mi věnovala při psaní bakalářské práce.

Abstrakt

Sucho je jedním z hlavních faktorů omezujících zemědělskou produkci. Reaktivní formy kyslíku (superoxidový radikál, hydroxylový radikál, peroxid vodíku, apod.) vznikající při stresu v buňce aktivují antioxidantní mechanismy, které tyto toxické látky zneškodňují. V řadě prací byla potvrzena pozitivní korelace mezi aktivitou enzymatických (např. kataláza, superoxiddismutáza, glutathionreduktáza, peroxidázy) a neenzymatických (např. glutathion, kyselina askorbová) antioxidantů a odolností rostlin vůči stresu. Byla rovněž zjištěna mezidruhová i vnitrodruhová variabilita v aktivitě antioxidantních systémů rostlin. Vyšší aktivita byla pozorována u hybridních genotypů F1 generace, u kterých se projevil pozitivní heterózní efekt, nebo u rostlin ošetřených podpůrnými látkami, jako jsou např. kyselina abscisová, brassinosteroidy a dusík. Nárůst aktivit antioxidantních látek byl zjištěn také v souvislosti se stupněm ploidie nebo silou stresu. Byla pozorována i lepší odolnost rostlin vůči jiným abiotickým stresorům po jejich předchozím vystavení stresu suchem. Reakce rostlin na stres je komplexní a závisí na mnoha dalších vnitřních a vnějších faktorech.

Klíčová slova: sucho, stres, antioxidanty, mezidruhová variabilita, vnitrodruhová variabilita, genotypy, ploidie, heteróze

Abstract

Drought is one of the major factors limiting agricultural production. Reactive oxygen species (eg. superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide) generated during stress in plant cells activate antioxidant mechanisms, which scavenge those toxic substances. The positive correlation between activity of enzymatic (eg. catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase, peroxidases) and nonenzymatic (eg. glutathione, ascorbic acid) antioxidants and stress tolerance was confirmed in various studies. Both interspecific and intraspecific variability was found in activities of antioxidant systems of plants. Higher activity was also observed in F1 generation in relation to positive heterosis, or in plants treated with supportive substances such as abscisic acid, brassinosteroids and nitrogen. The increase in the activity of antioxidants was also proved in relation to the ploidy level or to intensity of drought. It was observed the positive effect of previous drought exposition on tolerance to other abiotic stressors. The complex response of plants to stress factors depends on many other internal and external factors.

Key words: drought, stress, antioxidants, intraspecific variability, interspecific variability, genotypes, ploidy, heterosis

Seznam zkratek

AA	kyselina askorbová
ABA	kyselina abscisová
APX.....	askorbátperoxidáza
CAT.....	kataláza
cv.	kultivar
GR	glutathionreduktáza
NADPH.....	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADP ⁺	oxidovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
PEG	polyethylenglykol
POX/POD.....	peroxidáza, guaiacolperoxidáza
ROS	reaktivní formy kyslíku
RWC.....	relativní obsah vody
SOD.....	superoxiddismutáza

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Stres suchem.....	2
2.1. Oxidativní stres	2
2.2. Reaktivní formy kyslíku.....	3
3. Antioxidační systémy rostlin.....	4
3.1. Superoxiddismutáza	5
3.2. Glutathionreduktáza, glutathion.....	6
3.3. Kataláza, peroxidázy	6
3.4. Kyselina askorbová	7
3.5. Tokoferol.....	7
3.6. Karotenoidy.....	7
4. Účinky stresu suchem.....	7
4.1. Pozitivní vliv stresu suchem	7
4.2. Vliv sucha na plodnost.....	8
4.3. Vliv pomalu nastupujícího sucha.....	8
4.4. Faktory ovlivňující reakci rostliny na stres.....	8
4.5. Vliv vývojového stádia rostliny	9
4.6. Míra stresu suchem	9
5. Vnitrodruhová variabilita antioxidačních systémů	10
5.1. Vliv antioxidačních enzymů na plodnost.....	10
5.2. Výhoda rostlin předem stresovaných suchem.....	10
5.3. Vliv pomalu nastupujícího sucha.....	11
5.4. Závislost na míře stresu suchem	12
5.5. Porovnání citlivých a odolných genotypů.....	13
5.6. Regulace aktivit antioxidantů přidáním podpůrných látek	17
5.6.1. Kyselina abscisová (ABA).....	17
5.6.2. Brassinosteroidy	17
5.6.3. CaCl ₂	17
5.6.4. Dusík	17
5.7. Vnitrodruhová variabilita a heteróze.....	18
5.7.1. Vliv heteróze na antioxidační systémy.....	18
5.8. Vliv stupně ploidie na antioxidační systémy	18
6. Závěr.....	19
7. Seznam použité literatury.....	20

1. Úvod

Postupné změny klimatu a nárůst populace vyvolávají zvýšenou poptávku po hospodářsky významných rostlinách, které by splňovaly nejvyšší požadavky na výnos a kvalitu a byly současně dostatečně odolné zejména vůči měnícím se faktorům vnějšího prostředí. Jednou z největších komplikací současného pěstování rostlin je sucho. Rostliny, které jsou k němu citlivé, vadnou, méně rostou a snižuje se například jejich výnos či plodnost. Cílem četných studií je tedy snaha o nalezení nebo zlepšení takových parametrů, které se významně uplatňují ve stresové reakci rostlin. Jedním z těchto parametrů jsou antioxidantní systémy. Jsou to buď enzymatické, nebo neenzymatické látky, pomocí kterých se rostlina zbavuje nebezpečných reaktivních forem kyslíku vznikajících při různých typech stresu.

Když rostlina během sucha uzavře své průduchy, zabrání přístupu oxidu uhličitého a tím i fixaci uhlíku v Calvinově cyklu. Hromadí se NADPH a elektrony z elektron-transportního řetězce nemají akceptor. Tím se v těchto situacích stává kyslík, ze kterého tak vznikají nebezpečné reaktivní formy (např. superoxidové radikály, hydroxylové radikály, singletový kyslík, apod.), které poškozují buněčné struktury a funkce. Rostlina se potřebuje těchto toxických látek zbavovat a k tomu jí slouží zejména antioxidantní látky, jako např. superoxid-dismutáza, kataláza, askorbátperoxidáza, glutathionreduktáza, glutathion, kyselina askorbová. Jejich funkce na sebe navazují, některé zneškodňují produkty těch předchozích. Množství a aktivita antioxidantních látek je tedy pro rostlinu při jakémkoli typu stresu velmi důležitá, protože určuje, jestli rostlina přežije, nebo ne. Mezi různými druhy rostlin i mezi odlišnými genotypy téhož druhu existuje variabilita ve stresové odpovědi, která je základem pro výběr a šlechtění rostlin na vyšší odolnost vůči suchu a dalším nepříznivým vnějším vlivům.

Cílem předložené práce je shrnutí poznatků o mezidruhové a vnitrodruhové variabilitě antioxidantních systémů a jejím využití při výběru a šlechtění vhodných genotypů pro konkrétní podmínky. V práci jsem se zaměřila také na faktory ovlivňující míru projevu antioxidantů, kterými jsou např. síla stresu, rychlost jeho nástupu, roční období, růstové stádium rostliny nebo morfologické a fyziologické dispozice rostliny, díky kterým může vodu využívat a lépe udržet.

Reakce rostliny na stres představuje komplexní mechanismus vyžadující spolupráci morfologických, fyziologických a molekulárních přizpůsobení, které odolnějším rostlinám poskytují výhodu oproti citlivým.

2. Stres suchem

V přírodě je voda většinou nejvíce limitujícím faktorem růstu rostlin. Za ideálních podmínek jí rostliny získávají ze srážek, za umělých podmínek jsou rostliny zavlažovány. Pokud nejsou rostliny přirozeně nebo uměle zavlažovány může dojít, v závislosti na dalších podmínkách, k vadnutí a oxidativnímu stresu.

Doba potřebná k projevení stresové reakce rostlin je závislá na různých vnějších i vnitřních faktorech a může se lišit mezi různými druhy i v rámci druhu. Záleží na typu půdy, (schopnosti vázat a propouštět vodu), na velikosti a rozvinutosti kořenového systému, na růstovém stádiu rostliny, velikosti prýtu, který s vodou hospodaří, na efektivitě antioxidantních mechanismů, na osmoticky aktivních látkách v rostlině, apod.

