

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Iva Jelénková

Analýza antioxidačních systémů, morfologických a fyziologických parametrů u dvou odrůd bobu (*Vicia faba* L.) během stresu suchem

Analysis of antioxidant systems, morphological and physiological parameters in two faba bean (*Vicia faba* L.) cultivars during drought stress

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Marie Kočová, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 6. 5. 2013

Podpis

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Marii Kočové, CSc., jejíž neutuchající ochota a elán mi pomáhaly nejen při psaní a zdokonalování vlastního textu, ale především mi dodávaly sílu a naději, že to zvládnou, a jejíž přístup k práci je mi vzorem a velkou motivací.

Můj obrovský dík patří také Lence Tůmové, bez jejíž pomoci, rad a odpovědí na nesčetné množství otázek by moje diplomová práce jen těžko vznikla.

Dále děkuji všem, kteří mi pomáhali s pokusy a to především RNDr. Daně Holé Ph.D., RNDr. Olze Rottové a ostatním kolegům z Genetické zahrady.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému partnerovi za jeho trpělivost a podporu a svým rodičům, kterým jsem vděčná především za to, že jsem vůbec měla možnost studovat.

Abstrakt

Objasnění fyziologických a biochemických mechanismů souvisejících s odolností rostlin vůči suchu je zásadní pro šlechtění výnosných odolných rostlin, které budou dobře snášet i tyto nepříznivé podmínky prostředí. Stres suchem může vést k oxidativnímu poškození, které navozuje vážné poruchy fyziologických a biochemických procesů v rostlinách a jehož negativní vliv snižují antioxidanty. V této práci jsem se zaměřila na studium vybraných morfologických (hmotnost sušiny kořenů a prýtu, délka prýtu, počet listů), fyziologických (účinnost fotosyntézy, množství pigmentů, relativní obsah vody-RWC) a antioxidantních (kataláza-CAT, askorbát peroxidáza-APX, prolin) parametrů dvou odrůd *Vicia faba* L. lišících se citlivostí vůči suchu. Odolná odrůda (Merkur) a citlivá (Piešťanský) byly vystaveny 10- ti dennímu stresu suchem. Aktivita CAT a APX u stresovaných rostlin spíše klesala. Hodnoty množství prolinu kolísaly a nebyl patrný jasný trend a žádné významné rozdíly v souvislosti se stresem. V důsledku stresu klesal RWC výrazněji u citlivé odrůdy, aktivita elektron-transportního řetězce a množství pigmentů nebyly suchem příliš ovlivněny. Změny morfologických parametrů se ve stresu více negativně projevily u citlivé odrůdy, která je však vzrůstem mohutnější než odolná. Nejvíce byly pozitivní vlastnosti odolné odrůdy patrné u aktivity CAT, RWC, výšky a hmotnosti nadzemní části rostlin.

Klíčová slova

Sucho, stres, antioxidanty, *Vicia faba* L., odrůdy, fotosyntéza, morfologie, rostliny

Abstract

Knowledge of physiological and morphological mechanisms which are related to drought tolerance is essential in breeding high-yielding and tolerant plants, which would not suffer unfavourable environmental conditions. Drought stress can lead to oxidative damage which causes serious disorders in physiological and biochemical processes in plant cells. Antioxidants can reduce those negative effects. Morphological (dry mass of shoot and roots, height of shoot, number of leaves), physiological (photosynthetic efficiency, pigment content, relative water content-RWC) and antioxidative (catalase-CAT, ascorbate peroxidase-APX, proline) parameters were evaluated in this study using two genotypes of *Vicia faba* L. differing in drought susceptibility. Drought resistant (Merkur) and sensitive (Piešťanský) genotypes were exposed to 10 days of drought. Activity of CAT and APX of stressed plants rather decreased. Proline content oscillated and no evident trend or significant differences were observed in relation to drought stress. Decrease in RWC was expressed more at susceptible plants, electron-transport chain activity and pigment content were not affected much by drought. Drought susceptible genotype expressed more serious negative effects of drought in morphological parameters, however this genotype was a bit bigger than the resistant one. Positive attributes of the resistant genotype were pronounced mainly in CAT activity, RWC, height and weight of plants.

Keywords:

Drought, stress, antioxidants, *Vicia faba* L., genotypes, photosynthesis, morphology, plants

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíle práce a hypotézy	9
3 Přehled literatury	10
3.1 Stres suchem	10
3.2 Reaktivní formy kyslíku	12
3.3 Reakce na stres suchem	14
3.4 Zvýšení antioxidační ochrany	14
3.5 Antioxidanty	16
3.5.1 Antioxidační enzymy	17
3.5.1.1 Askorbát peroxidáza	17
3.5.1.2 Glutathion reduktáza	20
3.5.1.3 Kataláza	25
3.5.1.4 Peroxidáza	30
3.5.1.5 Superoxid dismutáza	32
3.5.1.6 Monodehydroaskorbát reduktáza a dehydroaskorbát reduktáza	36
3.5.1.7 Ostatní antioxidační enzymy	37
3.5.2 Neenzymatické antioxidanty	38
3.5.2.1 Kyselina askorbová	38
3.5.2.2 Glutathion	39
3.5.2.3 Prolin	41
3.5.2.4 α -Tokoferol	44
3.5.2.5 Ostatní neenzymatické antioxidanty	45
3.6 Další měřené parametry	45
3.6.1 Peroxid vodíku	45
3.6.2 Malondialdehyd	47
3.7 Závěr	49
4 Materiál a metody	54
4.1 Pokusný materiál	54
4.2 Schéma pokusů	55
4.3 Podmínky pěstování	56
4.4 Metody	60
4.4.1 Antioxidanty	60
4.4.2 Morfologické a fyziologické parametry	64
4.4.3 Fotosyntetické parametry	66
4.5 Statistické hodnocení výsledků	70
5 Výsledky	71
5.1 Sezona 2011	71
5.1.1 Antioxidanty	71
5.1.2 Morfologické a fyziologické parametry	75
5.1.3 Fotosyntetické parametry	81
5.2 Sezona 2012	86
5.2.1 Aktivita elektron-transportního řetězce izolovaných chloroplastů	86
5.2.2 Fotosyntetické a ostatní parametry	94
6 Diskuze	99
6.1 Antioxidanty	99
6.2 Morfologické parametry	103
6.3 Fotosyntetické parametry	105
6.4 Závěr	109
7 Souhrn	111
8 Seznam použité literatury	112

Seznam zkratek

APX	askorbát peroxidáza
APX _{2,4,5,6}	izoformy askorbát peroxidázy
AsA	kyselina askorbová
AsA-GSH cyklus	askorbát glutathionový cyklus
C ₃	rostliny s C ₃ metabolismem
C ₄	rostliny s C ₄ metabolismem
CAT	kataláza
CAT _{1,2,3}	izoformy katalázy
DCMU	3-(3',4'-dichlorfenyl)-1,1-dimetylmočovina
DCPIP	2,6-dichlorofenolindolifenol
DHA.....	dehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbát reduktáza
EDTA.....	kyselina etylendiamintetraoctová
F _v /F _m	maximální kvantový výtěžek fotochemických procesů fotosystému 2 u listu v temnotně adaptovaném stavu
GPOX.....	guaicol peroxidáza
GPX	glutathion peroxidáza
GR	glutathion reduktáza
GSSG	oxidovaný glutathion
GSH	glutathion (redukovaný)
GST	glutathion S-transferáza
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HO ₂ ⁻	perhydroxylový radikál
Chl.....	chlorofyl
MDHA	monodehydroaskorbát
MDA	malondialdehyd
MDHAR.....	monodehydroaskorbát reduktáza
OH ⁻	hydroxylový radikál
O ₂ ⁻	superoxidový radikál
¹ O ₂	singletový kyslík
O ₂ ²⁻	peroxidový iont
O ⁻	oxenový iont
O ²⁻	oxidový iont
PEG.....	polyetylen glykol
POX	peroxidáza
PS I.....	fotosystém 1
PS II	fotosystém 2
Q _Y	efektivní kvantový výtěžek fotochemických procesů fotosystému 2 u listu ve světelně adaptovaném stavu
ROS.....	reaktivní formy kyslíku
RWC	relativní obsah vody
SLW	specifická hmotnost listu
SOD	superoxid dismutáza
WC.....	celý elektron-transportní řetězec (PSII – PSI)

