

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie a anatomie rostlin



Bc. Kateřina Řehořová

**Vliv 24-epibrassinolidu na vybrané parametry genotypů kukuřice a bobu
lišících se citlivostí k suchu**

The effect of 24-epibrassinolide on selected parameters of maize and faba
bean genotypes varying in drought sensitivity

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Marie Kočová, CSc.

Konzultant: Prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.

Praha, 2015

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, 10. 8. 2015

Podpis

Ráda bych touto cestou poděkovala především RNDr. Marii Kočové, CSc. za její výborný nadhled, trpělivost, odborné rady a optimismus, který neopadal ani v těžších chvílích.

Můj velký dík patří rovněž Mgr. Lence Tůmové, která mi byla skvělým mentorem, a také dalším členům Genetické zahrady a laboratoře Genetiky rostlin. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Františku Hnilíčkoví, CSc. za zapůjčení přístrojů a v neposlední řadě mé rodině, která mi byla velkou oporou.

Tato práce vznikla za finanční podpory GAUK v rámci projektu B/BIO/612612 a GAČR 501/11/1650.

Abstrakt

Brassinosteroidy jsou rostlinné hormony, které jsou známy mimo jiné pro svůj pleiotropní účinek na rostliny vystavené různým biotickým a abiotickým stresovým faktorům. Cílem této práce bylo zhodnotit vliv 10^{-8} M 24-epibrassinolidu na rostliny *Zea mays* L. a *Vicia faba* L. pěstované v podmínkách stresu suchem (6, 10, 14, 18 dnů) s důrazem na odlišnou odpověď jejich citlivých a odolných genotypů k suchu. U stresovaných rostlin a rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách byla měřena rychlost čisté fotosyntézy (P_N) a transpirace (E), stomatální vodivost (g_s), osmotický potenciál (ψ_s), obsah prolinu (Pro) a malondialdehydu (MDA) a index poškození membrán (MI). Nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím zmíněné parametry bylo sucho, které vedlo k postupnému snížení P_N , E, g_s , ψ_s a zvýšení obsahu Pro, MDA a MI. Efekt 24-epibrassinolidu se průkazně projevil spíše výjimečně a v těchto případech byla pozorována výraznější odpověď rostlin stresovaných suchem ve srovnání s rostlinami pěstovanými v kontrolních podmínkách. V reakci rostlin se projevila vnitrodruhová variabilita, která u citlivých a tolerantních genotypů nebyla jednoznačná a lišila se v závislosti na studovaném parametru a podmínkách pěstování rostlin.

Klíčová slova: brassinosteroidy, fotosyntéza, malondialdehyd, osmotický potenciál, poškození membrán, prolin, stomatální vodivost, sucho, transpirace, *Vicia faba* L., *Zea mays* L.

Abstract

Brassinosteroids are plant hormones which are also known for their pleiotropic effects on plants exposed to various biotic and abiotic stress factors. The aim of this study was to evaluate the role of 10^{-8} M 24-epibrassinolide in *Zea mays* L. and *Vicia faba* L., grown under conditions of drought stress (6, 10, 14, 18 days) with an emphasis on different answer to their drought sensitive and resistant genotypes. Net photosynthetic rate (P_N) and transpiration rate (E), stomatal conductance (g_s), osmotic potential (ψ_s), proline (Pro) and malondialdehyde (MDA) content and membrane injury index (MI) were measured in stressed plants and plants grown under controlled conditions. The most important factor influencing these parameters was drought, which led to a gradual decrease of P_N , E, g_s , ψ_s and increase of Pro, MDA a MI. The effect of 24-epibrassinolid was significant rather exceptionally and in these cases, more pronounced response was observed in drought stressed plants compared with plants grown under controlled conditions. Plants showed intraspecific variability in their reactions, which in sensitive and tolerant genotypes were not clear and differed depending on the studied parameters and conditions of plant cultivation.

Key words: brassinosteroids, drought, malondialdehyde, membrane injury index, osmotic potential, photosynthesis, proline, stomatal conductance, transpiration, *Vicia faba* L., *Zea mays* L.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíle a hypotézy práce.....	10
3. Literární přehled	11
3.1. Výnosové a morfologické charakteristiky	11
3.2. Vodní parametry rostliny	13
3.3. Fotosyntetické parametry.....	16
3.4. Antioxidanty	18
3.5. Poškození buněk	22
4. Materiál a metodika.....	35
4.1. Pokusný materiál.....	35
4.1.1. Bob obecný	35
4.1.2. Kukuřice setá.....	35
4.2. Organizace pokusů	36
4.2.1. Podmínky pěstování.....	37
4.2.2. Aplikace postřiku.....	37
4.2.3. Stresová perioda	39
4.3. Metodika	40
4.3.1. Gazometrie	40
4.3.1. Osmotický potenciál	41
4.3.2. Obsah prolinu.....	42
4.3.3. Konduktivita	43
4.3.4. Obsah malondialdehydu	46
4.3.1. Použité přístroje.....	49
4.3.2. Použité chemikálie	49
4.4. Statistické hodnocení výsledků	50
5. Výsledky	52
5.1. Rychlost čisté fotosyntézy.....	52
5.2. Stomatální vodivost.....	56
5.3. Rychlost transpirace.....	60
5.4. Osmotický potenciál.....	64
5.5. Prolin	68
5.6. 3.6. Poškození membrán.....	72

5.7.	Malondialdehyd	76
5.8.	Výsledky analýzy rozptylu	78
6.	Diskuze	83
6.1.	Gazometrické veličiny	83
6.2.	Osmotický potenciál.....	85
6.3.	Obsah prolinu	86
6.4.	Poškození buněk	87
6.5.	Závěr.....	89
7.	Souhrn.....	91
8.	Seznam použité literatury	92

Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
APX	askorbát peroxidáza
CAT	katalázy
E	rychlost transpirace
FWC	polní kapacita půdy
Fv/Fm	poměr variabilní a maximální fluorescence
g_s	stomatální vodivost
MDA	malondialdehyd
MI	index poškození membrán
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
P_N	rychlost čisté fotosyntézy
Pro	prolin
PEG	polyethylenglykol
POD	peroxidázy
ROS	reaktivní formy kyslíku
RUBISCO	ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza
SOD	superoxid dismutázy
TBA	kyselina thiobarbiturová
TBARS	reaktivní sloučeniny kyseliny thiobarbiturové
WUE	efektivita využití vody
ψ_s	osmotický potenciál

1. Úvod

Brassinosteroidy jsou steroidní látky, které se ve velmi nízkých koncentracích vyskytují u většiny rostlin. Po jejich objevu v extraktu pylu *Brassica napus* L. na konci 70. let byly nejprve zařazeny k růstovým regulátorům, dnes se řadí jako samostatná skupina fytohormonů. V rostlinách se nachází v koncentracích nižších než 100 ng/g, ale i přesto mají vysokou účinnost a vliv na mnoho morfologických, biochemických a fyziologických parametrů rostlin. Byl zkoumán a potvrzen efekt exogenně aplikovaných brassinosteroidů na rostliny vystavené různým abiotickým i biotickým faktorům a dnes se již v některých zemích používají v zemědělství.

Jedním z nejvýznamnějších abiotických faktorů, které ovlivňují zemědělskou produkci, je sucho. Nedostatek vody postihuje čím dál větší oblasti a způsobuje velké ekonomické ztráty. Posledních 20 let se proto pozornost zaměřila na studium efektu brassinosteroidů na různé fyziologické funkce rostlin, na obsah a aktivitu jejich ochranných složek a systémů a na možnosti využití exogenní aplikace těchto přirozeně se vyskytujících látek k posílení ochrany proti stresu suchem. I přes intenzivní studium této problematiky nepřinesly zcela jednoznačnou odpověď - zda a jak rostliny reagují na ošetření brassinosteroidy. Reakce rostlin se liší mezi rostlinnými druhy i v rámci jednotlivých druhů.

Cílem mé práce bylo sledovat vliv exogenně aplikovaného 24-epibrassinolidu na rostliny vystavené suchu a zároveň se zaměřit na mezidruhovou a vnitrodruhovou variabilitu odpovědi. Zvolila jsem dva rostlinné druhy – *Zea mays* L. a *Vicia faba* L., které se dostatečně liší svými fyziologickými a biochemickými charakteristikami. Tato práce by proto měla přispět k získání dalších informací týkajících se vlivu brassinosteroidů na rostliny vystavené stresovým podmínkám.

2. Cíle a hypotézy práce

Cíle práce

- Zjistit, jaký efekt má exogenní aplikace 24-epibrassinolidu na vybrané fyziologické a biochemické parametry rostlin *Zea mays* L. a *Vicia faba* L. pěstovaných různě dlouhou dobu v prostředí nedostatku vody
- Zjistit, zda a jak se liší odpověď linií/odrůd s odlišnou citlivostí k suchu na postřik 24-epibrassinolidu

Hypotézy práce

- Stres suchem povede ke snížení rychlosti fotosyntézy, transpirace, stomatální vodivosti a osmotického potenciálu, a ke zvýšení indexu poškození membrán, obsahu prolinu a peroxidace lipidů.
- Rostliny stresované suchem budou na exogenní aplikaci brassinosteroidu reagovat výrazněji než rostliny pěstované v podmínkách optimálního zásobování vodou
- Citlivé genotypy k suchu budou v podmínkách stresu suchem reagovat na exogenní aplikaci brassinosteroidu výrazněji než genotypy odolnější

3. Literární přehled

3.1. Výnosové a morfologické charakteristiky

Zlepšení výnosových a morfologických charakteristik bylo v popředí zájmu ihned po objevení brassinosteroidů a jejich pozitivní efekt na výnos se potvrdil již v 80. letech (Takematsu a Takeuchi, 1989). Vliv brassinosteroidů na rostliny vystavené suchu byl zkoumán podrobněji až v posledních letech, ačkoliv je sucho významným faktorem, který snižuje výnos rostlin (Asana a Saini 1958, Hussain *et al.* 2008).

Klíčivost a délka rostliny

Jedním z nejkritičtějších období ve vývoji rostliny je klíčení, které bývá často negativně ovlivňováno i malým nedostatkem vody. Dalším citlivým obdobím je stádium raných semenáčů, kdy je hlavním důvodem úhynu mladých rostlin právě sucho (Mahesh *et al.* 2013). Exogenní aplikace brassinosteroidů zvyšuje klíčivost (Tabulka 1) u *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Vardhini a Rao 2003), *Raphanus sativus* L. (Mahesh *et al.* 2013) a *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek (Alyemeni a Al-Quwaiz 2014) a to ve všech případech při klíčení semen na kultivačním médiu s přidaným PEG, který se používá pro simulace osmotického stresu především v *in vitro* podmínkách. U těchto druhů aplikace brassinosteroidů zvětšuje také délku semenáčů (Vardhini a Rao 2003, Lal *et al.* 2013, Mahesh *et al.* 2013, Alyemeni a Al-Quwaiz 2014). Nárůst délky po aplikaci brassinosteroidů a vystavení rostlin suchu byl zaznamenán i u *Cicer arietinum* L. (Singh *et al.* 1993), *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Fariduddin *et al.* 2009) a *Oryza sativa* L. (Farooq *et al.* 2009). Naopak u genotypu *Zea mays* L. (citlivý k suchu) byl zaznamenán negativní efekt brassinolidu na délku rostliny, a na genotyp odolný k suchu neměla aplikace žádný vliv (Li a van Staden 1998a).

Suchá a čerstvá hmotnost

Nejčastěji používanými parametry charakterizujícími morfologické změny jsou suchá a čerstvá hmotnost rostliny, popřípadě prýtu a kořenů. U většiny studovaných rostlinných druhů byl potvrzen statisticky průkazný nárůst hmotnosti po ošetření brassinosteroidy a

následném vystavení rostlin suchu v porovnání s kontrolními rostlinami pěstovanými za stejných podmínek (Singh *et al.* 1993, Saraim 1994b, Li a van Staden 1998b, Vardhini a Rao 2003, Zhang *et al.* 2008, Farooq *et al.* 2009, Fariduddin *et al.* 2009, Mousavi *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2010, Hu *et al.* 2013, Lal *et al.* 2013, Mahesh *et al.* 2013, Alyemeni a Al-Quwaiz 2014, **Tabulka 1**). U *Capsicum annuum* L. došlo ke zvýšení čerstvé hmotnosti o 25% (Hu *et al.* 2013), u *Cicer arietinum* L. až o 50% v porovnání s kontrolními rostlinami (Singh *et al.* 1993). Výjimku tvoří *Carica papaya* L., u které se vliv brassinosteroidů na suchou hmotnost prýtu neprokázal (Gomes *et al.* 2013). Důvodem by mohlo být použití odlišného typu brassinosteroidu, spirotanického analoga, který se využívá z důvodu snadnější přípravy (Rodríguez *et al.* 2006), ale u kterého není zřejmý jednoznačný efekt na rostliny během stresu právě díky své strukturální modifikaci přírodních brassinosteroidů (Núñez *et al.* 2003). Dále se mohla projevit i mezidruhová variabilita. *Carica papaya* L. nepatří mezi intenzivně sledované druhy v souvislosti s testováním vlivu brassinosteroidů (Gomes *et al.* 2013).

Gomes *et al.* (2013) nepotvrdil vliv brassinosteroidů za sucha ani na plochu listů u *Carica papaya* L., ačkoliv u jiných zemědělsky významných plodin došlo k průkaznému zvýšení plochy listů oproti kontrolním rostlinám (Saraim 1994b, Fariduddin *et al.* 2009, Anjum *et al.* 2011, Lal *et al.* 2013, Tabulka 1).

Výnos

Mnoho fyziologických parametrů, které určují výnos rostliny, reaguje na stres způsobený nedostatkem vody. Záleží ovšem na délce, intenzitě sucha, jeho načasování a na interakci s případnými dalšími stresory. Například sucho v době kvetení *Triticosecale* a *Glycine max* L. zkracuje celkovou dobu květu a tím snižuje výnos (Kamal *et al.* 1995, Estrada-Campuzano *et al.* 2008). U *Hordeum vulgare* L. sucho snižuje počet výhonů, klasů i zrn. Stresová perioda, která postihne *Hordeum vulgare* L. těsně po období květu, v době kdy se vytváří zrno, způsobí ztrátu výnosu bez ohledu na intenzitu stresu (Samarah 2005). Naopak *Oryza sativa* L. zasažená suchem v tomto období reaguje remobilizací předem nasyntetizovaných zásob a zkrácením procesu tvorby zrn (Yang *et al.* 2001).

Brassinosteroidy mají během sucha významný efekt na výnosové parametry (**Tabulka 1**), ale interpretace jejich vlivu není jednoznačná a nedá se generalizovat. Vyšší

hmotnost a výnos zrna po aplikaci brassinosteroidů u *Zea mays* L. (Li a van Staden 1998a, Anjum *et al.* 2011), *Triticum aestivum* L. (Saraim 1994a) a *Glycine max* L. (Zhang *et al.* 2008) je vysvětlována translokací uhlíku C¹⁴ z listů do výnosových orgánů. Výsledky korelují s dřívějšími poznatky o vyšších výnosech plodin po aplikaci brassinosteroidů u rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách (Petzold *et al.* 1992, Fujii a Saka, 2001). Lepší výnos zrna byl zaznamenán i u lusků *Phaseolus vulgaris* L. a *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek, ačkoliv na počet a délku lusků brassinosteroidy neměly vliv *Phaseolus vulgaris* L. (Upreti a Murti, 2004; Lal *et al.* 2013).

Nodulace kořenů

Jednou z nejméně prozkoumaných oblastí týkajících se vlivu brassinosteroidů na morfologické a výnosové parametry je nodulace kořenů u *Fabaceae*. Nodulace kořenů je často negativně ovlivněna nedostatkem vody - sucho snižuje počet nodů, hmotnost a délku nodulujících kořenů např. *Phaseolus vulgaris* L. (Ramos *et al.* 1999), *Arachis hypogaea* L. (Vardhini a Rao 1999) a *Glycine max* L. i (Serraj *et al.* 1999). Úbytek kořenových nodů je spojen s nárůstem ABA a poklesem cytokininů. V jiné studii na toto téma (Upreti a Murti 2004) bylo zjištěno, že exogenně aplikovaný epibrassinolid zvyšuje počet nodulujících kořenů, jejich hmotnost i délku a zmírňuje tak dopad stresu na rostlinu. Pravděpodobným mechanismem působení je vliv brassinosteroidů na obsah cytokininů v kořenech.

3.2. Vodní parametry rostliny

V důsledku sucha dochází k poklesu vody v rostlině. V některých případech dosahují ztráty až několik desítek procent z celkového obsahu vody (Nerd a Nobel 1991). Rostlina se snaží tento důsledek zpomalit, uzpůsobuje morfologii listů i kořenů a snaží se předejít zbytečným ztrátám vody. Více než 99% vody, která je absorbována kořeny, je ztracena transpirací. Uzavírání průduchů, tedy snížení transpirace a stomatální vodivosti, je zpravidla první odpovědí na stres způsobený suchem. (Hsiao 1973, Anjum *et al.* 2011).

Relativní obsah vody

Relativní obsah vody patří mezi parametry, které jsou intenzivně studované v souvislosti s brassinosteroidy a jejich efektu efektem během sucha, avšak jednoznačný vliv dosud nebyl zcela prokázán.

Exogenní aplikace brassinosteroidů a následné vystavení rostlin suchu zvyšuje relativní obsah vody u *Triticum aestivum* L. (Saraim 1994a, Saraim 1994b), *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Xu *et al.* 1994), *Brassica juncea* L. (Fariddudin *et al.* 2009), *Brassica napus* L. (Mousavi *et al.* 2009), *Oryza sativa* L. (Farooq *et al.* 2010), *Lycopersicon esculentum* L. (Yuan *et al.* 2010), *Zea mays* L. (Anjum *et al.* 2011), *Xanthoceras sorbifolia* B. (Li a Feng 2011), *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek (Lal *et al.* 2013). Nicméně u *Pisum sativum* L. u se efekt brassinolidu na relativní obsah vody neprokázal (Jager *et al.* 2008). Příčinou v tomto případě může být odlišná doba aplikace brassinolidu, která byla na rozdíl od předchozích studií zvolena až po skončení stresové periody. Ke zvýšení nedošlo ani u *Carica papaya* L. (Gomes *et al.* 2013). Rozhodující vliv může mít také intenzita stresu. Například u *Robinia pseudoacacia* L., pěstované v mírném nedostatku vody (55% FWC), aplikace brassinosteroidů neovlivnila relativní obsah vody v listech. Při vyšší míře stresu (35% FWC) se ukázal vliv brassinolidu na relativní obsah vody jako průkazný (Li *et al.* 2008). Li a van Staden (1998a) testovali vliv brassinosteroidů na dva genotypy *Zea mays* L. – jeden odolný k suchu a druhý citlivý. Předpoklad, že efekt brassinosteroidů na citlivý genotyp bude výraznější, se však nepotvrdil. U odolného genotypu došlo ke zvýšení relativního obsahu vody v porovnání s neošetřenými rostlinami, citlivý genotyp po aplikaci brassinosteroidů reagoval snížením relativního obsahu vody a rychlosti transpirace (**Tabulka 1**).

Efektivita využití vody

Efektivita využití vody (WUE) se stanovuje jako poměr mezi přijatým CO₂ a vydanou vodou. Oxid uhličitý vstupuje do rostliny stejnou cestou, jakou voda opouští rostlinu – z větší části prostřednictvím průduchové transpirace. Obvyklá reakce rostlin na nedostatek vody je snížení efektivity využití vody v porovnání s rostlinami pěstovanými v běžných podmínkách. Rostlina však musí zvolit optimální model, který jí zaručí dostatečné zásobování buněk oxidem uhličitým a zároveň nesnížit relativní obsah vody nebo vodní

potenciál rostliny pod únosnou mez. U některých kulturních travin byla zaznamenána vyšší efektivita využití vody v suchých podmínkách (Abbate *et al.* 2004), stejně tak u *Trifolium alexandrinum* L. (Lazaridou a Koutroubas 2004). U některých odrůd *Triticum aestivum* L. nebyl znatelný žádný rozdíl (van den Boogaard *et al.* 1996) a u velmi příbuzného druhu *Triticum durum* Desf. byl průkazný pokles WUE v suchých podmínkách (Hafid *et al.* 1998).

Průkazně vyšší efektivita využití vody po aplikaci brassinosteroidů a po 7 až 12 dnech sucha byla zaznamenána u *Pinus banksiana* Lamb. (Rajasekaran a Blake 1999), *Oryza sativa* L. (Farooq *et al.* 2009), *Brassica juncea* L. (Fariduddin *et al.* 2009) a také u *Zea mays* L. (Anjum *et al.* 2011, **Tabulka 1**).

Transpirace a stomatální vodivost

Vliv brassinosteroidů na transpiraci a stomatální vodivost se mezidruhově liší (**Tabulka 1**). Zatímco u *Robinia pseudoacacia* L. (Li *et al.* 2008) a *Capsicum annuum* L. (Hu *et al.* 2013) je rychlost transpirace a stomatální vodivost průkazně vyšší po aplikaci brassinosteroidů, u *Oryza sativa* L. došlo během stresu k poklesu transpirace a stomatální vodivosti v porovnání s rostlinami neošetřenými a pěstovanými za stejných podmínek (Farooq *et al.* 2009). Ve srovnatelném experimentu, kde byly rostliny pěstovány v obdobných podmínkách, byla rychlost transpirace i vodivost průduchů signifikantně vyšší u rostlin ošetřených brassinolidem (Farooq *et al.* 2010, protichůdné výsledky nejsou blíže komentovány). Podobných výsledků bylo dosaženo i u *Zea mays* L. Mladé rostliny citlivého genotypu k suchu kultivované po dobu 48 hodin v roztoku PEG vykazovaly nižší rychlost transpirace (Li a van Staden 1998a), zatímco *Zea mays* L. pěstovaná v polních podmínkách za nedostatku vody měla po aplikaci brassinosteroidů vyšší rychlost transpirace (Anjum *et al.* 2011). Experimenty se v tomto případě neliší pouze způsobem pěstování a simulací stresu ale také koncentrací a typem aplikace brassinosteroidů. Kromě toho může být významným faktorem postupná aklimace rostlin pěstovaných v polních podmínkách. Dále bylo zjištěno, že u *Sorghum bicolor* (L.) Moench byla po předchozí aplikaci brassinolidu rychlost transpirace signifikantně nižší než u kontrol pěstovaných ve stejných podmínkách (Xu *et al.* 1994), naopak u *Triticum aestivum* L. průkazně vyšší (Saraim 1994a).

Podobný trend je i v případě stomatální vodivosti – u *Brassica juncea* L. brassinosteroidy zvyšují stomatální vodivost v podmínkách sucha (Fariduddin *et al.* 2009), u

Lycopersicon esculentum L. snižují (Yuan *et al.* 2010). V některých případech nemá na tento parametr aplikace brassinosteroidů žádný vliv (Rajasekaran a Blake 1999, Anjum *et al.* 2011).

3.3. Fotosyntetické parametry

Fotosyntetické procesy jsou nedostatkem vody výrazně ovlivněny. S přibývajícím intenzitou sucha klesá rychlost asimilace CO₂, což se negativně projevuje na růstu rostlin a v konečném důsledku i na celkovém výnosu. Rostlina, aby předešla ztrátám vody, reaguje na suchu uzavřením průduchů. Současně tím snižuje výměnu plynů s okolním prostředím a limituje tak fotosyntézu. Dostupnost CO₂ je řazena mezi stomatální limitace fotosyntézy a bývá označována jako hlavní faktor inhibující fotosyntézu během sucha (Yokota *et al.* 2002). Mezi nestomatální faktory limitující fotosyntézu se řadí pokles zastoupení a aktivity fotosynteticky aktivních pigmentů, snížená kapacita chloroplastů a inaktivace enzymů Calvinova cyklu (Hsiao 1973, Kaiser 1987, Lawlor 2002).

Obsah chlorofylu

Aplikace brassinosteroidů zvyšuje obsah chlorofylu u *Glycine max* L. (Zhang *et al.* 2008), *Brassica juncea* L. (Fariduddin *et al.* 2009), *Chorispóra bungeana* Fisch. Et C. A. Mey. (Li *et al.* 2012a) a *Vitis vinifera* L. (Wang *et al.* 2015) v porovnání s kontrolními rostlinami pěstovanými za stejných stresových podmínek. Brassinosteroidy mají pravděpodobně ochranný efekt na pigment-proteinové komplexy a vedou k zastavení degradace chlorofylu během sucha (Li *et al.* 2012a).

Naproti tomu u *Carica papaya* L. došlo ke snížení obsahu chlorofylu, které je vysvětlováno tím, že brassinosteroidy urychlují senescenci listu a tak podporují degradaci chlorofylu. Pokles chlorofylu se projevil nejvýrazněji u starších listů, u nejmladších listů byl zanedbatelný a u rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách nebyl zaznamenán vůbec. Tento výsledek naznačuje, že brassinosteroidy mají odlišný vliv na listy v různém stádiu vývoje a spouštěcím mechanismem tohoto vlivu může být například stres způsobený nedostatkem vody (Gomes *et al.* 2013). U *Vicia faba* L. nebyl pozorován žádný efekt na

obsah chlorofylu po aplikaci brassinosteroidů o široké škále koncentrací (10^{-6} – 10^{-12} M) během stresu suchem (Fridrichová *et al.* 2012, **Tabulka 1**).

Fluorescence chlorofylu

Existují různé charakteristiky fluorescence, které vypovídají o stavu fotosystémů v rostlině. Často sledovaným parametrem je poměr variabilní a maximální fluorescence (F_v/F_m) chlorofylu. Fluorescenční poměr je indikátorem snížené funkce nebo poškození reakčních center fotosystému II. Měření intenzity fluorescence tak umožňuje získat informace o absorpci energie dopadajícího záření a jejího využití ve fotosyntéze. Hodnoty F_v/F_m u rostlin pěstovaných v běžných podmínkách se pohybují v úzkém rozmezí okolo 0,85 a během stresu výrazně klesají (Björkman a Demmig 1987, Maxwell a Johnson 2000). Podle Gomes *et al.* (2013) nebyl dosud prokázán přímý vliv brassinosteroidů na F_v/F_m během sucha, nicméně u *Glycine max* L. (Zhang *et al.* 2008), *Chorispóra bungeana* Fisch. Et C. A. Mey. (Li *et al.* 2012a), *Capsicum annum* L. (Hu *et al.* 2013) a *Vitis vinifera* L. (Wang *et al.* 2015) byl zaznamenán vyšší poměr F_v/F_m po vystavení rostlin suchu a předchozí aplikaci brassinosteroidů v porovnání s neošetřenými rostlinami pěstovanými za stejných podmínek (**Tabulka 1**). Podle Li *et al.* (2012) mají brassinosteroidy schopnost zmírnit fotoinhibici způsobenou suchem a chránit tak fotosystém II.

Rychlost fotosyntézy a vnitrobuněčná koncentrace CO₂

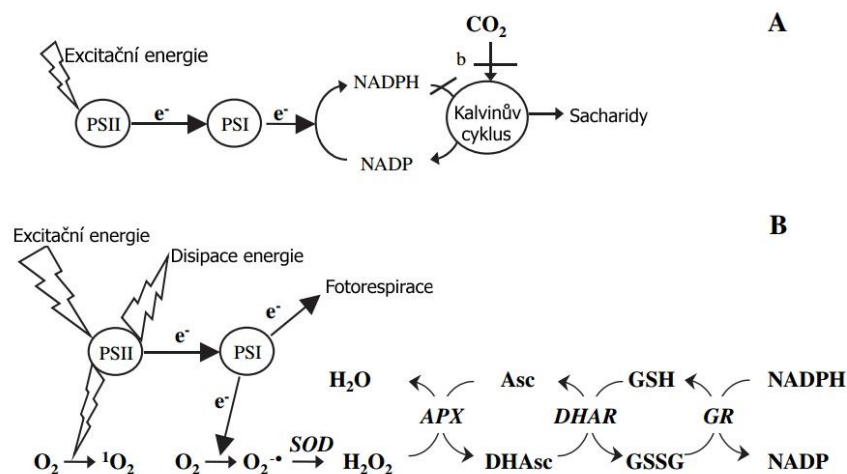
Brassinosteroidy zvyšují rychlost asimilace CO₂ a to prostřednictvím ovlivnění stomatálních i nestomatálních faktorů a mnohdy zcela vyrovnávají negativní změny způsobené suchem. Zvýšení rychlosti fotosyntézy po předchozí aplikaci brassinosteroidů a následném vystavení rostlin suchu bylo zjištěno u *Triticum aestivum* L. (Saraim 1994a, Saraim 1994b), *Glycine max* L. (Zhang *et al.* 2008), *Brassica juncea* L. (Fariduddin *et al.* 2009), *Oryza sativa* L. (Farooq *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2010), *Lycopersicon esculentum* L. (Yuan *et al.* 2010), *Zea mays* L. (Anjum *et al.* 2013), *Capsicum annum* L. (Hu *et al.* 2013), *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek (Lal *et al.* 2013) a v porovnání s neošetřenými rostlinami pěstovanými za stejných podmínek. Naproti tomu u *Pinus banksiana* Lamb. zvýšení rychlosti fotosyntézy prokázáno nebylo (Rajasekaran a Blake 1999).

Zvýšení rychlosti fotosyntézy provází v některých případech i nárůst vnitrobuněčné koncentrace CO₂ (Fariduddin *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2009, Anjum *et al.* 2011) a naopak

v jiných k snížení (Yuan *et al.* 2010, Hu *et al.* 2013). V případě snížení koncentrace by mohly brassinosteroidy přispívat k efektivnější fixaci uhlíku překonáním limitů CO₂, které tvoří uzavřené průduchy, a také zvýšením aktivace fotosyntetických enzymů (Ali *et al.* 2008). Zvýšená aktivace enzymu RUBISCO byla zjištěna například u *Glycine max* L. (Zhang *et al.* 2008, **Tabulka 1**).

3.4. Antioxidanty

Uzavřením průduchů se rostlina brání ztrátám vody. Současně s tím klesá dostupnost CO₂ pro Calvinův cyklus a snižuje se rychlost fotosyntézy. Světlem řízený elektronový transport zůstává ale stále aktivní a v řetězci nastává nedostatek NADP⁺, který slouží jako akceptor elektronu. Funkci akceptoru tak často převezme kyslík (**Obrázek 1**), což má za následek vznik superoxidového radikálu nebo peroxidu vodíku. Ty se dále mohou měnit na další reaktivní formy kyslíku (ROS). Vznik ROS, obecně nazývaný jako foto-oxidační stres, je spojený nejen se suchem, ale i s dalšími typy abiotického stresu (Tausz *et al.* 2004).



Obrázek 1: Zjednodušené schéma foto-oxidativního stresu a antioxidační ochrany v chloroplastech (upraveno dle Tausz *et al.* 2004)

ROS mohou způsobovat nescifické oxidace proteinů a membránových lipidů, degradovat chlorofyl, dále mohou poškodit DNA a způsobit až smrt buňky. Rostliny mají vyvinuté endogenní obranné systémy, díky kterým se s ROS dokážou vyrovnat. Systémy zahrnují neenzymatické antioxidanty (askorbát, glutathion, tokoferol a prolin) a enzymatické antioxidanty (katalázy, peroxidázy, superoxid dismutázy, glutathion reduktáza;

Noctor a Foyer 1998, Schützendübel a Polle 2002, Fariduddin *et al.* 2009). Funkce antioxidantů za stresových podmínek je intenzivně sledována již mnoho let, ale zejména v posledních letech je pozornost věnována také vlivu brassinosteroidů na antioxidační ochranu rostlin během sucha.