Při nedostatku vody rostlina začne zavírat průduchy, tím se sníží množství CO_2 v listovém mezofylu a začne se hromadit NADPH. V takovýchto podmínkách, kde je NADP limitující, se alternativním akceptorem volných elektronů stane kyslík, což vede ke vzniku nebezpečných kyslíkových radikálů (Egneus *et al.*, 1975; Moran *et al.*, 1994; Alscher *et al.*, 1997). Redukcí kyslíkových radikálů vzniká H_2O_2 nebo také hydroxylový radikál. Tyto látky v buňkách peroxidují lipidy, což vede k poškození membrán, degradaci proteinů, inaktivaci enzymů, uvolnění a degradaci pigmentů, k poškození DNA apod. (Fridovich, 1986; Imlay a Linn, 1988; Bartoli *et al.*, 2004).

Detoxifikace kyslíkových radikálů a peroxidu vodíku je tedy pro rostlinu zcela zásadní. K tomu rostlině slouží antioxidantní mechanismy, kterými jsou například enzymy superoxidodismutáza (SOD), kataláza (CAT), peroxidáza (POX, POD), askorbátperoxidáza (APX), glutathionreduktáza (GR) a metabolity glutathion, kyselina askorbová (AA), α -tokoferol a karotenoidy. Odlišná aktivita těchto antioxidantů je proto pro odolnost/citlivost vůči suchu velmi důležitá a rostliny se také podle ní hodnotí.

2.1. Oxidativní stres

Oxidativní stres je stav v rostlině navozený reaktivními formami kyslíku (ROS) (superoxidový radikál, singletový kyslík, peroxid vodíku, hydroxylový radikál), které vznikají jako meziprodukty redukce kyslíku. V rostlinách vznikají i v běžných reakcích, v důsledku reakcí probíhajících zejména v mitochondriích a chloroplastech, ale jejich množství se zvyšuje po vystavení rostlin stresu. Volné radikály jsou nestabilní, protože mají nespárovaný elektron, díky kterému jsou vysoce reaktivní a mohou způsobit vážné poškození buněčných

struktur a funkcí. Schopnost zneškodňovat ROS mají antioxidanty vznikající v rostlině přirozeně a jejich množství a aktivita se zvyšuje v důsledku stresu.

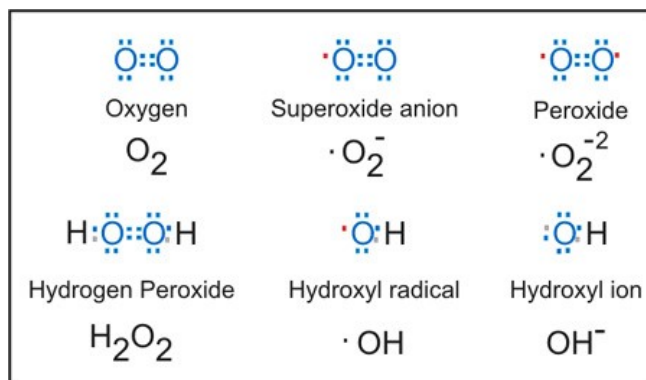
2.2. Reaktivní formy kyslíku

Rostlina vystavená suchu nejdříve zavře svoje průduchy, aby zabránila nežádoucímu poklesu obsahu vody v listech. Tím ale zabrání přístupu vzduchu a koncentrace vnitřního CO₂ poklesne, což vede k poklesu fixace uhlíku a fotosyntézy. NADPH, který je běžně zdrojem energie při fixaci uhlíku v Calvinově cyklu, není při nedostatku CO₂ štěpen na NADP a nemůže tak přijímat elektrony z elektron-transportního řetězce fotosyntézy. Tyto volné elektrony potom mohou redukovat molekulární kyslík (akceptor) O₂ za vzniku toxických volných radikálů: superoxidové radikály O₂^{·-}, hydroxylové radikály ·OH, peroxylové radikály ROO·, singletového kyslíku ¹O₂ a peroxidu vodíku H₂O₂ (Obr. 1). Tyto pak mohou poškodit enzymy, proteiny, lipidy a DNA (Sairam *et al.*, 1998). K tvorbě ROS dochází v chloroplastech, mitochondriích, endoplazmatickém retikulu, buněčné stěně, plazmatické membráně, peroxizómech a glyoxizómech.

Nicméně ROS mohou také sloužit jako molekuly přenášející signál o suchu, a tím posilovat obranné mechanismy rostlin (Yoshimura *et al.*, 2000; Foyer a Noctor, 2005). Foyer a Noctor (2005) upřednostňují název „oxidativní signalizace“ před „oxidativním stresem“, protože především superoxidový radikál a peroxid vodíku mají v buňce funkci sekundárních posílů. Aktivované antioxidanty mají pak v buňce další kontrolní a obranné funkce.

Zvýšené množství peroxidu vodíku u odolného genotypu fazole (*Phaseolus vulgaris* L.) Prelom, doprovázené vysokými hodnotami aktivity antioxidantních enzymů (CAT, APX) zjistili např. (Zlatev *et al.*, 2006). Zvýšená hladina peroxidu vodíku zde má spíše roli v signálních transdukčních cestách, což může mít souvislost s obranou proti stresu suchem a dále je peroxid vodíku důležitý pro tvorbu ligninu.

Obrázek 1. Elektronové struktury běžných reaktivních forem kyslíku. Převzato z biotek.com .



3. Antioxidační systémy rostlin

Antioxidanty jsou molekuly schopné zpomalit, nebo úplně potlačit oxidaci jiných molekul. Oxidační činidlo při oxidaci odebírá elektron jiné molekule a tím z ní může vytvořit volný nebezpečný radikál. Antioxidanty jsou samy oxidovány a zabraňují tak nežádoucí oxidaci jiných molekul. Mohou mít enzymatický charakter jako např. kataláza, superoxiddismutáza, peroxidázy, glutathionreduktáza, nebo neenzymatický charakter jako např. glutathion, kyselina askorbová (vitamin C), tokoferol a karotenoidy. Reakce antioxidačních enzymů jsou shrnuty v Tab. 1.

Ve své práci se věnuji především antioxidačním enzymům, proto neenzymatické antioxidanty zmíním jen krátce a okrajově.

Tabulka 1. Enzymy detoxifikující ROS (Blokhina *et al.*, 2003)

Enzym	EC číslo	Katalyzovaná reakce
Superoxiddismutáza	1.15.1.1	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \leftrightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Kataláza	1.11.1.6	$2H_2O_2 \leftrightarrow O_2 + 2H_2O$
Glutathionperoxidáza	1.11.1.12	$2GSH + PUFA-OOH \leftrightarrow GSSG + PUFA + 2H_2O$
Glutathion-S-transferáza	2.5.1.18	$RX + GSH \leftrightarrow HX + R-S-GSH^*$
Fosfolipid-hydroperoxid glutathionperoxidáza	1.11.1.9	$2GSH + PUFA-OOH (H_2O_2) \leftrightarrow GSSG + 2H_2O^\dagger$
Askorbátperoxidáza	1.11.1.11	$AA + H_2O_2 \leftrightarrow DHA + 2H_2O$
Guaiacolperoxidáza	1.11.1.7	$Donor + H_2O_2 \leftrightarrow oxidovaný\ donor + 2H_2O^\ddagger$
Monodehydroaskorbátreduktáza	1.6.5.4	$NADH + 2MDHA \leftrightarrow NAD^+ + 2AA$
Dehydroaskorbátreduktáza	1.8.5.1	$2GSH + DHA \leftrightarrow GSSG + AA$
Glutathionreduktáza	1.6.4.2	$NADPH + GSSG \leftrightarrow NADP^+ + 2GSH$

* R může být alifatická, aromatická, heterocyklická skupina, X může být síran, dusitan, halid

PUFA=polynenasycené mastné kyseliny

Ve většině prací zabývajících se studiem množství a aktivity antioxidantních enzymů v souvislosti se stresem suchem bylo potvrzeno, že čím více antioxidantních enzymů rostlina má a čím větší mají aktivitu, tím je odolnější vůči tomuto stresu (Tab. 2). Může to být jedno z kritérií testování odolnosti/citlivosti rostlin k suchu.

Byly však publikovány i práce, v nichž nebyl potvrzený jednoznačný vztah mezi aktivitou antioxidantních enzymů a odolností rostlin vůči stresu. Například u banánovníku (*Musa L.*) byla zjištěna nízká aktivita CAT u odolného genotypu (Chai *et al.*, 2005), podobně jako byla zjištěna nízká aktivita SOD u pšenice (*Triticum durum* Desf.) (Zaefyzadeh *et al.*, 2009). Rozdíl v aktivitě antioxidantních enzymů mezi rostlinami zavlažovanými a stresovanými suchem se nemusí objevit, jak potvrzují Simova-Stoilova *et al.* (2008) na kultivarech pšenice (*Triticum aestivum L.*), nebo Kholová *et al.* (2011) u *Pennisetum glaucum (L.)*.