1 Úvod

Rostlinná produkce je celosvětově negativně ovlivňována různými environmentálními stresy, z nichž jedním z nejvýznamnějších je sucho. Především v dnešní době, kdy dochází k nárůstu průměrné teploty a počet suchem postižených lokalit se zvyšuje, představuje nedostatek vody vážný ekonomický i sociální problém. Růst, vývoj a výnosy rostlin jsou silně ovlivněny suchem a rozsah ztrát výnosů a poškození rostlin závisí na délce trvání a intenzitě stresu. Tento problém je sice řešitelný umělým zavlažováním, nicméně ne vždy je tento přístup možný a realizovatelný s ohledem na ekonomické a místně specifické poměry. Voda z řek a vodních nádrží je v mnoha případech mnohem více potřebná jako pitná voda pro obyvatelstvo a zavlažování je často označováno za plýtvání nedostatečných vodních zdrojů v dané oblasti. Za těchto podmínek je jedním z nejžádanějších znaků rostlin vyšší odolnost ke stresu suchem a je v zájmu šlechtitelů hledat způsoby, jak u rostlin tuto odolnost zvýšit, popř. získávat genotypy a odrůdy rezistentní k nedostatku vody. Rostliny využívají při odezvě na stres suchem různé strategie, které závisí na délce a intenzitě stresu a zahrnují změny biochemických, fyziologických, anatomických a morfologických parametrů. Těmi se snaží snížit ztráty vody, získat a uchovat jí během trvání sucha a minimalizovat negativní důsledky stresu aktivací obranných mechanismů. V rostlinách vystavených stresu suchem vznikají toxické reaktivní formy kyslíku, které způsobují oxidativní poškození buněk, které může negativně ovlivnit morfologický a fyziologický stav rostliny, což v konečném důsledku vede ke snižování výnosu biomasy a semen. Rostliny se proti těmto toxickým látkám brání svým antioxidantním systémem, který sestává z enzymatických a neenzymatických antioxidantů. Při stresu, kdy dochází k nárůstu množství reaktivních forem kyslíku, záleží na tom, zda stávající aktivita nebo množství antioxidantů bude rostlině stačit k potlačení negativních důsledků takto navozeného oxidativního stresu, nebo zda na sucho zareaguje např. nárůstem aktivit nebo zvýšením množství některých antioxidantů. Často se však liší i odpověď různých genotypů jednoho druhu rostlin a v konečném důsledku i jejich celkové prospívání během období sucha. Četnými studiemi byla zjištěna souvislost vyšší aktivity/množství antioxidantů s lepší odolností vůči suchu a nárůst alespoň některých z těchto parametrů je uvažovaný jako jeden z významných faktorů vyšší tolerance rostlin k suchu. Při šlechtění rostlin odolných vůči suchu je proto kladen důraz na zlepšení efektivity jejich antioxidantních systémů a často se doporučuje posuzovat rostliny s neznámou citlivostí vůči suchu podle těchto parametrů. Vzhledem k tomu, že nedostatek vody je limitujícím

faktorem mnoha procesů probíhajících v rostlinách, je při studiu reakce rostlin na stres a při snaze, vyšlechtit odolné genotypy žádoucí, posuzovat odpověď rostlin co možná nejkompexněji a porovnáním změn významných parametrů pochopit mechanismy, které hrají v odolnosti vůči stresu suchem nejdůležitější roli. Tyto mechanismy mohou být, jak bylo již uvedeno, odlišné nejen u různých druhů rostlin, ale i u různých genotypů nebo odrůd téhož druhu. Reakce rostlin na stres je kromě toho závislá na délce a intenzitě stresu, na růstovém stádiu nebo podmínkách pěstování, v němž stres probíhá a strategie zvyšování tolerance rostlin k suchu musí uvažovat všechny tyto faktory.

Studiu vlivu různých abiotických stresorů na rostliny s ohledem na posouzení citlivosti a rezistence odlišných genotypů je na Katedře genetiky a mikrobiologie věnována pozornost již delší dobu. Modelovou rostlinou pro tyto studie byla především kukuřice. Kromě kukuřice jsou nejčastěji pro studium odezvy rostlin na stres suchem využívány obilniny (různé druhy pšenice), rýže, slunečnice nebo fazol. *Vicia faba* L., která byla v naší laboratoři vybrána jako vhodná modelová rostlina pro srovnání se *Zea mays* L., je v literatuře popisována pouze ojediněle a práce související s odolností vůči stresu suchem a antioxidanty nebyly u této rostliny v literatuře dosud popsány. Hlavním cílem mojí diplomové práce tedy bylo zjistit, zda a jak reagují dvě odrůdy *Vicia faba* L. na vystavení stresu suchem, zda se ve vybraných parametrech liší v odezvě na stres, zejména s ohledem na změny aktivity nebo množství některých antioxidantů, zda jsou případné změny v souladu se studii publikovanými u jiných rostlinných druhů a zda by bylo možné z výsledků vyvodit obecněji platné vztahy.

2 Cíle práce a hypotézy

Dílčí cíle práce:

- Zjistit, jestli dochází ke změně aktivity a množství vybraných antioxidantů, morfologických a fyziologických parametrů u dvou odlišných odrůd *Vicia faba* L. v důsledku stresu suchem
- Zjistit, zda se odrůdy liší ve studovaných parametrech v odezvě na stres a zda je jejich reakce v souladu s předpokladem jejich odlišné citlivosti vůči stresu suchem a odpovídá údajům, publikovaným v literatuře u jiných druhů rostlin
- Zjistit, zda by bylo možné některé ze studovaných parametrů uvažovat jako možné markery pro zjištění vyšší tolerance vůči stresu suchem

Hypotézy

- Odrůdy budou reagovat na stresové podmínky pěstování a jejich reakce na stres bude odlišná a bude záviset na studovaném parametru
- Aktivita/množství antioxidantů bude v reakci na stres vyšší u odolné odrůdy
- Odolná odrůda si i při stresu suchem udrží stejný růstový trend a stejný trend aktivity elektron-transportního řetězce jako v kontrolních podmínkách, nebo se negativní efekt stresu suchem projeví u odolné odrůdy méně než u citlivé.

3 Přehled literatury

3.1 Stres suchem

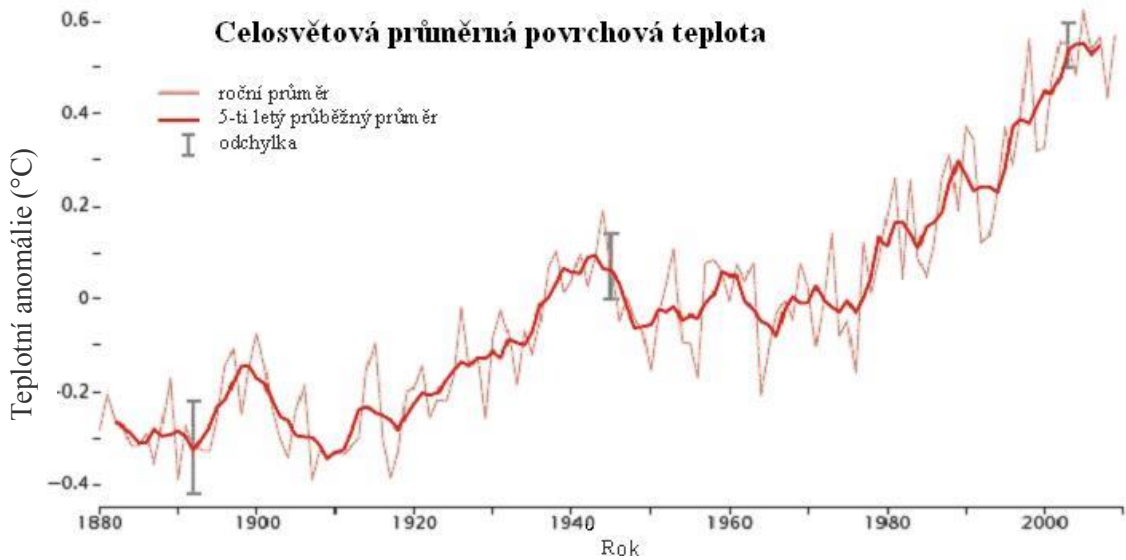
Stres suchem je jedním z nejvýznamnějších abiotických stresorů, který negativně ovlivňuje růst a vývoj rostlin, což v konečném důsledku vede ke snižování výnosů zemědělských plodin. Po celém světě se procento suchem postižených oblastí od roku 1970 do roku 2000 zdvojnásobilo a stále roste. Souvisí to s globálními změnami, které se projevují celosvětově zvyšováním průměrné teploty. Toto dokládá graf zachycující teplotní odchylky od dlouhodobě stanovené průměrné teploty (Obr. 1), které jsou v posledních 40- ti letech pozitivní a stále se zvětšují. Zvýšení průměrné letní teploty na území ČR dokládá také graf ze stanice Praha-Klementinum (Obr. 2), kde byly teploty sledovány od roku 1770.