V dalších podkapitolách budou uvedeny nejčastěji studované antioxidanty v souvislosti s aplikací brassinosteroidů a vystavení rostlin suchu (**Tabulka 1**).

Katalázy

Rozklad kyslíkového radikálu je během sucha spojen se vznikem peroxidu vodíku, který dále difunduje přes plasmatickou membránu. Peroxid vodíku je pro buňku toxický, ale při malé koncentraci současně působí jako antioxidant a redukční činidlo (Foyer *et al.* 1997). Katalázy (CAT) jsou enzymy, které katalyzují přeměnu peroxidu vodíku na vodu a molekulární kyslík. Tyto enzymy mají ale velmi nízkou afinitu k substrátu a reakce vyžaduje současně přístup dvou molekul peroxidu vodíku v aktivním místě. Z tohoto důvodu jsou v buňce katalázy přítomny ve vysoké koncentraci a během stresu se jejich aktivita zvyšuje (Willekens *et al.* 1997).

Již v 90. letech minulého století bylo prokázáno, že exogenní aplikace brassinosteroidů zvyšuje aktivitu CAT u kalusu a semenáčů *Zea mays* L. (genotyp odolný k suchu) pěstovaných na médiu s přidaným PEG v porovnání se stejně pěstovanými rostlinami bez ošetření (Li a van Staden 1997, Li *et al.* 1998). Vardhini a Rao (2003) dále potvrdili tento efekt u mladých rostlin *Sorghum bicolor* (L.) Moench pěstovaných v obdobných podmínkách. Zvýšená aktivita CAT po aplikaci brassinosteroidů byla v pozdějších letech zjištěna i u dalších rostlin pěstovaných *in vitro*, ale i v kontrolovaných podmínkách skleníku s použitím samovolného vysychání jako stresoru (Li *et al.* 2008, Behnamnia *et al.* 2009a, Behnamnia *et al.* 2009b, Fariduddin *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2010, Yuan *et al.* 2010, Anjum *et al.* 2011, Rao *et al.* 2011, Li a Feng 2011, Li *et al.* 2012a, Mahesh *et al.* 2013).

Peroxidázy

Alternativní způsob odstranění peroxidu vodíku zajišťují peroxidázy (POD), které se nacházejí v buňce i mezibuněčném prostoru a mají mnohem vyšší afinitu k substrátu než katalázy (Jiménez *et al.* 1997). Podílí se také na tvorbě suberinu a ligninu, které se v době

sucha ukládají do kořenů, což je důvodem vyšší koncentrace POD zejména v kořenech (Li *et al.* 2012b).

Podobně jako u CAT, byl prokázán pozitivní vliv brassinosteroidů na aktivitu POD u kalusu odolného genotypu *Zea mays* L. (Li a van Staden 1998a). Nicméně další práce na semenáčích *Zea mays* L. tento výsledek nepotvrdila (rostliny ošetřené stejnou koncentrací brassinosteroidů, Li *et al.* 1998). Vardhini a Rao (2003) zaznamenali u *Sorghum bicolor* (L.) Moench dokonce pokles aktivity POD. Uvádějí, že brassinosteroidy mohou eliminovat stres způsobený suchem (např. prostřednictvím zvýšení koncentrace CAT) a důsledkem toho může aktivita POD klesnout. Pozdější studie efekt brassinosteroidů na aktivitu POD během sucha potvrdily jako pozitivní (Li *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2008, Behnamnia *et al.* 2009a, Behnamnia *et al.* 2009b, Fariduddin *et al.* 2009, Anjum *et al.* 2011, Li *et al.* 2012a, Mahesh *et al.* 2013).

Kyselina askorbová a askorbát peroxidáza

Nejdůležitějším redukujícím substrátem pro detoxifikaci peroxidu vodíku je askorbát. Kyselina askorbová sama o sobě slouží jako neenzymatický antioxidant, který dokáže přímo odbourávat kyslíkové radikály (Smirnoff 1996, Chen *et al.* 2007) a regeneruje oxidovaný alfa tokoferol (Bartoli *et al.* 1999). Dále slouží jako substrát pro askorbát peroxidázu. Pro redukci peroxidu vodíku v glutathion-askorbátovém cyklu používá askorbát peroxidáza dvě molekuly askorbátu (Mehlhorn *et al.* 1996, Behnamnia *et al.* 2009a). Během reakce vzniknou dvě molekuly monodehydraskorbátu, radikálu s krátkou životností, který je obvykle rychle přeměněn zpátky na askorbát. Tato reakce, spolu s vysokou afinitou APX k askorbátu, způsobí, že během stresu může být koncentrace kyseliny askorbové snížena (Behnamnia *et al.* 2009a).

První studie zkoumající efekt brassinosteroidů na kalus *Zea mays* L. pěstované za osmotického stresu ukázaly, že brassinosteroidy snižují aktivitu APX a obsah kyseliny askorbové u genotypu citlivého k suchu a na odolný genotyp vliv nemá (Li a van Staden 1997). Navazující studie u semenáčů *Zea mays* L. prokázala pozitivní vliv brassinosteroidů na aktivitu APX u odolného genotypu, avšak vliv na obsah kyseliny askorbové se neprokázal. U citlivého genotypu nebyla patrná žádná odpověď na aplikaci brassinosteroidu (Li *et al.* 1998). Další studie potvrdily zvýšenou aktivitu APX u rostlin vystavených suchu a předem

ošetřených brassinosteroidy, nezabývaly se však porovnání odlišných genotypů (Behnamnia *et al.* 2009a, Behnamnia *et al.* 2009b, Farooq *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2010, Li a Feng 2011, Li *et al.* 2012a, Mahesh *et al.* 2013).

Superoxid dismutáza

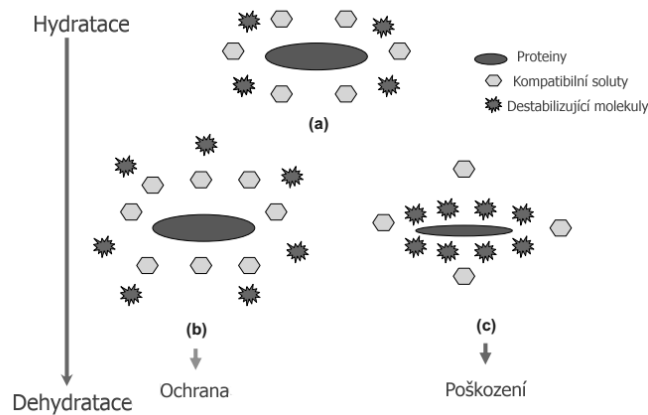
Superoxid dismutáza (SOD) katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu na kyslík a peroxid vodíku, který je dále přeměněn ostatními antioxidačními enzymy. Kyslíkové radikály jsou produkovány ve všech organelách, kde se nachází elektron-transportní řetězec a současně jsou fosfolipidové membrány nepropustné pro nabitě molekuly. Z těchto důvodů je důležité, aby se SOD nacházel přímo na místě tvorby radikálů (Takahashi a Asada 1983, Rao *et al.* 2011). SOD využívá jako kofaktory ionty železa, manganu a mědi se zinkem a podle typu kofaktoru jsou jednotlivé izoformy SOD rozmístěny v buňce (Kanematsu a Asada 1991).

Aktivita SOD během sucha u některých druhů a odrůd stoupá (Acar 2001, Behnamnia *et al.* 2009b, Anjum 2011), u jiných zůstává nezměněna (Li a Feng 2011). Nicméně aplikace brassinosteroidů před začátkem stresové periody ve většině případů významně zvyšuje aktivitu SOD a tím přispívá k lepšímu vypořádání se s oxidativním stresem (Li *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2008, Behnamnia *et al.* 2009a, Behnamnia *et al.* 2009b, Farooq *et al.* 2009, Fariduddin *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2010, Yuan *et al.* 2010, Anjum *et al.* 2011, Li a Feng 2011, Rao *et al.* 2011, Li *et al.* 2012a, Mahesh *et al.* 2013). Pouze práce na kalusu *Zea mays* L. neprokázala žádný vliv (Li a van Staden 1997). Behnamnia *et al.* (2009a,b) uvádí, že brassinosteroidy zmírňují oxidační poškození buněk právě tím, že zvyšují aktivitu SOD, i když zvýšená aktivita SOD a je téměř vždy spojena i se zvýšenou aktivitou ostatních antioxidačních enzymů (Liang *et al.* 2003).

Prolin

Prolin je nízkomolekulární aminokyselina a ve své volné formě zastává v buňce několik osmoprotektivních a antioxidačních funkcí. Především působí jako kompatibilní solut, které si buňka hromadí v době stresu proto, aby udržela svůj vodní potenciál (**Obrázek 2**). Dále stabilizuje proteinové struktury a membrány a zabraňuje denaturaci enzymů (Saradhi *et al.* 1995, Wang *et al.* 1999, Bandurska 2000). Slouží také jako zdroj uhlíku a dusíku, který rostlina může využít pro rychlejší zotavení ze stresu (Jain *et al.* 2001).

Během sucha dochází ke zvýšené syntéze prolinu a ošetření brassinosteroidy obsah prolinu v rostlině dále zvyšuje (Vardhini a Rao 2003).



Obrázek 2: Role kompatibilních solut během probíhající dehydratace. (b) tolerantní buňky k suchu, které hromadí kompatibilní soluty a tím předchází destabilizaci proteinů (c) citlivé buňky k suchu (upraveno dle Farooq et al. 2009)

Vyšší obsah prolinu po ošetření brassinosteroidy a následném vystavení rostlin suchu byl postupně zjištěn u *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Vardhini a Rao 2003), dále u *Glycine max* L. (Zhang et al. 2008), *Brassica juncea* L. (Fariduddin et al. 2009), *Brassica napus* L. (Mousavi et al. 2009), *Lycopersicon esculentum* L. (Behnamnia et al. 2009, Behnamnia et al. 2009, Yuan et al. 2010), *Oryza sativa* L. (Farooq et al. 2009), *Zea mays* L. (Anjum et al. 2011), *Raphanus sativus* L. (Mahesh et al. 2013) a *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek (Alyemeni a Al-Quwaiz 2014). Zvýšený obsah byl zjištěn také u dřevin – *Robinia pseudoacacia* L. (Li et al. 2008) a *Xanthoceras sorbifolia* B. (Li a Feng 2011).

U *Chorispora bungeana* Fisch. Et C. A. Mey. se jako u jediného druhu prokázal opačný efekt brassinosteroidů (Li et al. 2012a). Autoři pokles vysvětlují tím, že brassinosteroidy mohly ovlivnit expresi $\Delta 1$ -pyrrolin-5-karboxylát syntázy, která funguje jako významný katalyzátor v biosyntéze prolinu. K podobnému vysvětlení došli i Ábrahám et al. (2003) u *Arabidopsis thaliana* L. ošetřené brassinosteroidem a pěstované v zasolení.

3.5. Poškození buněk

Dehydratace pletiva vede ke změnám vnitrobuněčných struktur. Sucho způsobuje redukci sterolů a fosfolipidů a snižuje také jejich poměr (Zwiasek a Blake 1990). To vede

k destabilizaci a poškození membrán a tím tak k nevratnému narušení integrity organel a buněk.

Poškození membrán

Poškození membrán, někdy vyjadřované jako únik elektrolytu z poškozených buněk, udává obecný pohled na stav buňky. S přibývajícím stresem dochází k rozpadu membrán a obsah buňky se dostává do extracelulárního prostoru. S únikem elektrolytu tak stoupá konduktivita pletiva, která se dá stanovit prostřednictvím měrné elektrické vodivosti.

Většina prací (**Tabulka 1**), která se zabývá vlivem brassinosteroidů na poškození membrán během stresu suchem, zaznamenala výrazně nižší poškození u rostlin po aplikaci brassinosteroidů v porovnání s rostlinami kontrolními (Saraim 1994b, Li a van Staden 1998a, Li a van Staden 1998b, Zhang *et al.* 2008, Farooq *et al.* 2009, Mousavi *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2010, Li a Feng 2011, Li *et al.* 2012a). Pouze Rajasekaran (1999) po injekční aplikaci brassinosteroidu do xylému *Pinus banksiana* Lamb. nezaznamenal žádný průkazný rozdíl u odlišně ošetřených rostlin.

Malondialdehyd

Tvorba malondialdehydu (MDA) a dalších aldehydů v rostlinách vystavených vodnímu stresu je spolehlivým ukazatelem oxidativního stresu peroxidace lipidů (Meir *et al.* 1992). MDA se vytváří autooxidací a enzymatickou degradací polynenasycených mastných kyselin v buňce a je konečným produktem peroxidace lipidů (Zlatev *et al.* 2006). Přítomnost MDA se nejčastěji zjišťuje prostřednictvím reaktantů s kyselinou thiobarbiturovou (Hodges *et al.* 1999).

Obsah MDA během sucha v buňce stoupá, avšak v mnoha případech se ukázalo, že rostliny ošetřené brassinosteroidy reagovaly nižší tvorbou MDA než rostliny neošetřené (**Tabulka 1**). Již první studie u *Zea mays* L. ošetřené brassinosteroidy prokázaly významný pokles MDA u genotypu odolného k suchu (Li a van Staden 1997b, Li *et al.* 1998). Podobné výsledky byly publikovány u *Robinia pseudoacacia* L. (Li *et al.* 2008) a *Glycine max* L., u které došlo ke snížení obsahu MDA až o 11% v porovnání s rostlinami neošetřenými (Zhang *et al.* 2008). Tyto výsledky byly potvrzeny v dalších letech i u dalších rostlinných druhů (Farooq *et al.* 2009, Mousavi *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2010, Yuan *et al.* 2010, Anjum *et al.* 2011, Li a Feng 2011, Li *et al.* 2012a, Mahesh *et al.* 2013). Navzdory tomu Behnamnia *et al.* (2009a,

2009b) neprokázali vliv brassinosteroidů na mladé rostliny *Lycopersicon esculentum* L., ačkoliv vyšší aktivita antioxidantních enzymů (SOD, CAT, POD) byla potvrzena.

Peroxid vodíku

Peroxid vodíku je hlavním kyslíkovým radikálem, který se tvoří během osmotického stresu. Vzniká činností SOD při redukci superoxidového radikálu. Peroxid je silné oxidační činidlo, které rychle oxiduje thiolové skupiny, proto není žádoucí, aby se ve velké koncentraci hromadil například v chloroplastech, kde se nachází thiol-redukované enzymy nezbytné pro fotosyntézu (Kaiser 1979). CAT, POD a APX redukuje peroxid vodíku na vodu a proto jsou často zjišťovány aktivity jednotlivých antioxidantních enzymů v závislosti na obsahu peroxidu vodíku v buňkách během sucha.

Kromě experimentu na kalusu *Zea mays* L. (Li *et al.* 1998), byl ve všech případech prokázán pokles obsahu peroxidu vodíku po aplikaci brassinosteroidů v porovnání s neošetřenými rostlinami (**Tabulka 1**). U *Lycopersicon esculentum* L. a *Oryza sativa* L. pokles obsahu peroxidu vodíku provázelo i snížení obsahu MDA (Behnamnia *et al.* 2009a, Farooq *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2010, Yuan *et al.* 2010), což dokazuje úzkou vazbu těchto parametrů během oxidativního poškození (Feng *et al.* 2003). V jiném experimentu u *Lycopersicon esculentum* L. došlo také k významnému poklesu peroxidu vodíku, nicméně poklesem MDA tento efekt provázen nebyl (Behnamnia *et al.* 2009b). Ve všech zmíněných případech byla snížená koncentrace peroxidu vodíku provázena zvýšenou aktivitou antioxidantů.

Tabulka 1: Přehled výsledků studií popisující vliv brassinosteroidů na vybrané parametry rostlin pěstovaných v optimálních podmínkách a v podmínkách stresu suchem. Práce jsou řazeny abecedně podle rostlinného druhu, se kterým bylo pracováno (seznam zkratk použitých v tabulce je zařazen na konci).

Rostlinný druh	Podmínky pěstování	Typ, koncentrace a způsob ošetření BRs	BRs zvyšují (↑)/ snižují (↓) aktivitu/množství v kontrolních podmínkách	BRs zvyšují (↑)/ snižují (↓) aktivitu/množství po vystavení suchu	Citace
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. a <i>Brassica napus</i> L.	Inkubace <i>in vitro</i> BRs → 26(AT) a 17(BN) dnů staré rostliny → sucho na 96h(AT) a 60h(BN)	10 ⁻⁶ M BL V živném médiu	<i>Není uvedeno</i>	Ovlivňuje: • ↑: PS	Kagale <i>et al.</i> 2007
<i>Brassica juncea</i> L.	Síťový přístřešek, 8-14 dnů a 15-21 dnů staré rostliny → sucho na 7 dní → obnova závlivky → 30 dnů staré rostliny → BRs → odběr 60 dnů starých rostlin	10 ⁻⁸ M HBL Postřik listů	Ovlivňuje: • ↑: FW, DW, plocha listů, délka • ↑: RWC, WUE, g _s • ↑: P _N , C _i , SPAD • ↑: Pro, SOD, CAT, POD • ↑: CA	Ovlivňuje: • ↑: FW, DW, plocha listů, délka • ↑: RWC, WUE, g _s • ↑: P _N , C _i , SPAD • ↑: Pro, SOD, CAT, POD • ↑: CA	Fariduddin <i>et al.</i> 2009
<i>Brassica napus</i> L.	Růstová komora, 1 týden staré rostliny → BRs → 26 dnů od vyklíčení → sucho na 3 až 4 dny	10 ⁻⁷ M EBL Postřik listů	Ovlivňuje: • ↑: FW, DW • ↓: MDA • ↑: Na Neovlivňuje: RWC, Pro, MI, rozpustné cukry, Ca	Ovlivňuje: • ↑: FW, DW • ↑: RWC • ↑: Pro, rozpustné cukry • ↓: MDA, MI • ↑: Ca, K, Na	Mousavi <i>et al.</i> 2009

<i>Capsicum annuum</i> L. (citlivé genotypy)	Skleník, růstová komora 2 měsíce staré rostliny → BRs → 10 dnů sucho	2x10 ⁻⁸ M BL, postřik listů (1 den před suchem a 5 dnů po začátku sucha)	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> ↑: FW ↑: E, g_s ↑: P_N, P_{max}, Φ_{PSII}, LSP, qP ↓: C_i, LCP Neovlivňuje: AQY, F _v /F _m , NPQ	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> ↑: FW ↑: E, g_s ↑: P_N, P_{max}, Φ_{PSII}, LSP, qP, AQY, F_v/F_m, NPQ ↓: C_i, LCP 	Hu <i>et al.</i> 2013
<i>Carica papaya</i> L. (2 genotypy)	70 dnů staré rostliny → BRs → sucho na 11 - 15 dnů → BRs	1 mg/l BIOBRAS 16 postřik listů denně po dobu 5 dnů a 1x po stresu	Neovlivňuje: SDW, plocha listů, RWC, SPAD, F _v /F _m	Ovlivňuje: Po 15 dnech sucha ↓: SPAD Neovlivňuje: SDW, plocha listů, RWC, F _v /F _m	Gomes <i>et al.</i> 2013
<i>Cicer arietinum</i> L.	Skleník 1 týden staré rostliny → sucho → BRs → odběr po 8 týdnech od výsevu	0,001 ppm EBL, postřik listů po 2, 4, 6 týdnech po výsevu	<i>Není uvedeno</i>	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> ↑: FW, DW, počet nodů, počet oddenků, délka, aktivita kořenů ↑: NR 	Singh <i>et al.</i> 1993
<i>Glycine max</i> L.	Venkovní přístřešek První plně vyvinutý list → BRs → po sedmi dnech sucho na 7 dní	2x10 ⁻⁷ M BL postřik listů	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> ↑: DW, výnos ↑: P_N, RUBISCO, PEP-karboxyláza ↑: SOD, rozpustné cukry ↓: MI Neovlivňuje: Ψ _w , SPAD, F _v /F _m , Pro, POD, MDA	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> ↑: DW, výnos ↑: Ψ_w ↑: P_N, F_v/F_m, SPAD, RUBISCO ↑: Pro, SOD, POD, rozpustné cukry ↓: MDA, MI Neovlivňuje: PEP-karboxyláza	Zhang <i>et al.</i> 2008

<i>Chorisporea bungeana</i> Fisch. Et C. A. Mey.	Inkubace in vitro 5cm vysoké rostliny → BRs → po 1 dni 20% PEG → odběr po 72 hodinách	2x10 ⁻⁷ M BL Postřik listů (3x po 2 hodinách)	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> ↑: Chl a, F_v/F_m ↑: CAT, APX, AsA Neovlivňuje: RWC, Chl b, Chl a+b, Φ _{PSII} , F _m , F ₀ , Pro, SOD, GR, GSH, MDA, MI	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> ↑: Chl a, Chl a+b, Φ_{PSII}, F_v/F_m ↑: SOD, CAT, APX, GR, GSH, AsA ↓: Pro ↓: MDA, MI Neovlivňuje: RWC, Chl b, F _m , F ₀	Li <i>et al.</i> 2012a
<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Skleník, růstová komora, 4 vyvinuté listy → BRs → 3, 5 dnů sucho	10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁶ M BL, postřik listů (3x během 3 dnů)	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> ↑: GR, obsah proteinů 10⁻⁶ M ↑: SOD, POD, APX ↓: H₂O₂ Neovlivňuje: Pro, ostatní aldehydy, MDA	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> ↑: Pro, CAT, SOD, GR ↓: MDA, H₂O₂ Po 5 dnech sucha: <ul style="list-style-type: none"> ↑: POD, APX, obsah proteinů ↑: ostatní aldehydy Nejvýznamnější vliv 10⁻⁶ M po 5 dnech sucha.	Behnamnia <i>et al.</i> 2009a
<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Růstová komora, 4 vyvinuté listy → BRs → 3 a 5 dnů sucho	10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁶ M BL, postřik listů (3x během 3 dnů)	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> ↑: GR 10⁻⁶ M ↑: POD, SOD, APX, obsah proteinů 10⁻⁶ M ↓: H₂O₂ Neovlivňuje: Pro, CAT, MDA, ostatní aldehydy	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> ↑: Pro, SOD, CAT, GR Po 3 dnech sucha: <ul style="list-style-type: none"> 10⁻⁶ M ↓: H₂O₂ Po 5 dnech sucha: <ul style="list-style-type: none"> ↑: POD, APX ↓: H₂O₂, ostatní aldehydy 10⁻⁶ M ↑: obsah proteinů Neovlivňuje: Po 3 dnech sucha: rozpustné proteiny, CAT, POD, APX, MDA Po 5 dnech sucha: MDA	Behnamnia <i>et al.</i> 2009b

<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Skleník, 5 plně vyvinutých listů → BRs → 1-4 dny sucho	10^{-6} M BL, postřik na rostlinu	<i>Není uvedeno</i>	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: RWC ↓: g_s, • ↑: P_N ↓: C_i • ↑: SOD, CAT, APX, • ↑: ABA ↓: MDA, H_2O_2 	Yuan <i>et al.</i> 2010
<i>Oryza sativa</i> L.	Fytotron, 1) BRs → 4 plně vyvinuté listy → regulace závlivky 2) 4 vyvinuté listy → regulace závlivky → 5 vyvinutých listů → BRs → odběr po 1 týdnu	10^{-8} M BL,HBL (máčení kořenů na 48hod nebo postřik listů)	<i>Není uvedeno</i>	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: FW, DW, délka • ↑: RWC, WUE, ψ_w, ψ_s, ψ_p ↓: E, g_s • ↑: P_N, C_i, P_N/C_i • ↑: Pro, SOD, CAT, APX, fenoly, antokyany • ↓: MDA, H_2O_2, MI Účinek BL výraznější než HBL Aplikace postřikem na list efektivnější	Farooq <i>et al.</i> 2009
<i>Oryza sativa</i> L.	Fytotron 4 vyvinuté listy → BRs → sucho na 4, 8, 12, 16 dnů	10^{-8} M BL postřik listů	<i>Není uvedeno</i>	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: FW, DW, délka • ↑: RWC, WUE, E, g_s, ψ_w, ψ_s, ψ_p • ↑: P_N • ↑: Pro, SOD, CAT, APX, fenoly, antokyany ↓: MDA, H_2O_2, MI 	Farooq <i>et al.</i> 2010
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fóliovník Rostliny ve fázi kvetení → BRs → po 5 dnech sucho na 4-8 dní	10^{-6} a 5×10^{-6} M BL a HBL	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: nodulace kořenů • 5×10^{-6} M ↑: výnos lusků • ↑: ZR, NR Neovlivňuje: Počet a délka lusků, ABA	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • 5×10^{-6} M ↑: nodulace kořenů, výnos lusků • ↑: ZR, NR Neovlivňuje: Počet a délka lusků, ABA Nejvýznamnější vliv BL	Upreti a Murti 2004

<i>Pinus banksiana</i> Lamb.	Skleník a růstová komora 18 měsíců staré rostliny → 10 denní aklimace v růstové komoře → BRs → sucho na 12 dnů	10 ⁻⁸ M HBL, injekčně do xylému po dobu 7 dnů	<i>Není uvedeno</i>	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: elongace • ↑: WUE, xylémový potenciál • ↑: etylén Neovlivňuje: E, g _S , P _N , C _i /C _a , MI	Rajasekaran a Blake 1999
<i>Pisum sativum</i> L. (tři genotypy)	Skleník 28 dnů staré rostliny → sucho na 7, 8, 11, 13 dnů → BRs → odběr listů po 15 dnech	4x10 ⁻⁷ M BL postřik listů	<i>Není uvedeno</i>	Neovlivňuje: RWC	Jager <i>et al.</i> 2008
<i>Raphanus sativus</i> L.	Inkubace <i>in vitro</i> BRs → 72 hodin klíčení → roztok BRs a 15% PEG → 7 dnů kultivace	5x10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁶ , 2x10 ⁻⁶ M BL a HBL, máčení semen (24 hodin) a v kultivačním médiu	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: FW ↓: klíčivost po 12 hod; 5x10⁻⁷ M BL a HBL ↓: klíčivost po 24 hod; 10⁻⁶, 2x10⁻⁶ M BL a HBL ↑: délka; 2x10⁻⁶ M BL a HBL ↑: DW • ↑: Pro, SOD, CAT, rozpustné proteiny 10⁻⁶, 2x10⁻⁶ M BL a HBL ↑: POD, APX • 10⁻⁶, 2x10⁻⁶ M BL a HBL ↓: MDA • ↑: DNA, RNA 2x10⁻⁶ M BL ↓: RNáza Neovlivňuje: Klíčivost po 62 hod	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: klíčivost, délka, FW, DW (kromě 5x10⁻⁷ BL), • ↑: Pro, SOD, POD, APX, rozpustné proteiny 2x10⁻⁶ M BL, 1 a 2x10⁻⁶ M HBL ↑: CAT • ↓: MDA • ↑: DNA, RNA 2x10⁻⁶ M HBL ↓: RNáza Nejvýznamnější vliv 2x10⁻⁶ M BL a HBL	Mahesh <i>et al.</i> 2013

<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Venkovní přístřešek 1 rok staré rostliny → BRs → po 2 měsících 10 denní regulace zálivky (35%, 55% FWC)	2 – 8x10 ⁻⁷ M BL Máčení kořenů při přesazení (5min) a postřik listů (15 dnů po máčení)	Neovlivňuje: LWC, ψ_w , E, g_s , Pro, rozpustné cukry, SOD, CAT, POD, MDA	Ovlivňuje: 55% FWC: • 0,2 a 0,4x10 ⁻⁶ M ↑: Pro, rozpustné cukry, SOD, POD; 0,4x10 ⁻⁶ ↑: CAT 35% FWC: • 0,4x10 ⁻⁶ M ↑: LWC, ψ_w ↓: E, g_s • 0,4 a 0,6x10 ⁻⁶ M↑: Pro 0,2 a 0,4x10 ⁻⁶ M↑: rozpustné cukry, POD 0,6x10 ⁻⁶ M↑: POD • 0,4x10 ⁻⁶ M↓:MDA Neovlivňuje: 55% FWC: LWC, ψ_w , E, g_s , MDA Nejvýznamnější vliv 0,4 x 10⁻⁶ M BL	Li <i>et al.</i> 2008
<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	Skleník Výsev do substrátu nasyceného vodou → samovolné vysychání → BRs → sucho na několik týdnů	0,1 ppm BL postřik listů (4., 7., 11., a 14. den od výsevu)	<i>Není uvedeno</i>	Ovlivňuje: • ↑: RWC (nejvýznamněji s exogenně aplikovanou ABA) ↓: E Neovlivňuje: Kutikulární transpirace	Xu <i>et al.</i> 1994
<i>Sorghum vulgare</i> L. (citlivé a odolné genotypy k suchu)	Klíčení na médiu s BRs a 20% PEG → odběr 5. a 6. den	2–3x10 ⁻⁶ M HBL a BL v kulturačním médiu	<i>Není uvedeno</i>	Ovlivňuje: • ↑: klíčivost, FW, DW, délka • ↑: Pro, CAT, rozpustné proteiny ↓: POD, AsA oxidáza	Vardhini a Rao 2003
<i>Sorghum vulgare</i> L. (citlivé a odolné genotypy k suchu)	Po vyklíčení rostlin → BRs a 20% PEG → odběr 6 denních rostlin	2-3x10 ⁻⁶ M HBL a BL (v médiu každé dva dny)	<i>Není uvedeno</i>	Ovlivňuje: • ↑: SOD, GR • ↓: IAA oxidáza, polyfenol oxidáza, proteáza, RNáza Významnější odpověď na aplikaci BRs u odolnějších genotypů	Rao <i>et al.</i> 2011

<i>Triticum aestivum</i> L.	30 dnů po výsevu → BRs → sucho na 7 dní	0,1 a 1 ppm HBL, postřik listů (30. a 32. den po výsevu)	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: výnos • ↑: DR ↓: RWC, E • ↑: P_N, Chl • ↑: NR, GS, rozpustné proteiny 	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: výnos • ↑: RWC, E ↓: DR • ↑: P_N, Chl • ↑: NR, GS, rozpustné proteiny 	Saraim 1994a
<i>Triticum aestivum</i> L. (citlivé a odolné genotypy k suchu)	Pole a skleník (BRs) → 25 od výsevu → (BRs) → sucho na 7 dní	0,01 a 0,05 ppm HBL, máčení semen (6 hod) nebo postřik listů	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: Plocha listů, výnos • ↑: RWC • ↑: P_N, Chl • ↓: MI • ↑: NR 	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: Plocha listů, výnos • ↑: RWC • ↑: P_N, Chl • ↓: MI • ↑: NR • Nejvýznamnější vliv 0,05 ppm HBL 	Saraim 1994b
<i>Vicia faba</i> L. (citlivá odrůda)	Skleník, 18 dnů od výsevu → BRs → 10 dnů sucho	10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁸ , 10 ⁻¹⁰ , 10 ⁻¹² EBL, postřik listů	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: počet listů Neovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • Chl a, Chl b, karotenoidy 	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: počet listů Neovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • Chl a, Chl b, karotenoidy Nejvýznamnější vliv 10⁻¹⁰, 10⁻¹² EBL.	Fridrichová <i>et al.</i> 2012
<i>Vigna radiata</i> (L.) R. Wilczek	7 denní rostliny → 14 dní BRs a PEG	10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁸ , 10 ⁻¹⁰ M HBL v médiu	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: klíčivost, MNS • ↑: Pro 	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: klíčivost, MNS • ↑: Pro 	Alyemeni a Al-Quwaiz 2014
<i>Vigna radiata</i> (L.) R. Wilczek	25 a 35 dnů od výsevu → BRs → 10 dnů sucho	0,1; 0,5; 1 ppm BL postřik listů	<i>Není uvedeno</i>	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: plocha listů, délka, výnos • ↑: RWC, E, gs, teplota listu • ↑: P_N, index stability chlorofylu 	Lal <i>et al.</i> 2013