Zajímavou práci publikovali Zamora *et al.* (2010), kteří studovali aktivitu antioxidantních enzymů u *Deschampsia antarctica*, rostoucí v oblasti Antarktidy. Rostliny vykazovaly zvýšenou aktivitu CAT, GR a POX při stresu suchem ve srovnání s rostlinami, které nebyly vystaveny tomuto stresoru. Větší schopnost inaktivovat volné radikály podle jejich názoru dokazuje souvislost odolnosti rostlin s mírou aktivity antioxidantních enzymů.

Odolnost nebo citlivost rostlin nemusí nutně korelovat s mírou aktivity antioxidantních enzymů ve velmi raných vegetativních stádiích pšenice (Simova-Stoilova *et al.*, 2008). Může to souviset se skutečností, že vyšší aktivita některých enzymů může kompenzovat nižší aktivitu jiných. Autoři (Noctor a Foyer, 1998) též uvažují o synchronizovanosti v buňce, kde k efektivnímu ničení reaktivních kyslíkových forem je důležitější jejich spolupráce než úplný výčet všech enzymů.

Aktivita antioxidantních enzymů je významně ovlivněna také intenzitou záření (což souvisí s roční dobou), při níž rostlina roste. Byly např. zjištěny průkazně vyšší hodnoty aktivity antioxidantních enzymů (APX, GR) u rostlin (*Pisum sativum L. cv. Meteor*) pěstovaných v květnu-červnu, než u těch samých pěstovaných v prosinci-lednu (Gillham a Dodge, 1987).

3.1. Superoxiddismutáza

Superoxiddismutáza je enzym katalyzující reakci přeměny superoxidového radikálu na méně nebezpečné formy kyslíku - molekulární kyslík a peroxid vodíku (Tab. 2). Takto katalyzovaná reakce probíhá 10 000x rychleji, než spontánně probíhající reakce (Bowler *et al.*, 1992). Vzniká peroxid vodíku, který je však pro rostlinu také škodlivý a jeho odstranění

katalyzuje např. enzym kataláza. V rostlinné buňce je několik izoenzymů SOD. Mn-SOD v mitochondriích, Fe-SOD v chloroplastech (ne tak časté), CuZn-SOD v chloroplastech a cytosolu (Bannister a Calabrese, 1987).

Aktivita SOD se však často během stresu nezvyšuje na rozdíl od ostatních antioxidantních enzymů (APX, CAT, GR). Je možné, že aktivita SOD není pro odolnost limitující (Sairam *et al.*, 1998) a větší význam z hlediska odolnosti rostlin vůči stresu tak mají APX a CAT (Saruyama a Tanida, 1995). Je rovněž možné, že aktivita SOD se zvyšuje až po déle trvajícím působení stresu (Sairam *et al.*, 2001a).

U citlivých genotypů pšenice (*Triticum durum* Desf.) aktivita SOD během stresu dokonce klesá a za rezistentní se považují ty, u kterých se buď aktivita nemění, nebo se jen lehce zvyšuje (Zaefyzadeh *et al.*, 2009).

3.2. Glutathionreduktáza, glutathion

Glutathionreduktáza je enzym katalyzující reakci, která obnovuje glutathion. Glutathion je tripeptid podílející se na odstraňování peroxidu vodíku v glutathion-askorbátovém cyklu (Noctor a Foyer, 1998). Může být oxidován i redukován, ale pomocí GR je v buňce udržován v redukované formě, ve které může redukovat ostatní metabolity a enzymatické systémy. Thiolová skupina cysteinu v redukovaném glutathionu má schopnost poskytnout H^+ a e^- nestabilním molekulám, jako jsou ROS. Zvýšená aktivita GR v rostlinách ukazuje na vyšší odbourávání ROS, ale může také sloužit k zajištění čerpání elektronů pro NADP z elektron-transportního řetězce a ne z kyslíku (Sairam *et al.*, 1997).

Stejnou funkci jako GR má i APX, ale GR se v odpovědi rostlin uplatňuje dřív.

3.3. Kataláza, peroxidázy

Kataláza je spolu s peroxidázami (APX, POX) hlavním enzymem odbourávajícím peroxid vodíku na vodu a kyslík.

Stejnou funkci jako CAT má v buňkách i APX. Ta má, podle některých autorů, větší podíl na odbourávání peroxidu vodíku než CAT (Van Rensburg a Kruger, 1994). Bylo např. zjištěno, že u odolného genotypu banánu Berangan byla aktivita CAT nižší oproti citlivému genotypu Mas, a přes to byl tento genotyp odolný proti stresu suchem (Chai *et al.*, 2005). Případů, kdy se aktivita CAT při stresu suchem nezvýšila, přičemž aktivita APX ano, je mnoho. Například u *Pennisetum glaucum* (L.) (Kholová *et al.* 2011), u trav (Fu a Huang, 2001), nebo u rýže (*Oryza sativa* L.) (Selote a Khanna-Chopra, 2004).

Snížená aktivita CAT může být důsledkem inhibice fotosyntézy a fotorespirace během sucha (Hameed *et al.*, 2011).

3.4. Kyselina askorbová

Kyselina askorbová (AA), neboli vitamin C, je pravděpodobně nejsilnějším antioxidantem. Je snadno oxidovaná a díky tomu účinně odbourává ROS. Reakci, ve které se z AA přenáší elektrony na peroxid vodíku a tím ho rozkládají na vodu a dehydroaskorbát, katalyzuje askorbátperoxidáza (APX).

3.5. Tokoferol

Tokoferoly a tokotrienoly, neboli vitamin E, jsou součástí membrán, které chrání před produkty peroxidace. Nejvíce studovaný je α -tokoferol rozpustný v tucích, který chrání membrány před oxidací reaktivními lipidovými radikály. Jeho oxidovaná forma je redukována například pomocí askorbátu (Diplock *et al.*, 1989).

3.6. Karotenoidy

Karotenoidy jsou isoprenoidy a tetraterpeny, které mají vedle funkce fotosyntetických barviv hlavně funkci detoxifikační. Nacházejí se v chloroplastech, kde reagují s produkty peroxidace lipidů, čímž ukončují tuto řetězovou reakci, nebo zneškodňují singletový kyslík a energii uvolňují v podobě tepla.

4. Účinky stresu suchem

4.1. Pozitivní vliv stresu suchem

Vystavení rostlin stresu suchem může mít kromě výše zmíněných negativních vlivů i pozitivní vliv na různé funkce rostlin, zejména v případech, kdy jsou rostliny vystaveny kombinovaným abiotickým stresorům. Bylo zjištěno, že stres suchem má pozitivní vliv na rostliny, které byly následně vystaveny stresu chladem. Pokusy byly prováděny na kukuřici (*Zea mays* L.) (Irigoyen *et al.*, 1996; Javier *et al.*, 1997; Aroca *et al.*, 2003), topolu (následný stres suchem) (*Populus cathayana*) (Xiao *et al.*, 2008) a blahovičnicku (*Eucalyptus globulus* Labill.) (Silva *et al.*, 2009). Podrobněji je diskutováno v kapitole 5.2.

Stejně tak jako se zvyšuje při oxidativním stresu aktivita antioxidantních enzymů (POX, PPO-polyfenoloxidáza), zvyšuje se i množství některých jiných látek, např. alkaloidů.

Ty se poté dále využívají ve farmacii pro přípravu léků, které potlačují nádory (Jaleel *et al.*, 2007).

4.2. Vliv sucha na plodnost

Aktivita a množství antioxidantních mechanismů byly rovněž studovány v souvislosti s plodností rostlin. Bylo zjištěno, že citlivý genotyp rýže (*Oryza sativa* L.), který by měl v optimálních podmínkách větší výnos, má v důsledku sucha menší množství antioxidantních systémů, což celkově vede ke sterilitě klásků (Selote a Khanna-Chopra, 2004). Samčí sterilita rýže nastává dřív (pylová zrna jsou náchylnější ke stresu) a mohla by být způsobena nedostatečným ukládáním škrobu do pylových zrn (Sheoran a Saini, 1996). Samičí sterilita pšenice (*Triticum aestivum* L.) nastává po dlouhém a silném stresu suchem (Lalonde *et al.*, 1997).