Prvotní reakcí rostliny na sníženou dostupnost vody je zavírání průduchů. Klíčovou roli v tomto procesu hraje kyselina abscisová, která zprostředkovává zavírání svěracích buněk průduchů, čímž snižuje ztráty vody (Pei *et al.*, 2000). Tento proces ovšem snižuje dostupnost CO₂ pro fotosyntézu. Sníženou fixaci CO₂ doprovází snížená spotřeba ATP a NADPH, což způsobuje jeho nadbytek a naopak nedostatek NADP⁺. Vzhledem k tomu, že NADP⁺ je hlavním akceptorem elektronů z elektron-transportního řetězce, z důvodu jeho snížené koncentrace dochází k přenosu elektronů na kyslík, který je tím redukován na superoxidový radikál, a ze kterého mohou vznikat další reaktivní formy kyslíku (ROS) (Obr. 3). Zvýšené množství ROS nedovoluje opravy poškozeného fotosystému II a vede tak k fotoinhibici (Nishiyama *et al.*, 2001).

Poté, co v důsledku zavírání průduchů dojde ke snížení koncentrace CO₂, dochází často k tvorbě ROS. Zvýšená koncentrace CO₂ by tedy mohla pozitivně ovlivňovat růst rostlin během stresu suchem (Varga *et al.*, 2012). Je tedy možné, že budoucí klima se zvýšenou koncentrací CO₂ bude snižovat oxidativní tlak, a tvorbu peroxidu vodíku a tím omezovat oxidativní poškození během působení různých abiotických stresů (Farfan-Vignolo a Asard, 2012). Autoři tento jev popisují u rostlin *Lolium perenne* L. a *Medicago lupulina* L., u nichž navíc nedošlo k tak velkým poklesům aktivity antioxidačních enzymů askorbát peroxidázy (APX) a peroxidázy (POX) u stresovaných rostlin při zvýšené koncentraci CO₂ na rozdíl od rostlin rostoucích za normální koncentrace CO₂.

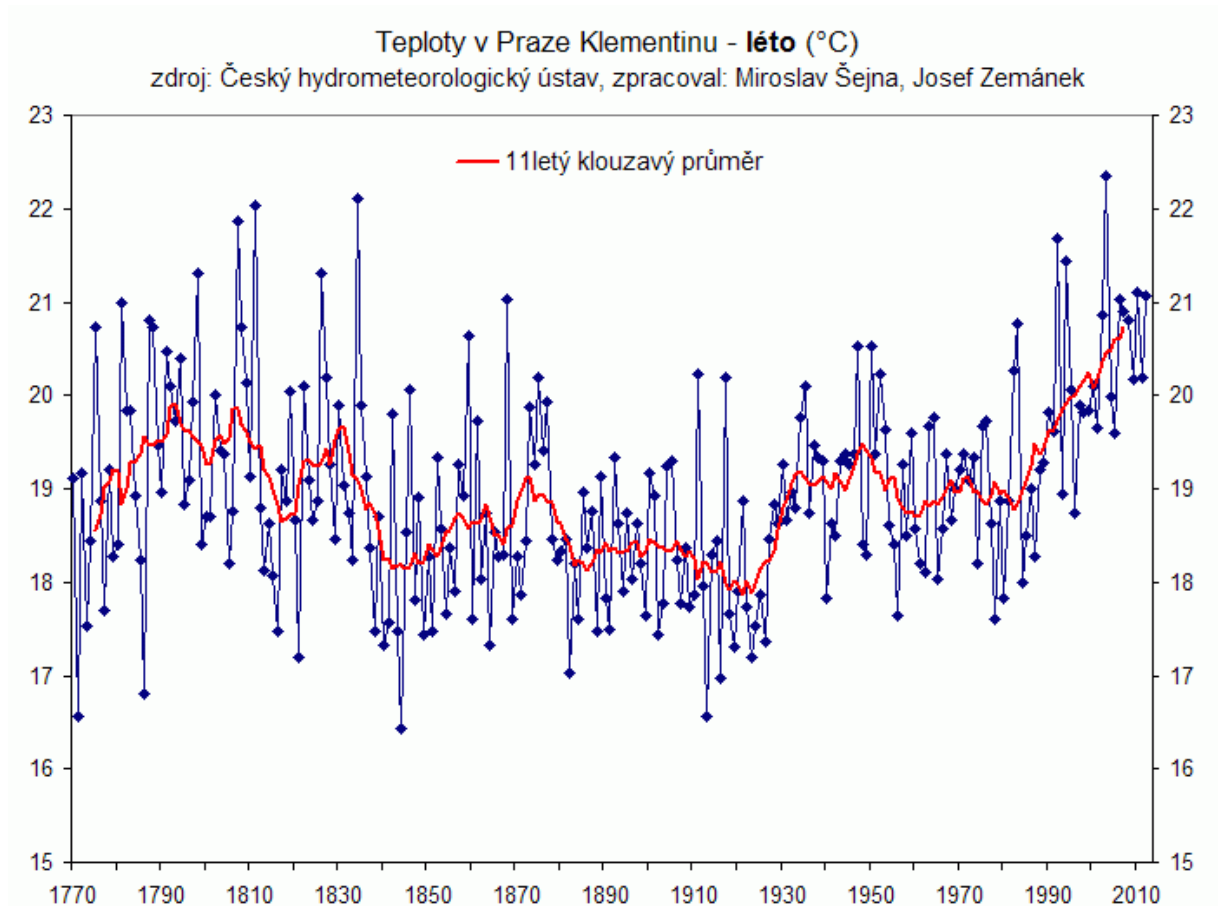
V experimentálních podmínkách může být stres suchem navozen omezenou závlahou rostlin nebo pomocí polyethylenglykolu (PEG). PEG neproniká do buňky, ani s ní

neinterferuje, pouze zabraňuje vstupu vody a anorganických iontů do buňky při osmotickém vyrovnávání (Lokhande *et al.*, 2010).



Obrázek 1. Celosvětová průměrná povrchová teplota zobrazená pomocí teplotních anomálií (°C) v letech 1880-2010.

Upraveno dle <http://earthobservatory.nasa.gov/Features/GlobalWarming/page2.php>



Obrázek 2. Vývoj teploty (°C) v letních měsících měřený na stanici Praha-Klementinum mezi roky 1770–2010. Převzato z: <http://www.globalni-ochlazovani.cz/teploty-praha-klementinum.php>

3.2 Reaktivní formy kyslíku

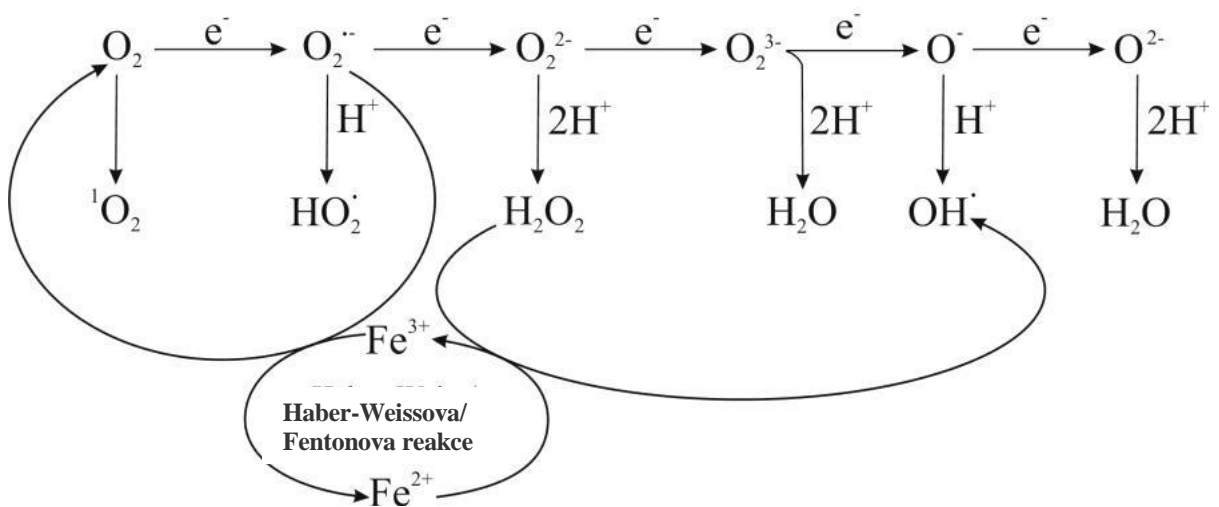
Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou látky vznikající v buňce na různých místech (především v chloroplastech, mitochondriích, peroxizómech) a během různých metabolických procesů. V rostlinné buňce je hlavní místo jejich vzniku chloroplast, protože do něj je lokalizovaná fotosyntéza s elektron-transportním řetězcem. Omezení dostupnosti CO₂ při zavřených průduších v důsledku stresu omezí aktivitu Calvinova cyklu a v buňce tak nastane nedostatek NADP⁺, akceptoru elektronů z elektron-transportního řetězce. Tak se může stát kyslík (produkovaný během fotosyntézy a přítomný v chloroplastu) akceptorem elektronů putujících fotosystémy a může způsobit vznik superoxidového radikálu (O₂^{•-}), nebo peroxidu vodíku, ale také tím omezí efektivitu fotosyntézy (Foyer *et al.*, 1994). Vzniklý superoxidový radikál dále dává vznik dalším ROS, např. peroxidu vodíku (H₂O₂) a hydroxylovému radikálu (OH[•]). Dalšími ROS jsou například singletový kyslík (¹O₂), perhydroxylový radikál (HO₂[•]) (Obr. 3). Tyto jsou vysoce reaktivní a velmi toxické a způsobují poškození proteinů, lipidů, uhlovodíků, DNA, což může vést v konečném důsledku až ke smrti buňky (Foyer a Noctor, 2005). ROS mohou také způsobovat peroxidaci fotosyntetických pigmentů, která může vést k degradaci pigmentů, a k poklesu obsahu chlorofylu (Sharifi *et al.*, 2012).