<i>Vitis vinifera</i> L.	Skleník Rostliny s 8 vyvinutými listy → 10% PEG + BRs → odběr po 9 dnech	10^{-7} , 2×10^{-7} , 410^{-7} BL v zálivce	<i>Není uvedeno</i>	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: hustota a velikost průduchů, NPQ ↓: F_0 • 10^{-7}, 2×10^{-7} ↑: Chl a, Chl a+b • 2×10^{-7}, 410^{-7} ↑: Φ_{PSII}, F_v/F_m Neovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • Chl b 	Wang <i>et al.</i> 2015
<i>Xanthoceras sorbifolia</i> B.	Venkovní přístřešek 29 cm vysoké rostliny → BRs → po 2 měsících 20 denní regulace zálivky (55%, 35% FWC)	$2-8 \times 10^{-7}$ M BL, máčení kořenů (5 minut) a postřik listů	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: CAT, POD, APX Neovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • $0,2 \times 10^{-6}$ M: AsA; • $0,8 \times 10^{-6}$ M: APX; RWC, Pro, SOD, rozpustné cukry a proteiny, GSH, MDA, MI 	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: RWC • ↑: Pro, SOD, CAT, APX, rozpustné cukry a proteiny, AsA, GSH • ↓: MDA, MI Neovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • 55% FWC: SOD; $0,8 \times 10^{-6}$ M: rozpustné proteiny Nejvýznamnější vliv $0,4 \times 10^{-6}$ M	Li a Feng 2011
<i>Zea mays</i> L. (citlivé a odolné genotypy k suchu)	Růstová komora BRs → 7 dnů staré rostliny → PEG po dobu 48 hodin	2×10^{-5} a 2×10^{-3} M BL máčení semen (17 hod)	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: DR • ↓: MI Neovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • E 	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↓: délka (citlivý g.) • ↑: RWC (odolný g.) ↓: RWC (citlivý g.), E ↓: MI 	Li a van Staden 1998a
<i>Zea mays</i> L. (citlivé a odolné genotypy k suchu)	Růstová komora 8 dnů starý kalus → BRs → PEG (-0,5 MPa) po dobu 24 hod → po 30 dnech odběr kalusu	$2,5 \times 10^{-5}$ M BL máčení kalusu (3 hod)	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: karotenoidy (odolný g.) • ↑: SOD (odolný g.), CAT (odolný g.), APX (odolný g.) ↓: POD (citlivý g.) • ↓: MI Neovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • AsA, GR, MDA, H_2O_2 	Ovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • ↑: CAT (odolný g.), POD (odolný g.) ↓: APX (citlivý g.), AsA (citlivý g.) • ↓: MDA (odolný g.), H_2O_2 (odolný g.), MI Neovlivňuje: <ul style="list-style-type: none"> • Karotenoidy, SOD, GR Významnější odpověď u odolnějšího genotypu	Li a van Staden 1998b

<p><i>Zea mays</i> L. (citlivé a odolné genotypy k suchu)</p>	<p>Růstová komora BRs → PEG (-1,0 MPa) po dobu 48 hodin</p>	<p>$2,5 \times 10^{-5}$ M BL máčení semen (17 hodin)</p>	<p>Ovlivňuje:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑: karotenoidy (citlivý g.) • ↑: APX (odolný g.) CAT (odolný g.) ↓: APX (citlivý g.) <p>Neovlivňuje: SOD, POD, AsA, GR, MDA, H₂O₂</p>	<p>Ovlivňuje:</p> <p>Po 24 hod sucha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑: CAT • ↓: MDA (odolný g.) <p>Po 48 hod sucha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑: APX (odolný g.), CAT (odolný g.) • Neovlivňuje: Karotenoidy, POD, AsA, GR, H₂O₂ 	<p>Li <i>et al.</i> 1998</p>
<p><i>Zea mays</i> L.</p>	<p>Venkovní přístřešek 14 denní rostliny → 6 dnů sucho → BRs → 7, 12, 17 dnů sucho</p>	<p>2×10^{-7} M BL, postřik listů</p>	<p>Ovlivňuje:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑: FW, DW, plocha listů, počet listů, výnos • ↑: RWC, WUE, E • ↑: P_N, C_i, Chl a, chl b, chl a+b • ↑: Pro, SOD, CAT, POD, rozpustné proteiny • ↓: MDA <p>Neovlivňuje: Délka rostliny, délka klasu, g_s</p>	<p>Ovlivňuje:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑: FW, DW, plocha listů, počet listů, výnos • ↑: RWC, WUE, E • ↑: P_N, C_i, Chl a, chl b, chl a+b • ↑: Pro, SOD, CAT, POD, rozpustné proteiny • ↓: MDA <p>Neovlivňuje: Délka rostliny, délka klasu, WUE_i, g_s</p>	<p>Anjum <i>et al.</i> 2011</p>

Seznam zkratk použitých v **Tabulce 1**:

ABA	kyselina abscisová	LWC	obsah vody v listech
AN	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	MDA	malondialdehyd
APX	askorbát peroxidáza	MI	index poškození membrán
AQY	zjevný kvantový výtěžek	MNS	obsah minerálních látek
AsA	kyselina askorbová	NPQ	koeficient nefotochemického zhášení
BL	brassinolid	NR	nitrát reduktáza
BN	<i>Brassica napus</i> L.	PEG	polyethylenglykol
BRs	brassinosteroidy	PEP-karboxyláza	fosfoenolpyruvát-karboxyláza
CA	karbonická anhydráza	P_{max}	maximální rychlost fotosyntézy
CAT	kataláza	P_N	rychlost fotosyntézy
C_i/C_a	atmosférická koncentrace CO_2 /vnitrobuněčná koncentrace CO_2	POD	peroxidáza
DR	difuzní rezistance	Pro	prolin
DW	suchá hmotnost	PS	přežití rostliny
E	rychlost transpirace	qP	koeficient fotochemického zhášení
EBL	epibrassinolid	RUBISCO	ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza
F_0	minimální fluorescence v listech adaptovaných na tmu	RWC	relativní obsah vody
F_m	maximální fluorescence v listech adaptovaných na tmu	SDW	suchá hmotnost prýtu
F_v/F_m	maximální kvantový výtěžek fotosystému II	SOD	superoxid dismutáza
FW	čerstvá hmotnost	SPAD	množství SPAD chlorofylu
FWC	polní kapacita půdy	WUE	efektivita využití vody
GR	glutathion reduktáza	WUE_i	skutečná efektivita využití vody
g_s	stomatální vodivost	$\Phi PSII$	kvantový výtěžek fotosystému II
GSH	redukovaný glutathion	ZR	zeatin ribóza
H_2O_2	peroxid vodíku	Ψ_p	tlakový potenciál
HBL	homobrassinolid	Ψ_s	osmotický potenciál
Chl a	chlorofyl a	Ψ_w	vodní potenciál
Chl a+b	chlorofyl a+b		
Chl b	chlorofyl b		
IAA oxidáza	oxidáza kyseliny indolyl-3-octové		
LCP	světelný kompenzační bod		
LSP	Hustota fotosyntetického toku fotonů		

4. Materiál a metodika

4.1. Pokusný materiál

Pro pokusy byly vybrány dva rostlinné druhy s odlišným typem fixace CO₂ při fotosyntéze - bob obecný (*Vicia faba* L.) a kukuřice setá (*Zea mays* L.). V případě kukuřice byly zvoleny linie 2023 a CE704, u bobu odrůdy Merkur a Piešťanský. Vybrány byly tak, aby u každého druhu byla jedna k suchu citlivější a druhá k suchu odolnější. Rostlinný materiál byl zvolený na základě výsledků předchozích pokusů (Holá *et al.* 2010, Kuklíková 2011, Fridrichová *et al.* 2012).

4.1.1. Bob obecný

Bob obecný (*Vicia faba* L., *Faba sativa* Moench) je významná hospodářská plodina používaná především jako zelené hnojení a krmivo. Systematicky se řadí do čeledi *Fabaceae*, řádu *Fabales*, třídy *Rosopsida* a oddělení *Magnoliophyta* a byl vybrán jako zástupce rostlin s C3 fotosyntézou.

Odrůda Piešťanský je středně raná, středně vysoká s bílými květy a vysokou kvalitou semen a byla zvolena pro svou citlivost k suchu. Vyšlechtěna byla ve ŠS Horna Streda, a.s. na Slovensku, semenný materiál poskytla firma Agritec, s.r.o. Šumperk. Odrůda Merkur je poloraná, středně vysoká s barevnými květy a středně vysokým výnosem. Vyznačuje se vyšší odolností k suchu. Byla vyšlechtěna v SŠ Chlumeč nad Cidlinou, odtud také pocházela semena pro pokusy.

4.1.2. Kukuřice setá

Kukuřice setá (*Zea mays* L.) je důležitá kulturní rostlina pěstována mimo jiné jako krmivo, potravinu a technická plodina. Systematicky se řadí do čeledi *Poaceae*, řádu *Poales*, třídy *Liliopsida* a oddělení *Magnoliophyta* a byla vybrána jako zástupce rostlin s C4 fotosyntézou.

Linie 2023 se vyznačuje pomalejším vývojem, citlivostí k suchu a velmi dobrým výnosem. V polních podmínkách dosahuje výšky až 150 cm. Linie CE704 má rychlejší vývoj, dosahuje v polních podmínkách vzrůstu zhruba kolem 130 cm, je ve srovnání s linií 2023 odolnější k

suchu. Obě použité linie byly vyšlechtěny firmou CEZEA a.s. v ŠS v Čejči a odtud také pocházela semena pro pokusy.

4.2. Organizace pokusů

Pokusné rostliny byly pěstovány ve skleníku v několika vzájemně si odpovídajících sériích (**Tabulka 2**). Kukuřice byla vždy vysévána v průběhu března a stresová perioda probíhala v dubnu. Bob byl vyséván v průběhu srpna a v září byly rostliny vystaveny stresu. Časové rozpětí pokusů bylo zvoleno tak, aby bylo možné zvládnout u obou rostlinných druhů potřebná srovnávací měření a současně dodrženy optimální podmínky pěstování pokusných rostlin, zejména teplota ve skleníku, délka světelného dne apod. Veškerá měření i odběry rostlinného materiálu byly prováděny mezi osmou a čtrnáctou hodinou.

Tabulka 2: Časový rozpis pěstování a odběru pokusného materiálu a měření vybraných parametrů v letech 2013 - 2015

STUDOVANÉ PARAMETRY	ROSTLINNÝ DRUH	PĚSTOVÁNÍ A ODBĚR ROSTLINNÉHO MATERIÁLU	STANOVENÍ A ZHODNOCENÍ VELIČIN
GAZOMETRIE (P_N , E, g_s)	<i>Vicia faba</i> L.	Podzim 2013	Podzim 2013
	<i>Zea mays</i> L.	Jaro 2014	Jaro 2014
PROLIN	<i>Vicia faba</i> L.	Podzim 2013	Zima 2013
	<i>Zea mays</i> L.	Jaro 2013	Jaro 2013
OSMOTICKÝ POTENCIÁL	<i>Vicia faba</i> L.	Podzim 2014	Zima 2014
	<i>Zea mays</i> L.	Jaro 2015	Jaro 2015
KONDUKTOMETRIE	<i>Vicia faba</i> L.	Podzim 2014	Podzim 2014
	<i>Zea mays</i> L.	Jaro 2015	Jaro 2015
MALONDIALDEHYD	<i>Vicia faba</i> L.	Podzim 2013	Zima 2015
	<i>Zea mays</i> L.	Jaro 2013	Zima 2015

4.2.1. Podmínky pěstování

Rostliny byly pěstovány ve skleníku v Brožkově genetické zahradě katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Semena rostlin byla vyseta do pěstebních nádob (o rozměrech 8x12 cm) naplněných zahradním substrátem, umístěných na parapetu ve skleníku. Do každého květináče bylo vyseto jedno semeno a rostliny byly během svého raného vývoje zalévány běžnou zálivkou – nejprve horní zálivkou, později kontrolovanou zálivkou do podmisek. Kontrolní rostliny byly zalévány do podmisek i nadále, po celou dobu pěstování (relativní vlhkost půdy 20-30%), rostlinám stresovaným suchem byla zálivka zcela přerušena. Rostliny byly pěstovány v přirozených světelných podmínkách s regulovanou teplotou (průměrná teplota den/noc 23,8°C/16°C) a jí odpovídající vlhkostí (průměrná vlhkost 71%/86%).

4.2.2. Aplikace postřiku

Jakmile rostliny dosáhly vývojové fáze V3-V4 (plně vyvinutý 3. - 4. list), byly rostliny rozděleny do osmi skupin (**Tabulka 3**) a v rámci těchto skupin byl na všechny rostliny aplikován příslušný postřik:

Tabulka 3: Pokusné skupiny v závislosti na podmínkách pěstování (kontrola, stres suchem) a ošetření

ODRŮDA BOBU	OŠETŘENÍ	PĚSTOVÁNÍ	ZKRATKA SKUPINY
Piešťanský	24-epibrassinolid	Kontrolní podmínky	PEK
Piešťanský	24-epibrassinolid	Sucho	PES
Piešťanský	voda	Kontrolní podmínky	PTK
Piešťanský	Voda	Sucho	PTS
Merkur	24-epibrassinolid	Kontrolní podmínky	MEK
Merkur	24-epibrassinolid	Sucho	MES
Merkur	Voda	Kontrolní podmínky	MTK
Merkur	Voda	Sucho	MTS

LINIE KUKUŘICE	OŠETŘENÍ	PĚSTOVÁNÍ	ZKRATKA SKUPINY
2023	24-epibrassinolid	Kontrolní podmínky	23EK
2023	24-epibrassinolid	Sucho	23ES
2023	Voda	Kontrolní podmínky	23TK
2023	Voda	Sucho	23TS
CE704	24-epibrassinolid	Kontrolní podmínky	704EK
CE704	24-epibrassinolid	Sucho	704ES
CE704	Voda	Kontrolní podmínky	704TK
CE704	Voda	Sucho	704TS

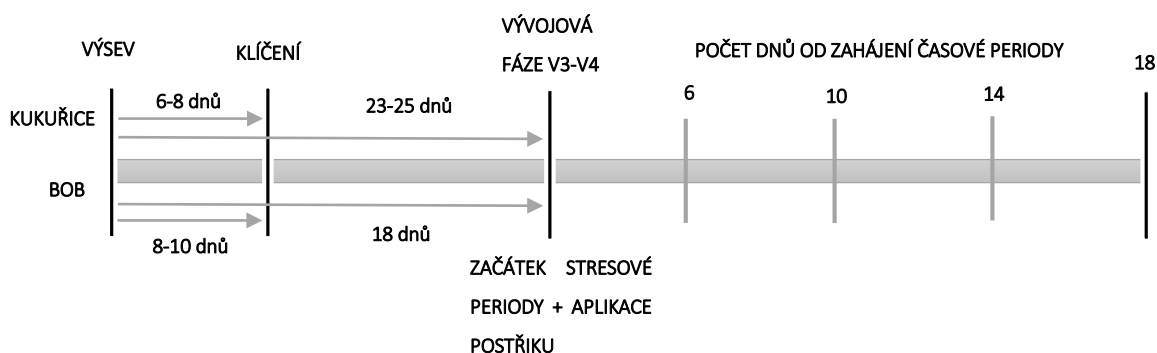
Kontrolní postřik: 0,1% roztok Tweenu 20 ve vodě, zvolený jako kontrolní postřik a zároveň jako smáčedlo pro ošetření kontrolních rostlin i rostlin, na které byl aplikovaný epibrassinolid

Postřik s brassinosteroidem: roztok 10^{-8} M 24-epibrassinolidu a 0,1% Tweenu 20.

Aplikace byla provedena čtyřmi stříky na list, poslední střík byl mířen do středu růžice na vyvíjecí se listy. Celkový objem aplikovaného postřiku byl přibližně 0,5 ml na rostlinu. Koncentrace 10^{-8} M 24-epibrassinolidu byla vybrána na základě výsledků předchozích metodických pokusů provedených u bobu i kukuřice, kdy byla zkoušena nejvhodnější koncentrace 24-epibrassinolidu v rozmezí 10^{-6} M, 10^{-8} M, 10^{-10} M, 10^{-12} M (Holá *et al.* 2010, Kuklíková 2011, Fridrichová *et al.* 2012)

4.2.3. Stresová perioda

V den aplikace brassinosteroidu byla vybraným skupinám přerušena závlivka a substrát samovolně vysychal. Maximální délka stresové periody byla 18 dnů. Relativní vlhkost půdy u kontrolních rostlin se pohybovala v rozmezí 20-30%, u rostlin s přerušenu závlivkou došlo po několika dnech k výraznému poklesu vlhkosti substrátu a po 10 dnech od začátku stresové periody nebyly hodnoty relativní vlhkosti půdy detekovatelné. Vybrané parametry byly měřeny 1 hodinu po postřiku (označováno jako den 0) a dále 6, 10, 14 a 18 dnů po postřiku a začátku stresové periody (označováno jako den 6, den 10, den 14, den 18, **Obrázek 3**). Všechny parametry byly měřeny na 4. nebo 5. plně vyvinutém listu v závislosti na tom, v jaké vývojové fázi se nacházela konkrétní rostlina v den postřiku.



Obrázek 3: Schéma organizace pokusů v sezoně

Pokud nebyly příslušné parametry měřeny ihned, byly vzorky listového pletiva odebrány do tekutého dusíku a dále uchovávány v hlubokomrazicím boxu při -80°C . V případě stanovení osmotického potenciálu bylo listové pletivo odebráno a vloženo do injekčních stříkaček, které byly uloženy a uchovávány až do stanovení této charakteristiky v mrazicím boxu při -20°C . Následné zpracování vzorků bylo vždy načasováno tak, aby doba uchovávání v mrazicím boxu měla co nejmenší efekt na vzorky a jejich další zpracování.

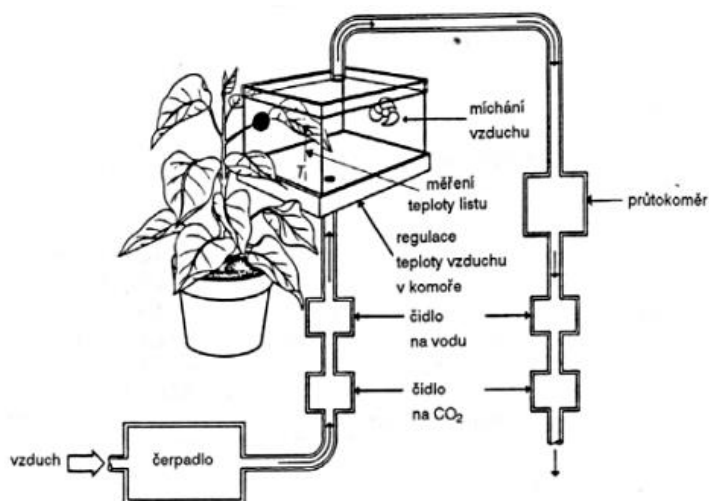
4.3. Metodika

Pro posouzení vlivu exogenně aplikovaného brassinosteroidu na reakci rostlin v důsledku stresu suchem jsem zvolila parametry fotosyntetické, vodního režimu, obsahu osmoprotektantu a poškození membrán. Pro stanovení jednotlivých charakteristik jsem nejprve ověřovala, a podle získaných výsledků modifikovala, a optimalizovala metodiky pro oba rostlinné druhy.

4.3.1. Gazometrie

Měření pomocí otevřeného gazometrického systému umožňuje na listu jedné rostliny *in situ* měřit a sledovat v reálném čase rychlost fotosyntézy, transpirace a vodivost průduchů.

List rostliny byl opatrně umístěn do měřicí komory, do níž je vháněn vzduch. Na vstupu a na výstupu komory jsou umístěna čidla (**Obrázek 4**) pro detekci vodní páry a oxidu uhličitého a také čidlo na měření rychlosti průtoku vzduchu komorou. Změny na čidlech



Obrázek 4: Schéma otevřeného gazometrického systému (Procházka *et al.* 1999)

jsou detekovány infračerveným plynovým analyzátozem, jehož princip je založen na specifické absorpci záření v infračervené oblasti spektra molekulami oxidu uhličitého a vody.

Rozdíly z těchto čidel jsou základem pro výpočet studovaných veličin. Měření jednoho vzorku trvalo přibližně 20 minut a za tuto dobu bylo registrováno cca 40 hodnot z

měřící komory. Z takto získaných dat přístroj vypočítal vybrané veličiny následujícím způsobem:

Rychlost asimilace oxidu uhličitého přístroj vyjadřuje jako:

$$P_N = u_s \Delta c$$

P_N ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) = rychlost asimilace oxidu uhličitého

u_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) = průtok vzduchu na m^2 listové plochy

Δc ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) = rozdíl v koncentraci oxidu uhličitého na vstupu a výstupu měřící komory

Rychlost transpirace:

$$E = \frac{\Delta e u_s}{p}$$

E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) = rychlost transpirace

Δe (mbar) = rozdíl koncentrace vodní páry na vstupu a výstupu měřící komory

u_s ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) = průtok vzduchu na m^2 listové plochy

p (mbar) = atmosférický tlak

Stomatální vodivost:

$$g_s = \frac{E}{(w_{leaf} - w_{m_{an}})} - \frac{1}{r_b}$$

g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) = stomatální vodivost

E ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) = rychlost transpirace

w_{leaf} (mol mol^{-1}) = koncentrace saturované vodní páry při teplotě listu

$w_{m_{an}}$ (mol mol^{-1}) = koncentrace vodní páry při výstupu z komory

r_b ($\text{m}^2 \text{s mol}^{-1}$) = difuzní vodivost povrchové vrstvy listu

4.3.1. Osmotický potenciál

Listy rostlin pro stanovení osmotického potenciálu byly odebrány do injekčních stříkaček, píst byl poté utěsněn parafilmem a takto připravené vzorky byly uchovány při -18°C v mrazicím boxu. V případě déle stresovaných rostlin a jejich kontrol (den 14 a den 18) byly odebrány vždy dva listy reprezentující jeden vzorek od dvou různých rostlin

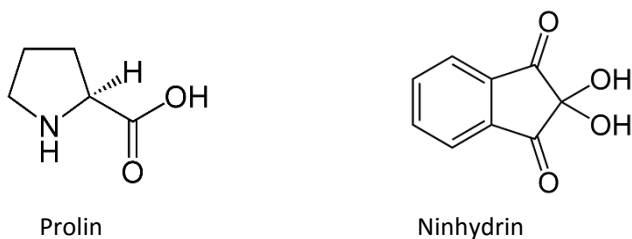
dané skupiny, aby se v souvislosti s výraznějším projevem stresu suchem předešlo případným problémům se získáním dostatečného množství extraktu z odebraného listového pletiva pro měření potenciálu.

Vzorek o objemu zhruba 0,05 ml byl získán stlačením vzorku listového pletiva v injekční stříkačce. Takto připravený extrakt byl umístěn na filtračním papíře do měřící komory osmometru. V případě malé teplotní odchylky vzorku od kalibrační teploty přístroje (25 °C), dojde během 20 minut k ustavení rovnovážného stavu - vodní potenciál vzduchu v komoře je stejný jako potenciál vzorku. Přístroj je opatřen zrcadlem, jehož teplota je kontrolována termoelektrickým Peltierovým ochlazovačem. Pomocí fotodetektoru a termočlánu se měří teplota, při které dojde ke kondenzaci vodní páry na zrcadle. Teplota rosného bodu v komoře slouží pro vyjádření osmotického potenciálu.

Jelikož byly použity vzorky, které byly před samotným měřením zmrazeny, nejedná se o potenciál vodní, ale osmotický.

4.3.2. Obsah prolinu

Obsah prolinu v rostlinném pletivu lze určit na základě spektrofotometrické detekce komplexu prolin-ninhydrin (**Obrázek 5**). Ninhydrin se běžně používá i ke stanovení jiných volných aminokyselin.



Obrázek 5: Strukturální vzorec prolinu a ninhydrinu (upraveno podle: www.worldofchemicals.com)

Listové pletivo o hmotnosti 0,25 - 0,5 g bylo rozetřeno ve třecí misce v 5 ml 0,22 M kyseliny sulfosalicylové a směs byla bezprostředně poté přefiltrována přes filtrační papír. K 1 ml filtrátu byl přidán ninhydrin (4,45 M ninhydrin; 2,84 M kyselina trihydrogenfosforečná; 10,8 M kyselina octová) a kyselina octová v poměru 1 : 1 : 1. Po promíchání se suspenze 30 minut vařila ve vodní lázni. Po následném zchlazení bylo ke směsi přidáno 3 ml toluenu a vzorek se ponechal cca 20 minut odstát, než došlo k oddělení

fází. Poté byla změřena absorbance vrchní fáze na spektrofotometru při vlnové délce $\lambda = 520$ nm.

Spolu se vzorky obsahujícími listové pletivo byly stejným postupem připraveny i vzorky sloužící k sestavení kalibrační přímky. Kalibrační vzorky místo 1 ml filtrátu obsahovaly 1 M prolinu o známém objemu 0, 20, 50, 100, 250 μ l (objem do 1 ml doplněný 0,22 M kyselinou sulfosalicylovou). Obsah prolinu byl následně vyjádřen na jednotku suché hmotnosti listu (Bates *et al.* 1973):

$$Pro = \frac{m_{sušiny}}{m_{vzorku} m_{sušiny}} A_{520} a_{kp}$$

Pro (μ g g^{-1}) = obsah prolinu ve vzorku

$m_{sušiny}$ (g) = hmotnost navážky pro sušinu

m_{vzorku} (g) = hmotnost navážky měřeného vzorku

A_{520} = absorbance vzorku při vlnové délce 520 nm

a_{kp} (μ g) = koeficient kalibrační přímky pro 1 mM roztok prolinu

4.3.3. Konduktivita

Konduktivita neboli měrná elektrická vodivost, je veličina, která udává schopnost látky vést elektrický proud a využívá se k vyjádření indexu poškození membrán jako procento vylitého elektrolytu. Stanovení míry poškození membrán v důsledku stresu je založeno na porovnání hodnot konduktivity kontrolních vzorků listového pletiva s hodnotami naměřenými u testovacích vzorků s přesně definovanými stupni poškození.

Pro tato stanovení byl nejprve odebrán vzorek listového pletiva z kontrolních rostlin, které nebyly vystaveny stresu suchem (15 terčíků o průměru 0,4 mm), který se inkuboval v 10 ml destilované vody po dobu 24 hodin při teplotě 8 - 10 °C. Poté se vzorek nechal ohřát na pokojovou teplotu a změřila se jeho konduktivita. Takto získaná hodnota odpovídá poškození pletiva v důsledku vysekání terčíků. Vzorek byl poté vařen ve vodní lázni po dobu 15 minut. Následně byl zchlazen na pokojovou teplotu a znovu byla změřena konduktivita, která vyjadřuje maximální poškození pletiva. S takto získanými hodnotami lze následně porovnávat hodnoty získané měřením vzorků odebraných z rostlin stresovaných suchem (upraveno dle Sullivan 1972, Saraim 1994b, Hatami a Ghorbanpour 2014).

Výpočet pro procentuální vyjádření poškození membrán:

$$I = \frac{C_1}{C_2} 100$$

I (%) = index poškození membrán

C₁ (μS m⁻¹)= konduktivita měřená po 24 hodinové inkubaci

C₂ (μS m⁻¹)= konduktivita měřená po vystavení teplotě varu

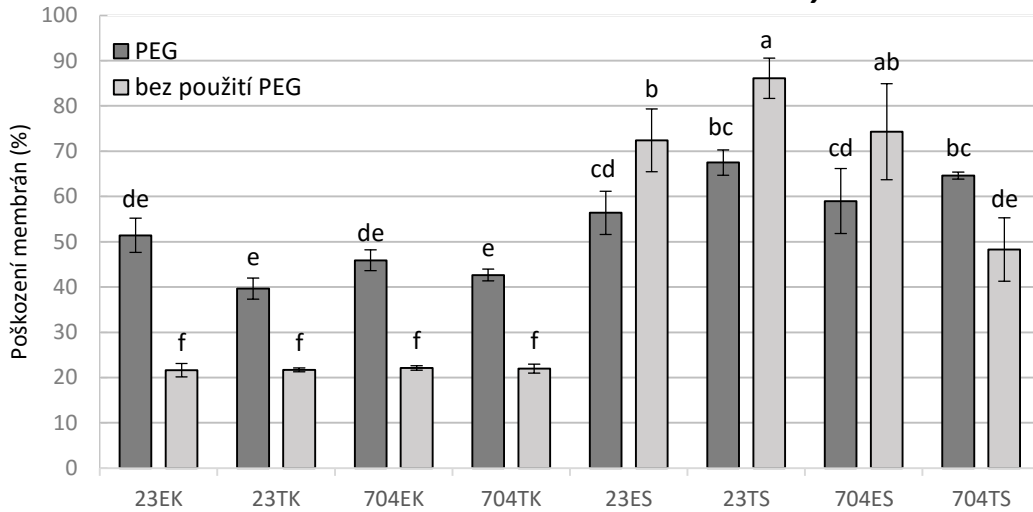
Použití PEG jako umělého stresoru

Pro porovnání vlivu přirozeného stresu suchem (prostým vysycháním substrátu) a dalšího přidaného stresoru navozujícího vysychání (s využitím PEG 6000) byly vzorky připraveny obdobným způsobem (upraveno dle Premachandra *et al.* 1990). Terčiky byly nejprve inkubovány v 10 ml 30% roztoku PEG 6000 po dobu 24 hodin a poté důkladně promyty destilovanou vodou. Následně byl použit stejný postup a výpočet jako při měření konduktivity bez využití dalšího stresoru. Tato metoda byla použita u rostlin s nejdelší stresovou periodou (den 18).