Nedostatečné odbourávání ROS způsobující poškození DNA, proteinů, a membrán v době tvorby generativních orgánů (nejvíce při meioze) má tedy ve svých důsledcích negativní vliv na plodnost rostlin.

Sucho ovlivňuje i tvorbu semen u slunečnice (*Helianthus annuus* L.). Vyšší aktivita antioxidantních enzymů byla v korelaci s vyšším výnosem (Pourtaghi *et al.*, 2011).

4.3. Vliv pomalu nastupujícího sucha

Reakce rostlin na stres suchem závisí také na rychlosti nástupu sucha. V přírodě sucho často nastává pomalu a rostliny jsou ve svém přirozeném prostředí. V simulovaných podmínkách ho můžeme navodit omezením závlivky, nebo přidáním polyethylenglykolu (PEG) (Chai *et al.*, 2005; Moussa a Abdel Aziz, 2008; Li *et al.*, 2009; Zamora *et al.*, 2010). Při experimentálních podmínkách tomu tak často není a rostliny jsou navíc pěstovány v malých květináčích, kde proschnutí nastupuje rychle. Při pomalém nástupu sucha má rostlina možnost se fyziologicky a mnohdy i morfologicky přizpůsobit a vyhnout se tak oxidativnímu stresu.

4.4. Faktory ovlivňující reakci rostliny na stres

Rostlina se proti stresu brání souborem mechanismů a až jejich společná kooperace vytváří její definitivní reakci na stres.

Antioxidantní mechanismy nastupují až ve chvíli, kdy má rostlina opravdu nedostatek vody, to ale může nastat pro různé rostliny na stejném stanovišti v rozdílnou dobu. Klíčové

jsou v tuto chvíli schopnosti rostliny udržet si vodu, lépe jí vázat, ale i velikost kořenového systému. Osmotické regulátory jako např. K^+ ionty, prolin a rozpuštěné cukry mají schopnost lépe absorbovat vodu i ze sušších míst (Shao *et al.*, 2006).

Aktivitu antioxidantních enzymů lze kontrolovaně regulovat, např. zvýšit přidáním brassinosteroidů (Yuan *et al.*, 2010), $CaCl_2$ (Upadhyaya *et al.*, 2011), kyselinou abscisovou (ABA) (Keles a Ünyayar, 2004) a dusíku (Zhang *et al.*, 2007 a Liu *et al.*, 2008). Také rostliny trávy *Elymus dahuricus* napadené endofytní houbou *Neotyphodium* vykazovaly při stresu suchem vyšší aktivity antioxidantních enzymů (SOD, POX, CAT, APX) než rostliny nenapadené, což dokazuje pozitivní vliv mykorrhizy (Zhang a Nan, 2007; Zhang a Nan, 2010).

4.5. Vliv vývojového stádia rostliny

Reakce rostlin na stres je odlišná také v závislosti na fázi vývoje, v níž byla vystavena působení stresu (Shao *et al.* 2005, Khan a Naqvi 2010).

Khan a Naqvi (2010) studovali u genotypů pšenice v různých růstových stádiích (vegetativní, kvetení, nalévání a tvorba zrn) jejich odpověď na stres suchem. Ve vegetativním stádiu různé genotypy pšenice odpovídaly klasicky zvyšováním aktivity antioxidantů (POX, SOD). Při kvetení se však aktivita snížila a při posledním stádiu se zase trochu posílila. Odpověď antioxidantních enzymů těchto genotypů se lišila ještě v závislosti na míře stresu.

4.6. Míra stresu suchem

V pokusech zaměřených na studium vlivu stresorů jsou rostliny vystaveny obvykle odlišným úrovním stresu (většinou procentuální nasycenost substrátu vodou, nebo počtem dnů bez zalévání). Neplatí ovšem vždy, že čím větší je stres, tím vyšší je aktivita antioxidantních enzymů. Antioxidanti enzymy každého genotypu mohou reagovat na určitou míru stresu odlišně a pro každý genotyp může být hraniční hodnota jiná (Anjum *et al.*, 2008; Hameed *et al.*, 2011; Pourtaghi *et al.*, 2011).

5. Vnitrodruhová variabilita antioxidačních systémů

V reakci rostlin na stres suchem existuje značná mezidruhová i vnitrodruhová variabilita. Ta je obvykle studována v souvislosti se změnami morfologických nebo funkčních parametrů rostlin, aktivitou a typem obranných mechanismů, s výnosovými parametry rostlin a schopností celkově se vyrovnat s negativními účinky stresu. Reakce různých genotypů však nejsou jednoznačné, závisejí na mnoha vnitřních i vnějších faktorech a jsou ovlivnitelné podpůrnými látkami.

5.1. Vliv antioxidačních enzymů na plodnost

Míra sterility klásků rýže (*Oryza sativa* L.) byla studována v závislosti na spektru izoenzymů SOD a APX u odolného (N22) a citlivého (N118) kultivaru. U citlivého N118 bylo zjištěno pět izoenzymů SOD a pouze jeden izoenzym APX, zatímco u odolného N22 bylo sedm izoenzymů SOD a čtyři izoenzymy APX. Tento rozdíl se projevil na množství neodbouraného peroxidu vodíku. Podobně tomu bylo i pokud jde o množství a účinnost kyseliny askorbové, glutathionu, GR, POX a SOD, zatímco aktivita CAT byla vyšší u citlivého N118 (Selote a Khanna-Chopra, 2004). Funkce těchto enzymů na sebe v rostlině při obranných mechanismech navazuje a i když jsou částečně zastupitelné (Willekens *et al.*, 1997), nižší aktivita, nebo ztráta některého z nich je pro rostlinu zcela zásadní a může způsobit oxidativní poškození. Výše uvedené rozdíly byly příčinou sterility genotypu N118 na rozdíl od genotypu N22, který si zachoval plnou fertilitu.

U čtyř genotypů slunečnice (*Helianthus annuus* L.) byla sledována korelace mezi množstvím semen a aktivitou antioxidačních enzymů během sucha. Pozitivní korelace se projevila především u CAT a glutathion peroxidázy u genotypu Allestar. Tento poznatek je zajímavý v ohledu na rozmnožování rostlin, ale u slunečnice zejména z hospodářského hlediska (Pourtaghi *et al.*, 2011).

5.2. Výhoda rostlin předem stresovaných suchem

Vnitrodruhové rozdíly v citlivosti k oxidativnímu stresu byly studovány u kukuřice (*Zea mays* L.) v souvislosti s kombinovaným účinkem různých stresorů. Během stresu chladem uniká voda otevřenými průduchy a rostlina usychá. Předchozí stres suchem urychlí jejich zavírání a následky poškození nadměrnou ztrátou vody jsou menší. Bylo tomu tak např. u genotypu kukuřice (*Zea mays* L.) Errazu (citlivý k chladu), kdy rostliny předem stresované

suchem vykazovaly nižší obsah i aktivitu ROS, nižší peroxidaci lipidů a lepší příjem vody (RWC) během následného stresu chladem (Irigoyen *et al.*, 1996). Podobné výsledky získali u kukuřice (genotyp Penjalinan citlivý k chladu) i Javier *et al.* (1997) a Aroca *et al.* (2003), kdy příznivý účinek předchozího stresu suchem byl více patrný u citlivého genotypu Penjalinan, než u odolného Z7. Aroca *et al.* (2003) navrhuje možnost vlivu peroxidu vodíku, jehož množství po prvním stresu suchem zůstalo vyšší, jakožto signální molekuly při obraně proti stresu chladem.

Rostliny se po ukončení stresu chladem, který následuje po stresu suchem lépe zotavují. Genotyp Penjalinan (citlivý k chladu), se nakonec po stresu chladem zotavoval stejně jako odolný genotyp Z7 který nebyl předem vystavený vodnímu deficitu. Vykazoval vyšší účinnost fotosyntézy a nižší pokles hladiny askorbátu ve srovnání s odolným Z7. Množství glutathionu se zvýšilo u obou genotypů, méně však u Z7. Penjalinan měl ve srovnání s Z7 méně nekrotizovaného listového pletiva (Aroca *et al.*, 2003).

Xiao *et al.* (2008) zjistili u dvou populací topolu (*Populus cathayana* Rehder.) rostoucích v sušších a vlhčích oblastech odlišnou adaptivní odpověď na stres suchem. Rostliny ze sušší oblasti následně reagovaly lépe na stres suchem vyšší aktivitou POX a větším množstvím karotenoidů, na rozdíl od rostlin z vlhčí oblasti.