Za normálních podmínek je běžné množství ROS odbouráváno antioxidačním systémem rostliny, ale v případě zvýšeného množství ROS může být tato rovnováha narušena a ROS se mohou kumulovat a působit v buňce toxicky. Náchylné jsou přitom především chloroplasty, které ačkoliv jsou na přítomnost ROS připravené a mají své antioxidanty, mohou být poškozeny ROS, které jsou ve zvýšené míře produkovány v ostatních kompartmentech a do chloroplastu mohou difundovat (Asada, 1992).

ROS mohou v buňce reagovat odlišně v závislosti na koncentraci. V nízkých koncentracích mohou fungovat jako sekundární posli při zajišťování normálního růstu a vývoje rostliny (Foreman *et al.*, 2003) a ve vysokých koncentracích mohou způsobovat senescenci nebo případně i programovanou buněčnou smrt (Procházková *et al.*, 2001). To, jakou budou mít v buňce roli, záleží na přesné rovnováze v daný čas na daném místě. ROS mohou být pro buňku škodlivé v důsledku narušení významných procesů a současně prospěšné díky zprostředkované iniciaci exprese genů. V aktivaci těchto procesů rozhoduje mimo jiné i přesné místo jejich vzniku, protože vzhledem k jejich reaktivitě stihnou difundovat jen na krátkou vzdálenost, bez toho aniž by s něčím reagovaly (Gill a Tuteja, 2010).

Rychlé a efektivní odbourávání ROS je tak klíčem k zachování zásadních buněčných procesů, jako je fotosyntéza a uchování nepoškozených buněčných struktur. Proto si rostlina vytvořila důmyslný antioxidační systém sestávající s enzymatických a neenzymatických antioxidantů, které zajišťují odbourávání zvýšeného množství ROS (Obr. 4).

Negativní účinky ROS, které vedou k poškození buňky, se označují jako oxidativní stres. Oxidativní stres může vést nejen k inhibici fotosyntézy a respiračních procesů a tak i k omezení růstu rostliny, ale v extrémních případech až k smrti rostliny. Akumulace ROS v důsledku environmentálních stresů (sucho, salinita, vysoké ozáření, chlad, a další) je celosvětově hlavní příčinou úbytku výnosu zemědělských plodin.



Obrázek 3. Metabolická dráha univalentní redukce molekulárního kyslíku (O_2) na vodu (H_2O), která vede v rostlinách k tvorbě různých reaktivních forem kyslíku (ROS): superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$), perhydroxylového radikálu (HO_2^{\cdot}), peroxidu vodíku (H_2O_2), hydroxylového radikálu (OH^{\cdot}), singletového kyslíku (1O_2), peroxidového iontu (O_2^{2-}), oxenového iontu (O^{\cdot}), oxidového iontu (O^{2-}). Superoxidový radikál může poskytnout elektron (e^-) železu (Fe^{3+}) za vzniku redukované formy (Fe^{2+}), který dále může redukovat peroxid vodíku za tvorby hydroxylového radikálu. Tento dílčí cyklus se jmenuje Haber-Weissova reakce, jeho poslední krok zahrnující oxidaci Fe^{2+} peroxidem vodíku se nazývá Fentonova reakce. Upraveno dle Karuppanapandian *et al.* (2011).

3.3 Reakce na stres suchem

Rostliny na stres suchem reagují komplexně, a jeho účinky lze tudíž sledovat na různých úrovních od sledování změn růstu a vývoje rostliny jako celku až po změny odehrávající se na molekulární úrovni.

Rostliny se snaží buď stresu vyhnout, nebo se mu nějak přizpůsobit. Z morfologického pohledu často dochází k urychlení růstu/vývoje, tudíž jsou rostliny často menšího vzrůstu. Vysoký vodní potenciál se snaží udržet tak, že redukuje ztráty vody, zlepšují příjem vody, nebo kombinují oba procesy. U rostlin *Poa pratensis* L. byla tato souvislost přizpůsobení se rostlin k suchu menším vzrůstem prokázána opačně. Rostliny, u kterých byl uměle inhibován růst, byly poté odolnější vůči suchu (Xu a Huang, 2012). Menší vzrůst rostliny může být dán také poklesem elongace a diferenciací buněk v důsledku poklesu turgoru buněk (Jaleel *et al.*, 2008).

Velice častou reakcí rostliny na stres suchem je senescence. Je to fyziologický proces, který může být navozen/urychlen při nedostatku vody a jeho hlavní příčinou jsou poruchy metabolismu aktivního kyslíku. Její primární efekt je odbourávání chloroplastů a remobilizace jejich obsahu. Za normálních podmínek k senescenci dochází na konci života rostliny a je často spojená s vyšší akumulací ROS a malondialdehydu (MDA) a naopak nižším množstvím antioxidantů (Zhang *et al.*, 2012). Suchem navozená senescence listu pomůže rostlině bojovat se stresem tak, že rostlina kontrolovaně obětuje pletivo listu, využije jeho živiny a vodu a zabrání transpiračním ztrátám vody (Munne-Bosch a Alegre, 2004). Obranou proti senescenci je šlechtění tzv. staygreen genotypů, které jsou charakteristické tím, že si chlorofyl (který je při senescenci odbouráván) dokáží udržet déle než odpovídající standardní genotypy (Tian *et al.*, 2012a).

3.4. Zvýšení antioxidační ochrany

Cílený mírný stres

Zvyšování množství antioxidantů může být v některých případech dokonce záměrně navozené a rostliny jsou právě díky mírně vyšší hladině antioxidantů doporučovány jako vhodné ke konzumaci. Tyto látky mohou pomáhat i člověku a jejich přítomnost je tedy žádoucí (Koyama *et al.*, 2012). Mírný cílený stres by mohl v rostlinách zvýšit hladiny antioxidantů a přitom neovlivnit jejich morfologii. Při zalévání *Solanum lycopersicum* L. lehce slanou vodou docházelo k zvýšení množství antioxidantů (kyselina askorbová,

α -tokoferol), ale na rostlinách nebyly patrné žádné negativní účinky stresu (Sgherri *et al.*, 2007). Podobně u hydroponicky pěstované *Lactuca sativa* L. působení sucha zvýšilo množství L-askorbové kyseliny, cukrů a polyfenolu aniž by to ovlivnilo výnos (Koyama *et al.*, 2012).

Vnášení genů

Zvýšená antioxidační aktivita enzymů byla také zjištěna u transgenních rostlin po vnesení genů pro dané antioxidanty. Rostliny *Nicotiana tabacum* L. s vnesenými geny pro cytosolickou CuZn-superoxid dismutázu (SOD) a askorbát peroxidázu (APX) vykazovaly vyšší aktivitu během stresu suchem v porovnání s kontrolou. Dokonce byla pozorována zvýšená aktivita i ostatních antioxidačních enzymů (peroxidáza, glutathion reduktáza, kataláza, monodehydroaskorbát reduktáza). To může být vysvětleno větší tvorbou peroxidu vodíku a tím i větší potřebou po detoxikaci (Faize *et al.*, 2011). Rovněž u transformovaných rostlin *Solanum tuberosum* L. s vneseným promotorem SWPA2 (reaguje na oxidativní stres) došlo ke zvýšení exprese CuZn-SOD a APX a byla u nich pozorována větší odolnost vůči suchu spojená s vyššími aktivitami těchto enzymů v chloroplastech (Lu *et al.*, 2010). Stejně tak rostliny *Solanum lycopersicum* L. s vneseným genem pro protein ZAT12, který kontroluje expresi různých genů aktivovaných stresem, zvýšily aktivitu antioxidačních enzymů a množství prolinu a byly odolnější vůči suchu. Také zde byla pozorována nižší akumulace peroxidu vodíku (Rai *et al.*, 2012).