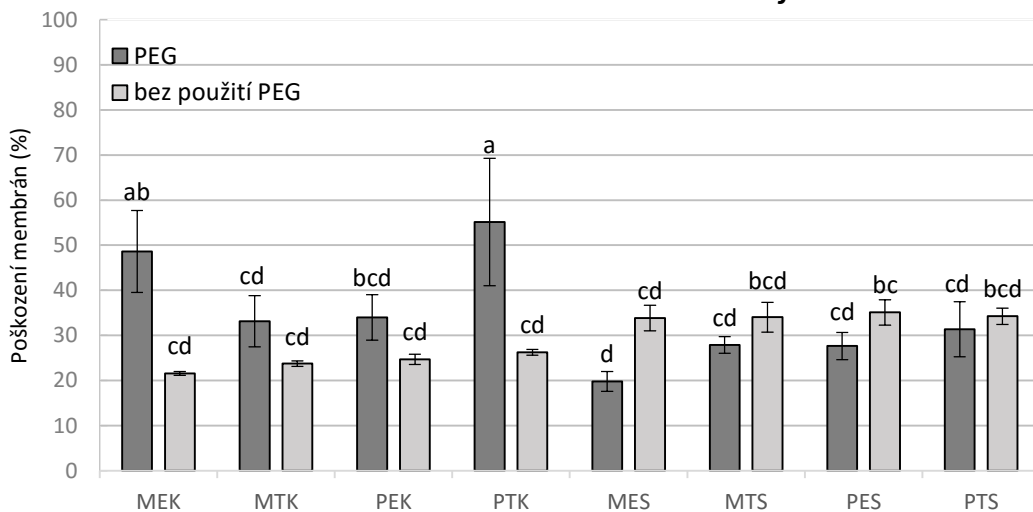
Z grafů 1 a 2 je patrný významný rozdíl mezi rostlinami stresovanými suchem pomocí přerušení zálivky na 18 dnů a pomocí simulace roztokem PEG. Ovšem zejména u bobu, dosahují rostliny pěstované v kontrolních podmínkách a následně vystavené roztoku PEG značně velkých odchylek oproti běžně stresovaným rostlinám. U kukuřice jsou taktéž výraznější odchylky, ale u mnohem více poškozených rostlin, kde se přirozená variabilita projevuje významněji. Dále je z grafů zřejmé, že rostliny stresované pomocí PEG nekopírují (s určitou odchylkou) trend poškození rostlin obvykle stresovaných a mezi skupinami jsou tak rozdílné odlišnosti v porovnání se skupinami obvyklým způsobem stresovanými. Z těchto důvodů jsem zvolila pro další charakterizaci rostlin samovolné vysychání substrátu jako nejoptimálnějšího stresoru.

Graf 1-2: Index poškození membrán u dvou linií *Zea mays* L. (Graf 1) a odrůd *Vicia faba* L. (Graf 2) pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavení 18 dennímu stresu a/nebo 30% PEG. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=4) a střední chyby průměru.

Graf 1: Poškození membrán - den 18 - *Zea mays* L.



Graf 2: Poškození membrán - den 18 - *Vicia faba* L.

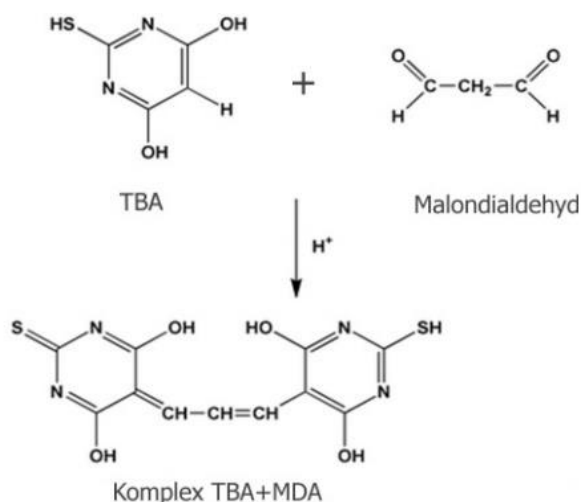


23EK: linie 2023, postřik 24EPI, kontrolní podmínky
23ES: linie 2023, postřik 24EPI, sucho
23TK: linie 2023, postřik voda, kontrolní podmínky
23TS: linie 2023, postřik voda, sucho
704EK: linie CE704, postřik 24EPI, kontrolní podmínky
704ES: linie CE704, postřik 24EPI, sucho
704TK: linie CE704, postřik voda, kontrolní podmínky
704TS: linie CE704, postřik voda, sucho

MEK: odrůda Merkur, postřik 24EPI, kontrolní podmínky
MES: odrůda Merkur, postřik 24EPI, sucho
MTK: odrůda Merkur, postřik voda, kontrolní podmínky
MTS: odrůda Merkur, postřik voda, sucho
PEK: odrůda Piešťanský, postřik 24EPI, kontrolní podmínky
PES: odrůda Piešťanský, postřik 24EPI, sucho
PTK: odrůda Piešťanský, postřik voda, kontrolní podmínky
PTS: odrůda Piešťanský, postřik voda, sucho

4.3.4. Obsah malondialdehydu

Nejčastěji používanou metodou pro stanovení obsahu malondialdehydu (MDA) je metoda detekující komplex TBARS (thiobarbituric acid reactive substances, reaktivní sloučeniny kyseliny thiobarbiturové). Reakcí MDA s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) vzniká komplex MDA:TBA v poměru 1:2 (**Obrázek 6**), který lze spektrometricky kvantifikovat při absorpčním maximu 532nm.



Obrázek 6: Reakce kyseliny thiobarbiturové (TBA) a malondialdehydu (MDA) za vzniku komplexu TBA-MDA (upraveno dle Sochr *et al.* 2014)

Metoda je hojně používaná od konce 50. let (Sinnhuber a Yu 1958; Heath a Packer, 1968), má však četné modifikace a korekce a dodnes není zcela jednoznačně přijímána z důvodu nadhodnocení a nepřesného vyjádření obsahu MDA a to hned z několika příčin. TBA netvoří komplex pouze s MDA, ale, zejména v rostlinách bohatých na cukry, také se sacharózou, fruktózou a glukózou (Du a Bramlage, 1992). Dále mohou mít na absorbanci při vlnové délce 532 nm vliv některé pigmenty (Hodges 1999). Z těchto důvodů jsem pro oba rostlinné druhy vyzkoušela (s drobnými úpravami) několik metodických postupů, které jsou v literatuře doporučeny pro stanovení obsahu MDA (Heath a Packer, 1968; Du a Bramlage, 1992; Hodges 1999) a modifikovala je tak, aby nejlépe vyhovovaly navrženým pokusům a poskytovaly spolehlivé výsledky. Na základě získaných výsledků jsem pro stanovení obsahu MDA zvolila modifikovanou a optimalizovanou metodu (Hodges 1999).

Původní metodika (Heath a Packer, 1968), která je dosud často využívána (Verma a Dubey, 2003; Issam 2012; Siddiqui *et al.*, 2012), je založena na homogenizaci vzorku přímo

v reakčním roztoku kyseliny thiobarbiturové a kyseliny trichloroctové a následné inkubaci při 95 °C po dobu 25 minut, centrifugaci a změření absorpance při vlnové délce 532 nm a 600 nm (korekce nespecifického zákalu). Výpočet ekvivalentů MDA je uveden v tabulce (**Tabulka 4**). Nevýhodou této metody je obtížný postup homogenizace, kdy navíc může docházet ke tvorbě sraženin. Metoda používá pouze korekci k nespecifickému zákalu, což může vést k nadhodnocení výsledků.

Druhá testovaná metodika (Du a Bramlage, 1992) používá jako homogenizační roztok aceton. Další postup včetně použité reakční směsi se shoduje s první metodikou (Heath a Packer, 1968), absorpance vzorku je měřena při vlnové délce 532 nm, 600 nm (korekce nespecifického zákalu) a 440 nm (korekce komplexu TBA-cukr). Výpočet ekvivalentů MDA je uveden v tabulce (**Tabulka 4**). Při zkoušení tohoto postupu docházelo také k častým problémům s homogenizací, metoda však pracuje s korekcí, která by měla odfiltrvat vlivy komplexu TBA-cukr na celkový výsledek. Výhodou obou metod je rychlé zpracování vzorků, což snižuje pravděpodobnost vzniku nových komplexů TBA-MDA. Do reakční směsi se však nepřidává žádný antioxidant.

Další modifikaci postupu navrhli Hodges *et al.* (1999). Vzorek se v tomto případě homogenizuje v 80 % roztoku EtOH, následný postup je obdobný jako v předcházejících případech. Během homogenizace podle této metody nedocházelo ke tvorbě sraženin (etanol nijak nereaguje s reakční směsí) a vzorky se mnohem lépe homogenizovaly. Tato metoda používá korekce jako metoda první a druhá a dále korekci barviv obsažených v pletivu, které by při absorpaci 532 nm mohly interferovat s absorpací komplexu TBA-MDA a ovlivnit skutečné hodnoty obsahu MDA.

V sérii metodických pokusů, které předcházely vlastnímu stanovení obsahu MDA u pokusných variant, jsem vyzkoušela a modifikovala všechny uvedené postupy. Nejstabilnější výsledky jsem pro oba testované druhy získala s použitím modifikované metodiky Hodges *et al.* (Hodges 1999; Kramná, ústní sdělení).

Tabulka 4: Vybrané metody pro stanovení obsahu MDA, použité korekce a vzorce

Citace	Korekce	MDA ekvivalenty (nmol ml ⁻¹)
Heath a Packer, 1968	1) nespecifický zákal	$\frac{A_{532} - A_{600}}{155\ 000} 10^6$
Du a Bramlage, 1992	1) nespecifický zákal 2) korekce komplexu TBA-cukr	$\frac{(A_{532} - A_{600}) - [(A_{440} - A_{600}) \frac{MA_{532}}{MA_{440}}]}{157\ 000} 10^6$
Hodges <i>et al.</i> 1999	1) nespecifický zákal 2) korekce komplexu TBA-cukr 3) korekce barviv	$\frac{A - B}{157\ 000} 10^6$ $A = (A_{TBA+532} - A_{TBA+600}) - (A_{TBA-532} - A_{TBA-600})$ $B = (A_{TBA+440} - A_{TBA+600}) 0,0571$

A_{532} = absorbance vzorku při vlnové délce 532 nm, maximální absorbance TBA-MDA komplexu

A_{600} = absorbance vzorku při vlnové délce 600 nm, korekce pro nespecifické zakalení

155 000;157 000 = koeficient extinkční molarity pro MDA

A_{440} = absorbance vzorku při vlnové délce 440 nm, maximální absorbance sacharózy

MA_{532} = molární absorbance sacharózy při vlnové délce 532 nm

MA_{440} = molární absorbance sacharózy při vlnové délce 440 nm

0,0571 = poměr MA_{532} a MA_{440}

Index TBA+/TBA- = absorbance vzorku při příslušné vlnové délce za přítomnosti/absence kyseliny thiobarbiturové ve vzorku

Vzorek o hmotnosti 0,2 g byl homogenizován ve vymražené třecí misce v 2,1 ml 80 % EtOH a následně centrifugován při 14 000x g a 4 °C po dobu 20 minut. Supernatant byl rozdělen v poměru 1:1 a k jedné polovině byl přidán 0,7 ml roztoku TBA - (20% kyseliny trichloroctové s 0,01 % obsahem butylovaného hydroxytoluenu), k druhé 0,7 ml roztoku

TBA + (0,65% roztok kyseliny thiobarbiturové v 20% kyselině trichloroctové s 0,01 % obsahem butylovaného hydroxytoluenu). Následně byly vzorky promíchány a 25 minut temperovány při 95 °C. Po prudkém zchlazení byly centrifugovány při 14 000x g a 4 °C po dobu 20 minut. U získaných supernatantů byla změřena absorbance při vlnové délce 440 nm, 532nm a 600 nm a ze získaných hodnot byl vypočten obsah ekvivalentů MDA (**Tabulka 4**). Při přípravě vzorků je nezbytné pracovat rychle, bez jakýchkoliv časových posunů a udržovat vzorky, s výjimkou nezbytného temperování, při nízké teplotě. Obsah MDA byl stanovený pouze u rostlin vystavených 18 dnů stresu suchem včetně odpovídajících kontrolních rostlin a rostlin ošetřených 24-EPI.

4.3.1. Použité přístroje

Automatický záznamník teploty a vlhkosti Testo 175 T-1, Testo, ČR

Gazometrický systém LCI Portable PhotosynthesisSystem, ADC BioScientific Ltd., Velká Británie

Hlubokomrazicí box ULTF 420, Darei, Dánsko

Konduktometr GRYF 158, Gryf HB, Havlíčkův Brod, ČR

Centrifuga Universal 320, Hettich, Německo

Potenciometr WP4C, Decagon Devices, Inc., USA

Spektrometr Anthelie Advanced 2, Secoman, Francie

Termoblok Ultimate Dry Bath Incubator, Major science, USA

Váhy Kern ABS, Unipro-alpha c. s., Česká republika

4.3.2. Použité chemikálie

24-epibrassinolid; 24-EPI; (22R,23R,24R)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-B-homo-7-oxa-5 α -cholestane-6-one; Sigma-Aldrich, USA

Butylovaný hydroxytoluen, BHT, AppliChem, Německo

Etanol, EtOH, Lach-Ner s.r.o., Česká republika

Kyselina octová, Lach-Ner s.r.o., Česká republika

Kyselina sulfosalicylová, dihydrát kyseliny 5-sulfosalicylové, Sigma-Aldrich, USA

Kyselina thiobarbiturová, TBA, Sigma-Aldrich, USA

Kyselina trihydrogenfosforečná, Sigma-Aldrich, USA

Kyselina trichloroctová, Sigma-Aldrich, USA

Ninhydrin; 2,2-Dihydroxy-1,3-indanedion; Sigma-Aldrich, USA

Polyethylenglykol 6000, PEG 6000, Sigma-Aldrich, USA

Prolin, Sigma-Aldrich, USA

Toluen, Sigma-Aldrich, USA

Tween 20, polyoxyethylensorbitanmonolaurát, Sigma-Aldrich, USA

4.4. Statistické hodnocení výsledků

Získané výsledky kromě gazometrických charakteristik (obsah prolinu, osmotický potenciál, poškození membrán a obsah malondialdehydu) jsem hodnotila analýzou variance (ANOVA) trojného třídění s interakcemi a to vždy v rámci jednoho pokusného dne (0, 6, 10, 14, 18 dnů od začátku stresové periody). Cílem této analýzy bylo zjistit, zdali jsou průkazné rozdíly mezi odrůdami (genotypy), způsobem ošetření nebo pěstováním. Dále jsem pro detailnější rozpoznání rozdílů použila analýzu jednoduchého třídění a LSD Fisherův test. Pokud jsem při měření jednotlivých parametrů prováděla technická opakování jednoho vzorku, použila jsem v rámci statistiky jejich průměr a s ním jsem dále pracovala jako s jedním biologickým opakováním. Výsledky jsem zhodnotila pomocí programu CoStat (CoHort Software Monterey 1998-2003, USA).

V případě gazometrických veličin (rychlost fotosyntézy, rychlost transpirace, vodivost průduchů) bylo před statistickou analýzou nutné optimalizovat měření, odstranit odlehlá opakování a data transformovat na jednotnou hladinu ozáření za použití odpovídajících matematických modelů.

Měření každé rostliny trvalo 20 minut, během kterých přístroj odečetl zhruba 40 hodnot pro každou veličinu. Počáteční a konečné hodnoty mohly být ovlivněny z důvodu manipulace s rostlinou, kontroly utěsnění měřící komory apod., krajní hodnoty jsem proto

nezařazovala do statistického hodnocení. Dále bylo nezbytné odstranit všechny odlehlé hodnoty, které mohl přístroj odečíst během aklimatizace listu v měřící komoře (přibližně 3-5 minut). Pro rozlišení těchto odlehlých pozorování jsem využila kvartilů a kvartilové šíře dat (rozdíl třetího a prvního kvartilu). Za odlehlé hodnoty jsem považovala ty, které byly menší než hodnota prvního kvartilu zmenšená o 1,5 násobek kvartilové šíře a dále ty, které byly větší než hodnota třetího kvartilu zvětšená o 1,5 násobek kvartilové šíře. Všechna odlehlá pozorování jsem odstranila. Pro další úpravu dat jsem použila prvních 20 měření od každé rostliny.

V rámci každé skupiny jsem prováděla 8 biologických opakování a měření probíhala mezi 8 a 14 hodinou. Vzhledem k tomu, že přístroj využívá přirozeného ozáření komory, průměrné hodnoty ozáření jednoho opakování se v rámci skupiny lišily a lišily se i průměrné hodnoty ozáření mezi skupinami. Bylo proto nutné hodnoty měřených parametrů transformovat na jednotnou hladinu ozáření. Zvolila jsem průměrnou hodnotu ozáření všech skupin - $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pomocí statistického programu jsem sestavila lineární model, ve kterém jsem předpokládala, že v rámci skupiny je vždy vhodná závislost mezi ozářením a studovanou veličinou (například lineární, kvadratická apod.). Tyto závislosti jsem otestovala a zvolila pro všechny skupiny závislost lineární (Kindlemann, Ústav pro životní prostředí, PŘF UK, ústní sdělení). Musela jsem vzít také v úvahu, že každá rostlina byla měřena vícekrát, takže nelze těmto měřením přiřkládat stejnou váhu, jako by to byla měření na různých rostlinách. Využila jsem proto modifikaci lineárního modelu, tzv. GEE lineární model (Hlávka, Moravec, Ondřej; katedra pravděpodobnosti a matematické statistiky MFF UK, ústní sdělení). Jako referenční skupinu pro porovnání výsledků získaných trojnou analýzou rozptylu s interakcemi jsem u bobu zvolila odrůdu Merkur (odolnější k suchu) ošetřenou kontrolním postřikem a pěstovanou v kontrolních podmínkách, u kukuřice linii CE704 (odolnější k suchu) ošetřenou kontrolním postřikem a pěstovanou rovněž v kontrolních podmínkách. Všechny hodnoty gazometrických parametrů, které jsou znázorněny v grafech a které jsou dále diskutovány, jsou již po transformaci na jednotnou hladinu ozáření.

Pro zjištění konkrétních rozdílů mezi skupinami jsem využila analýzu jednoduchého třídění. Abych pracovala s modifikovanými daty a současně zhodnotila všechny skupiny

mezi sebou, použila jsem jako referenční skupiny postupně všechny varianty sledovaných skupin (**Tabulka 3**).

Statistické zhodnocení gazometrických parametrů jsem provedla v programu R verze 3.0.3. (The R Foundation for Statistical Computing, Institute for Statistics and Mathematics, Rakousko).

5. Výsledky

5.1. Rychlost čisté fotosyntézy

Zea mays L.

Rychlost čisté fotosyntézy u kukuřice se pohybovala v rozmezí -0,2 a 11 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny během začátku stresové periody (den 0, 6; Graf 3, 4), později se rychlost fotosyntézy začala snižovat. U rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách nejprve klesla pod hranici 8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (den 10, Graf 5) a v dalších dnech k hodnotě 6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (den 14, 18; Graf 6, 7). Rostliny vystavené stresu reagovaly na sucho postupným poklesem hodnot rychlosti čisté fotosyntézy (den 10, 14; graf 5, 6), která na konci stresové periody u všech skupin výrazně klesla (den 18, Graf 7). U 704ES dokonce až k záporné hodnotě.

Nejvýraznějším faktorem ovlivňujícím hodnoty tohoto parametru bylo sucho. Průkazně vyšší rychlost fotosyntézy u rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách v porovnání s rostlinami stresovanými byla potvrzena v době nejdelší stresové periody (den 18) pomocí analýzy trojného třídění (**Tabulka 5**). Z této analýzy dále vyplynuly průkazné rozdíly mezi genotypy, ale pouze v prvním testovaném období stresu (den 6, **Tabulka 5**). Uvedené vztahy nejsou ovlivněné případnými interakcemi, které nebyly u žádné ze skupin statisticky průkazné

Rozdíly byly dále testovány s využitím jednoduché analýzy rozptylu a vzájemným porovnáním skupin. Výsledky tohoto hodnocení (**Tabulka 7**) ukázaly, že již během dne 10 se průkazně liší odlišně pěstované linie CE704 (Graf 5, tabulka 6, 704EK-704ES). I v pozdějším období stresu (den 14, 18) byly všechny odlišně pěstované varianty průkazně rozdílné (Graf 6,7; **Tabulka 7**).

Na začátku sucha varianty linie CE704 (704EK, 704ES, 704TK, 704TS) dosahovaly vyšší rychlosti čisté fotosyntézy v porovnání s linií 2023 (den 6, Graf 4) a rozdíly mezi 704EK-23EK a 704TK-23EK byly statisticky průkazné (**Tabulka 7**). V dalších dnech byly rozdíly mezi liniemi již méně výrazné a s jedinou výjimkou (den 18, 704ES-23ES) statisticky neprůkazné.

Z výsledků není zřejmý žádný efekt aplikovaného brassinolidu na rychlost čisté fotosyntézy rostlin stresovaných nebo pěstovaných v kontrolních podmínkách a v žádné z porovnávaných skupin nebyly zjištěny průkazné rozdíly (Graf 3-7; **Tabulka 5, Tabulka 7**).

Vicia faba L.

Rychlost čisté fotosyntézy měřená na rostlinách bobu se po celou dobu pokusu pohybovala v rozmezí 4 až 10,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Vyšších hodnot dosahovaly rostliny pěstované v optimálních podmínkách a maxima dosáhly během dne 10 (Graf 10), v dalších dnech (den 14, 18; Graf 11, 12) následoval mírný pokles. Nejnižší hodnoty byly zaznamenány u rostlin vystavených nejdelšímu suchu (den 18; Graf 12).

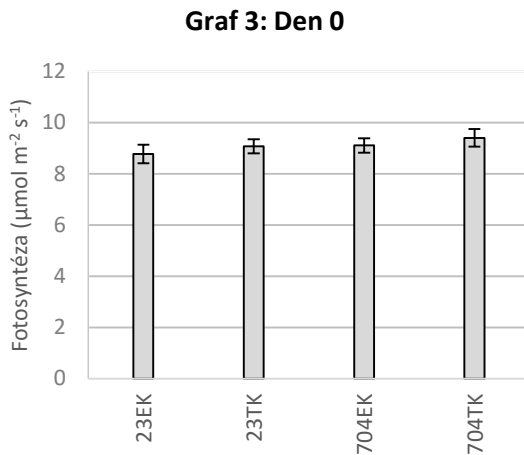
Podobně jako u kukuřice bylo sucho nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím rychlost čisté fotosyntézy bobu. Zřejmé rozdíly mezi rostlinami pěstovanými v kontrolních podmínkách a rostlinami stresovanými suchem jsou patrné již na začátku stresu (den 6, Graf 9). Analýza rozptylu trojného třídění potvrdila jejich významnost ode dne 10 (den 10-18, **Tabulka 6**). Interakce nebyly významné ani v jednom případě, což stejně jako u kukuřice svědčí o stejném vlivu faktorů.

Podrobnějším testováním skupin jsem zjistila průkazné rozdíly mezi odlišně pěstovanými rostlinami odrůdy Piešťanský již od počátku hodnocení stresu (den 6; **Tabulka 7**; PEK-PES, PTK-PTS). Ve všech dalších dnech (den 10-18, Graf 10-12) byly prokázány rozdíly mezi všemi odlišně pěstovanými variantami (**Tabulka 7**).

Během celého pokusu nebyl patrný žádný rozdíl mezi odrůdami nebo mezi rostlinami ošetřenými brassinosteroidem a rostlinami ošetřenými kontrolním postřikem (Graf 8-12) s jedinou výjimkou (den 10, **Tabulka 7**, MTS-PTS).

Graf 3-7: Rychlost fotosyntézy u dvou linií *Zea mays* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období **sucha** (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření 10^{-8} M **24-epibrassinolidem**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.

□ kontrolní podmínky ■ sucho



23EK: linie 2023, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

23ES: linie 2023, postřik 24EPI, sucho

23TK: linie 2023, postřik voda, kontrolní podmínky

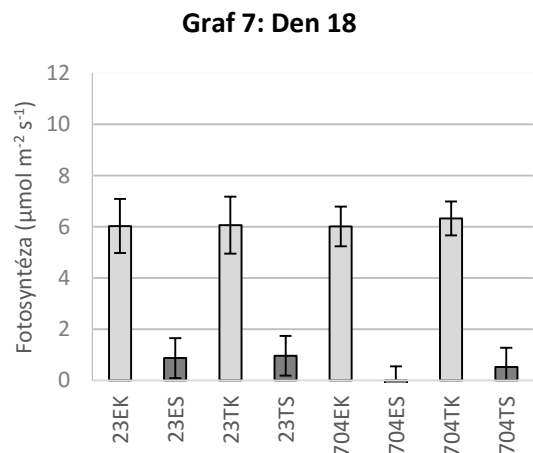
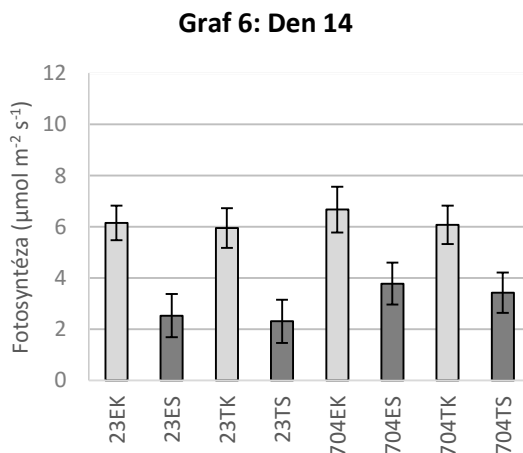
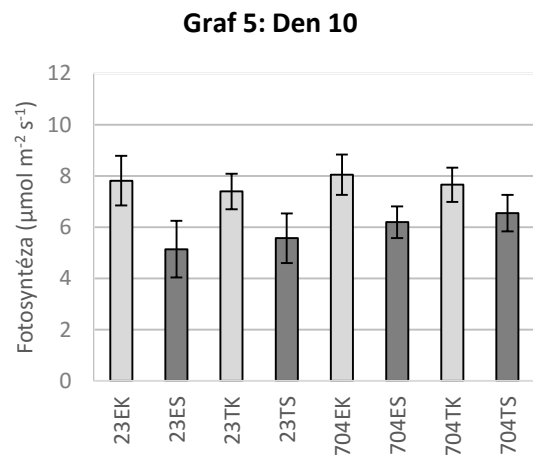
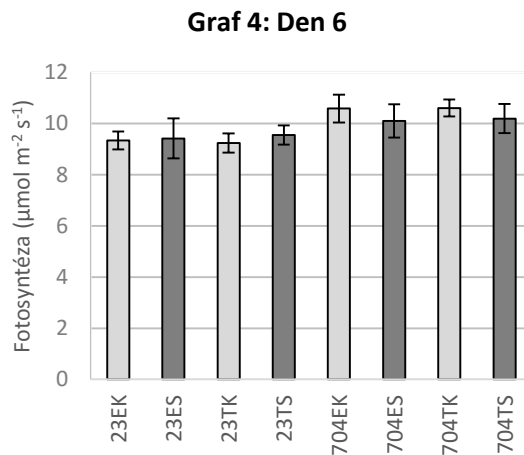
23TS: linie 2023, postřik voda, sucho

704EK: linie CE704, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

704ES: linie CE704, postřik 24EPI, sucho

704TK: linie CE704, postřik voda, kontrolní podmínky

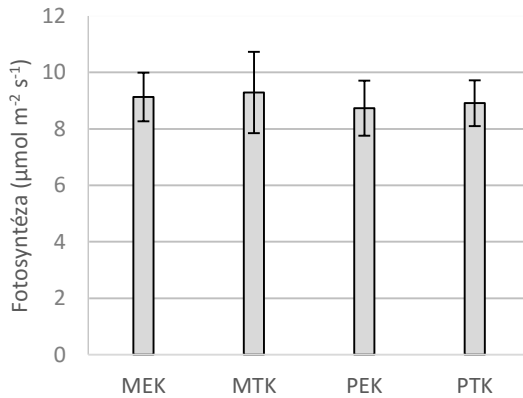
704TS: linie CE704, postřik voda, sucho



Graf 8-12: Rychlost fotosyntézy u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období **sucha** (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření 10^{-8} M **24-epibrassinolidem**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=8) a střední chyby průměru.

□ kontrolní podmínky ■ sucho

Graf 8: Den 0



MEK: odrůda Merkur, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

MES: odrůda Merkur, postřik 24EPI, sucho

MTK: odrůda Merkur, postřik voda, kontrolní podmínky

MTS: odrůda Merkur, postřik voda, sucho

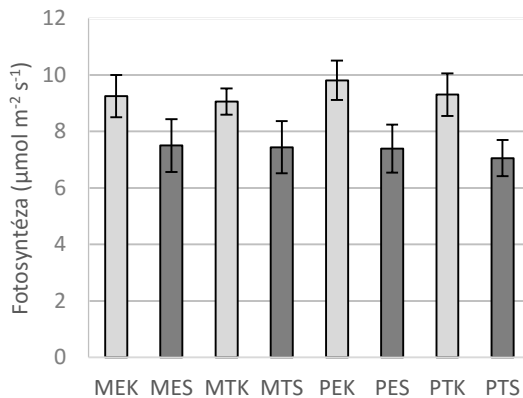
PEK : odrůda Piešťanský, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

PES: odrůda Piešťanský, postřik 24EPI, sucho

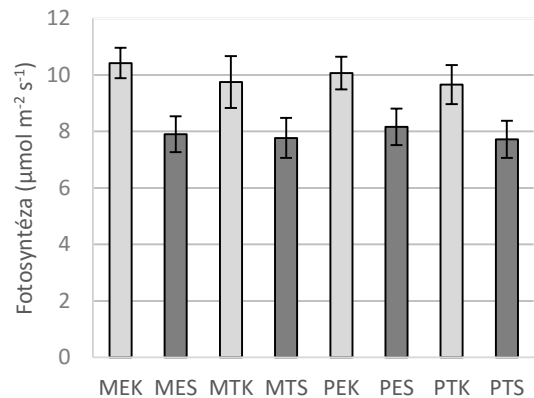
PTK: odrůda Piešťanský, postřik voda, kontrolní podmínky

PTS: odrůda Piešťanský, postřik voda, sucho

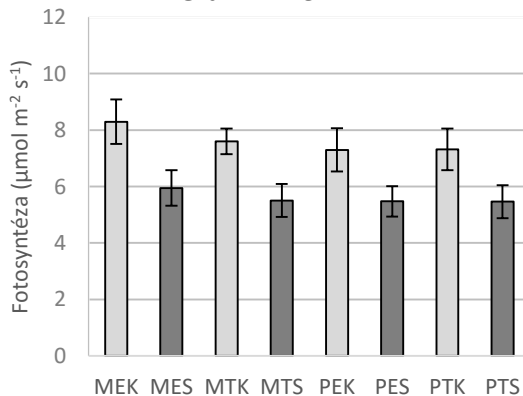
Graf 9: Den 6



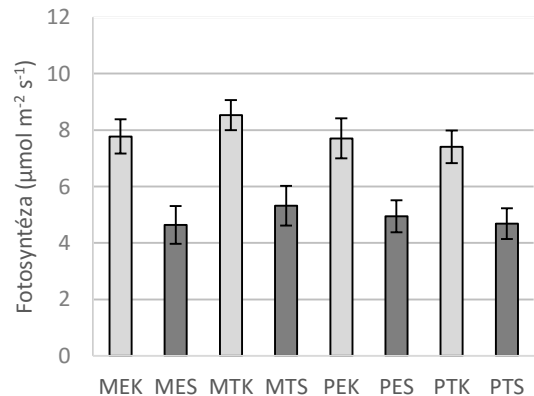
Graf 10: Den 10



Graf 11: Den 14



Graf 12: Den 18



5.2. Stomatální vodivost

Zea mays L.