5.3. Vliv pomalu nastupujícího sucha

Brown *et al.* (1995) pozorovali u kukuřice (*Zea mays* L.), že hodnoty GR, APX a peroxidu vodíku nebyly nijak ovlivněny pomalu nastupujícím mírným suchem, rostlina se stačila aklimatizovat. Ke stejným výsledkům dospěli u pšenice (*Triticum durum* Desf.) vystavené suchu po 35 dní Loggini *et al.* (1999). Aktivita GR u citlivého genotypu Adamello se při stresu suchem zvýšila na rozdíl od odolného genotypu Ofanto, u něhož nebyla zjištěna žádná změna aktivity GR. Rostliny odolného genotypu nebyly poškozeny oxidativním stresem natolik, aby musely zapojit své antioxidační mechanismy. Tento genotyp si za sucha zachoval stejnou růstovou rychlost jako kontrolní rostliny pěstované v optimálních podmínkách s normální zálivkou. Naproti tomu, v podobném experimentu se dvěma citlivými a dvěma tolerantními genotypy kávovníku (*Coffea canephora*) nebyly zjištěny žádné rozdíly v poškození oxidativním stresem v důsledku sucha (Pinheiro *et al.*, 2004).

Jak bylo již uvedeno výše, reakce rostlin na stres závisí na rychlosti jeho nástupu a jeho intenzitě. Pomalu nastupující sucho může navodit např. u semenáčků dřevnatých rostlin přizpůsobení (lepší kořenový systém, lepší absorpce vody a minerálů), které rostliny chrání před inhibicí růstu k níž dochází při náhlém navození stresu. Krátce trvající sucho během

vývoje rostlin obvykle posílí jejich růst. Cykly střídajícího se sucha a závlahy rostlinám prospívají (Kozłowski a Pallardy, 2002)

5.4. Závislost na míře stresu suchem

Rovněž míra působení stresu silně ovlivňuje reakci rostlin, která může být odlišná u různých genotypů téhož druhu. Např. u dvou genotypů *Vigna radiata* (L.) (Pusa 9531 a PS 16) bylo zjištěno, že největší nárůst aktivity antioxidantních enzymů byl při 75% půdní vlhkosti ve srovnání s původním nasyceným stavem. Pusa 9531 vykazoval vyšší hodnoty než PS16. Při dalším poklesu vlhkosti (na 50%) nebyl nárůst aktivity tak výrazný. Nárůst hladiny ROS s rostoucím suchem vede k inaktivaci aktivity CAT a i aktivita APX klesá. Takové změny vedou ke zvýšení míry oxidativního stresu, který rostlinu poškozuje (Anjum *et al.*, 2008).

K podobným výsledkům dospěli Hameed *et al.* (2011), kteří studovali vliv odlišné míry sucha (100% vlhkost, 75% vlhkost, 50% vlhkost, bez zalévání) na aktivitu CAT, POX, SOD a APX u sedmi genotypů pšenice (*Triticum aestivum* L.) (NR-234, Pfau, Nesser, FD-83, Sitta, Sarsabz, NR-241). Různé genotypy reagovaly odlišně v závislosti na intenzitě stresu a žádný genotyp nevykazoval jednoznačnou reakci ve všech studovaných parametrech. Pro CAT byla už 75% vlhkost (100% = nejvyšší možná absorpce vody půdou) signálem pro zvýšení aktivity, pro POX a APX to byla až 50% vlhkost. Od těchto hodnot pak aktivity enzymů klesaly. Hodnoty SOD sice během stresu mírně rostly a klesaly (nejvyšší hodnoty nabývaly většinou při 75% vlhkosti), ale rozdíly mezi nimi byly velmi malé. Téměř všem rostlinám bez zalévání (až na 2 případy z 28) aktivita všech antioxidantních enzymů již nestoupala, ale klesala. Někdy (v 11-ti případech z 28) byla jejich hodnota dokonce nižší než hodnota plně zalévané kontroly (100% vlhkost). Celkově však rostliny reagovaly na nastupující stres zvýšením aktivit antioxidantů, jak bychom očekávali. Pouze v pěti případech (u třech genotypů) se při nejslabším stresu, tj. 75% vlhkosti aktivita enzymu snížila a vzrostla až na další úrovni.

To potvrzují i další pokusy např. na slunečnici, kdy hodnoty aktivit čtyř antioxidantních enzymů (SOD, CAT, GR, glutathionperoxidáza) byly nejvyšší při mírném stresu (na rozdíl od plně zalévaného stavu a extrémnímu stresu). Při extrémním stresu aktivita antioxidantních enzymů sice klesala, ale nikdy neklesla pod hodnoty plně zalévaných rostlin (Pourtaghi *et al.*, 2011).

Pokud aktivita antioxidantních enzymů někdy klesne pod hodnoty kontrolních rostlin, je tomu tak většinou u největšího sucha. U suchem stresovaného genotypu pšenice (*Triticum*

aestivum L.) Beltskaya však aktivity GR a APX klesly pod hodnoty kontrol již při mírném stresu. Na rozdíl od dalších dvou porovnávaných genotypů Ballada a Belchanka, u kterých toto nastalo při silnějším a nejsilnějším stresu suchem (vztaženo na počet dnů sucha) (Nikolaeva *et al.*, 2010).

5.5. Porovnání citlivých a odolných genotypů

Jak vyplývá z mnoha studií (Tab. 2), odolné genotypy rostlin mají vyšší aktivitu antioxidantních enzymů oproti citlivým. Citlivým genotypům se aktivita různých enzymů buď zvyšuje méně, nebo někdy dokonce i klesá. Na základě těchto prací by bylo možné rozlišovat genotypy na odolné a citlivé podle aktivity enzymů, což má praktický význam při šlechtění a výběru rostlin odolných proti stresu suchem. Možnost určení odolnosti genotypů podle aktivity antioxidantních enzymů byla však využita jen výjimečně (Zlatev *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009), ve zbylých studiích byly studovány genotypy, u kterých byla citlivost k suchu již předem známa. V práci Li *et al.* (2009) byl parametr aktivity antioxidantních enzymů (SOD, POX) pouze dílčí a nebyla mu přikládána taková váha jako ostatním, nicméně výsledek podpořil.

Z výsledků práce Shao *et al.* (2007) je patrné, že aktivita antioxidantních enzymů sice o odolnosti genotypu vypovídá, ale nelze ji brát jako jediné určující kritérium. Na 10 genotypech pšenice (*Triticum aestivum* L.) sledovali aktivity SOD, POX, CAT při třech úrovních sucha (75%, 55%, 45%). Některé enzymy zareagovaly na stres okamžitým nárůstem aktivity, jiné až při silnějším stresu suchem. Vysoká aktivita jednoho enzymu nebyla vždy v pozitivní korelaci s aktivitou jiného enzymu u stejného genotypu. Jednotlivé enzymy mají různé regulační a expresní dráhy příslušných genů, které se ještě liší mezi genotypy, a proto při určování odolnosti nemůže být brán ohled pouze na antioxidanty.

Jednoznačný vztah mezi aktivitou antioxidantních enzymů a odolností vůči suchu nepotvrdili ani (Ünyayar *et al.*, 2005) u rajčete. Aktivity SOD, CAT a GR byly sice po vystavení suchu u stresovaných rostlin vyšší než u kontrolních nestresovaných rostlin, ale aktivity APX a SOD byly u odolného genotypu (*Lycopersicon peruvianum* L.) nižší, než u citlivého genotypu (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

Tabulka 2. Porovnání genotypů různých druhů rostlin lišících se v odpovědi antioxidantů na stres suchem.