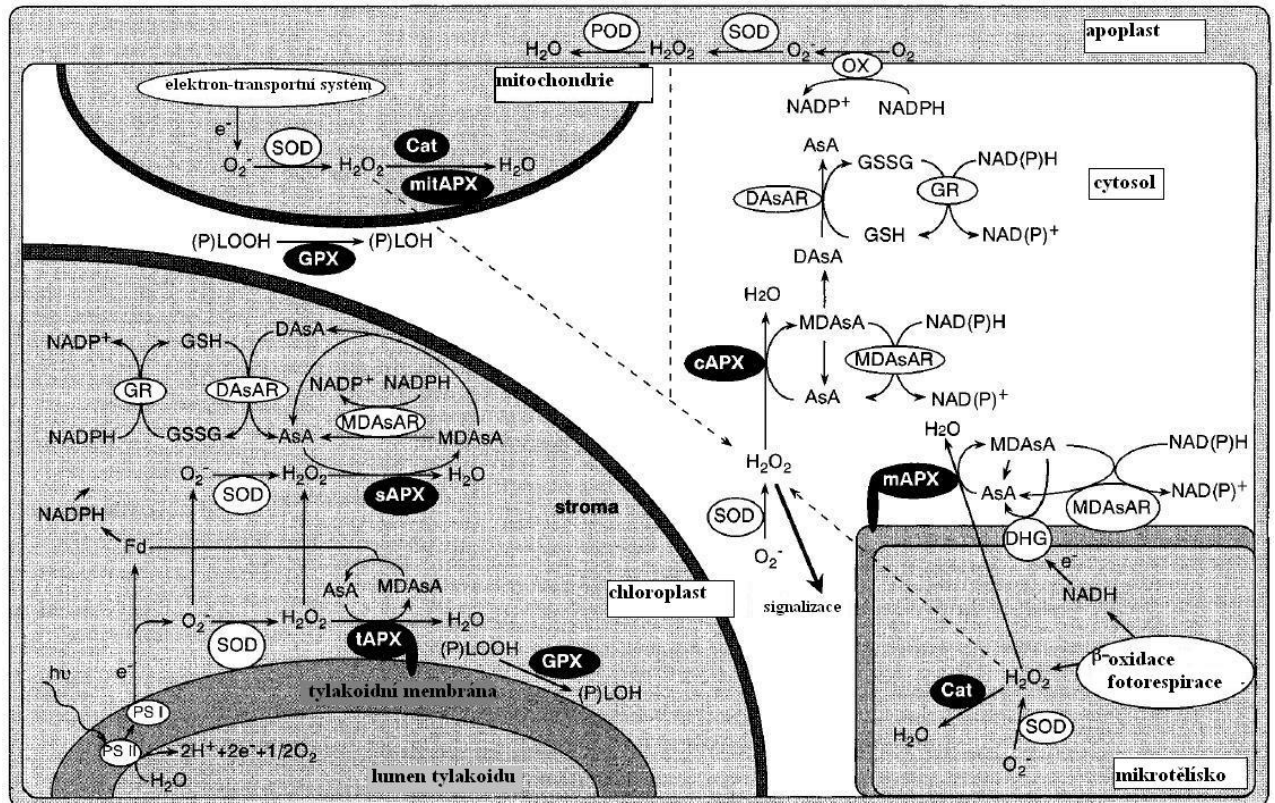
Aplikace podpůrných chemických látek

Zvýšení antioxidační ochrany bylo také docíleno aplikací různých chemických látek: brassinosteroidů (Yuan *et al.*, 2010), kyseliny 5-aminolevulové (Li *et al.*, 2011), Ca^{2+} a K^{+} iontů (Alam *et al.*, 2011), kyseliny skořicové (Sun *et al.*, 2012), kyseliny abscisové (Ozfidan *et al.*, 2012), nebo superabsorpčního polymeru, který pomáhá udržet vodu a živiny v půdě, není toxický a časem se rozloží na CO_2 , vodu, amonné a draselné ionty (Mao *et al.*, 2011), (Moghadam *et al.*, 2011).

3.5 Antioxidanty

Rostliny na stres často reagují nárůstem množství antioxidantů (Obr. 4), který může být dán buď adaptivní změnou katalytických vlastností nebo zvýšenou transkripcí příslušných tichých genů (Sgherri a Navariizzo, 1995).

Antioxidanty se dělí na **enzymatické** a **neenzymatické**.



Obrázek 4. Odbourávání reaktivních forem kyslíku v mitochondriích, chloroplastech, mikrotěličkách, cytosolu a apoplastu buněk vyšších rostlin. Upraveno dle Shigeoka *et al.* (2002).

Tabulka 1 popisuje změny v aktivitě/koncentraci jednotlivých antioxidantů v reakci na stres suchem u různých druhů rostlin. V rámci jednotlivých druhů byly sledovány genotypy lišící se citlivostí ke stresu suchem.

Reakce antioxidantního systému rostlin v souvislosti se stresem suchem je hlavním tématem, kterému se věnuji v literárním přehledu.

3.5.1 Antioxidační enzymy

3.5.1.1 Askorbát peroxidáza

Askorbát peroxidáza (APX) je enzym využívající askorbát jakožto specifický donor elektronů k redukci peroxidu vodíku na vodu a dále jeho činností vzniká monodehydroaskorbát. K obnově askorbátu dochází buď přímo spontánní přeměnou monodehydroaskorbátu na askorbát a dehydroaskorbát nebo pomocí enzymů monodehydroaskorbát reduktázy (MDHAR) a dehydroaskorbát reduktázy (DHAR) (Asada, 1992). APX je důležitou složkou askorbát-glutathionového cyklu (AsA-GSH) (Obr. 4). Aktivita APX (na rozdíl od CAT, která také rozkládá H₂O₂) je závislá na přítomnosti askorbátu jako donoru elektronů. U vyšších rostlin se APX vyskytuje nejméně ve čtyřech kompartmentech: stroma a tylakoidní membrány chloroplastu, mikrozomy (peroxizomy a glyoxozomy), cytosol (Chen a Asada, 1989) a mitochondrie (Jiménez *et al.*, 1997). Každý kompartment může obsahovat buď jednu, nebo více APX izoform (Shigeoka *et al.*, 2002).

Izoenzymy APX, především ty chloroplastové, jsou nestabilní v nepřítomnosti askorbátu, jakožto donoru elektronu. Takže při poklesu hladiny askorbátu během fotooxidativních stresových podmínek dochází k jejich inaktivaci. Vysoká hladina endogenního askorbátu je tedy esenciální pro efektivní udržení funkčního antioxidačního systému. Proto je biosyntéza, intracelulární translokace, subcelulární distribuce a regenerace askorbátu tak zásadní pro správnou aktivitu každého izoenzymu APX (Shigeoka *et al.*, 2002).

APX ve funkci hlavního antioxidantu

APX může v rostlinách zajišťovat ochranu buď společně s dalšími antioxidanty, jejichž aktivity nebo množství během stresu roste, nebo k nárůstu aktivity APX může docházet, aniž by docházelo k podobným změnám i u dalších antioxidantů. U rostlin *Coffea canephora* Pierre ex Froehner ze všech měřených antioxidantů (SOD, CAT, GR, DHAR, AsA) pouze aktivita APX vzrostla u 3 ze 4 genotypů (1 odolný a 2 citlivé) a u odolného to byl jediný enzym, jehož aktivita v reakci na sucho vzrostla. Z toho lze usuzovat jeho význam v antioxidační ochraně rostliny (Pinheiro *et al.*, 2004). Jako hlavní antioxidační enzym funguje APX například u *Sedum album* L., kdy oproti ostatním enzymům s postupujícím suchem neklesla jeho aktivita, ale zůstala zvýšená (Habibi a Hajiboland, 2012). Při

porovnávání C3 *Cleome spinosa* (Jacq.) Raf. a C4 *Cleome gynandra* L. byla APX jediným enzymem, jehož aktivita rostla a v průběhu 10-ti denního stresu neklesala oproti ostatním měřeným enzymům. Na základě těchto výsledků autoři usuzují, že v odbourávání peroxidu vodíku bude hrát hlavní roli (Uzilday *et al.*, 2012).

I slabý nárůst aktivity APX může mít zásadní vliv na odolnost rostliny vůči suchu. Odolný a citlivý genotyp *Helianthus annuus* L. vykazoval stejný trend v aktivitách glutathion reduktázy (GR) a katalázy (CAT) u obou genotypů, jediná APX u odolného genotypu lehce vzrostla, zatímco u citlivého zůstala nezměněna. I tento malý rozdíl má pozitivní vliv na růst a vývoj rostlin během sucha (Baloglu *et al.*, 2012). U *Kochia scoparia* (L.) Schrad. byla sice zvýšená aktivita APX doprovázena i vyšší aktivitou GR u odolného i citlivého genotypu, ale u odolného genotypu byl nárůst APX dvojnásobný, zatímco u citlivého jen velice malý (Masoumi *et al.*, 2010). K rozdílu v odolnosti vůči suchu mohla tedy stačit i tato rozdílná reakce aktivity APX. Význam aktivity APX ve zvýšení odolnosti rostlin vůči stresu suchem podporují i výsledky molekulárně genetických studií. Rostliny *Nicotiana tabacum* L. s vneseným genem pro APX vykazovaly během stresu jeho zvýšenou expresi, což se projevilo následnou větší odolností vůči suchu na rozdíl od rostlin s vneseným genem pro SOD, u nichž nebyly pozorovány tak výrazné změny (Faize *et al.* 2011). Tím tedy přímo potvrzují pozitivní vliv zvýšené aktivity APX při obraně proti oxidativnímu stresu.