Stomatální vodivost u kukuřice byla naměřena v rozmezí 0,02 a 0,063 mol m⁻² s⁻¹. Maximální hodnoty byly stanoveny na začátku stresové periody (den 0, 6; Graf 13, 14) a v pozdějším období docházelo k jejich poklesu (den 10-18, Graf 15-17). Významnější pokles byl zaznamenán u skupin vystavených suchu.

Reakce stresovaných skupin na suchu byla zjevná již ode dne 10 (Graf 15) a postupný pokles pokračoval až do období nejdelšího sucha (den 18, Graf 17), kdy byly rozdíly mezi odlišně pěstovanými skupinami statisticky průkazné (**Tabulka 5**). Dalším faktorem ovlivňujícím vodivost průduchů byl genotyp. Výsledky trojného třídění potvrdily, že rozdíly jsou v některých případech statisticky průkazné (**Tabulka 5**). Vliv interakcí nebyl ani u této charakteristiky významný.

Následné statistické testování upřesnilo výše uvedené výsledky. U všech porovnávaných skupin, s výjimkou linie CE704 bez aplikace BRs (den 10, 704TS-704TK, **Tabulka 8**), byl již ode dne 10 zjištěn průkazný rozdíl mezi rostlinami odlišně pěstovanými (Graf 15-17). U linie 2023 stresované suchem došlo k výraznějšímu snížení stomatální vodivosti ve srovnání s linií CE704 (den 10, Graf 15), které pokračovalo i v dalších dnech až k hodnotám blízkým 0,02 mol m⁻² s⁻¹. Linie CE704 pěstovaná v podmínkách stresu suchem dosahovala nejprve průkazně vyšších hodnot v porovnání s linií 2023 (den 10, 14; Graf 15, 16, **Tabulka 8**, 23ES-704ES, 23TS-704TS), ale v době kdy byly rostliny vystaveny nejdéle trvajícím suchu (den 18, Graf 17, **Tabulka 8**) již nebyly patrné rozdíly mezi liniemi.

Vliv brassinosteroidů na stomatální vodivost u kukuřice nebyl v žádné z porovnávaných skupin významný (Graf 13-17; **Tabulka 5**, **Tabulka 8**).

Vicia faba L.

Stomatální vodivost se u bobu pohybovala v rozmezí 0,05 a 0,55 mol m⁻² s⁻¹. Nejvyšších hodnot dosahovaly rostliny pěstované v kontrolních podmínkách, rostliny vystavené stresu suchem vykazovaly již v prvním intervalu sucha (den 6) nízké hodnoty blízké se spodní hranici uvedeného rozmezí (den 6, Graf 19). Nejvýraznější rozdíly však byly

patrné uprostřed období stresu (den 10, 14; Graf 20, 21). V těchto dnech stomatální vodivost u rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách dosahovala i 6x vyšších hodnot v porovnání s rostlinami stresovanými suchem (Graf 20, 21). V poslední fázi stresové periody (den 18) došlo ke snížení stomatální vodivosti i u rostlin pěstovaných v optimálních podmínkách a rozdíly mezi oběma skupinami byly nižší (Graf 22).

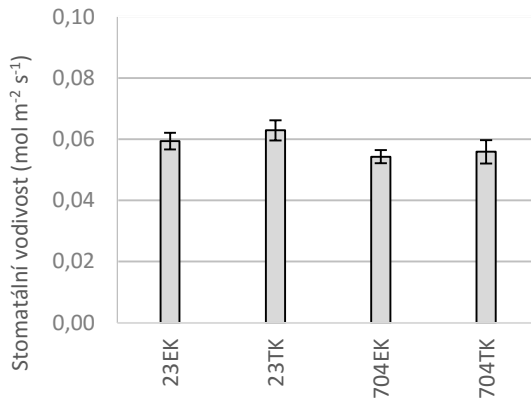
Výrazný vliv sucha, který se negativně projevil na hodnotách stomatální vodivosti už od počátku sledovaného období, potvrdily i výsledky statistického hodnocení. Všechny provedené analýzy prokázaly významné rozdíly mezi rostlinami odlišně pěstovanými, které byly ve většině případů vysoce průkazné (den 6 - 18, **Tabulka 6**, **Tabulka 8**). Reakce obou odrůd na suchu byla bez zjevných rozdílů. Uvedené výsledky nejsou nijak ovlivněny případnými interakcemi vlivu sledovaných faktorů, které byly ve všech případech statisticky neprůkazné.

U obou odrůd pěstovaných v kontrolních podmínkách byl v rámci dne 10 patrný vliv brassinosteroidu na stomatální vodivost rostlin. Rostliny ošetřené 24-epibrassinolidem dosahovaly vyšších hodnot vodivosti průduchů v porovnání s rostlinami ošetřenými kontrolním postřikem (den 10; Graf 20; MEK-MTK, PEK-PTK). Statisticky významné však byly tyto rozdíly pouze u odrůdy Merkur (**Tabulka 8**, MEK-MTK). Vliv brassinosteroidu na rostliny pěstované za stresu suchem nebyl patrný (Graf 19-22, **Tabulka 8**).

Graf 13–17: Stomatální vodivost u dvou linií *Zea mays* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období **sucha** (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření **10⁻⁸ M 24-epibrassinolidem**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (**n=8**) a střední chyby průměru.

□ kontrolní podmínky ■ sucho

Graf 13: Den 0



23EK: linie 2023, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

23ES: linie 2023, postřik 24EPI, sucho

23TK: linie 2023, postřik voda, kontrolní podmínky

23TS: linie 2023, postřik voda, sucho

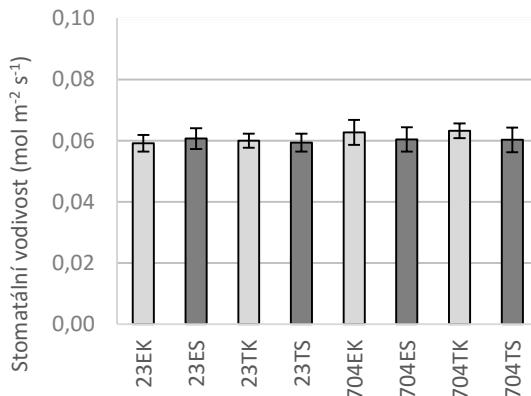
704EK: linie CE704, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

704ES: linie CE704, postřik 24EPI, sucho

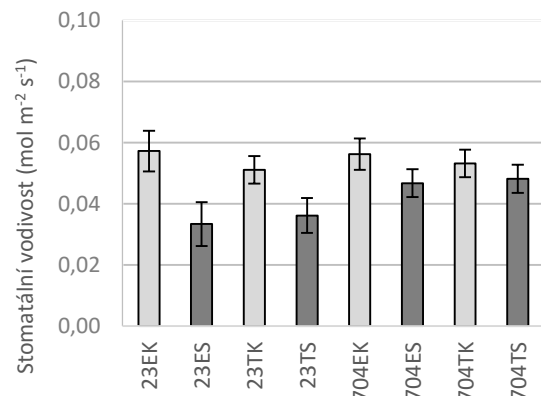
704TK: linie CE704, postřik voda, kontrolní podmínky

704TS: linie CE704, postřik voda, sucho

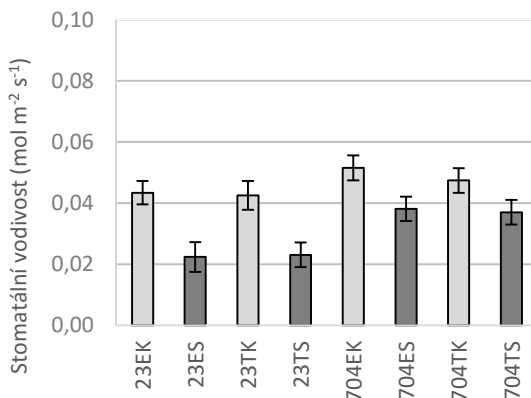
Graf 14: Den 6



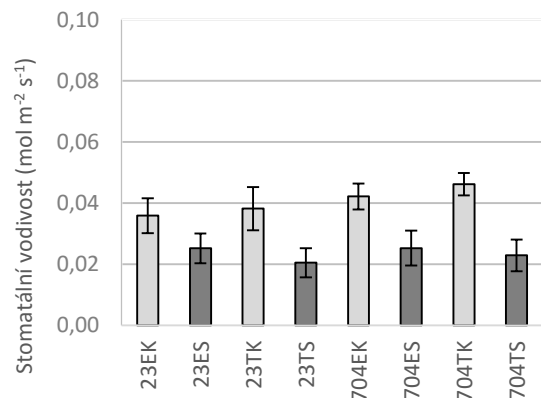
Graf 15: Den 10



Graf 16: Den 14



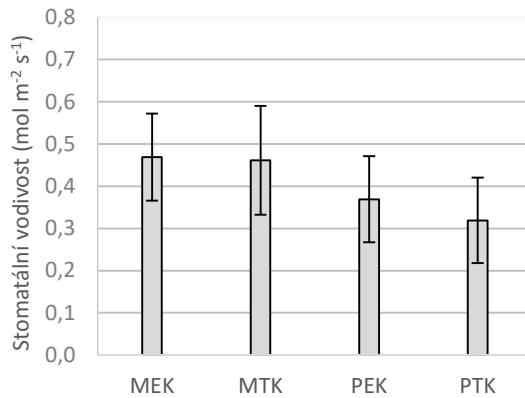
Graf 17: Den 18



Graf 18-22: Stomatální vodivost u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období **sucha** (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření 10^{-8} M **24-epibrassinolidem**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=8) a střední chyby průměru.

□ kontrolní podmínky ■ sucho

Graf 18: Den 0



MEK: odrůda Merkur, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

MES: odrůda Merkur, postřik 24EPI, sucho

MTK: odrůda Merkur, postřik voda, kontrolní podmínky

MTS: odrůda Merkur, postřik voda, sucho

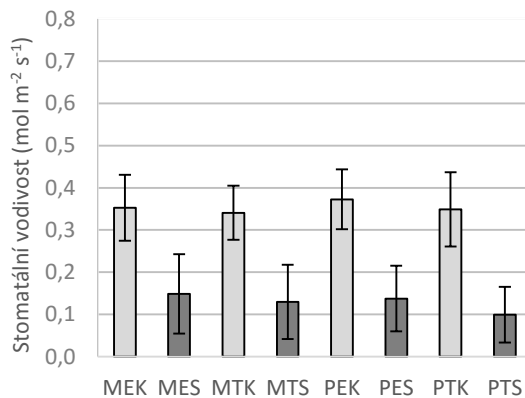
PEK : odrůda Piešťanský, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

PES: odrůda Piešťanský, postřik 24EPI, sucho

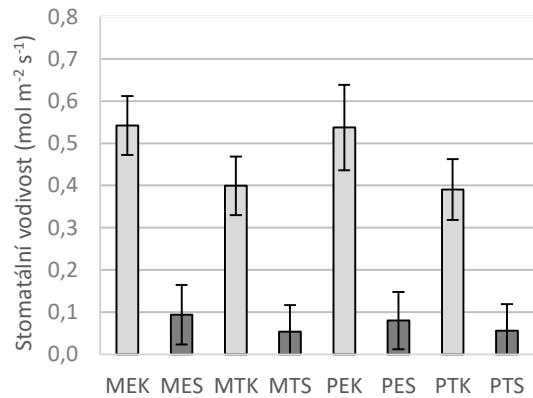
PTK: odrůda Piešťanský, postřik voda, kontrolní podmínky

PTS: odrůda Piešťanský, postřik voda, sucho

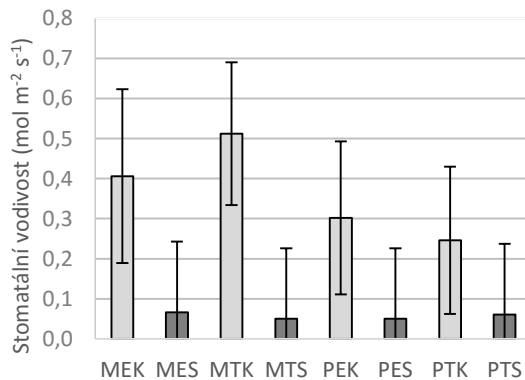
Graf 19: Den 6



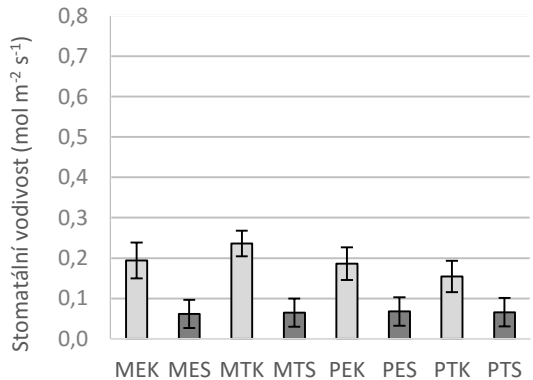
Graf 20: Den 10



Graf 21: Den 14



Graf 22: Den 18



5.3. Rychlost transpirace

Zea mays L.

Poslední studovanou gazometrickou veličinou charakterizující stav rostliny byla rychlost transpirace. Rychlost transpirace kukuřice byla během celého pokusu naměřena v rozmezí 0,7 a 2,1 mmol m⁻² s⁻¹. Nižší hodnoty byly stanoveny u rostlin stresovaných suchem.

Rozdíl mezi odlišně pěstovanými skupinami byl znatelný ode dne 10 (Graf 25) a udržoval se na srovnatelných hodnotách nebo mírně narůstal až do konce stresu (den 14, 18; Graf 14, 18). Z analýzy trojného třídění vyplynuly statisticky průkazné rozdíly mezi rostlinami stresovanými a pěstovanými v kontrolních podmínkách v době nejdelšího stresu (den 18, **Tabulka 5**). Interakce mezi studovanými faktory nebyly ani v případě tohoto parametru významné.

Detailní analýza zjištěných rozdílů opět přinesla více statisticky významných výsledků. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami odlišně pěstovanými byly průkazné ve většině případů již v den 10 (Graf 25; **Tabulka 9**; 23EK-23ES, 23TK-23TS, 704EK-704ES). V dalších dnech byly statisticky významné rozdíly mezi všemi odlišně pěstovanými skupinami (den 14, 18; **Tabulka 9**). Dále je z grafu patrné (den 10, Graf 25), že již během dne 10 dosahuje linie 2023 průkazně nižších hodnot (23ES-704ES, 23TS-704TS). Během dne 14 transpirace u stresovaných rostlin 2023 opět klesla a rozdíly mezi genotypy byly rovněž významné (Graf 26, **Tabulka 9**). V posledním sledovaném období (den 18) klesla rychlost transpirace všech stresovaných skupin pod hranici 1 mmol m⁻² s⁻¹ a nebyly mezi nimi patrné žádné rozdíly (den 18, Graf 27, **Tabulka 9**).

Vliv brassinolidu na rychlost transpirace kukuřice nebyl zaznamenán ani u jedné z pozorovaných skupin (Graf 23-27; **Tabulka 5**, **Tabulka 9**).

Vicia faba L.

Rychlost transpirace u bobu dosahovala v průměru vyšších hodnot než kukuřice a pohybovala se v rozmezí 1,3 až 5,2 mol m⁻² s⁻¹. Maximální hodnoty byly zaznamenány na

začátku pokusu (den 0, Graf 28) a v dalších dnech docházelo ke snižování vodivosti u všech skupin (den 6-18, Graf 29-32). Výraznější pokles byl patrný u rostlin vystavených suchu.

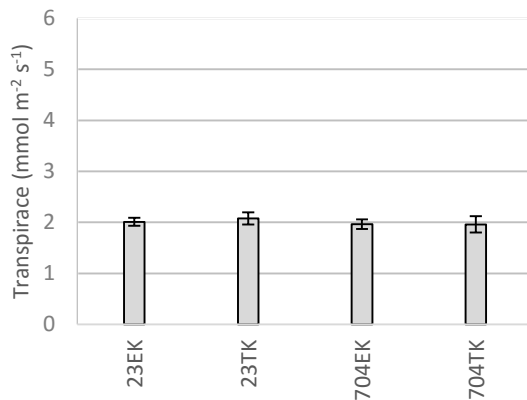
Rozdíly mezi rostlinami pěstovanými v kontrolních podmínkách a rostlinami vystavenými suchu byly statisticky průkazné již od začátku stresu (den 6; Graf 29; **Tabulka 6, Tabulka 9**) a udržely se až do konce stresové periody (den 10-18; Graf 30-32). Rozdílná reakce odrůd na suchu není z výsledků patrná. Pouze během nejdelšího stresu odrůda Merkur pěstovaná v kontrolních podmínkách dosahuje průkazně vyšších hodnot stomatální vodivosti v porovnání s odrůdou Piešťanský (den 18, **Tabulka 9**, MTK-PTK). Interakce nebyly prokázány.

Aplikace brassinolidu na transpiraci bobu neměla žádný zřejmý vliv (Graf 28-32, **Tabulka 6, Tabulka 9**).

Graf 23–27: Transpirace u dvou linií *Zea mays* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období **sucha** (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření **10⁻⁸ M 24-epibrassinolidem**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (**n=8**) a střední chyby průměru.

□ kontrolní podmínky ■ sucho

Graf 23: Den 0



23EK: linie 2023, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

23ES: linie 2023, postřik 24EPI, sucho

23TK: linie 2023, postřik voda, kontrolní podmínky

23TS: linie 2023, postřik voda, sucho

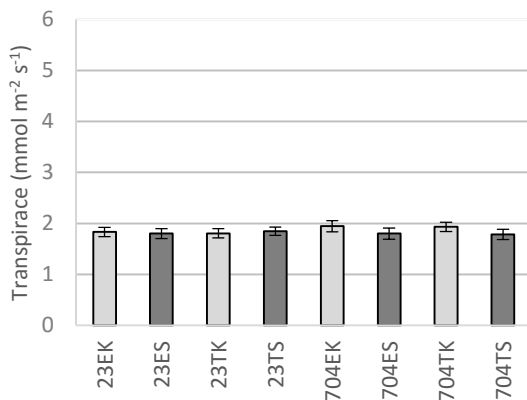
704EK: linie CE704, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

704ES: linie CE704, postřik 24EPI, sucho

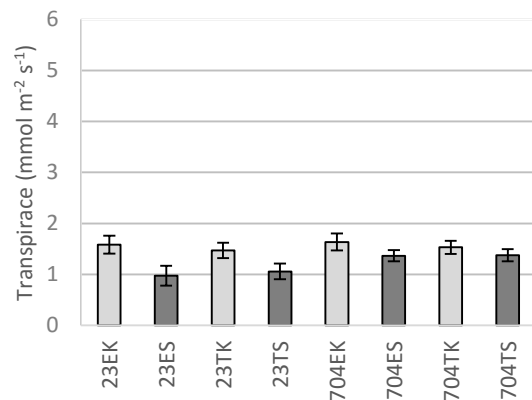
704TK: linie CE704, postřik voda, kontrolní podmínky

704TS: linie CE704, postřik voda, sucho

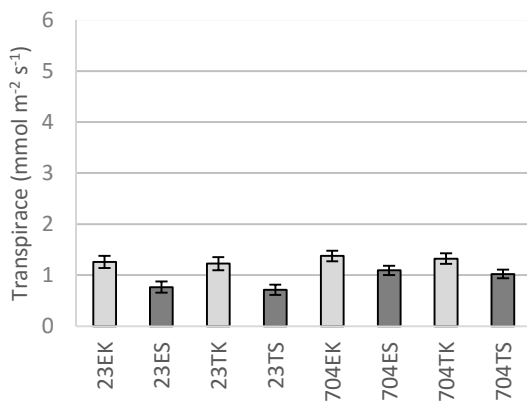
Graf 24: Den 6



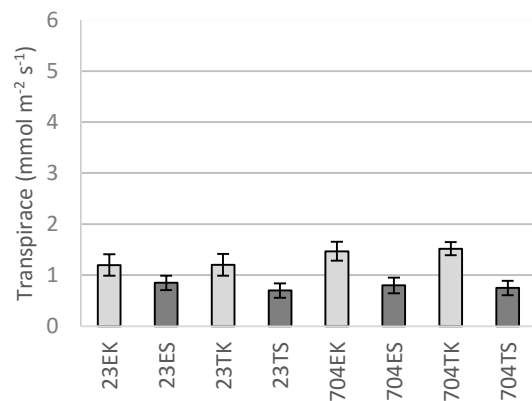
Graf 25: Den 10



Graf 26: Den 14



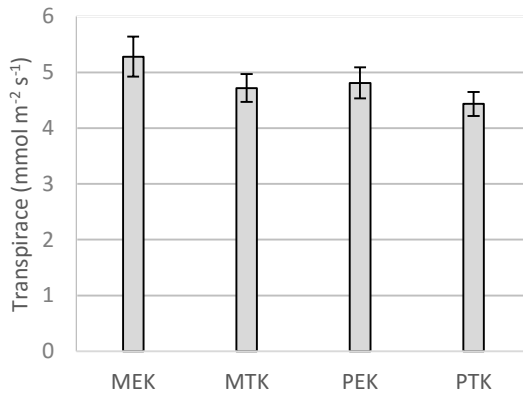
Graf 27: Den 18



Graf 28– 32: Transpirace u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období **sucha** (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření 10^{-8} M **24-epibrassinolidem**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.

□ kontrolní podmínky ■ sucho

Graf 28: Den 0



MEK: odrůda Merkur, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

MES: odrůda Merkur, postřik 24EPI, sucho

MTK: odrůda Merkur, postřik voda, kontrolní podmínky

MTS: odrůda Merkur, postřik voda, sucho

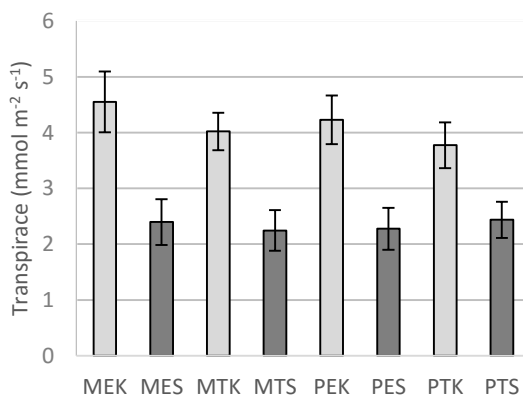
PEK : odrůda Piešťanský, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

PES: odrůda Piešťanský, postřik 24EPI, sucho

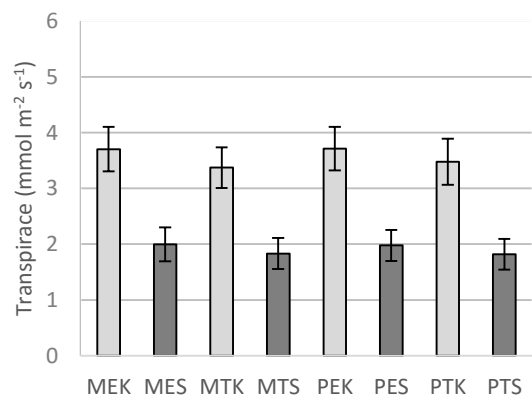
PTK: odrůda Piešťanský, postřik voda, kontrolní podmínky

PTS: odrůda Piešťanský, postřik voda, sucho

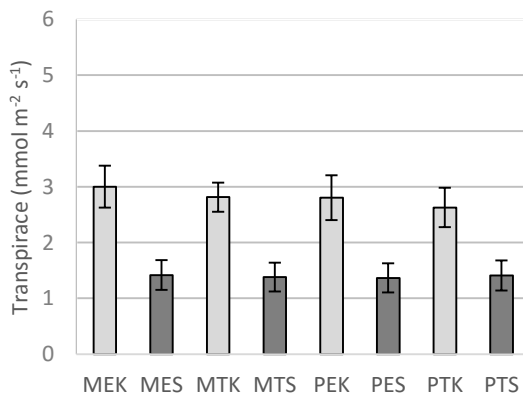
Graf 29: Den 6



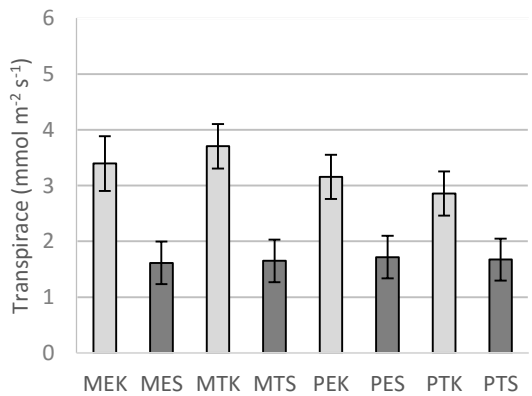
Graf 30: Den 10



Graf 31: Den 14



Graf 32: Den 18



5.4. Osmotický potenciál

Zea mays L.

Hodnoty osmotického potenciálu se u rostlin kukuřice pěstovaných v kontrolních podmínkách pohybovaly v rozmezí -0,8 MPa a -1,2 MPa po celou dobu pokusu (Graf 33-37). Naproti tomu u rostlin stresovaných byly zaznamenány hodnoty od -0,9 MPa, které v pokračujícím suchu překročily i hranici -2,0 MPa (Graf 33-37). U rostlin vystavených nejdelšímu stresu (den 18) nebylo možné z důvodu vysoké dehydratace pletiva osmotický potenciál stanovit (Graf 37).

Analýzou trojného třídění jsem zjistila průkazné rozdíly mezi rostlinami stresovanými a rostlinami pěstovanými v kontrolních podmínkách již na začátku stresu (den 6, **Tabulka 5**) a zůstaly významné po celou dobu stresové periody (**Tabulka 5**). Odlišné byly také reakce genotypů, které se ukázaly v některých případech jako významné (den 6, 10; **Tabulka 5**). Interakce mezi studovanými faktory nebyly (s jedinou výjimkou, den 14, pěstování-ošetření) statisticky průkazné (**Tabulka 5**).

Pro upřesnění rozdílů mezi variantami jsem dále využila jednoduchou analýzu rozptylu a následný Fisherův LSD test. Nejvýrazněji se osmotický potenciál měnil v důsledku odlišných podmínek pěstování (Graf 33-37). Snížení osmotického potenciálu stresovaných rostlin je patrné již ode dne 6 a tento trend pokračuje i v dalších sledovaných dnech, kdy se projevil jako statisticky významný (Graf 34-36). Největší rozdíly mezi skupinami byly prokázány u dne 14 (Graf 36). Linie 2023 pěstovaná ve stresovaných podmínkách a ošetřená kontrolním postřikem (23TS) dosahovala ve srovnání se stejně ošetřenými rostlinami pěstovanými v optimálních podmínkách (23TK) dvojnásobně nízkých hodnot a překročila tak hranici -2,0 MPa. Podobné hodnoty byly za stejných podmínek pěstování i ošetření zjištěny rovněž u linie CE704 (Graf 36, 704TK-704TS). Dále je z výsledků patrné, že hodnoty osmotického potenciálu se mezi genotypy liší. Linie 2023 dosahuje spíše nižších hodnot, avšak průkazné rozdíly mezi genotypy jsou spíše výjimečně (den 6, 23EK-704EK; den 10, 23TS-704TS).

Na počátku stresu suchem byl pozorován mírný negativní efekt brassinosteroidu na hodnotu osmotického potenciálu v porovnání s rostlinami pěstovanými za stejných podmínek a předem ošetřenými kontrolním postřikem (den 6, 10; Graf 34, 35;). Statisticky

průkazné rozdíly byly pozorovány v den 6 u linie 2023 (23ES-23TS) a v den 10 u linie CE704 (704ES-704TS). V pozdějším období se tento trend změnil (den 14, Graf 36). Stresované skupiny ošetřené brassinolidem dosahovaly vyšších hodnot osmotického potenciálu než rostliny ošetřené kontrolním postřikem a pěstované ve stejných podmínkách. Tyto rozdíly ale nebyly statisticky průkazné. Na rostliny pěstované v kontrolních podmínkách měla aplikace 24-epibrassinolidu zanedbatelný vliv.

Vicia faba L.

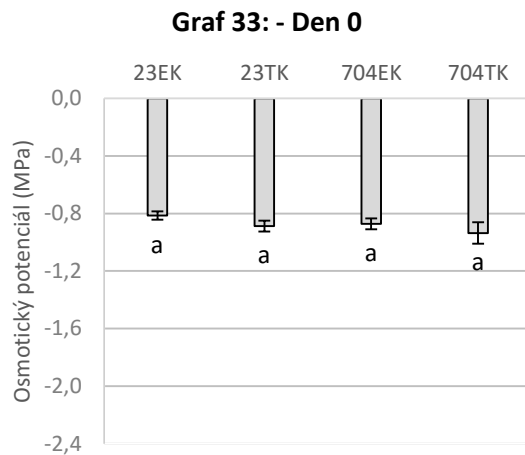
Osmotický potenciál bobu se po celou dobu pokusu pohyboval v rozmezí -0,5 MPa až -1,1 MPa a na začátku stresové periody nebyl mezi skupinami patrný žádný rozdíl (Graf 38-39). S postupujícím stresem (den 10-18) se začaly odlišovat rozdílně pěstované skupiny a pomocí analýzy trojného třídění jsem tyto rozdíly potvrdila jako statisticky významné (Graf 40-42, **Tabulka 6**). Ode dne 10 byly průkazné i rozdíly mezi genotypy (**Tabulka 6**). Interakce prokázány nebyly.

Z detailní analýzy vyplynulo, že faktor sucha je významný ode dne 14, kdy jsou zjištěné rozdíly s výjimkou MEK-MES statisticky průkazné (Graf 41). Minimální hodnota osmotického potenciálu v den 14 byla zaznamenána u odrůdy Merkur ošetřené kontrolním postřikem a pěstované za stresových podmínek (MTS) a přesáhla hranici -1,0 MPa (Graf 41). V posledním testovaném dni (den 18) se již všechny hodnoty osmotického potenciálu u stresovaných rostlin pohybovaly okolo -1,0 MPa a rozdíly mezi skupinami stresovanými a pěstovanými v kontrolních podmínkách byly ve všech případech významné (Graf 42). Rozdíl mezi genotypy v podmínkách stresu byly výjimečné (den 14, Graf 41, MTS-PTS), ale byly zřejmé průkazné rozdíly mezi rostlinami odlišných genotypů pěstovaných za kontrolních podmínek (Graf 40-42).

Negativní vliv sucha na odrůdu Merkur (den 14, Graf 41, MES-MTS) byl částečně eliminován předchozí aplikací brassinosteroidu a rozdíl mezi ošetřením brassinosteroidem a kontrolním postřikem se ukázal jako významný. Na ostatní skupiny (včetně rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách) v rámci jiných sledovaných dnů neměl postřik průkazný vliv.

Graf 33-37: Osmotický potenciál u dvou genotypů *Zea mays* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období **sucha** (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření **10⁻⁸ M 24-epibrassinolidem**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=12) a střední chyby průměru. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly (p < 0,05) podle výsledků Fisherova LSD testu.