druh	genotyp/kultivar	citlivý	odolný	střední	aktivita GR	aktivita APX	aktivita SOD	aktivita POX	aktivita CAT	aktivita AA	zdroj
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Florispan		+		vyšší	nižší		nezměněná	vyšší		Akçay <i>et al.</i> , 2010
	Gazipasa	+			nižší	vyšší		nezměněná	nezměněná		
<i>Avena sativa</i> L.	JHO 884		+						vyšší		Chandra <i>et al.</i> , 1998
	JHO 888	+							nižší		
<i>Coffea canephora</i>	120		+			vyšší	vyšší		vyšší		Lima <i>et al.</i> , 2002
	109a	+				nižší	nižší		nižší		
	120		+		nižší	nezměněná	vyšší		nezměněná		Pinheiro <i>et al.</i> , 2004
	109a	+			nezměněná	vyšší	vyšší		vyšší		
	14		+		nezměněná	vyšší	nezměněná		nezměněná		
	46	+			vyšší	vyšší	nezměněná		vyšší		
<i>Glycine max</i> (L.)	Maple Arrow		+		vyšší	vyšší					Van Heerden a Kruger, 2002
	Fiskeby V	+			nezměněná	nižší					
<i>Helianthus annuus</i> L.	Nantio F1				nižší		zvýšená		nezměněná	nezměněná	Keles a Ünyayar, 2004
	Özdemirbey				vyšší		zvýšená		nižší	nezměněná	
	Allestar		+		nejvyšší		nejvyšší		nejvyšší		Pourtaghi <i>et al.</i> , 2011
	Azargol			+	nižší		nižší		nižší		
	Euroflor		+		nižší		nižší		nižší		
	Karaj	+			nejnižší		nejnižší		nejnižší		
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	Lukullus	+			nižší	lehce vyšší	lehce vyšší		nižší		Ünyayar <i>et al.</i> , 2005
<i>Lycopersicon peruvianum</i> L.			+		vyšší	nižší	nižší		vyšší		
<i>Musa</i> L.	Berangan		+		nižší	vyšší	vyšší		nižší		Chai <i>et al.</i> , 2005
	Mas	+			vyšší	nižší	nižší		vyšší		
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	TL 33	+			nižší	nižší	nižší		zvýšená		Van Rensburg a Kruger, 1994
	CDL 28	+			nižší	nižší	nižší		zvýšená		
	GS 46		+		vyšší	vyšší	vyšší		zvýšená		
	ELSOMA		+		vyšší	vyšší	vyšší		zvýšená		

druh	genotyp/kultivar	citlivý	odolný	střední	aktivita GR	aktivita APX	aktivita SOD	aktivita POX	aktivita CAT	aktivita AA	zdroj
<i>Oryza sativa</i> L.	N 22		+		vyšší	vyšší	vyšší				Selote a Khanna-Chopra, 2004
	N 118	+			nižší	nižší	nižší				
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Plovdiv 10		+			vyšší			vyšší		Zlatev <i>et al.</i> , 2006
	Prelom		+			vyšší			vyšší		
	Dobrudjanski ran	+				nižší			nižší		
<i>Radix astragali</i>	Mongolia		+				nejvyšší	nejvyšší	nejvyšší		Yong <i>et al.</i> , 2006
	Wild			+			nižší	nižší	nižší		
	Hebei	+					nejnižší	nejnižší	nejnižší		
<i>Sesamum indicum</i> L.	Yekta		+				vyšší	vyšší	vyšší		Fazeli <i>et al.</i> , 2007
	Darab 14	+					nižší	nižší	nižší		
<i>Triticum aestivum</i> L.	C 306		+		vyšší	vyšší	nezměněná*	vyšší	vyšší	vyšší	Sairam <i>et al.</i> , 1998; Sairam a Saxena, 2000; Sairam <i>et al.</i> , 2001a
	HD 2285			+	střední	střední	nezměněná*	střední	střední	střední	Sairam <i>et al.</i> , 1997; Sairam <i>et al.</i> , 1998
	HD 2329	+			nižší	nižší	nezměněná*	nižší	nižší	nižší	Sairam <i>et al.</i> , 1998; Sairam <i>et al.</i> , 2001a
	PEW 175		+		vyšší	vyšší	nezměněná*	vyšší	vyšší	vyšší	Sairam <i>et al.</i> , 2000; Sairam <i>et al.</i> , 2001a
	HD 2402			+	střední	střední		střední			Sairam <i>et al.</i> , 2000
	WH 542	+			nižší	nižší		nižší			
	DL 153-2		+		vyšší		nezměněná*	vyšší	vyšší	vyšší	Sairam <i>et al.</i> , 1997; Sairam <i>et al.</i> , 2001a
	Raj 3077	+			nižší			nižší			Sairam <i>et al.</i> , 1997
	HD 2428	+			nižší		nezměněná*		nižší	nižší	Sairam <i>et al.</i> , 2001a
	Hira	+			nižší				nižší		Sairam a Saxena, 2000

druh	genotyp/kultivar	citlivý	odolný	střední	aktivita GR	aktivita APX	aktivita SOD	aktivita POX	aktivita CAT	aktivita AA	zdroj
	Ballada		+		střední	vyšší					Nikolaeva <i>et al.</i> , 2010
	Belchanka		+		vyšší	střední					
	Beltskaya	+			nižší	nižší					
<i>Triticum durum</i> Desf.	Adamello	+			zvýšená						Loggini <i>et al.</i> , 1999
	Ofanto		+		nezměněná						
<i>Zea mays</i> L.	LIZA		+		vyšší						Pastori a Trippi, 1992
	LG11	+			nižší						
	Shaandan 9		+				vyšší	vyšší	vyšší		Zhang <i>et al.</i> , 2007
	Shaandan 911	+					nižší	nižší	nižší		
	Giza 2		+				vyšší	vyšší	vyšší		Moussa a Abdel Aziz, 2008
	Trihybrid 321	+					nižší	nižší	nižší		
	Chang 7-2		+				vyšší	vyšší			Li <i>et al.</i> , 2009
Huangzao 4	+					nižší	nižší				

* aktivita se zvýšila až v posledním stádiu stresu suchem, opět nejvyšší (relativně) hodnoty u odolných genotypů, nejnižší u citlivých

5.6. Regulace aktivit antioxidantů přidáním podpůrných látek

5.6.1. Kyselina abscisová (ABA)

Přidáním kyseliny abscisové se posílila aktivita antioxidantních enzymů (SOD, GR) u dvou genotypů (Nantio F1 a Özdemirbey) slunečnice *Helianthus annuus* L. pěstovaných jak v optimálních podmínkách, tak za stresu suchem. Naopak aktivita CAT, která se v podmínkách stresu buď neměnila, nebo dokonce klesala se po přidání ABA ještě snížila (Keles a Ünyayar, 2004).

5.6.2. Brassinosteroidy

Přidáním rostlinných hormonů brassinosteroidů lze zvýšit aktivitu antioxidantních enzymů během stresu suchem. Například genotyp Ailsa Craig rajčete (*Lycopersicon esculentum* Mill.) vykazoval vyšší aktivitu antioxidantních enzymů (SOD, CAT, APX) než mutant notabilis (deficientní v syntéze ABA). Aktivita enzymů byla vyšší u obou genotypů ošetřených brassinosteroidy (Yuan *et al.*, 2010).

5.6.3. CaCl₂

Při zotavování rostlin čaje *Camellia sinensis* (L.) po stresu suchem mají pozitivní vliv na aktivitu antioxidantních enzymů (SOD, CAT, GR, POX) ionty Ca²⁺, které se jako sekundární posli účastní signalizace oxidativního stresu a interagují s reaktivními formami kyslíku (Upadhyaya *et al.*, 2011).

5.6.4. Dusík

Přidání dusíku má obecně pozitivní vliv na růst a vývoj rostlin, ale také na aktivitu antioxidantních enzymů (SOD, POX, CAT). Při porovnávání dvou genotypů kukuřice (*Zea mays* L.) lišících se odolností vůči suchu překvapivě lépe reagoval na přidání dusíku citlivý genotyp Shaandan 911 zvýšením aktivit antioxidantních enzymů. Tímto by se v praxi mohly kompenzovat horší vlastnosti citlivých genotypů (Zhang *et al.*, 2007). Podobné výsledky byly publikovány u bavlníku (*Gossypium hirsutum* L.) (Liu *et al.*, 2008). Aktivita POX a CAT se zvýšila, naopak u SOD byl pozorovaný pokles s rostoucím množstvím dusíku.

5.7. Vnitrodruhová variabilita a heteróze

Heteróze popisuje jev při křížení, kdy heterozygotní potomek F1 generace svými vlastnostmi převyšuje své homozygotní rodiče. Poprvé byla popsána Charlesem Darwinem v roce 1876. Jako pozitivní heteróze se obvykle označují případy, kdy F1 hybrid převyšuje ve sledovaných charakteristikách průměr rodičů, při negativní heterózi je tomu naopak. Heterobeltióze je jev, kdy F1 potomek převyší lepšího z rodičů. „Ekonomická/standardní“ heteróze je taková, kdy F1 hybrid převyší standardní, komerční hybrid. Ta je cílem heterózního šlechtění zemědělských plodin.

Inbrední a hybridní genotypy jsou dalším vhodným modelem pro studium vnitrodruhové variability. Je u nich testován mimo jiné i vliv heterózního efektu na aktivitu antioxidantů.