APX neovlivňuje odolnost vůči suchu

Ani velký nárůst aktivity APX však nemusí rostlině zajistit odolnost vůči suchu. U citlivého genotypu *Arachis hypogaea* L. došlo po vystavení rostlin 12- ti dennímu stresu suchem (aplikací PEG) k 2x vyššímu nárůstu aktivity APX, ale i přesto bylo u tohoto genotypu pozorováno jasné opoždění růstu. APX byla jediným enzymem, jehož aktivita u citlivého genotypu takto vzrostla, v rostlině hrála zásadní roli při ochraně během sucha, ale i přesto jí nedokázala zajistit odolnost (Akcaay *et al.*, 2010). Podobné výsledky popsali Saglam *et al.* (2011) u *Phaseolus vulgaris* L., kde u citlivých genotypů zaznamenali nárůst aktivity APX, zatímco u odolných ne. Aktivita APX odolného genotypu nebyla nejvyšší, byla jen o málo nižší než aktivita jednoho citlivého genotypu a výrazně vyšší než aktivita druhého citlivého genotypu. Nicméně to, že si tuto svou vysokou aktivitu udržela, jí zajistilo odolnost, zatímco tato zvýšená aktivita nezajistila odolnost citlivým genotypům. U odolného genotypu *Solanum peruvianum* L. došlo v důsledku stresu suchem k nárůstu aktivity pouze u GR,

zatímco aktivita APX poklesla. U citlivého genotypu však došlo k poklesu aktivit u obou těchto enzymů, takže zvýšená aktivita alespoň jednoho článku AsA-GSH cyklu zajistila rostlině odolnost (Ünyayar *et al.*, 2005).

U *Coffea canephora* Pierre ex Froehner došlo k opačnému trendu, kdy aktivity APX a GR vzrostly u citlivého kultivaru, zatímco klesly nebo zůstaly nezměněny u odolných kultivarů, což autoři vysvětlují tak, že citlivý genotyp potřeboval zapojit více antioxidantních mechanismů či jejich vyšší aktivitu, aby se s ROS vypořádal na rozdíl od odolného genotypu (Pinheiro *et al.* 2004).

Nižší aktivita APX u odolného genotypu byla pozorována rovněž u *Phaseolus vulgaris* L. Aktivita odolného genotypu vzrostla jen první měřený den (13. den stresu) a ten druhý (22. den stresu) již ne, zatímco aktivita APX u citlivého genotypu vzrostla oba měřené dny. Naopak u odolného genotypu došlo k nárůstu množství askorbátu na rozdíl od citlivého genotypu (Rosales *et al.*, 2012). Samozřejmě v odolnosti rostlin vůči suchu mohly hrát roli i jiné složky antioxidantní ochrany, které nebyly studovány. Aktivita APX nemusí nutně vždy v reakci na stres suchem růst. U *Guizotia abyssinica* Cass. byl popsán pokles aktivity APX u obou odolných i obou citlivých genotypů, stejně tak jako např. u CAT. Odolnější genotypy měly však i přes zjištěný pokles aktivity APX v důsledku stresu vyšší aktivity než citlivé genotypy. Je tedy možné, že hladina APX je dostatečně vysoká, a že její pokles během stresu rostlinu neovlivní a nepotřebuje jí proto zvyšovat. Kromě toho se na odbourávání ROS mohly podílet i další složky antioxidantních mechanismů (prolin, SOD) (Ghane *et al.*, 2012). K nárůstu APX nemusí dojít ani v případě, kdy došlo ke zvýšení některých enzymů AsA-GSH cyklu (GR, MDHAR) jak potvrzují u *Triticum aestivum* L. (Smirnov a Colombe, 1988).

Izoformy APX v souvislosti s reakcí na stres suchem

Vzhledem k tomu, že APX se v rostlinné buňce vyskytuje v několika izoformách, její působení a vliv na funkce v rostlinách závisí také na jejich zastoupení. U odolného genotypu *Oryza sativa* L. byly v reakci na sucho popsány 4 izoformy APX, zatímco u citlivého pouze jedna (Selote a Khanna-Chopra, 2004). Kholová *et al.* (2011) popisují nárůst aktivity APX v reakci na suchu z 9 studovaných izoform pouze u APX5 u odolného genotypu *Pennisetum glaucum* L. Dále pak Kholová a Vadez (2013) popisují nárůst aktivity dvou minoritních izoform APX (APX2, APX4) a jedné hlavní (APX6) v reakci na stres suchem u *Pennisetum*

glaucum L., nicméně celkový nárůst aktivity APX prokázán nebyl. Toto dokazuje, že rostliny mohou reagovat na stres změnou aktivity jen některých izoform.

3.5.1.2 Glutathion reduktáza

Glutathion reduktáza (GR) je enzym, který udržuje intracelulární glutathion v redukované formě tím, že katalyzuje NAD(P)H-dependentní tvorbu disulfidické vazby glutathion disulfidu (GSSG). Glutathion reduktáza katalyzuje poslední limitující krok AsA-GSH cyklu (Noctor a Foyer, 1998). Jeho zvýšená aktivita může pomáhat regeneraci NADPH na NADP^+ a zajišťovat tak jeho dostupnost pro elektrony z ferredoxinu v elektron transportním řetězci, a tím snižovat možnost tvorby superoxodiových radikálů (Baisak *et al.*, 1994). Nárůst aktivity GR v rostlinách v důsledku působení stresu vede k akumulaci glutathionu a ke zvýšení odolnosti rostlin vůči stresu (Selote a Khanna-Chopra, 2004).

GR ve funkci hlavního antioxidantu

GR je považována za jeden ze zásadních antioxidačních enzymů uplatňujících se v ochraně rostlin před působením stresových faktorů. U odolných genotypů dochází velice často ke zvýšení aktivity většiny jejich antioxidantů a společně mají pozitivní vliv na odolnost rostliny, nicméně v některých případech byla označena právě GR jako klíčový enzym.

Význam GR v odpovědi rostlin *Glycine max* (L.) Merrill. na nepříznivé účinky stresu zdůraznili Van Heerden a Krüger (2002). Ze dvou měřených antioxidantů se od sebe genotypy lišily právě aktivitou GR, která u citlivého v důsledku stresu nevzrostla, zatímco u odolného ano. Akcay *et al.* (2010) u rostlin *Arachis hypogaea* L. zjistili, že došlo sice k nárůstu aktivity GR (a takéž APX a CAT) u obou genotypů, ale u odolného byl tento nárůst dvojnásobný, zatímco u citlivého aktivita vzrostla pouze 1,5x. Aktivita CAT dokonce u citlivého genotypu s postupujícím stresem poklesla, tudíž tyto dva enzymy byly klíčové při určení odolnosti rostlin vůči suchu. U *Glycine max* (L.) Merrill. došlo během stresu k nárůstu množství prolinu a aktivity CAT u všech genotypů (2 odolných a 3 citlivých), s výjimkou aktivity GR, která zůstala u dvou citlivých genotypů beze změny a u dvou odolných a jednoho citlivého vzrostla. GR by podle autorů mohla mít zásadní funkci, protože její nezměněná aktivita nejspíše rozhoduje o citlivosti rostlin (Masoumi *et al.*, 2011). Rovněž Chakraborty a

Pradhan (2012) považují GR společně s peroxidázou (POX) za hlavní enzymy určující odolnost studovaných genotypů *Triticum aestivum* L. Zjistili, že u odolných genotypů jejich aktivita rostla po celou dobu 9- ti denního stresu, zatímco u citlivých rostla jen do třetího dne stresu a pak klesala. Prokazatelně zásadním enzymem ze studovaných antioxidantů (APX, SOD, GR, CAT) u rostlin *Atriplex hortensis* L. stresovaných suchem byla GR. V reakci odolného a citlivého genotypu na stres suchem došlo k nárůstu aktivit APX a CAT a poklesu aktivity SOD u obou genotypů, s výjimkou aktivity GR, která u odolného genotypu vzrostla a u citlivého poklesla (Sai *et al.*, 2012).

Nárůst aktivity GR u odolných genotypů

Souvislost odolnosti rostlin se zvýšenou aktivitou GR, jakožto enzymem zbavujícím buňku toxických ROS, je dokázána v mnoha pracích u mnoha různých druhů rostlin. Například u *Zea mays* L. (Pastori a Trippi, 1992), *Oryza sativa* L. (Selote a Khanna-Chopra, 2004), *Solanum lycopersicum* L. (Ünyayar *et al.*, 2005), *Atriplex hortensis* L. (Sai *et al.*, 2012) došlo k nárůstu aktivity GR u odolného genotypu, zatímco u citlivého došlo k jeho poklesu.