□ kontrolní podmínky ■ sucho



23EK: linie 2023, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

23ES: linie 2023, postřik 24EPI, sucho

23TK: linie 2023, postřik voda, kontrolní podmínky

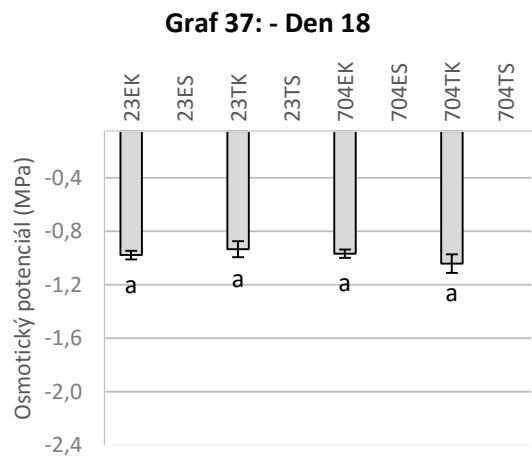
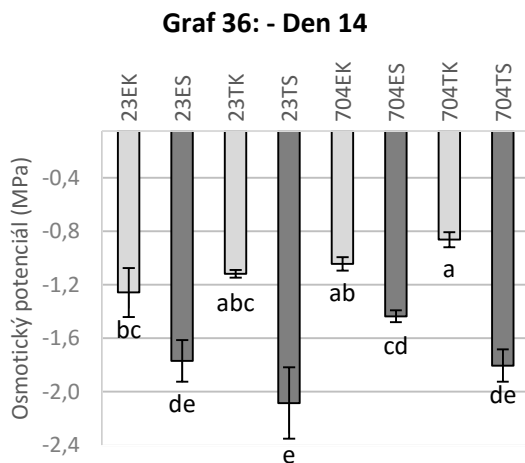
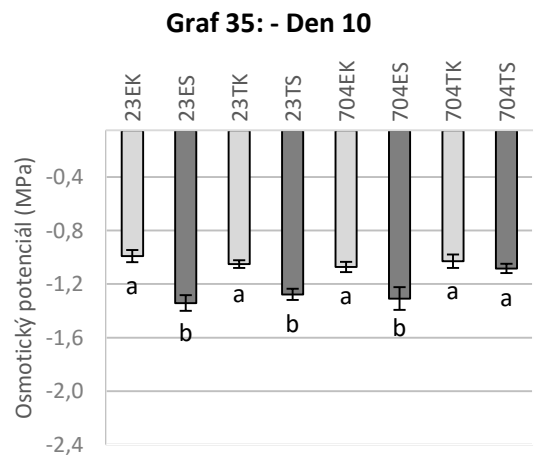
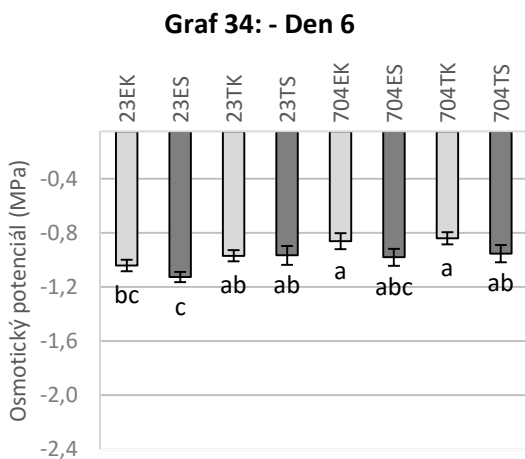
23TS: linie 2023, postřik voda, sucho

704EK: linie CE704, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

704ES: linie CE704, postřik 24EPI, sucho

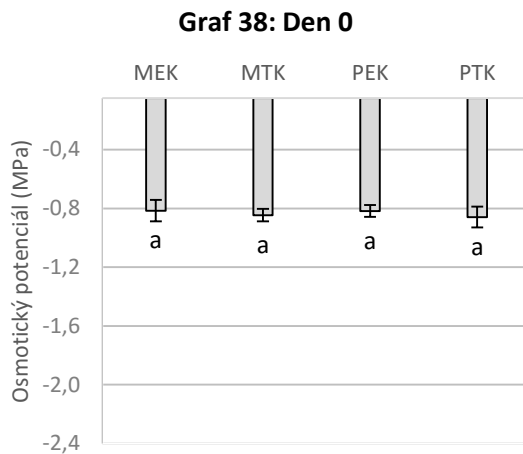
704TK: linie CE704, postřik voda, kontrolní podmínky

704TS: linie CE704, postřik voda, sucho



Graf 38-42: Osmotický potenciál u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období **sucha** (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření 10^{-8} M **24-epibrassinolidem**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=12) a střední chyby průměru. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($p < 0,05$) podle výsledků Fisherova LSD testu.

□ kontrolní podmínky ■ sucho



MEK: odrůda Merkur, ošetření 24EPI, kontrolní podmínky

MES: odrůda Merkur, ošetření 24EPI, sucho

MTK: odrůda Merkur, ošetření voda, kontrolní podmínky

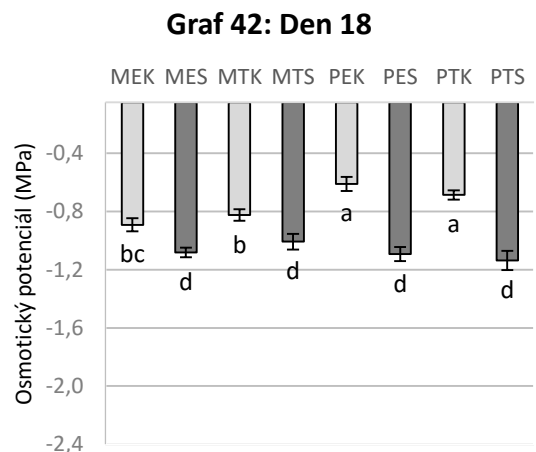
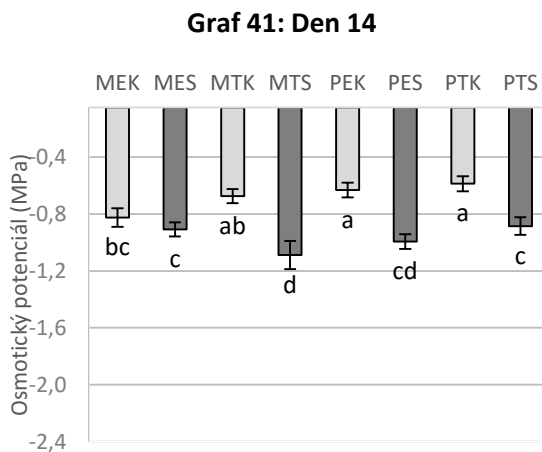
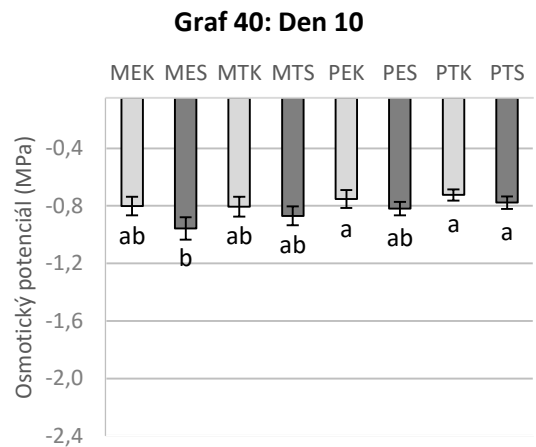
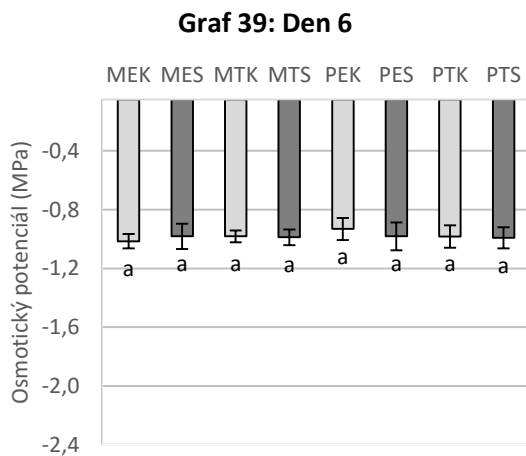
MTS: odrůda Merkur, ošetření voda, sucho

PEK: odrůda Piešťanský, ošetření 24EPI, kontrolní podmínky

PES: odrůda Piešťanský, ošetření 24EPI, sucho

PTK: odrůda Piešťanský, ošetření voda, kontrolní podmínky

PTS: odrůda Piešťanský, ošetření voda, sucho



5.5. Prolin

Zea mays L.

Obsah prolinu v listu kukuřice se během celého pokusu pohyboval v širokém rozmezí hodnot (7-119 ng g⁻¹). Maximálních hodnot dosahovaly skupiny stresované, minimálních hodnot naopak varianty pěstované v kontrolních podmínkách.

Z analýzy trojného třídění vyplynuly průkazné rozdíly mezi genotypy (den 10, 14; tabulka 4) a způsobem pěstování (den 14, 18; **Tabulka 5**). Ukázalo se, že v uvedených dnech je obsah prolinu u linie CE704 vyšší v porovnání s linií 2023. Interakce byly průkazné pouze v ojedinělém případě (**Tabulka 5**).

Podle Fisherova LSD testu byly rozdíly mezi odlišně pěstovanými skupinami významné u linie CE704 (den 14; Graf 46; 704EK-704ES, 704TK-704TS) a později u linie 2023 (den 18, Graf 47, 23EK-23ES), ačkoliv rozdíly mezi odlišně pěstovanými skupinami jsou od počátku stresu patrné (Graf 44-47). Linie CE704 reagovala na sucho v některých případech vyšším zvýšením obsahu prolinu v porovnání s linií 2023 (den 10 a 14). Výjimku tvoří den 18, během kterého bylo u linie 2023 ošetřené brassinosteroidem a vystavené suchu (23ES) naměřeno 8x vyšší množství prolinu než u odpovídající skupiny pěstované v kontrolních podmínkách (23EK, Graf 47).

Vliv aplikace brassinosteroidu na obsah prolinu nebyl v rámci většiny sledovaných dnů patrný a nevykazoval žádný jednoznačný trend. Pouze v jednom případě (23ES-23TS) byl prokázán jako významný (den 18, Graf 47).

Vicia faba L.

Množství prolinu u bobu dosahovalo řádově vyšších hodnot, než tomu bylo u kukuřice. U bobu se minimální hodnoty pohybovaly okolo 50 ng g⁻¹ a maximální stoupaly až ke 2500 ng g⁻¹. Nižší hodnoty byly naměřeny u rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách a nejvyšší hodnoty u rostlin stresovaných suchem. První známky vlivu sucha na obsah prolinu byly patrné ode dne 10 a s postupujícím suchem se vliv prohluboval (Graf 50-52). Největší rozdíly mezi rostlinami stresovanými a pěstovanými v kontrolních podmínkách

byly zaznamenány na konci stresové periody (den 18). V tento den byl obsah prolinu u odrůdy Merkur, ošetřené kontrolním postřikem a pěstované v suchu (MTS) 38x vyšší v porovnání se stejnou skupinou pěstovanou v optimálních podmínkách (MTK, Graf 52). Podobná závislost byla pro MTS-MTK zjištěna i v jiných pokusných dnech (den 10-14, Graf 50-51). Několikanásobně vyšší hodnoty obsahu prolinu byly zjištěny i mezi zbývajícími skupinami nejdelšího působení stresu (den 18) a také mezi všemi skupinami kontrola-stres dne 14.

Tyto vztahy potvrdily výsledky analýzy rozptylu (**Tabulka 6**). Vliv interakcí byl průkazný pouze v jednom případě (den 18, pěstování x ošetření).

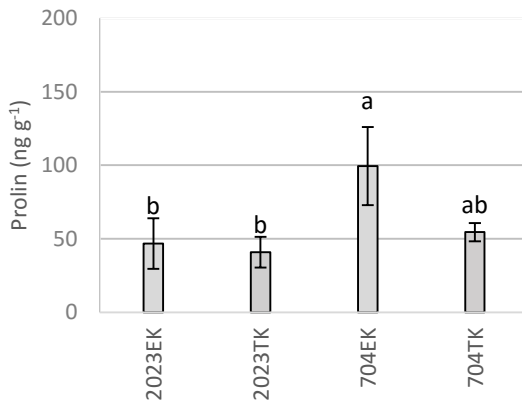
Rovněž detailnější analýza potvrdila výše uvedené vztahy. Odrůda Merkur (MTK-MTS) reaguje na sucho průkazně již během začátku stresu (den 10, Graf 50), zatímco rozdíly mezi rostlinami odrůdy Piešťanský byly průkazné až ode dne 14 (Graf 51, PEK-PES). V době nejdelší stresové periody (den 18, Graf 52) byly prokázány rozdíly mezi všemi skupinami, které se lišily způsobem pěstování. Odrůda Merkur reagovala na sucho časněji, ale také průkazně vyšší akumulací prolinu v porovnání s odrůdou Piešťanský (Graf 50-51, MTS-PTS).

Během celé stresové periody se průkazně projevil vliv brassinosteroidu pouze dvakrát a to v rámci dvou pokusných dnů a pokaždé u stejné skupiny rostlin. U odrůdy Merkur ošetřené kontrolním postřikem (MTS) bylo naměřeno průkazně vyšší hodnota prolinu v porovnání se stejnou skupinou ošetřenou brassinosteroidem (MES; den 10,14; Graf 50,51). Naproti tomu na rostliny pěstované v kontrolním prostředí neměl postřik brassinosteroidem žádný efekt.

Graf 43-47: Hodnoty obsahu prolinu, vztážené na jednotku sušiny listu, u dvou linií *Zea mays* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období sucha (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření 10^{-8} M 24-epibrassinolidem. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=4) a střední chyby průměru. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly (p < 0,05) podle výsledků Fisherova LSD testu.

□ kontrolní podmínky ■ sucho

Graf 43: Den 0



23EK: linie 2023, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

23ES: linie 2023, postřik 24EPI, sucho

23TK: linie 2023, postřik voda, kontrolní podmínky

23TS: linie 2023, postřik voda, sucho

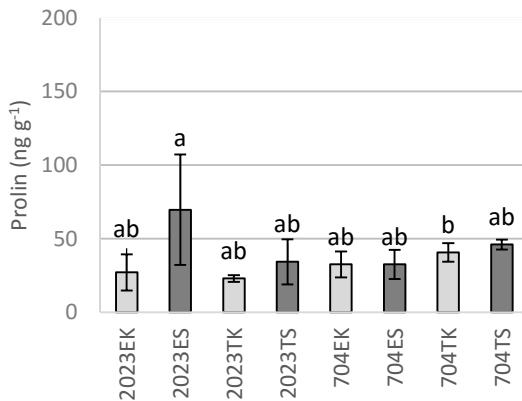
704EK: linie CE704, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

704ES: linie CE704, postřik 24EPI, sucho

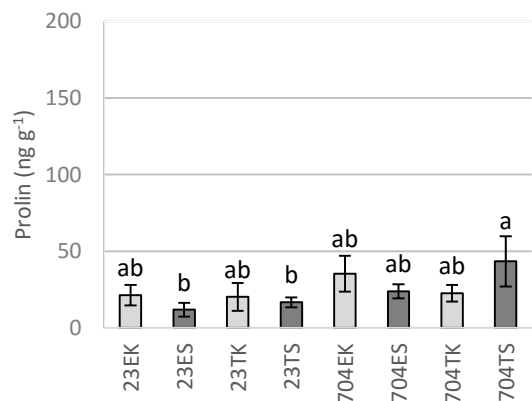
704TK: linie CE704, postřik voda, kontrolní podmínky

704TS: linie CE704, postřik voda, sucho

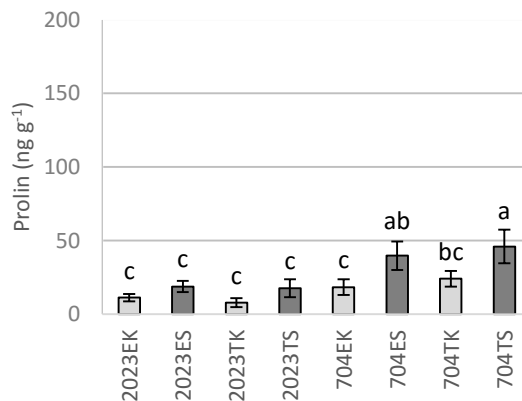
Graf 44: Den 6



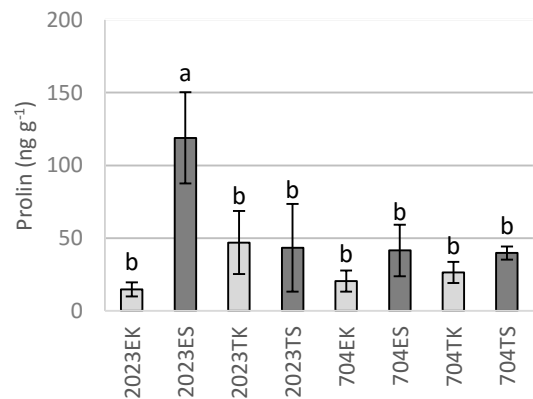
Graf 45: Den 10



Graf 46: Den 14



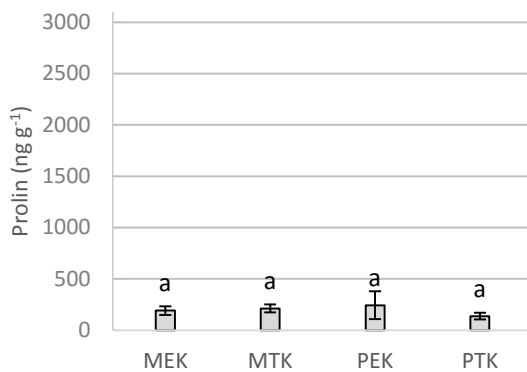
Graf 47: Den 18



Graf 48-50: Hodnoty obsahu prolinu, vztažené na jednotku sušiny listu, u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období **sucha** (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření 10^{-8} M 24-epibrassinolidem. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=4) a střední chyby průměru. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly (p<0,05) podle výsledků Fisherova LSD testu.

□ kontrolní podmínky ■ sucho

Graf 48: Den 0



MEK: odrůda Merkur, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

MES: odrůda Merkur, postřik 24EPI, sucho

MTK: odrůda Merkur, postřik voda, kontrolní podmínky

MTS: odrůda Merkur, postřik voda, sucho

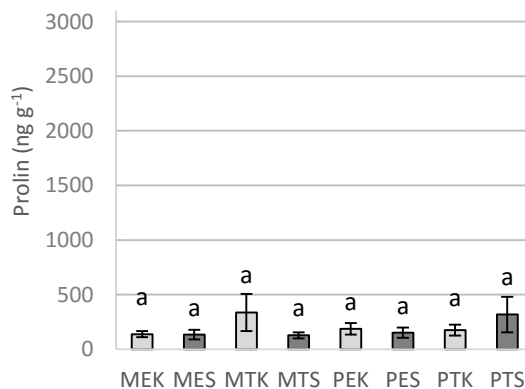
PEK : odrůda Piešťanský, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

PES: odrůda Piešťanský, postřik 24EPI, sucho

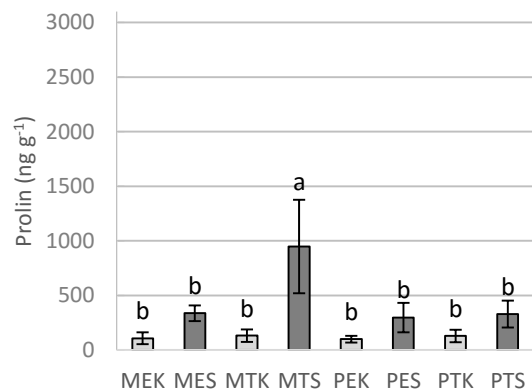
PTK: odrůda Piešťanský, postřik voda, kontrolní podmínky

PTS: odrůda Piešťanský, postřik voda, sucho

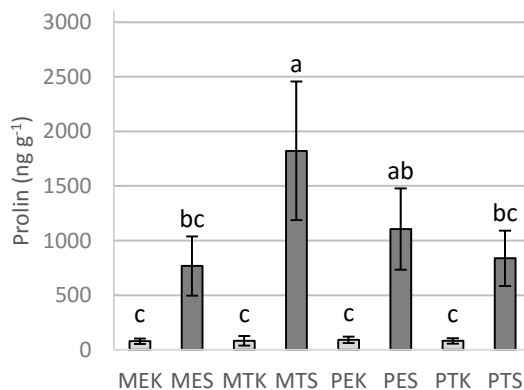
Graf 49: Den 6



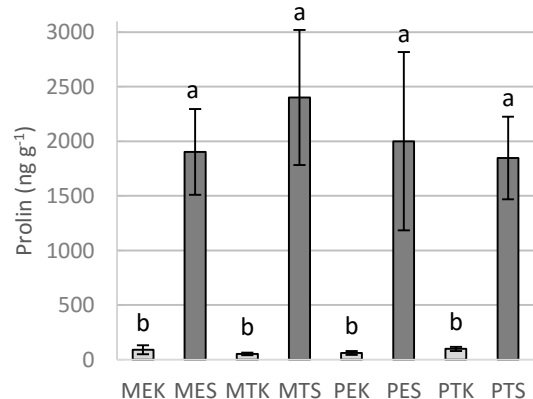
Graf 50: Den 10



Graf 51: Den 14



Graf 52: Den 18



5.6.3.6. Poškození membrán

Zea mays L.

Parametr poškození membrán procentuálně vyjadřuje, nakolik byla struktura buněk poškozena suchem. Čím nižší je procento poškození membrán, tím byla rostlina ovlivněna suchem méně. Rostliny kukuřice pěstované v optimálních podmínkách nepřesáhly po celou dobu pokusu hranici 25 %. Naopak rostliny stresované suchem dosáhly v ojedinělých případech i 80 %.

Z výsledků je patrné, že sucho nemělo v raných fázích stresu na rostlinu významný vliv, ale důsledky dehydratace pletiva se projeví až v pozdějším stádiu stresu (den 14, 18; Graf 56, 57), což bylo potvrzeno i pomocí analýzy trojného třídění (**Tabulka 5**). Z výsledků této analýzy dále vyplynuly průkazné rozdíly mezi genotypy na začátku (den 0-6, **Tabulka 5**) a na konci stresové periody (den 18, **Tabulka 5**). Vliv interakcí nebyl významný (**Tabulka 5**).

Výsledky Fisherova LSD testu ukázaly, že průkazné rozdíly způsobené odlišnými podmínkami (kontrola-stres) pěstování (den 18, Graf 57) se týkají všech vzájemně si odpovídajících skupin (23EK-23ES, 23TK-23TS, 704EK-704ES, 704TK-704TS). Rozdíly byly zjištěny u všech těchto skupin i v předchozím pokusném bloku (den 14), ale nebyly statisticky průkazné (Graf 44). Na začátku stresové periody nebyly zřejmé odlišné reakce genotypů na sucho, významné rozdíly byly pouze mezi liniemi pěstovanými v kontrolních podmínkách (den 0, 6; Graf 53, 52; 23EK-704EK, 23TK-704TK). V těchto dnech měla linie CE704 pěstovaná v kontrolních podmínkách (704EK-2023EK) průkazně vyšší procento poškození membrán než linie 2023. V konečné fázi stresu již genotypy pěstované v suchu reagovaly na stres odlišně. Citlivá linie 2023 dosahovala významně vyššího procenta poškození membrán a hodnoty přesáhly i 80 % (den 18, Graf 57).

Vliv aplikace brassinosteroidu byl na rostliny z počátku (den 0) spíše negativní, jak se ukázalo u linie CE704 ošetřené brassinosteroidem (Graf 53, 704EK). Rozdíl mezi skupinami nebyl tak velký, ale díky malému rozptylu hodnot byl významný. V dalších dnech nebyl patrný žádný významný efekt postřiku na rostliny stresované nebo rostliny pěstované v kontrolních podmínkách (Graf 54-56). Během posledního dne ale došlo k výraznému nárůstu poškození membrán a stresované rostliny reagovaly na ošetření odlišně. Linie CE704 ošetřená kontrolním postřikem (704TS) vykazovala průkazně nižší hodnoty poškození

v porovnání se stejnou skupinou ošetřenou brassinosteroidem (Graf 57,704ES). U rostlin linie 2023 stresované suchem byl patrný opačný trend, ale nebyl statisticky významný (Graf 57).

Vicia faba L.

Poškození membrán u bobu dosahovalo u rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách podobných hodnot jako u kukuřice, nejčastěji okolo 25 %. Rostliny stresované reagovaly méně výrazně v porovnání s kukuřicí a nepřesáhly hranici 40 % ani během nejdéle trvajících sucha.

V prvních dvou testovaných obdobích (den 0,6) nebyly patrné žádné odlišnosti mezi jednotlivými skupinami (**Tabulka 6**; Graf 58,59). V dalších dnech se začaly projevovat významné rozdíly mezi genotypy (den 10, MES-PES) a později mezi odlišně pěstovanými skupinami (den 14,18; **Tabulka 6**). Interakce nebyly statisticky průkazné.

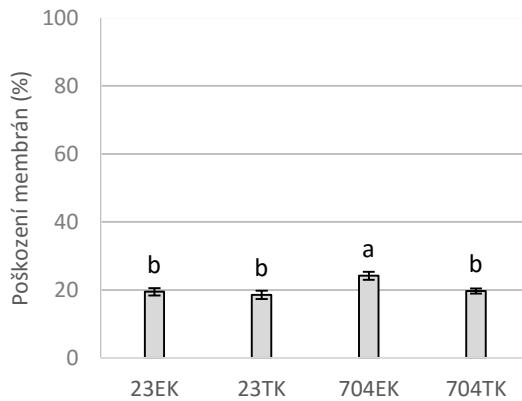
Nejvýrazněji začala na sucho reagovat odrůda Piešťanský ošetřená brassinolidem (den 10) a projevovalo se u ní průkazně vyšší poškození v porovnání se stejnou skupinou pěstovanou v optimálních podmínkách (Graf 60, PEK-PES). Tento trend pokračoval i v dalším období (den 14, Graf 61) a na konci stresové periody (den 18) již byly průkazné rozdíly mezi všemi skupinami odlišně pěstovanými (Graf 62). Průkazné rozdíly mezi genotypy byly během dne 10 a 14 významné právě díky odlišnosti skupiny PES od všech ostatních variant - odrůda Piešťanský dosahovala vyšších hodnot poškození (Graf 60,61; PES).

Na rostliny pěstované v kontrolních podmínkách neměl postřik brassinosteroidu žádný vliv, efekt se projevil pouze u rostlin stresovaných uprostřed období stresu (den 10-14). Citlivá odrůda Piešťanský pěstovaná v suchu reagovala negativně na aplikaci BRs (PES), což se projevilo významně vyšším indexem poškození membrán ve srovnání s totožnou skupinou ošetřenou kontrolním postřikem (Graf 10, 14; PES-PTS). Stejného procenta poškození dosáhly ostatní stresované skupiny až v pozdějších dnech (den 18, Graf 62).

Graf 53-57: Poškození membrán u dvou linií *Zea mays* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období **sucha** (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření **10⁻⁸ M 24-epibrassinolidem**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=4) a střední chyby průměru. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly (p < 0,05) podle výsledků Fisherova LSD testu.

□ kontrolní podmínky ■ sucho

Graf 53: Den 0



23EK: linie 2023, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

23ES: linie 2023, postřik 24EPI, sucho

23TK: linie 2023, postřik voda, kontrolní podmínky

23TS: linie 2023, postřik voda, sucho

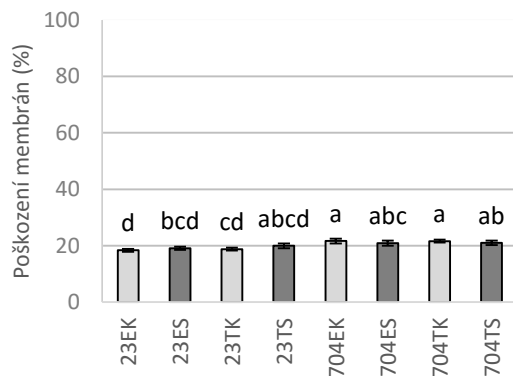
704EK: linie CE704, postřik 24EPI, kontrolní podmínky

704ES: linie CE704, postřik 24EPI, sucho

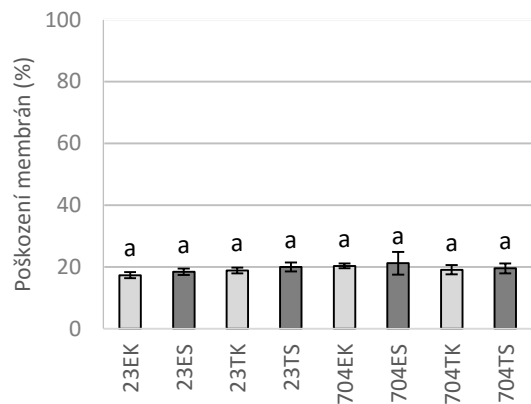
704TK: linie CE704, postřik voda, kontrolní podmínky

704TS: linie CE704, postřik voda, sucho

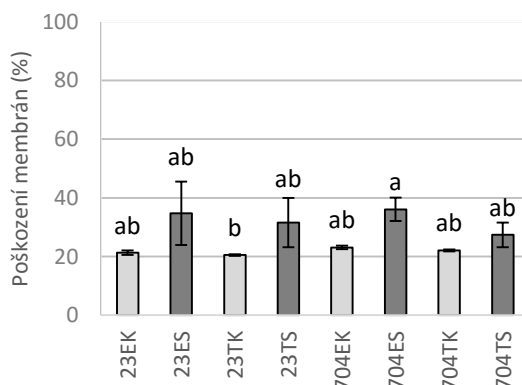
Graf 54: Den 6



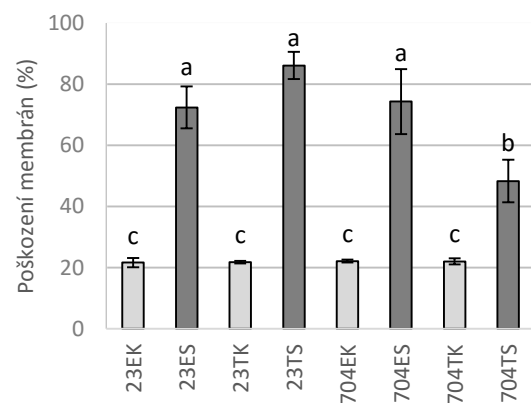
Graf 55: Den 10



Graf 56: Den 14



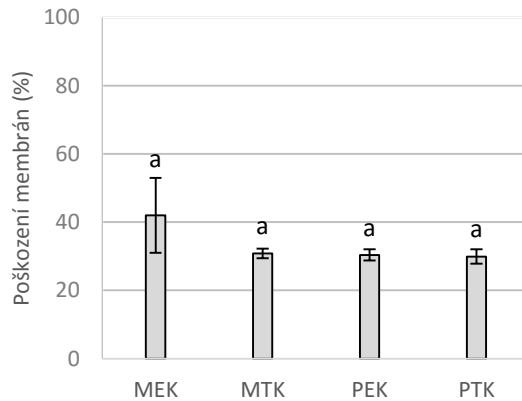
Graf 57: Den 18



Graf 58-62: Index poškození membrán u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období **sucha** (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření **10⁻⁸ M 24-epibrassinolidem**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=4) a střední chyby průměru. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly (p < 0,05) podle výsledků Fisherova LSD testu.