5.7.1. Vliv heteróze na antioxidační systémy

Heteróze může mít kromě pozitivního vlivu na morfologické a výnosové parametry rostlin, také pozitivní vliv na aktivity antioxidačních enzymů.

Singh *et al.* (2010) studovali změny aktivity antioxidačních enzymů (CAT, POX, SOD) u 16 inbredních rodičovských genotypů (11 otcovských, 5 mateřských) a jejich 55 F1 hybridů zelí (*Brassica oleracea* var. *capitata*). Pozitivní heteróze v aktivitě CAT byla zjištěna u 17 hybridů, u ostatních enzymů byla spíše výjimečná. U SOD se projevila u 9 F1 hybridů a u POX to bylo pouze u jednoho hybridu. Průkazná „ekonomická“ heteróze byla zjištěna u 12 F1 hybridů v případě SOD a u 21 pro POX a CAT. Pouze u 8 z 55 hybridů se potvrdila pozitivní heteróze společně pro SOD a CAT a/nebo POX (v buňce zastávají stejnou funkci).

Pozitivní heterózi v aktivitě SOD a CAT potvrdily v souvislosti s chladovým stresem Kočová *et al.* (2009) u kukuřice, v aktivitě SOD, APX a GR Zhang *et al.* (2010) u rýže.

Naproti tomu u světlice (*Carthamus tinctorius* L.) byla pozitivní heteróze prokázána jen u 3 ze celkových 12 studovaných hybridů a pouze pro aktivitu SOD. Pro APX a GR prokázána nebyla. U těchto dvou byla naopak prokázána pozitivní korelace mezi jejich aktivitami, nejspíše díky jejich podobné funkci v buňce (Golkar *et al.*, 2009).

5.8. Vliv stupně ploidie na antioxidační systémy

Polyploidie je jev, kdy buňka obsahuje více než dvě kompletní sady chromozomů. Je velice častá u rostlin a je známo, že až 70% krytosemenných rostlin je polyploidních. Změny stupně ploidie mohou být také příčinou vnitrodruhové variability různých parametrů.

Chandrasekar *et al.* (2000) porovnávali čtyři genotypy pšenice, dva hexaploidní *Triticum aestivum* L. (odolný C306 a citlivý Hira) a dva tetraploidní (A 9-30-1 *Triticum durum* Desf., HW 24 *Triticum dicoccum*). Tetraploidní genotypy udržely ve srovnání s hexaploidními vyšší RWC a došlo u nich k menšímu poklesu obsahu karotenoidů během stresu suchem. Mezi hexaploidy byl lepší odolný genotyp.

Lepší odolnost tetraploidních genotypů potvrdili také Sairam *et al.* (2001b) na stejných rostlinách jako Chandrasekar *et al.* (2000). Aktivita i procentuální nárůst aktivity SOD během sucha byly vyšší u tetraploidních genotypů. Hodnoty pro CAT se mezi genotypy příliš nelišily, ale nejnižší byly u tetraploidního A 9-30-1. Vyšší aktivitu POX naopak vykazovaly hexaploidní genotypy. Zhang a Kirkham (1994) uvádějí, že nižší akumulace peroxidu vodíku v genotypech pšenice nižších stupňů ploidie (diploidní, tetraploidní) nesouvisí s jejich antioxidační aktivitou. To by vysvětlovalo vyšší aktivitu SOD a nižší aktivitu CAT a POX u tetraploidů spojenou s nižším množstvím peroxidu vodíku v tetraploidních genotypech pšenice (A 9-30-1, HW 24). Zhang a Kirkham (1994) potvrzují, že hexaploidní genotypy pšenice mají méně efektivní antioxidační mechanismy, než tetraploidní a diploidní genotypy pšenice.

Chandra a Dubey (2010) ve svých pokusech na diploidní, tetraploidní a hexaploidní trávě *Cenchrus* považuje tetraploidní a hexaploidní genotypy za odolnější než diploidní. Tyto genotypy se však nelišily aktivitami antioxidačních enzymů (SOD, POX), ale množstvím malondialdehydu, jehož vyšší množství v buňce znamená větší množství peroxidu vodíku.

6. Závěr

Z předložené práce vyplývá, že existuje značná mezidruhová i vnitrodruhová variabilita v aktivitě antioxidačních systémů rostlin. Celkově lze však shrnout, že jejich zvýšená aktivita přímo souvisí s reakcí na stres suchem. Odolné rostliny vykazují ve většině případů vyšší aktivitu antioxidačních enzymů než citlivé genotypy. Pozitivní vliv na zvýšení aktivity antioxidačních enzymů má efekt heteróze, nebo přidání podpůrných látek. Také stupeň ploidie se odráží v antioxidační obraně rostlin. Tyto poznatky mohou být využity jako kritérium při výběru vhodných genotypů při šlechtění na vyšší odolnost vůči stresu suchem. Odolnost/citlivost rostlin je však závislá na mnoha dalších faktorech jako je růstové stádium, morfologické přizpůsobení, schopnost lépe vázat a udržet vodu, ale záleží i na intenzitě a délce trvání sucha, na předchozím působení sucha, popř. na kombinovaném působení různých stresových faktorů. Jedná se vždy o komplexní odpověď rostliny, což je nutné brát v úvahu při interpretaci získaných výsledků.

7. Seznam použité literatury

- Akcaý UC, Ercan O, Kavas M, Yildiz L, Yilmaz C, Oktem HA, Yucel M (2010) Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation* 61: 21-28
- Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* 100: 224-233
- Anjum NA, Umar S, Iqbal M, Khan NA (2008) Growth characteristics and antioxidant metabolism of moongbean genotypes differing in photosynthetic capacity subjected to water deficit stress. *Journal of Plant Interactions* 3: 127-136
- Aroca R, Irigoyen JJ, Sanchez-Diaz M (2003) Drought enhances maize chilling tolerance. II. Photosynthetic traits and protective mechanisms against oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 117: 540-549
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide-dismutase. *Crc Critical Reviews in Biochemistry* 22: 111-180
- Bartoli CG, Gomez F, Martinez DE, Guiamet JJ (2004) Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 55: 1663-1669
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91: 179-194
- Bowler C, Vanmontagu M, Inze D (1992) Superoxide-dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83-116
- Brown PS, Knievel DP, Pell EJ (1995) Effects of moderate drought on ascorbate peroxidase and glutathione-reductase activities in mesophyll and bundle-sheath cells of maize. *Physiologia Plantarum* 95: 274-280
- Chai TT, Fadzillah NM, Kusnan M, Mahmood M (2005) Water stress-induced oxidative damage and antioxidant responses in micropropagated banana plantlets. *Biologia Plantarum* 49: 153-156
- Chandra A, Bhatt RK, Misra LP (1998) Effect of water stress on biochemical and physiological characteristics of oat genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau* 181:45-48.

- Chandra A, Dubey A (2010) Effect of ploidy levels on the activities of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase, superoxide dismutase and peroxidase in *Cenchrus* species grown under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 27-34
- Chandrasekar V, Sairam RK, Srivastava GC (2000) Physiological and biochemical responses of hexaploid and tetraploid wheat to drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* 185: 219-227
- Diplock AT, Machlin LJ, Packer L, Pryor WA (1989). Eds., *Vitamin E: Biochemistry and Health Implications*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 570 p. 1-535
- Egneus H, Heber U, Matthiesen U, Kirk M (1975) Reduction of oxygen by electron-transport chain of chloroplasts during assimilation of carbon-dioxide. *Biochimica Et Biophysica Acta* 408: 252-268
- Fazeli F, Ghorbanli M, Niknam V (2007) Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum* 51:98-103.
- Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment* 28: 1056-1071
- Fridovich I (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 247: 1-11
- Fu JM, Huang BR (2001) Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 45: 105-114
- Gillham DJ, Dodge AD (1987) Chloroplast superoxide and hydrogen-peroxide scavenging systems from pea leaves: seasonal variations. *Plant Science* 50: 105-109
- Golkar P, Arzani A, Rezaei AM, Yarali Z, Yousefi M (2009) Genetic variation of leaf antioxidants and chlorophyll content in safflower. *African Journal of Agricultural Research* 4: 1475-1482
- Hameed A, Bibi N, Akhter J, Lqbal N (2011) Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 178-185
- Imlay JA, Linn S (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240: 1302-1309
- Irigoyen JJ, deJuan JP, SanchezDiaz M (1996) Drought enhances chilling tolerance in a chilling-sensitive maize (*Zea mays*) variety. *New Phytologist* 134: 53-59