U *Nicotiana tabacum* L. sice došlo k nárůstu aktivity u všech genotypů, ale u odolných to byl nárůst 233% a 250%, zatímco u citlivých jen 159% a 187% (Van Rensburg a Kruger, 1994). Podobné případy nárůstu aktivity GR u obou genotypů, kde byl však nárůst u odolného větší než u citlivého, popisují také u rostlin *Arachis hypogaea* L. Akcay *et al.* (2010), u *Poa pratensis* L. Xu *et al.* (2011), u *Nicotiana benthamiana* Deng *et al.* (2012), u *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. Kusvuran (2012).

U *Glycine max* (L.) Merrill. došlo v reakci na stres suchem k nárůstu aktivity GR u odolného genotypu, zatímco u citlivého genotypu aktivita nebyla změněna (Van Heerden a Krüger, 2002). Podobný případ byl popsán u *Triticum durum* L., kde byla aktivita GR u odolného genotypu po celou dobu stresu vyšší než u kontrolních rostlin, ačkoliv v průběhu vývoje celková aktivita nejprve vzrostla a pak s dospíváním rostliny klesla. Zatímco u citlivého genotypu byla aktivita GR hned od počátku stresu nižší nebo bez rozdílu od kontrolních rostlin a celkově se jeho aktivita také v průběhu vývoje snižovala (Huseynova, 2012).

Provázanost GR a DHAR jakožto dvou složek AsA-GSH cyklu dokládá ve svém pokusu Sánchez-Rodríguez *et al.* (2012) u *Solanum lycopersicum* L., kde zatímco u odolného

genotypu aktivity obou dvou těchto enzymů vzrostly, u citlivého nebyly stresem nijak ovlivněny. Autoři tedy přisuzují odolnému genotypu efektivnější detoxikační mechanismus peroxidu vodíku.

Nejednoznačné chování GR

V řadě prací však nebyly získány tak jednoznačné výsledky nebo byly dokonce zcela protichůdné. Ne vždy dochází u odolných genotypů v reakci na stres suchem k nárůstu aktivity GR. U *Phaseolus vulgaris* L. zůstala aktivita GR u odolného genotypu nezměněna, ačkoliv u citlivých genotypů aktivita vzrostla. Toto může být dáno tím, že odolný genotyp měl celkově nejvyšší aktivitu GR, která mu nejspíše stačila pro efektivní odbourávání ROS (Saglam *et al.*, 2011). Podobná odezva rostlin na stres suchem byla pozorována u *Helianthus annuus* L. U těchto rostlin byla u obou genotypů aktivita nezměněna oproti kontrolním rostlinám a ani genotypy navzájem se průkazně nelišily. Glutathion reduktáza tak nejspíše nebyla zásadním enzymem účastnícím se reakce rostlin na sucho (Baloglu *et al.*, 2012).

U *Triticum aestivum* L. se odolné genotypy lišily od citlivých mírou poklesu aktivity GR. U citlivého genotypu aktivita klesala s délkou stresu, zatímco u odolných na počátku a v průběhu stresu aktivita vzrůstala (až do 5. dne stresu) a klesala až ke konci (7. den stresu) (Nikolaeva *et al.*, 2010). I takovýto rozdíl může být zásadní v reakci rostliny na stres suchem.

Ne vždy aktivita GR vykazovala jasný trend v závislosti na genotypu a působení stresu. Například u *Coffea canephora* Pierre ex Froehner došlo u citlivého genotypu nejprve k nárůstu aktivity GR a poté k mírnému poklesu a u odolného genotypu došlo nejprve k zachování stejné aktivity a poté jejímu poklesu, a ze získaných výsledků nebylo možné vyvodit žádný obecněji platný vztah (Pinheiro *et al.*, 2004).

Přesto, že zvýšená aktivita GR byla většinou pozorována u odolných genotypů a měla tak vliv na odolnost rostlin, byly publikovány i zcela opačné výsledky, které nepotvrdily souvislost zvýšené aktivity GR s odolností vůči stresu suchem.

Větší nárůst aktivity GR a celkově vyšší hodnoty byly zjištěny u citlivého genotypu *Musa* L. na rozdíl od odolného genotypu v reakci na sucho. Důvod, proč byl tento genotyp citlivý, je nejspíše ten, že zvýšená aktivita GR nebyla doprovázena zvýšenou aktivitou APX (Chai *et al.*, 2005). Nárůst aktivity u citlivých genotypů ve srovnání s odolnými byl zjištěn také u *Saccharum officinarum* L. Zde došlo k výrazně většímu nárůstu aktivity GR u obou citlivých genotypů v porovnání s odolnými genotypy a dokonce byly hodnoty citlivého

genotypu celkově nejvyšší, tudíž v této rostlině nejspíš aktivita GR nebude hrát zásadní roli (Cia *et al.*, 2012). Podobné výsledky byly popsány u *Triticum aestivum* L., kde právě nejvyšší nárůst aktivity GR byl pozorován u dvou citlivých genotypů, zatímco u odolných buď k nárůstu nedošlo, nebo jen k malému (Grzesiak *et al.*, 2013).

Spolupráce APX a GR

Vzhledem k tomu, že se APX i GR uplatňují jakožto katalyzující enzymy AsA-GSH cyklu dá se předpokládat, že pro správné a efektivní fungování celého cyklu a účinné obrany proti ROS by byla optimální zvýšená aktivita obou enzymů (Sekmen Esen *et al.*, 2012). Nicméně ne vždy tento ideální model funguje tak, že jsou tyto dva enzymy v pozitivní korelaci.

Nárůst aktivity APX doprovázený nárůstem aktivity GR u odolných genotypů

Provázanost těchto dvou enzymů dokládá Van Rensburg a Kruger (1994), kteří tyto dva enzymy označili jako hlavní, podle kterých by se mohla posuzovat odolnost vůči stresu suchem u *Nicotiana tabacum* L. Důkaz ideálně fungujícího celého AsA-GSH cyklu byl popsán u *Oryza sativa* L., kde v reakci na suchu došlo u odolného genotypu k nárůstu aktivity APX, GR a množství glutathionu (GSH) i askorbátu (AsA), zatímco u citlivého došlo k poklesu všech těchto antioxidantů (Selote a Khanna-Chopra, 2004). Množství a aktivitu složek toho cyklu (AsA, GSH, APX, GR) měřili Chugh *et al.* (2011) u odolného a citlivého genotypu *Zea mays* L. vystaveného 72- hodinovému stresu suchem. V tomto případě vykazoval odolný a citlivý genotyp podobnou odezvu na stres suchem. U antioxidantů došlo k nárůstu jejich množství/aktivit u obou genotypů, u citlivého genotypu došlo k poklesu aktivity APX. Oslabená funkce tohoto jednoho článku řetězce by mohla být jednou z příčin menší odolnosti daného genotypu vůči suchu a naopak vyšší aktivita u odolných genotypů pozitivním přizpůsobením ke stresu. Podobné výsledky byly publikovány u *Poa pratensis* L., kde hlavní rozdíl mezi odolným a citlivým genotypem byl ve vyšší aktivitě APX, GR, MDHAR a DHAR u odolného genotypu, zatímco u citlivého byl nárůst aktivit těchto enzymů po vystavení stresu menší (Xu *et al.*, 2011). Vyšší aktivity enzymů AsA-GSH cyklu u odolného genotypu (oktoploidního) byly zjištěny také u *Nicotiana benthamiana* L. Lišil se

od citlivého (allotetraploidního) především větším nárůstem aktivity APX a celkově vyššími hodnotami dalších antioxidantů AsA-GSH cyklu (Deng *et al.*, 2012). Vzájemná korelace těchto dvou enzymů byla potvrzena rovněž u *Saccharum officinarum* L., kdy k nárůstu aktivit APX a GR došlo u odolného genotypu ve stejnou dobu a to ke konci stresu suchem, zatímco citlivé genotypy pozitivní korelaci nevykazovaly. U nich naopak aktivita jednoho enzymu rostla, když aktivita druhého klesala nebo aktivita jednoho rostla s postupujícím stresem stále, zatímco aktivita druhého se zvýšila až na konci stresové periody. Autoři uvádějí, že by to mohlo být znakem ne příliš dobře fungujícího AsA-GSH cyklu (Cia *et al.*, 2012). K podobným výsledkům dospěli Van Heerden a Kruger (2002), kteří sledovali aktivitu APX a GR u *Glycine max* (L.) Merrill. U odolného genotypu zjistili zvýšenou aktivitu obou těchto enzymů, zatímco u citlivého pouze APX. Další pozitivní korelace APX a GR u odolného genotypu byla potvrzena u *Musa* L. Autoři zdůrazňují význam optimální spolupráce složek AsA-GSH cyklu, protože u citlivého genotypu v reakci na sucho došlo sice ke zvýšení aktivity GR, ale aktivita APX zůstala nezměněna, což by mohlo být jedním z důvodů citlivosti toho genotypu vůči stresu suchem (Chai *et al.*, 2005).