□ kontrolní podmínky ■ sucho

Graf 58: Den 0



MEK: odrůda Merkur, ošetření 24EPI, kontrolní podmínky

MES: odrůda Merkur, ošetření 24EPI, sucho

MTK: odrůda Merkur, ošetření voda, kontrolní podmínky

MTS: odrůda Merkur, ošetření voda, sucho

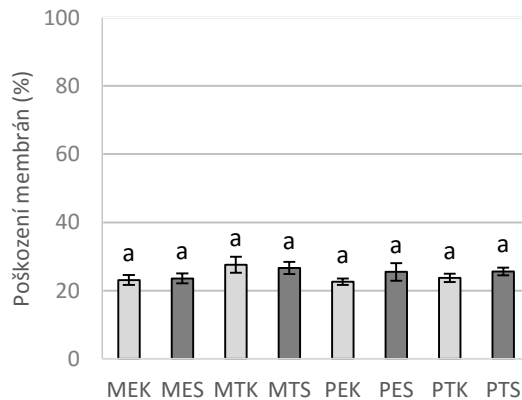
PEK: odrůda Piešťanský, ošetření 24EPI, kontrolní podmínky

PES: odrůda Piešťanský, ošetření 24EPI, sucho

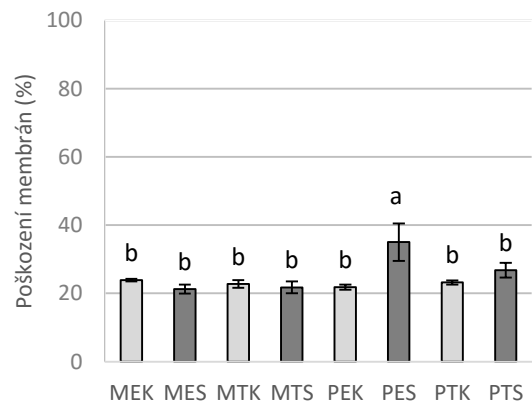
PTK: odrůda Piešťanský, ošetření voda, kontrolní podmínky

PTS: odrůda Piešťanský, ošetření voda, sucho

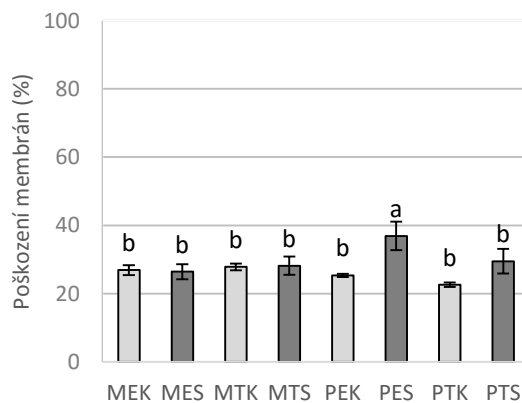
Graf 59: Den 6



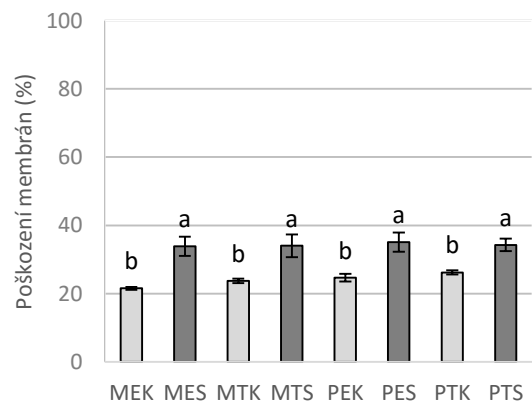
Graf 60: Den 10



Graf 61: Den 14



Graf 62: Den 18



5.7. Malondialdehyd

Zea mays L.

Obsah malondialdehydu byl u kukuřice (den 18) v rozmezí 20-80 ng g⁻¹, spodní hranice dosahovaly skupiny pěstované v kontrolních podmínkách a maxima skupiny vystavené stresu (Graf 63).

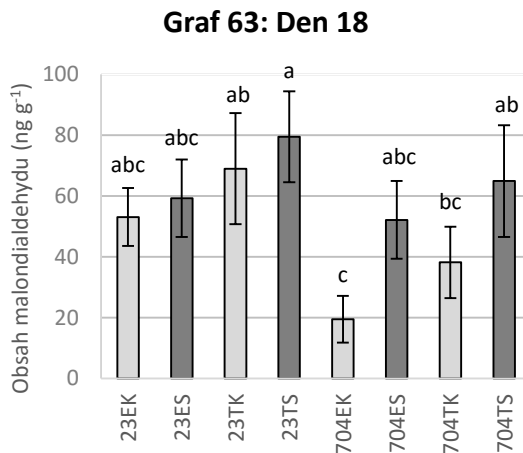
Z grafu jsou patrné rozdíly mezi odlišně pěstovanými skupinami, ale rozdíly se neukázaly jako významné (**Tabulka 5**, Graf 63). Analýzou trojného třídění jsem však potvrdila odlišnosti mezi genotypy. Linie 2023 dosahovala hodnot od 50 do 80 ng g⁻¹ zatímco linie CE704 od 20 do 65 ng g⁻¹. Statisticky průkazné rozdíly se však netýkaly vzájemně si odpovídajících skupin genotypů. Ačkoliv byl zaznamenán vyšší obsah malondialdehydu u rostlin ošetřených pouze kontrolním postřikem v porovnání s rostlinami ošetřenými brassinolidem, nebyly tyto rozdíly statisticky významné, a rozdíly v reakci na aplikaci brassinolidu u rostlin stresovaných a pěstovaných v optimálních podmínkách nebyl prokázán (**Tabulka 5**, Graf 63). Vliv interakcí byl zanedbatelný (**Tabulka 5**).

Vicia faba L.

V porovnání s kukuřicí byl u bobu naměřen nižší obsah malondialdehydu a to v rozmezí 7-20 ng g⁻¹ (Graf 64). Nižší hodnoty byly stanoveny u rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách a vyšší u rostlin stresovaných. Rozdíly mezi všemi vzájemně si odpovídajícími skupinami byly zřejmé, ale nebyly statisticky průkazné (**Tabulka 6**, Graf 64). Rozdíly mezi odrůdami nebo typem ošetření byly minimální a nepozorovala jsem, že by rostliny stresované a rostliny pěstované v kontrolních podmínkách reagovaly na aplikaci brassinosteroidu odlišně (**Tabulka 6**, Graf 64). Statisticky průkazné nebyly ani žádné interakce studovaných faktorů (**Tabulka 6**).

Graf 63: Obsah malondialdehydu u dvou linií *Zea mays* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených 18 dennímu suchu a po ošetření 10^{-8} M 24-epibrassinolidem. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=6) a střední chyby průměru. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly (p < 0,05) podle výsledků Fisherova LSD testu.

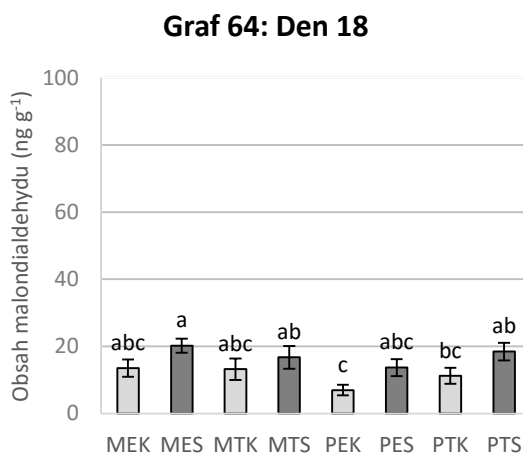
□ kontrolní podmínky ■ sucho



23EK: linie 2023, postřik 24EPI, kontrolní podmínky
23ES: linie 2023, postřik 24EPI, sucho
23TK: linie 2023, postřik voda, kontrolní podmínky
23TS: linie 2023, postřik voda, sucho
704EK: linie CE704, postřik 24EPI, kontrolní podmínky
704ES: linie CE704, postřik 24EPI, sucho
704TK: linie CE704, postřik voda, kontrolní podmínky
704TS: linie CE704, postřik voda, sucho

Graf 64: Obsah malondialdehydu u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených 18 dennímu suchu a po ošetření 10^{-8} M 24-epibrassinolidem. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=6) a střední chyby průměru. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly (p < 0,05) podle výsledků Fisherova LSD testu.

□ kontrolní podmínky ■ sucho



MEK: odrůda Merkur, ošetření 24EPI, kontrolní podmínky
MES: odrůda Merkur, ošetření 24EPI, sucho
MTK: odrůda Merkur, ošetření voda, kontrolní podmínky
MTS: odrůda Merkur, ošetření voda, sucho
PEK: odrůda Piešťanský, ošetření 24EPI, kontrolní podmínky
PES: odrůda Piešťanský, ošetření 24EPI, sucho
PTK: odrůda Piešťanský, ošetření voda, kontrolní podmínky
PTS: odrůda Piešťanský, ošetření voda, sucho

5.8. Výsledky analýzy rozptylu

Tabulka 5: Výsledky analýzy rozptylu s interakcemi pro hodnoty parametrů měřených u dvou genotypů *Zea mays* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období sucha (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření 10^{-8} M 24-epibrassinolidem. Uvedeny jsou hladiny statistické významnosti (tučně na šedivém pozadí jsou vyznačeny průkazné rozdíly), jako zdroj variability byly použity genotypy, ošetření, pěstování a interakce mezi nimi.

<i>Zea mays</i> L.	Parametr	Genotyp	Ošetření	Pěstování	Genotyp x Ošetření	Pěstování x Genotyp	Pěstování x Ošetření	Pěstování x Genotyp x Ošetření
DEN 0	Fotosyntéza	0,300	0,530		0,980			
	Stomatální vodivost	0,020	0,873		0,612			
	Transpirace	0,600	0,770		0,600			
	Osmotický potenciál	0,267	0,158		0,924			
	Prolin	0,074	0,160		0,272			
	Index poškození membrán	0,022	0,029		0,120			
DEN 6	Fotosyntéza	0,010	0,910	0,520	0,830	0,500	0,990	0,860
	Stomatální vodivost	0,360	0,940	0,590	0,960	0,510	1,000	0,840
	Transpirace	0,220	0,960	0,270	0,920	0,400	0,860	0,660
	Osmotický potenciál	0,002	0,068	0,042	0,236	0,327	0,547	0,591
	Prolin	0,962	0,696	0,200	0,186	0,291	0,571	0,424
	Index poškození membrán	<0,001	0,517	0,758	0,541	0,136	0,808	0,916
DEN 10	Fotosyntéza	0,811	0,770	0,250	0,981	0,597	0,690	0,958
	Stomatální vodivost	0,883	0,872	0,831	0,699	0,159	0,854	0,717
	Transpirace	0,780	0,710	0,700	0,980	0,230	0,810	0,820
	Osmotický potenciál	0,228	0,065	<0,001	0,067	0,053	0,709	0,709
	Prolin	0,036	0,676	0,877	0,899	0,377	0,135	0,298
	Index poškození membrán	0,279	0,992	0,469	0,230	0,830	0,958	0,924
DEN 14	Fotosyntéza	0,505	0,568	0,087	0,716	0,531	0,846	0,873
	Stomatální vodivost	0,039	0,393	0,167	0,601	0,222	0,693	0,870
	Transpirace	0,350	0,720	0,290	0,920	0,190	0,940	0,990
	Osmotický potenciál	0,007	0,356	<0,001	0,974	0,712	0,011	0,806
	Prolin	0,001	0,695	0,004	0,381	0,177	0,885	0,931
	Index poškození membrán	0,977	0,375	0,008	0,706	0,677	0,513	0,730
DEN 18	Fotosyntéza	0,987	0,731	<0,001	0,840	0,279	0,710	0,831
	Stomatální vodivost	0,195	0,476	0,011	0,767	0,372	0,580	0,991
	Transpirace	0,216	0,811	0,001	0,879	0,172	0,842	0,865
	Osmotický potenciál	0,342	0,771	x	0,260	x	x	x
	Prolin	0,087	0,471	0,020	0,441	0,218	0,042	0,084
	Malondialdehyd	0,036	0,097	0,063	0,907	0,287	0,967	0,797
	Index poškození membrán	0,027	0,470	<0,001	0,018	0,212	0,469	0,019

Tabulka 6: Výsledky analýzy rozptylu s interakcemi pro hodnoty parametrů měřených u dvou genotypů *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních podmínkách a vystavených různě dlouhému období sucha (0, 6, 10, 14, 18 dnů) a po ošetření 10^{-8} M 24-epibrassinolidem. Uvedeny jsou hladiny statistické významnosti (tučně na šedivém pozadí jsou vyznačeny průkazné rozdíly), jako zdroj variability byly použity genotypy, ošetření, pěstování a interakce mezi nimi.

<i>Vicia faba</i> L.	Parametr	Genotyp	Ošetření	Pěstování	Genotyp x Ošetření	Pěstování x Genotyp	Pěstování x Ošetření	Pěstování x Genotyp x Ošetření
DEN 0	Fotosyntéza	0,670	0,850		0,990			
	Stomatální vodivost	0,277	0,933		0,766			
	Transpirace	0,210	0,120		0,670			
	Osmotický potenciál	0,894	0,551		0,927			
	Prolin	0,888	0,587		0,417			
	Index poškození membrán	0,290	0,330		0,360			
DEN 6	Fotosyntéza	0,510	0,800	0,100	0,780	0,640	0,920	0,980
	Stomatální vodivost	0,743	0,871	0,017	0,917	0,776	0,963	0,954
	Transpirace	0,549	0,331	<0,001	0,914	0,756	0,551	0,760
	Osmotický potenciál	0,696	0,868	0,862	0,666	0,660	1,000	0,690
	Prolin	0,710	0,189	0,679	0,885	0,226	0,915	0,148
	Index poškození membrán	0,480	0,379	0,082	0,295	0,209	0,628	0,933
DEN 10	Fotosyntéza	0,410	0,210	<0,001	0,750	0,420	0,530	0,640
	Stomatální vodivost	0,950	0,040	<0,001	0,970	0,930	0,190	0,870
	Transpirace	0,990	0,410	<0,001	0,860	0,950	0,700	0,880
	Osmotický potenciál	0,036	0,368	0,049	0,937	0,563	0,537	0,645
	Prolin	0,177	0,161	0,006	0,245	0,192	0,233	0,237
	Index poškození membrán	0,014	0,261	0,053	0,344	0,004	0,229	0,097
DEN 14	Fotosyntéza	0,290	0,370	0,005	0,550	0,640	0,800	0,850
	Stomatální vodivost	0,492	0,625	0,010	0,494	0,569	0,576	0,431
	Transpirace	0,640	0,620	<0,001	0,990	0,740	0,710	0,900
	Osmotický potenciál	0,027	0,485	<0,001	0,300	0,356	0,133	0,027
	Prolin	0,452	0,356	<0,001	0,118	0,435	0,348	0,127
	Index poškození membrán	0,469	0,285	0,012	0,071	0,012	0,571	0,429
DEN 18	Fotosyntéza	0,920	0,210	<0,001	0,230	0,680	0,940	0,930
	Stomatální vodivost	0,804	0,347	<0,001	0,148	0,685	0,393	0,199
	Transpirace	0,520	0,530	<0,001	0,270	0,430	0,610	0,400
	Osmotický potenciál	0,039	0,871	<0,001	0,050	<0,001	0,783	0,851
	Prolin	0,709	0,770	<0,001	0,623	0,687	0,767	0,538
	Malondialdehyd	0,084	0,496	0,003	0,095	0,626	0,731	0,625
	Index poškození membrán	0,225	0,594	<0,001	0,771	0,479	0,452	0,945

Tabulka 7: Výsledky statistického hodnocení rychlosti čisté fotosyntézy u *Zea mays* L. a *Vicia faba* L. Použita byla analýza jednoduchého třídění se vzájemným porovnáním skupin. Hvězdičkami jsou zvýrazněné průkazné rozdíly mez skupinami ($p < 0,05$). Nejtmavší pole značí rozdíl mezi genotypy, méně tmavé rozdíly v ošetření a nejsvětlejší zvýrazněná pole rozdíly mezi odlišně ošetřenými skupinami.

DENO	23EK	23TK	704EK
23EK	#	-	
23TK	-	#	
704EK	-	-	#
704TK	-	-	-

DEN6	23EK	23ES	23TK	23TS	704EK	704ES	704TK	DEN10	23EK	23ES	23TK	23TS	704EK	704ES	704TK
23EK	#							23EK	#						
23ES	-	#						23ES	-	#					
23TK	-	-	#					23TK	-	-	#				
23TS	-	-	-	#				23TS	-	-	-	#			
704EK	*	*	**	*	#			704EK	-	*	-	*	#		
704ES	-	-	-	-	-	#		704ES	-	-	*	-	**	#	
704TK	***	**	***	**	-	-	#	704TK	-	*	-	*	-	*	#
704TS	-	-	-	-	-	-	-	704TS	-	-	-	-	*	-	-

DEN14	23EK	23ES	23TK	23TS	704EK	704ES	704TK	DEN 18	23EK	23ES	23TK	23TS	704EK	704ES	704TK
23EK	#							23EK	#						
23ES	***	#						23ES	***	#					
23TK	-	***	#					23TK	-	***	#				
23TS	***	-	***	#				23TS	***	-	***	#			
704EK	-	***	-	***	#			704EK	-	***	-	***	#		
704ES	***	-	**	-	**	#		704ES	***	*	***	*	***	#	
704TK	-	***	-	***	-	**	#	704TK	-	***	-	***	-	***	#
704TS	***	-	***	-	***	-	***	704TS	***	-	***	-	***	-	***

DENO	MEK	MTK	PEK
MEK	#	-	-
MTK	-	#	-
PEK	-	-	#
PTK	-	-	-

DEN6	MEK	MES	MTK	MTS	PEK	PES	PTK	DEN10	MEK	MES	MTK	MTS	PEK	PES	PTK
MEK	#							MEK	#						
MES	-	#						MES	***	#					
MTK	-	-	#					MTK	-	**	#				
MTS	-	-	-	#				MTS	***	-	**	#			
PEK	-	*	-	*	#			PEK	-	***	-	***	#		
PES	-	-	*	-	*	#		PES	***	-	*	-	***	#	
PTK	-	-	-	-	-	-	#	PTK	-	**	-	*	-	*	#
PTS	*	-	**	-	***	-	**	PTS	***	-	**	*	***	-	**

DEN14	MEK	MES	MTK	MTS	PEK	PES	PTK	DEN18	MEK	MES	MTK	MTS	PEK	PES	PTK
MEK	#							MEK	#						
MES	**	#						MES	***	#					
MTK	-	**	#					MTK	-	***	#				
MTS	***	-	***	#				MTS	***	-	***	#			
PEK	-	-	-	*	#			PEK	-	***	-	**	#		
PES	***	-	***	-	*	#		PES	***	-	***	-	***	#	
PTK	-	-	-	*	-	*	#	PTK	-	***	-	***	-	***	#
PTS	***	-	***	-	*	-	*	PTS	***	-	***	-	***	-	***

Tabulka 8: Výsledky statistického hodnocení **stomatální vodivosti** u *Zea mays* L. a *Vicia faba* L.. Použita byla analýza jednoduchého třídění se vzájemným porovnáním skupin. Hvězdičkami jsou zvýrazněné průkazné rozdíly mezi skupinami ($p < 0,05$). Nejtmavší pole značí rozdíl mezi genotypy, méně tmavé rozdíly v ošetření a nejsvětlejší zvýrazněná pole rozdíly mezi odlišně ošetřenými skupinami.

DENO	23EK	23TK	704EK
23EK	#	-	*
23TK	-	#	**
704EK	*	**	#
704TK	-	*	-

DEN6	23EK	23ES	23TK	23TS	704EK	704ES	704TK	DEN10	23EK	23ES	23TK	23TS	704EK	704ES	704TK
23EK	#							23EK	#						
23ES	-	#						23ES	**	#					
23TK	-	-	#					23TK	-	*	#				
23TS	-	-	-	#				23TS	**	-	**	#			
704EK	-	-	-	-	#			704EK	-	**	-	***	#		
704ES	-	-	-	-	-	#		704ES	-	*	-	*	*	#	
704TK	-	-	-	-	-	-	#	704TK	-	**	-	**	-	-	#
704TS	-	-	-	-	-	-	-	704TS	-	*	-	*	-	-	-

DEN14	23EK	23ES	23TK	23TS	704EK	704ES	704TK	DEN 18	23EK	23ES	23TK	23TS	704EK	704ES	704TK
23EK	#							23EK	#						
23ES	***	#						23ES	*	#					
23TK	-	***	#					23TK	-	-	#				
23TS	***	-	***	#				23TS	**	-	**	#			
704EK	*	***	-	***	#			704EK	-	***	-	***	#		
704ES	-	**	-	***	**	#		704ES	-	-	-	-	***	#	
704TK	-	***	-	***	-	*	#	704TK	-	***	-	***	-	***	#
704TS	-	**	-	***	***	-	*	704TS	*	-	*	-	***	-	***

DENO	MEK	MTK	PEK
MEK	#	-	
MTK	-	#	
PEK	-	-	#
PTK	-	-	-

DEN6	MEK	MES	MTK	MTS	PEK	PES	PTK	DEN10	MEK	MES	MTK	MTS	PEK	PES	PTK
MEK	#							MEK	#						
MES	*	#						MES	***	#					
MTK	-	*	#					MTK	*	***	#				
MTS	**	-	*	#				MTS	***	-	***	#			
PEK	-	**	-	***	#			PEK	-	***	-	***	#		
PES	***	-	**	-	***	#		PES	***	-	***	-	***	#	
PTK	-	*	-	*	-	**	#	PTK	**	***	-	***	-	***	#
PTS	***	-	***	-	***	-	***	PTS	***	-	***	-	***	-	***

DEN14	MEK	MES	MTK	MTS	PEK	PES	PTK	DEN 18	MEK	MES	MTK	MTS	PEK	PES	PTK
MEK	#							MEK	#						
MES	**	#						MES	***	#					
MTK	-	*	#					MTK	-	***	#				
MTS	**	-	**	#				MTS	***	-	***	#			
PEK	-	**	-	**	#			PEK	-	***	-	***	#		
PES	**	-	**	-	**	#		PES	***	-	***	-	***	#	
PTK	-	**	-	***	-	***	#	PTK	-	***	*	***	-	***	#
PTS	**	-	*	-	**	-	**	PTS	***	-	***	-	***	-	***

Tabulka 9: Výsledky statistického hodnocení rychlosti transpirace u *Zea mays* L. a *Vicia faba* L. Použita byla analýza jednoduchého třídění se vzájemným porovnáním skupin. Hvězdičkami jsou zvýrazněné průkazné rozdíly mezi skupinami ($p < 0,05$). Nejtmavší pole značí rozdíl mezi genotypy, méně tmavé rozdíly v ošetření a nejsvětlejší zvýrazněná pole rozdíly mezi odlišně ošetřenými skupinami.

DENO	23EK	23TK	704EK
23EK	#	-	
23TK	-	#	
704EK	-	-	#
704TK	-	-	-

DEN6	23EK	23ES	23TK	23TS	704EK	704ES	704TK	DEN10	23EK	23ES	23TK	23TS	704EK	704ES	704TK
23EK	#							23EK	#						
23ES	-	#						23ES	*	#					
23TK	-	-	#					23TK	-	*	#				
23TS	-	-	-	#				23TS	*	-	*	#			
704EK	-	-	-	-	#			704EK	-	**	-	***	#		
704ES	-	-	-	-	-	#		704ES	-	*	-	*	*	#	
704TK	-	-	-	-	-	-	#	704TK	-	**	-	**	-	-	#
704TS	-	-	-	-	-	-	-	704TS	-	*	-	*	-	-	-

DEN14	23EK	23ES	23TK	23TS	704EK	704ES	704TK	DEN 18	23EK	23ES	23TK	23TS	704EK	704ES	704TK
23EK	#							23EK	#						
23ES	***	#						23ES	*	#					
23TK	-	**	#					23TK	-	*	#				
23TS	***	-	***	#				23TS	**	-	**	#			
704EK	-	***	-	***	#			704EK	-	***	-	***	#		
704ES	-	**	-	***	**	#		704ES	*	-	*	-	***	#	
704TK	-	***	-	***	-	*	#	704TK	-	***	-	***	-	***	#
704TS	*	*	-	***	***	-	***	704TS	**	-	*	-	***	-	***

DENO	MEK	MTK	PEK
MEK	#	-	-
MTK	-	#	-
PEK	-	-	#
PTK	*	-	-

DEN6	MEK	MES	MTK	MTS	PEK	PES	PTK	DEN10	MEK	MES	MTK	MTS	PEK	PES	PTK
MEK	#							MEK	#						
MES	***	#						MES	***	#					
MTK	-	***	#					MTK	-	***	#				
MTS	***	-	***	#				MTS	***	-	***	#			
PEK	-	***	-	***	#			PEK	-	***	-	***	#		
PES	***	-	***	-	***	#		PES	***	-	***	-	***	#	
PTK	-	***	-	***	-	***	#	PTK	-	***	-	***	-	***	#
PTS	***	-	***	-	***	-	***	PTS	***	-	***	-	***	-	***

DEN14	MEK	MES	MTK	MTS	PEK	PES	PTK	DEN 18	MEK	MES	MTK	MTS	PEK	PES	PTK
MEK	#							MEK	#						
MES	***	#						MES	***	#					
MTK	-	***	#					MTK	-	***	#				
MTS	***	-	***	#				MTS	***	-	***	#			
PEK	-	***	-	***	#			PEK	-	***	-	***	#		
PES	***	-	***	-	***	#		PES	***	-	***	-	***	#	
PTK	-	***	-	***	-	***	#	PTK	-	***	*	***	-	***	#
PTS	***	-	***	-	***	-	***	PTS	***	-	***	-	***	-	***

6. Diskuze

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit, zdali má exogenní aplikace 24-epibrassinosteroidu vliv na fyziologické a biochemické parametry rostlin vystavených podmínkám sucha. Dílčím cílem bylo zjistit, jestli existuje mezidruhová a zejména vnitrodruhová variabilita, konkrétně jak se liší reakce na postřik 24-epibrassinolidem u citlivých a odolných genotypů/odrůd k suchu.

Většina prací, která zkoumá vliv brassinosteroidů na rostliny stresované suchem, se zaměřuje pouze na jeden genotyp či odrůdu vybraného druhu a vnitrodruhové variabilitě věnuje pozornost pouze minimum studií (seznam dostupných článků viz **Tabulka 1**). Proto jsem se ve své diplomové práci rozhodla posoudit vnitrodruhovou variabilitu u dvou rostlinných druhů pěstovaných ve srovnatelných podmínkách stresu suchem a po ošetření 24-epibrassinosteroidem. Abych obsáhla co největší spektrum fyziologických a biochemických změn v rostlinách, vybrala jsem pro studium parametry, které dobře charakterizují důležité funkce a stav rostliny. Pomocí gazometrie jsem zhodnotila rychlost čisté fotosyntézy, transpirace a vodivost průduchů. Dále jsem se zaměřila na vodní režim rostliny a stanovila osmotický potenciál listu a obsah prolinu, který má mimo jiné i antioxidační funkci. Poškození buněk jsem charakterizovala pomocí indexu poškození membrán a obsahu malondialdehydu.

6.1. Gazometrické veličiny

Všechny gazometrické veličiny byly nejvíce ovlivněny probíhající stresovou periodou. Sucho způsobilo pokles rychlosti čisté fotosyntézy, transpirace a vodivosti u bobu již na samém začátku stresu, u kukuřice byly patrné rozdíly mezi kontrolními a stresovanými rostlinami až v pozdějších dnech.

Vliv 24-epibrassinolidu na rychlost čisté fotosyntézy nebyl ani u kukuřice ani u bobu zaznamenán, ačkoliv studie potvrzující jejich pozitivní vliv u různých rostlinných druhů včetně kukuřice jsou známy (Saraim 1994a, Saraim 1994b, Zhang *et al.* 2008, Farooq *et al.* 2009, Fariduddin *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2010, Yuan *et al.* 2010, Anjum *et al.* 2011, Hu *et al.* 2013, Lal *et al.* 2013). Vliv neprokázali pouze Rajasekaran a Blake (1999) u *Pinus*

banksiana Lamb., ale v této studii byly brassinosteroidy aplikovány injekčně do xylému stromu a tak data nelze adekvátně porovnat. Příčinou odlišných výsledků může být zejména značná mezidruhová a vnitrodruhová variabilita, kterou jsem předpokládala a prokázala a která rovněž vyplývá z publikovaných prací (**Tabulka 1**). Studie se liší organizací pokusů, zejména délkou stresové periody, vývojovou fází pokusných rostlin, způsobem aplikace brassinosteroidů a jejich koncentrací a tyto podmínky mohou mít významný vliv na konečné výsledky.

Podobné výsledky jako v případě rychlosti čisté fotosyntézy byly zjištěny i u rychlosti transpirace - exogenní aplikace 24-epibrassinolidu před stresovou periodou neměla u kukuřice ani bobu na rychlost transpirace žádný zjevný efekt. Dostupná literatura na toto téma není jednotná. Například Li *et al.* (2008) nezaznamenali žádný vliv brassinosteroidu na rostliny *Robinia pseudoacacia* L. pěstované v mírném stresu (55% FWC) a k podobným výsledkům došel i Rajasekaran a Blake (1999). Naproti tomu jiní autoři potvrdili zvýšení rychlosti transpirace po aplikaci brassinosteroidů (Saraim 1994, Farooq *et al.* 2010, Anjum *et al.* 2011, Hu *et al.* 2013, Lal *et al.* 2013), další naopak její významné snížení (Xu *et al.* 1994, Li a van Staden 1998, Li *et al.* 2008, Farooq *et al.* 2009).

Na stomatální vodivost u rostlin pěstovaných v podmínkách sucha neměla aplikace 24-epibrassinolidu žádný vliv. Zvýšená vodivost průduchů byla zjištěna pouze ojediněle u rostlin ošetřených 24-epibrassinolidem a pěstovaných v kontrolních podmínkách. K podobným závěrům došli Anjum *et al.* (2011) u *Zea mays* L., kteří nepotvrdili průkazný vliv brassinosteroidu na stomatální vodivost. V literatuře jsou však opět publikovány protichůdné výsledky u mnoha rostlinných druhů. Některé práce publikují zvýšenou stomatální vodivost u ošetřených rostlin pěstovaných v suchu (Fariduddin *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2010, Hu *et al.* 2013, Lal *et al.* 2013), jiné pokles (Farooq *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2010). Snížení vodivosti průduchů v podmínkách sucha a její případné změny navozené aplikací brassinosteroidů mohou mít v konečném důsledku pozitivní i negativní vliv na významné procesy rostlin ovlivňující jejich růst a výslednou produktivitu. Změna stomatální vodivosti mění rychlost výměny plynů, což může být za konkrétních podmínek pro rostliny jak výhodné (pokles ztráty vody v podmínkách sucha), tak nevýhodné (pokles rychlosti fotosyntézy). Naše výsledky neprokázaly změny stomatální vodivosti ani změny procesů, které by mohly být tímto způsobem následně ovlivněny.

6.2. Osmotický potenciál

Hodnoty osmotického potenciálu se u obou studovaných druhů v průběhu experimentu, zejména vlivem nastupujícího sucha, výrazně měnily. Dehydratace pletiva, která způsobuje snížení osmotického potenciálu, se u obou druhů projevila zhruba v polovině stresové periody. Dále byla u linií kukuřice patrná významná vnitrodruhová variabilita - linie CE704 dosahovala vyšších hodnot osmotického potenciálu při pěstování v kontrolních i stresových podmínkách ve srovnání s linií 2023. U bobu byly zřejmé rozdíly mezi genotypy pouze u rostlin pěstovaných v optimálních podmínkách, v suchu rozdíly mezi odrůdami nebyly jednotné a v průběhu stresu kolísaly.