- Jaleel CA, Manivannan P, Kishorekumar A, Sankar B, Gopi R, Somasundaram R, Panneerselvam R (2007) Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 59: 150-157
- Javier PD, Jose IJ, Manuel SD (1997) Chilling of drought-hardened and non-hardened plants of different chilling-sensitive maize lines - Changes in water relations and ABA contents. *Plant Science* 122: 71-79
- Keles Y, Ünyayar S (2004) Responses of antioxidant defense system of *Helianthus annuus* to abscisic acid treatment under drought and waterlogging. *Acta Physiologiae Plantarum* 26: 149-156
- Khan N, Naqvi FN (2010) Effect of water stress on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in local bread wheat hexaploids. *Journal of Food Agriculture & Environment* 8: 521-526
- Kholova J, Hash CT, Kocova M, Vadez V (2011) Does a terminal drought tolerance QTL contribute to differences in ROS scavenging enzymes and photosynthetic pigments in pearl millet exposed to drought? *Environmental and Experimental Botany* 71: 99-106
- Kocova M, Hola D, Wilhelmova N, Rothova O (2009) The influence of low-temperature on the photochemical activity of chloroplasts and activity of antioxidant enzymes in maize leaves. *Biologia Plantarum* 53: 475-483
- Kozłowski TT, Pallardy SG (2002) Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *Botanical Review* 68: 270-334
- Lalonde S, Beebe DU, Saini HS (1997) Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic-stage water deficit. *Sexual Plant Reproduction* 10: 40-48
- Li YZ, Sun CB, Huang ZB, Pan JL, Wang L, Fan XW (2009) Mechanisms of Progressive Water Deficit Tolerance and Growth Recovery of Chinese Maize Foundation Genotypes Huangzao 4 and Chang 7-2, Which are Proposed on the Basis of Comparison of Physiological and Transcriptomic Responses. *Plant and Cell Physiology* 50: 2092-2111
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* 47: 239-247
- Liu RX, Zhou ZG, Guo WQ, Chen BL, Osterbuis DM (2008) Effects of N fertilization on root development and activity of water-stressed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Agricultural Water Management* 95: 1261-1270

- Loggini B, Scartazza A, Brugnoli E, Navari-Izzo F (1999) Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology* 119: 1091-1099
- Moran JF, Becana M, Iturbeorrieta I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-tejo P (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194: 346-352
- Moussa HR, Abdel-Aziz SM (2008) Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science* 1: 31-36
- Nikolaeva MK, Maevskaya SN, Shugaev AG, Bukhov NG (2010) Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. *Russian Journal of Plant Physiology* 57: 87-95
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279
- Pastori GM, Trippi VS (1992) Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. *Plant and Cell Physiology* 33: 957-961
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Fontes EPB, Loureiro ME (2004) Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science* 167: 1307-1314
- Pourtaghi A, Darvish F, Habibi D, Nourmohammadi G, Daneshian J (2011) Effect of irrigation water deficit on antioxidant activity and yield of some sunflower hybrids. *Australian Journal of Crop Science* 5: 197-204
- Sairam RK, Chandrasekhar V, Srivastava GC (2001b) Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their responses to water stress. *Biologia Plantarum* 44: 89-94
- Sairam RK, Deshmukh PS, Saxena DC (1998) Role of antioxidant systems in wheat genotype tolerance to water stress. *Biologia Plantarum* 41: 387-394
- Sairam RK, Deshmukh PS, Shukla DS (1997) Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau* 178: 171-177
- Sairam RK, Saxena DC (2000) Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: Possible mechanism of water stress tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift fur Acker Und Pflanzenbau* 184: 55-61
- Sairam RK, Srivastava GC (2001a) Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): Variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science* 186: 63-70

- Saruyama H, Tanida M (1995) Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and temperature-tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Science* 109: 105-113
- Selote DS, Khanna-Chopra R (2004) Drought-induced spikelet sterility is associated with an inefficient antioxidant defence in rice panicles. *Physiologia Plantarum* 121: 462-471
- Shao HB, Chen XY, Chu LY, Zhao XN, Wu G, Yuan YB, Zhao CX, Hu ZM (2006) Investigation on the relationship of proline with wheat anti-drought under soil water deficits. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 53: 113-119
- Shao HB, Chu LY, Wu G, Zhang JH, Lu ZH, Hu YC (2007) Changes of some anti-oxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at tillering stage. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 54: 143-149
- Shao HB, Liang ZS, Shao MA, Sun SM, Hu ZM (2005) Investigation on dynamic changes of photosynthetic characteristics of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes during two vegetative-growth stages at water deficits. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 43: 221-227
- Sheoran IS, Saini HS (1996) Drought-induced male sterility in rice: Changes in carbohydrate levels and enzyme activities associated with the inhibition of starch accumulation in pollen. *Sexual Plant Reproduction* 9: 161-169
- Silva FCE, Shvaleva A, Broetto F, Ortuno MF, Rodrigues ML, Almeida MH, Chaves MM, Pereira JS (2009) Acclimation to short-term low temperatures in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought resistance. *Tree Physiology* 29: 77-86
- Simova-Stoilova L, Demirevska K, Petrova T, Tsenov N, Feller U (2008) Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant Soil and Environment* 54: 529-536
- Singh BK, Sharma SR, Singh B (2010) Heterosis for superoxide dismutase, peroxidase and catalase enzymes in the head of single cross-hybrids of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Journal of Genetics* 89: 217-221
- Upadhyaya H, Panda SK, Dutta BK (2011) CaCl₂ improves post-drought recovery potential in *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze. *Plant Cell Reports* 30: 495-503
- Ünyayar S, Keles Y, Cekic FÖ, (2005) The anti-oxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations. *Plant Soil and Environment* 51: 57-64

- Van Heerden PDR, Kruger GHJ (2002) Separately and simultaneously induced dark chilling and drought stress effects on photosynthesis, proline accumulation and antioxidant metabolism in soybean. *Journal of Plant Physiology* 159: 1077-1086
- Van Rensburg L, Kruger GHJ (1994) Evaluation of components of oxidative stress metabolism for use in selection of drought tolerant cultivars of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology* 143: 730-737
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, VanMontagu M, Inze D, VanCamp W (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *Embo Journal* 16: 4806-4816
- Xiao XW, Xu X, Yang F (2008) Adaptive Responses to Progressive Drought Stress in Two *Populus cathayana* Populations. *Silva Fennica* 42: 705-719
- Yong T, Zongsuo L, Hongbo S, Feng D (2006) Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of *Radix Astragali* at seeding stage. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 49: 60-65
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* 123: 223-233
- Yuan GF, Jia CG, Li Z, Sun B, Zhang LP, Liu N, Wang QM (2010) Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. *Scientia Horticulturae* 126: 103-108
- Zaefyzadeh M, Quliyev RA, Babayeva SM, Abbasov MA (2009) The Effect of the Interaction between Genotypes and Drought Stress on the Superoxide Dismutase and Chlorophyll Content in Durum Wheat Landraces. *Turkish Journal of Biology* 33: 1-7
- Zamora P, Rasmussen S, Pardo A, Prieto H, Zuniga GE (2010) Antioxidant responses of in vitro shoots of *Deschampsia antarctica* to polyethylene glycol treatment. *Antarctic Science* 22: 163-169
- Zhang JX, Kirkham MB (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant and Cell Physiology* 35: 785-791
- Zhang LX, Li SX, Zhang H, Liang ZS (2007) Nitrogen rates and water stress effects on production, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in two maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science* 193: 387-397
- Zhang YH, Chen LJ, He JL, Qian LS, Wu LQ, Wang RF (2010) Characteristics of chlorophyll fluorescence and antioxidative system in super-hybrid rice and its parental cultivars under chilling stress. *Biologia Plantarum* 54: 164-168

- Zhang YP, Nan ZB (2007) Growth and anti-oxidative systems changes in *Elymus dahuricus* is affected by *Neotyphodium* endophyte under contrasting water availability. *Journal of Agronomy and Crop Science* 193: 377-386
- Zhang YP, Nan ZB (2010) Germination and seedling anti-oxidative enzymes of endophyte-infected populations of *Elymus dahuricus* under osmotic stress. *Seed Science and Technology* 38: 522-527
- Zlatev ZS, Lidon FC, Ramalho JC, Yordanov IT (2006) Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biologia Plantarum* 50: 389-394

Použité internetové zdroje:

- www.plantstress.com [29.5.2011]
- www.theagricos.com/plant-breeding/ [29.5.2011]
- www.search.com/reference/Antioxidant [29.5.2011]