Efekt exogenní aplikace 24-epibrassinolidu byla u kukuřice v počátečních fázích stresu spíše negativní. S prodlužující se délkou stresu je zřejmý opačný trend a stresované rostliny ošetřené pouze kontrolním postřikem vykazovaly větší snížení potenciálu v porovnání s rostlinami po aplikaci 24-epibrassinolidu, nicméně rozdíly jsou statisticky neprůkazné. Podobné výsledky publikovali i Farooq *et al.* (2009, 2010) u rostlin *Oryza sativa* L. Rostliny ve stejné vývojové fázi jako kukuřice a postříkané brassinolidem o shodné koncentraci 10^{-8} M dosahovaly po vystavení 4 až 16 dnům sucha taktéž vyšších hodnot osmotického potenciálu v porovnání s rostlinami neošetřenými. Autoři uvádějí, že exogenní aplikace brassinosteroidů může napomáhat udržení vody v pletivech aktivací a regulací procesů počínaje genovou expresí.

Vliv 24-epibrassinolidu na osmotický potenciál bobu za stresových podmínek se projevilo pouze výjimečně. Rostliny odrůdy Merkur ošetřené 24-epibrassinolidem dosahovaly v pokročilé fázi stresu průkazně vyšších hodnot osmotického potenciálu. Studie na toto téma u dvouděložných rostlin neexistují. Pouze práce zkoumající vliv brassinosteroidu na vodní potenciál *Glycine max* L. (po přerušení závlivy na 7 dní) potvrzuje jeho pozitivní efekt (Zhang *et al.* 2008). Jelikož je za sucha nejvýznamnější složkou vodního potenciálu právě potenciál osmotický, můžeme je hodnotit rovnocenně. Nižší ztráta vody u stresovaných rostlin po aplikaci brassinosteroidů může pozitivně ovlivnit další významné procesy v rostlině, zejména fotosyntézu, obsah fotosyntetických pigmentů a další, což se v konečném důsledku může projevit na snížení negativního efektu sucha až na úrovni

konečného výnosu. Z našich výsledků sice nebyl patrný vztah mezi snížením ztráty vody po aplikaci 24-epibrassinolidu a fotosyntézou, ovšem i samotný pokles ztráty vody u stresovaných rostlin je pro jejich další růst a vývoj jistě významný.

6.3. Obsah prolinu

Obsah prolinu stoupal u obou rostlinných druhů zejména vlivem sucha. Vyšším obsahem prolinu reagovaly na sucho linie a odrůdy odolnější k suchu. Až na konci stresové periody citlivější stresovaná linie kukuřice 2023 dosahovala vyššího obsahu prolinu než odolnější CE704. U bobu došlo s pokračujícím suchem k několikanásobnému zvýšení obsahu prolinu a vnitrodruhové rozdíly nebyly patrné.

Vliv brassinolidu na obsah prolinu se u kukuřice podařilo prokázat v době nejdelšího stresu. Citlivá linie 2023 ošetřená 24-epibrassinolidem dosahovala průkazně vyššího obsahu prolinu v porovnání se stejně pěstovanou linií ošetřenou kontrolním postřikem. Zvýšení obsahu prolinu u kukuřice zaznamenali i Anjum *et al.* (2011), kteří pěstovali rostliny za srovnatelných podmínek. Ve srovnání s kukuřicí se obsah prolinu u bobu měnil v důsledku aplikace brassinosteroidu na stresované rostliny odlišně. Vliv brassinolidu se projevil hlavně u odolnější odrůdy Merkur, avšak rostliny po aplikaci 24-epibrassinolidu vykazovaly nižší hodnoty prolinu než rostliny neošetřené. U citlivé odrůdy nebyly průkazné rozdíly mezi rostlinami odlišně ošetřenými. Výsledky zjištěné u odolné odrůdy bobu neodpovídají údajům v literatuře, kde u rostlin stresovaných suchem a ošetřených brassinosteroidy ve srovnání s neošetřenými rostlinami byl opakovaně pozorován vyšší obsah prolinu (Vardhini a Rao 2003, Li *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2008, Behnamnia 2009a, Behnamnia 2009b, Fariduddin *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2009, Mousavi *et al.* 2010, Li a Feng. 2011, Li *et al.* 2012, Mahesh *et al.* 2013, Alyemeni *et al.* 2014). S výjimkou jedné práce (Vardhini a Rao 2003) však autoři neporovnávali tolerantní a citlivé genotypy rostlin.

6.4. Poškození buněk

Prvním parametrem, kterým jsem charakterizovala poškození buněk rostlin, bylo procentuální vyjádření poškození membrán pomocí stanovení množství vylitého elektrolytu z buněk listového pletiva.

Nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím poškození buněk bylo podle očekávání sucho. U bobu, konkrétně u citlivé odrůdy Piešťanský, byl zřejmý vliv sucha již ode dne 10. Oproti tomu kukuřice vykazovala známky poškození až v pozdějším stádiu stresu. Avšak na konci stresové periody dosahovaly linie kukuřice vyššího poškození než odrůdy bobu. U obou zvolených druhů citlivější linie/odrůdy reagovaly na sucho vyšším nárůstem poškození membrán.

Vliv ošetření na rostliny kukuřice a bobu pěstované v kontrolních podmínkách nebyl patrný ani v jednom případě. K podobným výsledkům došli i Mousavi *et al.* (2009) u *Brassica napus* L., ačkoliv většina autorů uvádí významné snížení poškození membrán u rostlin pěstovaných v optimálních podmínkách po aplikaci brassinosteroidu (Saraim 1994b, Li a van Staden 1997, Lia van Staden 1998, Zhang *et al.* 2008, **Tabulka 1**).

Vliv ošetření na rostliny vystavené suchu jsem pozorovala u obou druhů, efekt byl rozdílný a rozdílná byla i reakce odlišně citlivých genotypů obou druhů. Odolná linie kukuřice CE704 dosahovala po déletrvajícím období sucha průkazně vyššího poškození membrán po aplikaci 24-epibrassinolidu, zatímco u citlivější linie 2023 došlo spíše k předpokládanému snížení poškození. Vliv brassinosteroidů na poškození membrán kukuřice po vystavení rostlin suchu je v literatuře popsán pouze výjimečně (Li a van Staden 1997, 1998). Autoři uvádějí významné snížení poškození membrán po aplikaci brassinosteroidů, a to jak u citlivé tak odolné linie. Jako simulant sucha zvolili PEG a odlišné podmínky navození stresu suchem od běžného postupného vysychání, které jsem zvolila v našich pokusech, může být příčinou částečně odlišných výsledků. U bobu byl významný vliv 24-epibrassinolidu na stresované rostliny zaznamenán pouze u citlivé odrůdy Piešťanský. Rostliny odrůdy Piešťanský ošetřené 24-epibrassinolidem dosahovaly průkazně vyššího poškození než rostliny ošetřené kontrolním postřikem (den 10, 14). Tento negativní efekt na poškození membrán v literatuře není popsán, nicméně většina autorů popisuje u různých druhů vliv brassinosteroidů na rostliny vystavené mnohem kratšímu stresu, než

jakému byly vystaveny rostliny kukuřice, u kterých jsem prokázala negativní vliv brassinosteroidu (Saraim 1994b, Zhang *et al.* 2008, Farooq *et al.* 2009, Mousavi *et al.* 2009, Farooq *et al.* 2010).

Dalším parametrem, který se velmi často používá jako indikátor peroxidace lipidů a oxidativního poškození, je obsah malondialdehydu v listu. Obsah malondialdehydu jsem stanovila až po ukončení stresové periody.

Z výsledků stanovení obsahu malondialdehydu u kukuřice a bobu jsou jasně patrné mezidruhové rozdíly. U obou druhů je zřejmý vliv sucha na rostliny. U bobu jsou tyto rozdíly v pěstování významné, a ačkoliv se hodnoty malondialdehydu u kukuřice pohybují v širokém rozmezí, kvůli velkým odchylkám hodnot průkazné nejsou.

Aplikace 24-epibrassinolidu na rostliny kukuřice pěstované v kontrolních podmínkách vedla k mírnému, ale neprůkaznému poklesu obsahu malondialdehydu. Anjum *et al.* (2011), kteří taktéž měřili obsah MDA u kukuřice, prokázali jeho významné snížení.

Efekt postřiku na množství malondialdehydu na rostliny vystavených suchu byl zřejmý u obou druhů, ale statisticky potvrzen nebyl ani v jednom případě. Citlivější linie/odrůdy reagovaly mírným snížením obsahu malondialdehydu po aplikaci 24-epibrassinolidu, u kukuřice byl patrný podobný trend i u odolné linie CE704. Tyto závěry, ač neprůkazné, zcela odpovídají většině dostupné literatury, kde ale rozdíly byly statisticky významné (Li a van Staden 1997, Li 1998, Li 2008, Zhang 2008, Behnamnia 2009a, Behnamnia 2009b, Farooq 2009, Mousavi 2009, Farooq 2010 Yuan 2010, Anjum 2011, Li a Feng 2011, Li 2012, Mahesh 2013, **Tabulka 1**).

Efekt 24-epibrassinolidu na studované parametry charakterizující poškození rostlin během stresu nebyl jednotný. Zatímco aplikace 24-epibrassinolidu mírně zvyšovala poškození membrán, obsah malondialdehydu spíše snižovala a tím zmírnila poškození rostlin nedostatkem sucha.

6.5. Závěr

Z dostupné literatury i z výsledků mých experimentů na kukuřici a bobu je zřejmé, že vliv brassinosteroidů na rostliny pěstované v podmínkách sucha není jednoznačný a v odpovědi rostlin existuje značná variabilita.

Efekt 24-epibrassinolidu na gazometrické parametry jsem neprokázala, nicméně práce zabývající se hodnocením, zejména rychlosti transpirace a stomatální vodivosti, došly taktéž k nejednoznačným výsledkům.

U dalších měřených parametrů jsem pozorovala vnitrodruhovou variabilitu v odpovědi na aplikaci 24-epibrassinolidu u rostlin pěstovaných v podmínkách sucha i přesto, že v řadě případů nebyly zjištěné rozdíly statisticky průkazné. Zatímco u citlivé linie kukuřice měl v případě zjištěných rozdílů 24-epibrassinolid spíše pozitivní vliv, odolná linie buď na aplikaci 24-epibrassinolidu nereagovala, nebo byla její reakce spíše negativní. U bobu byl efekt méně jednoznačný. S výjimkou obsahu MDA, který je indikátorem peroxidace lipidů, bylo u citlivé odrůdy patrné větší poškození po aplikaci 24-epibrassinolidu posuzované podle parametrů indexu poškození membrán a osmotického potenciálu. U odolnější odrůdy dosahovaly rostliny po aplikaci brassinosteroidů spíše lepších výsledků (nižší obsah prolinu a vyšší osmotický potenciál) v porovnání s rostlinami neošetřenými a pěstovanými za stejných stresových podmínek.

Přesto, že výsledky předložené práce nepřinesly jednoznačné závěry, ukázaly, že v odpovědi rostlin na stres suchem a aplikaci 24-epibrassinolidu existují vnitrodruhové rozdíly. Podobně zaměřené práce porovnávající rozdíly mezi různými genotypy jsou prozatím spíše výjimečné. Rozdíly mezi genotypy byly zkoumány pouze u tří rostlinných druhů (*Sorghum vulgare* L., *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., **Tabulka 1**) a u dvou z nich byla potvrzena vnitrodruhová variabilita. Zároveň bylo prokázáno, že odolnější genotyp vystavený suchu reaguje na aplikaci brassinosteroidů významněji a celkově dochází k prohloubení odolnosti k suchu (Li a van Staden 1998a, Li a van Staden 1998b, Li *et al.* 1998, Rao *et al.* 2011). Zatímco na citlivou linii mají brassinosteroidy v některých případech negativní (Li a van Staden 1998a, Li a van Staden 1998b), mírně pozitivní (Rao *et al.* 2011) nebo žádný vliv (Li *et al.* 1998).

Z výše uvedeného je zřejmé, že studium variability uvnitř odlišných druhů v souvislosti s posouzením vlivu brassinosteroidů na konečnou odpověď rostlin vystavených stresu suchem je zásadní pro vysvětlení některých rozporných nebo zdánlivě rozporných výsledků.

7. Souhrn

- Citlivé i odolné linie kukuřice (*Zea mays* L.) a odrůdy bobu (*Vicia faba* L.) reagovaly na stres suchem snížením rychlosti fotosyntézy a transpirace, vodivosti průduchů a osmotického potenciálu a zvýšením indexu poškození membrán, obsahu prolinu a malondialdehydu. Rostliny bobu reagovaly na podmínky sucha časněji, avšak v době nejdelší stresové periody dosahovaly většinou lepších výsledků než rostliny kukuřice.
- Nebyla zjištěna jednoznačná závislost v reakci rostlin pěstovaných v podmínkách stresu suchem a v kontrolních podmínkách na exogenní aplikaci 24-epibrassinolidu. Efekt brassinosteroidu se průkazně projevil spíše výjimečně, ale v těchto případech jsem pozorovala výraznější reakci u rostlin stresovaných suchem ve srovnání s rostlinami pěstovanými v kontrolních podmínkách.
- V reakci rostlin na aplikaci 24-epibrassinolidu jsem pozorovala vnitrodruhovou variabilitu, ale reakce citlivých a tolerantních linií/odrůd nebyla jednoznačná a lišila se v závislosti na studovaném parametru a podmínkách pěstování rostlin.

8. Seznam použité literatury

- Abbate, P.E., Dardanelli, J.L., Cantarero, M.G., Maturano, M., Melchior, R., and Suero, E. (2004). Climatic and water availability effects on water-use efficiency in wheat. *Crop Sci.* 44, 474–483.
- Ábrahám, E., Rigó, G., Székely, G., Nagy, R., Koncz, C., and Szabados, L. (2003). Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 51, 363–372.
- Acar, O., Türkan, I., and Özdemir, F. (2001). Superoxide dismutase and peroxidase activities in drought sensitive and resistant barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Acta Physiol. Plant* 23, 351–356.
- Ali, Q., Athar, H., and Ashraf, M. (2008). Modulation of growth, photosynthetic capacity and water relations in salt stressed wheat plants by exogenously applied 24-epibrassinolide. *Plant Growth Regul.* 56, 107–116.
- Alyemeni, M.N., and Al-Quwaiz, S.M. (2014). Effect of 28-homobrassinolide on the drought induced changes in the seeds of *Vigna Radiata*. *Legume Res.* 37, 515–519.
- Anjum, S.A., Wang, L.C., Farooq, M., Hussain, M., Xue, L.L., and Zou, C.M. (2011). Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange: Brassinolide improves drought tolerance in maize. *J. Agron. Crop Sci.* 197, 177–185.
- Asana, R.D., and Saini, A.D. (1958). Studies in physiological analysis of yield. 4. The influence of soil drought on grain development, photosynthetic surface and water content of wheat. *Physiol. Plant.* 11, 666–674.
- Bandurska, H. (2000). Does proline accumulated in leaves of water deficit stressed barley plants confine cell membrane injury? I. Free proline accumulation and membrane injury index in drought and osmotically stressed plants. *Acta Physiol Plant* 22, 409–415.
- Bartoli, C.G., Simontacchi, M., Tambussi, E., Beltrano, J., Montaldi, E., and Puntarulo, S. (1999). Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *J. Exp. Bot.* 50, 375–383.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Behnamnia, M., Kalantari, K.M., and Rezanejad, F. (2009a). Exogenous application of brassinosteroid alleviates drought-induced oxidative stress in *Lycopersicon esculentum* L. *Gen. Appl. Plant Physiol.* 35, 22–34.
- Behnamnia, M., Kalantari, K.M., and Ziaie, J. (2009b/12/14). The effects of brassinosteroid on the induction of biochemical changes in *Lycopersicon esculentum* under drought stress. *Turk. J. Bot.* 33, 417–428.
- Björkman, O., and Demmig, B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489–504.

- van den Boogaard, R., de Boer, M, Veneklaas, EJ, and Lambers, H (1996). Relative growth rate, biomass allocation pattern and water use efficiency of three wheat cultivars during early ontogeny as dependent on water availability. *Physiol. Plant.* *98*, 493–504.
- Du, Z., and Bramlage, W.J. (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J. Agric. Food Chem.* *40*, 1566–1570.
- Hafid, R. El, Smith, D.H., Karrou, M., and Samir, K. (1998). Root and shoot growth, water use and water use efficiency of spring durum wheat under early-season drought. *Agronomie* *18*, 181–195.
- Estrada-Campuzano, G., Miralles, D.J., and Slafer, G.A. (2008). Genotypic variability and response to water stress of pre- and post-anthesis phases in triticale. *Eur. J. Agron.* *28*, 171–177.
- Fariduddin, Q., Khanam, S., Hasan, S.A., Ali, B., Hayat, S., and Ahmad, A. (2009). Effect of 28-homobrassinolide on the drought stress-induced changes in photosynthesis and antioxidant system of *Brassica juncea* L. *Acta Physiol. Plant.* *31*, 889–897.
- Farooq, M., Wahid, A., Basra, S.M.A., and Islam-ud-Din (2009). Improving water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress. *J. Agron. Crop Sci.* *195*, 262–269.
- Farooq, M., Wahid, A., Lee, D.-J., Cheema, S.A., and Aziz, T. (2010). Comparative time course action of the foliar applied glycinebetaine, salicylic acid, nitrous oxide, brassinosteroids and spermine in improving drought resistance of rice. *J. Agron. Crop Sci.* *196*, 336–345.
- Feng, Z., Guo, A., and Feng, Z. (2003). Amelioration of chilling stress by triadimefon in cucumber seedlings. *Plant Growth Regul.* *39*, 277–283.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., and Scott, I.M. (1997). Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* *100*, 241–254.
- Fridrichová, L., Jelénková, Iva, Holá, D., Kočová, M., Rothová, O., Trubanová, N., Panchártek, D., Seňková, J., and Palovská, M. (2012). Odezva bobu obecného (*Vicia faba* L.) na nedostatek vody a ošetření 24-epibrassinolidem. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2012 (Recenzovaný sborník příspěvků), (Praha, Česká republika: Česká zemědělská univerzita v Praze), pp. 115–119.
- Fujii, S., and Saka, H. (2001). Distribution of assimilates to each organ in rice plants exposed to a low temperature at the ripening stage, and the effect of brassinolide on the distribution. *Plant Prod. Sci.* *4*, 136–144.
- Gomes, M. de M. de A., Torres Netto, A., Campostrini, E., Bressan-Smith, R., Zullo, M.A.T., Ferraz, T.M., Siqueira, L. do N., Leal, N.R., and Núñez-Vázquez, M. (2013). Brassinosteroid analogue affects the senescence in two papaya genotypes submitted to drought stress. *Theor. Exp. Plant Physiol.* *25*, 186–195.
- Hatami, M., and Ghorbanpour, M. (2014). Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nanosilver application and dark storage. *Turk. J. Biol.* *38*, 130–139.
- Heath, R.L., and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* *125*, 189–198.

- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., and Prange, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604–611.
- Holá, D., Rothová, O., Kočová, M., Kohout, L., and Kvasnica, M. (2010). The effect of brassinosteroids on the morphology, development and yield of field-grown maize. *Plant Growth Regul.* 61, 29–43.
- Hsiao, T.C. (1973). Plant responses to water stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 24, 519–570.
- Hu, W., Yan, X., Xiao, Y., Zeng, J., Qi, H., and Ogwen, J.O. (2013). 24-Epibrassinosteroid alleviate drought-induced inhibition of photosynthesis in *Capsicum annuum*. *Sci. Hortic.* 150, 232–237.
- Hussain, M., Malik, M.A., Farooq, M., Ashraf, M.Y., and Cheema, M.A. (2008). Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. *J. Agron. Crop Sci.* 194, 193–199.
- Chen, K.M., Gong, H.J., Wang, S.M., and Zhang, C.L. (2007). Antioxidant defense system in *Phragmites communis Trin.* ecotypes. *Biol. Plant.* 51, 754–758.
- Issam, N., Kawther, M., Haythem, M., and Moez, J. (2012). Effects of CaCl₂ pretreatment on antioxidant enzyme and leaf lipid content of faba bean (*Vicia faba* L.) seedlings under cadmium stress. *Plant Growth Regul.* 68, 37–47.
- Jager, C.E., Symons, G.M., Ross, J.J., and Reid, J.B. (2008). Do brassinosteroids mediate the water stress response? *Physiol. Plant.* 133, 417–425.
- Jain, M., Mathur, G., Koul, S., and Sarin, N. (2001). Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep* 20, 463–468.
- Jiménez, A., Hernández, J.A., del Rio, L.A., and Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114, 275–284.
- Kagale, S., Divi, U.K., Krochko, J.E., Keller, W.A., and Krishna, P. (2007). Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* 225, 353–364.
- Kaiser, W.M. (1979). Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* 145, 377–382.
- Kaiser, W.M. (1987). Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiol. Plant.* 71, 142–149.
- Kamal, M., Takahashi, H., Mikoshiba, H., and Ota, Y. (1995). Analysis of soybean yield components as affected by plant growth regulators applied at flowering stages. *Jpn. J. Trop. Agric.* 39, 184–189.
- Kanematsu, S., and Asada, K. (1990). Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-Superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant Cell Physiol.* 31, 99–112.

- Kuklíková, R. (2011). Reakce různých genotypů *Zea mays* L. a *Vicia faba* L. ošetřených brassinosteroidy na působení vodního deficit, diplomová práce (Praha: Univerzita Karlova v Praze).
- Lal, S., Bagdi, D.L., Kakralya, B.L., Jat, M.L., and Sharma, P.C. (2013). Role of brassinolide in alleviating the adverse effect of drought stress on physiology, growth and yield of green gram (*Vigna radiata* L.) genotypes. *Legume Res.* 36, 359–363.
- Lawlor, D.W. (2002). Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: Stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Ann Bot* 89, 871–885.
- Lazaridou, M., and Koutroubas, S.D. (2004). Drought effect on water use efficiency of berseem clover at various growth stages. Sborník příspěvků, (4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia)
- Li, K.R., and Feng, C.H. (2011). Effects of brassinolide on drought resistance of *Xanthoceras sorbifolia* seedlings under water stress. *Acta Physiol. Plant.* 33, 1293–1300.
- Li, L., and van Staden, J. (1998a). Effects of plant growth regulators on drought resistance of two maize cultivars. *S. Afr. J. Bot.* 64, 116–120.
- Li, L., and van Staden, J. (1998b). Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in callus of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regul.* 24, 55–66.
- Li, K.R., Wang, H.H., Han, G., Wang, Q.J., and Fan, J. (2008). Effects of brassinolide on the survival, growth and drought resistance of *Robinia pseudoacacia* seedlings under water-stress. *New Forests* 35, 255–266.
- Li, L., van Staden, J., and Jäger, A. (1998). Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regul.* 25, 81–87.
- Li, Y.H., Liu, Y.J., Xu, X.L., Jin, M., An, L.Z., and Zhang, H. (2012a). Effect of 24-epibrassinolide on drought stress-induced changes in *Chorispora bungeana*. *Biol. Plant.* 56, 192–196.
- Li, Z., Peng, Y., and Ma, X. (2012b). Different response on drought tolerance and post-drought recovery between the small-leafed and the large-leafed white clover (*Trifolium repens* L.) associated with antioxidative enzyme protection and lignin metabolism. *Acta Physiol. Plant.* 35, 213–222.
- Liang, Y., Chen, Q. i. n., Liu, Q., Zhang, W., and Ding, R. (2003). Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.* 160, 1157–1164.
- Mahesh, K., Balaraju, P., Ramakrishna, B., and Ram Rao, S.S. (2013). Effect of brassinosteroids on germination and seedling growth of radish (*Raphanus sativus* L.) under PEG-6000 induced water stress. *Am. J. Plant Sci.* 04, 2305–2313.
- Maxwell, K., and Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G., and Foyer, C.H. (1996). Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letters* 378, 203–206.

- Meir, S., Philosoph-Hadas, S., and Aharoni, N. (1992). Ethylene-increased accumulation of fluorescent lipid-peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* *117*, 128–132.
- Mousavi, E.A., Manochehri, K.K., and Jafari, S.R (2009). Change of some osmolytes accumulation in water-stressed colza (*Brassica napus* L.) as affected by 24-epibrassinolide. *Iran. J. Sci. Technol.* *33*, 1–11.
- Nerd, and Nobel (1991). Effects of drought on water relations and nonstructural carbohydrates in cladodes of *Opuntia ficus-indica*. *Physiol. Plant.* *81*, 495–500.
- Noctor, G., and Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *49*, 249.
- Núñez, M., Mazzafera, P., Mazorra, L.M., Siqueira, W.J., and Zullo, M. a. T. (2003). Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. *Biol. Plant.* *47*, 67–70.
- Petzold, U., Peschel, S., Dahse, I., and Adam, G. (1992). Stimulation of source-applied ¹⁴C sucrose export in *Vicia faba* plants by brassinosteroids, GA₃ and IAA. *Acta Bot. Neerl.* *41*, 469–479.
- Premachandra, G.S., Saneoka, H., and Ogata, S. (1990). Evaluation of polyethylene glycol test for measuring cell membrane stability in maize. *J. Agron. Crop Sci.* *164*, 131–136.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule J., and Šebánek J. (1999). *Fyziologie rostlin* (Academia, Praha).
- Rajasekaran, L.R., and Blake, T.J. (1999). New plant growth regulators protect photosynthesis and enhance growth under drought of jack pine seedlings. *J. Plant Growth Regul.* *18*, 175–181.
- Ramos, M.L.G., Gordon, A.J., Minchin, F.R., Sprent, J.I., and Parsons, R. (1999). Effect of water stress on nodule physiology and biochemistry of a drought tolerant cultivar of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann Bot* *83*, 57–63.
- Rao, S.R., Vardhini, B.V., and Sujatha, E. (2011). Brassinosteroids: alleviation of water stress in certain enzymes of Sorghum seedlings. *J. Phytol.* *3*, 2075–6240.
- Rodríguez, C.M.R., Zullo, M.A.T., Queiroz, H.M., de Azevedo, M. de B.M., Becerra, E.A., and Manchado, F.C. (2006). The preparation of the spirostanoic analogues of brassinolide and castasterone. *Pol. J. Chem.* *80*, 637–646.
- Sairam, R.K. (August 1994a). Effect of homobrassinolide application on metabolic activity and grain yield of wheat under normal and water-stress condition. *Z. Acker- Pflanzenbau* *173*, 11–16.
- Sairam, R.K. (1994b). Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varieties. *Plant Growth Regul.* *14*, 173–181.
- Samarah, N.H. (2005). Effects of drought stress on growth and yield of barley. *Agron. Sustainable Dev.* *25*, 145–149.

- Saradhi, P.P., Alia, Arora, S., and Prasad, K.V.S.K. (1995). Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *209*, 1–5.
- Serraj, R., Sinclair, T.R., and Purcell, L.C. (1999). Symbiotic N₂ fixation response to drought. *J. Exp. Bot.* *50*, 143–155.
- Schützendübel, A., and Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* *53*, 1351–1365.
- Siddiqui, M.H., Whaibi, M.H. Al-, Sakran, A.M., Basalah, M.O., and Ali, H.M. (2012). Effect of calcium and potassium on antioxidant system of *Vicia faba* L. under cadmium stress. *Int. J. Mol. Sci.* *13*, 6604–6619.
- Singh, J., Nakamura, S., and Ota, Y. (1993). Effect of epibrassinolide on gram (*Cicer arietinum*) plants grown under water-stress in juvenile stage. *Indian J. Agric. Sci.* *63*, 395–397.
- Sinnhuber, and Yu, T.C. (1958). 2-Thiobarbituric acid method for measurement of rancidity in fishery products 2. The quantitative determination of malonaldehyde. *Inst Food Technologists, Chicago* *12*, 9–12.
- Smirnoff, N. (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* *78*, 661–669.
- Sochr, J., Cinkova, K., and Svorc, L. (2014). Degradation markers in nutritional products. *Austin J. Anal. Pharm. Chem.* *1*, 1005.
- Sullivan, C.Y. (1972). Mechanisms of heat and drought resistance in grain *Sorghum* and methods of measurement. *Sorghum in Seventies*, Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi.
- Takahashi, M., and Asada, K. (1983). Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.* *226*, 558–566.
- Takematsu, T., and Takeuchi, Y. (1989). Effects of brassinosteroids on growth and yields of crops. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B-Phys. Biol. Sci.* *65*, 149–152.
- Tausz, M., Šircelj, H., and Grill, D. (2004). The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *J. Exp. Bot.* *55*, 1955–1962.
- Upreti, K.K., and Murti, G.S.R. (2004). Effects of brassinosteroids on growth, nodulation, phytohormone content and nitrogenase activity in French bean under water stress. *Biol. Plant.* *48*, 407–411.
- Vardhini, B.V., and Ram Rao, S.S. (1999). Effect of brassinosteroids on nodulation and nitrogenase activity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Growth Regul.* *28*, 165–167.
- Vardhini, B.V., and Rao, S.S.R. (2003). Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. *Plant Growth Regul.* *41*, 25–31.
- Verma, S., and Dubey, R.S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* *164*, 645–655.

- Wang, H.L., Lee, P.D., Liu, L.F., and Su, J.C. (1999). Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures. *Bot. Bul. Acad. Sin.* *40*, 219–225.
- Wang, Z., Zheng, P., Meng, J., and Xi, Z. (2015). Effect of exogenous 24-epibrassinolide on chlorophyll fluorescence, leaf surface morphology and cellular ultrastructure of grape seedlings (*Vitis vinifera* L.) under water stress. *Acta Physiol. Plant* *37*, 1–12.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., van Montagu, M., Inze, D., and van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *Embo J.* *16*, 4806–4816.
- Xu, H., Shida, A., Futatsuya, F., and Kumura, A. (1994). Effects of epibrassinolide and abscisic-acid on Sorghum plants growing under soil-water deficit. 1. Effects on growth and survival. *Jpn. J. Crop Sci.* *63*, 671–675.
- Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Zhu, Q., and Wang, W. (2001). Remobilization of carbon reserves in response to water deficit during grain filling of rice. *Field Crops Research* *71*, 47–55.
- Yokota, A., Kawasaki, S., Iwano, M., Nakamura, C., Miyake, C., and Akashi, K. (2002). Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon. *Ann Bot* *89*, 825–832.
- Yuan, G.-F., Jia, C.-G., Li, Z., Sun, B., Zhang, L.-P., Liu, N., and Wang, Q.-M. (2010). Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. *Sci. Hortic.* *126*, 103–108.
- Zhang, M., Zhai, Z., Tian, X., Duan, L., and Li, Z. (2008). Brassinolide alleviated the adverse effect of water deficits on photosynthesis and the antioxidant of soybean (*Glycine max* L.). *Plant Growth Regul.* *56*, 257–264.
- Zlatev, Z.S., Lidon, F.C., Ramalho, J.C., and Yordanov, I.T. (2006). Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biol Plant* *50*, 389–394.
- Zwiazek, J., and Blake, T. (1990). Effects of preconditioning on electrolyte leakage and lipid composition in black spruce (*Picea mariana*) stressed with polyethylene glycol. *Physiol. Plant.* *79*, 71–77.