Dalšími příklady, kdy u odolných genotypů došlo ke zvýšení aktivit obou těchto enzymů, jsou: *Kochia scoparia* (L.) Schrad. (Masoumi *et al.*, 2010), *Zea mays* L. (Benešová *et al.*, 2012), *Triticum durum* L. (Huseynova, 2012), *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. (Kusvuran, 2012), *Triticum aestivum* L. (Chakraborty a Pradhan, 2012) a (Huseynova, 2012), *Solanum lycopersicum* L. (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). Citlivé genotypy se pak často vyznačovaly sníženou nebo nezměněnou aktivitou jednoho nebo více enzymů a jejich AsA-GSH cyklus nemusel fungovat tak efektivně jako u odolných.

Nárůst aktivity APX nedoprovázen nárůstem aktivity GR u odolných genotypů

Naproti tomu v řadě prací nebyla prokázána korelace mezi složkami AsA-GSH cyklu a nebyla zjištěna žádná souvislost s odolností vůči stresu suchem.

Například u odolného genotypu *Atriplex hortensis* L. nebyla zvýšená aktivita APX doprovázena zvýšenou aktivitou GR (Sai *et al.*, 2012). Obdobné výsledky byly publikovány např. u *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (Pinheiro *et al.*, 2004), *Helianthus annuus* L. (Baloglu *et al.*, 2012), *Saccharum officinarum* L. (Cia *et al.*, 2012).

3.5.1.3 Kataláza

Kataláza (CAT) je enzym obsahující hem, který katalyzuje reakci rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Jeho hlavním úkolem je odstraňování peroxidu vodíku, který vzniká mimo jiné při fotorespiraci při oxidativním stresu v peroxizómech (Willekens *et al.*, 1997). Dalo by se tedy usuzovat, že zvýšená aktivita CAT odráží míru fotorespirace v peroxizómech. Byly popsány různé izoformy CAT v závislosti na druhu, všechny jsou tetramery (Sekmen Esen *et al.*, 2012). CAT je velice citlivá na světlo a její aktivita může tedy velmi kolísat (Hertwig *et al.*, 1992). U silného a dlouhotrvajícího stresu může pokles její aktivity znamenat nastupující stres nadměrným ozářením, kdy dochází nejen k fotoinaktivaci CAT, ale také fotoinhibici PSII a tudíž tvorbě ROS (Dat *et al.*, 1998).

Na rozdíl od APX, s níž zastává v buňce stejnou funkci, není CAT závislá na žádném substrátu.

CAT ve funkci hlavního antioxidantu

Ačkoliv mnoho studií poukazuje na výraznější funkci APX v odbourávání peroxidu vodíku, různé práce popisují právě aktivitu CAT za klíčovou pro lepší odolání stresu suchem. Devi *et al.* (2012) označili aktivitu CAT za výraznou u rostlin *Triticum aestivum* L. Zatímco u ostatních měřených antioxidantů (APX, GR, POX) nebyl potvrzen výrazný trend a rozdíl mezi genotypy, u CAT byl zaznamenán největší rozdíl mezi odolnými a citlivými genotypy. Aktivita CAT u čtyř z pěti odolných genotypů vzrostla a u čtyř z pěti citlivých v reakci na sucho klesla. Na základě získaných výsledků doporučují autoři CAT jako nejlepší ukazatel odolnosti vůči stresu suchem u rostlin *Triticum aestivum* L.

Další práce, ve které byla aktivita CAT zásadní v odolnosti vůči suchu, je u rostlin *Phaseolus vulgaris* L. (Zlatev *et al.*, 2006).

Akcay *et al.* (2010) uvádějí, že u *Arachis hypogaea* L. mohou mít hlavní úlohu v určení odolnosti rostlin vůči suchu oba dva enzymy CAT i APX současně, a nemusí se vždy projevit výraznější nárůst pouze u jednoho z enzymů. Benešová *et al.* (2012) popisují výrazný nárůst aktivity APX u odolného genotypu *Zea mays* L. a současný výrazný pokles aktivity CAT u citlivého. Z toho by také bylo možné usuzovat důležitou funkci obou dvou těchto enzymů.

Jasnou pozitivní korelaci mezi aktivitou CAT a SOD v důsledku stresu suchem potvrzují Sayfzadeh *et al.* (2011) u rostlin *Beta vulgaris* L., nebo Candan a Tarhan (2012)

u *Pulegium vulgare* Mill. Jejich jasnou prioritní funkci a korelaci dokládá nárůst aktivit obou dvou po 4. dnu stresu a pokles po 6. -7. dnu. SOD představuje první linii odbourávání ROS. Svou aktivitou dává vznik peroxidu vodíku, který CAT rozkládá. Tím je jasná její zásadní funkce, navíc aktivity dalších studovaných antioxidantů (APX, GPX) od počátku stresu klesaly (Candan a Tarhan, 2012).

Zajímavý pokus provedli Sedghi *et al.* (2012) na rostlinách *Calendula officinalis* L., kde měřili aktivity antioxidantních enzymů netypicky v korunních listech květu během působení sucha. Tato rostlina je totiž farmaceuticky významná a využívají se z ní právě květy. Aktivita enzymů (CAT a SOD) vzrostla i v těchto rostlinných částech, na rozdíl od aktivity POX, která v reakci na sucho klesla. To potvrzuje CAT jako hlavní antioxidant odbourávající peroxid vodíku. Xin *et al.* (2011) popisují jev, kdy ze všech studovaných antioxidantních enzymů zareagovala u *Zea mays* L. aktivita CAT nejrychleji - svého maxima dosáhla na rozdíl od SOD nebo POX nejdříve. U odolného byl nárůst aktivity větší než u citlivého a celkově měl odolný vyšší hodnoty.

Nárůst aktivity CAT především na počátku stresu

V různých studiích byl popsán pozitivní vliv CAT především v časných stádiích stresu suchem, kdy aktivita CAT zareagovala na stres jako první a došlo k jejímu zvýšení u odolných genotypů. Beis a Patakas (2012) spojují časnou aktivaci CAT se signalizací prostřednictvím oxidu dusnatého (NO), jako významné signální molekuly rostlin. Jeho zvýšená koncentrace na počátku sucha vedla ke zvýšení aktivity CAT u odolného genotypu *Vitis vinifera* L. během mírného stresu. U citlivého genotypu, u něhož při mírném stresu nezměněné hodnoty koncentrace NO korespondovaly se stabilní aktivitou CAT, docházelo k větším ztrátám vody, projevu oslabení stresem. Nicméně při intenzivnějším stresu už nárůst NO nebyl dostatečný, aby udržel i následný nárůst aktivity CAT u odolného. CAT je v této fázi působení stresu suchem už citlivá k fotoinaktivaci a celkově u dlouho trvajícího sucha už dochází k potlačení syntézy proteinů, čemuž odpovídá pokles její aktivity (Zhang a Kirkham, 1996). Za normálních podmínek probíhá resyntéza CAT, která doplňuje pokles celkové aktivity vzniklý ozářením. Výše zmíněná inhibice syntézy proteinů způsobená nedostatkem vody může poškodit tuto resyntézu a tím částečně způsobit pokles celkového množství a aktivity CAT u stresovaných rostlin (Badiani *et al.*, 1990). Výhoda odolného genotypu tedy spočívala v tom, že dokázal aktivovat účinné mechanismy hned na začátku stresu, zatímco

citlivý se na počátku stresu bránil aktivací alternativních sinků pro nadměrnou excitaci, jako je fotorespirace. Pozdní aktivace CAT u citlivého genotypu může způsobit rychlejší akumulaci peroxidu vodíku, který je sice škodlivý, ale může v buňce působit také během signalizace jako sekundární posel v hormonálně zprostředkované odpovědi průduchů na sucho. Odolný genotyp tuto akumulaci odbourává právě včasnou aktivací CAT.

Změny aktivity CAT v závislosti na době působení stresu suchem studovali Ghane *et al.* (2012). Popisují reakci *Guizotia abyssinica* (Cass.) na stres suchem, kde u citlivých genotypů sice nejprve vzroste aktivita CAT, ale s postupujícím stresem výrazně klesne. Naproti tomu u odolných genotypů nepozorovali žádný nárůst aktivity, ale pozvolný pokles v průběhu stresové periody. Hodnoty aktivity CAT byly však u odolného genotypu během stresu celkově vyšší než u citlivého, což jim zajistilo odolnost. Podobné závislosti byly popsány také u rostlin *Nicotiana benthamiana* Domin, kde u obou genotypů po počátečním nárůstu aktivita CAT klesla až pod hodnoty kontrolních rostlin, nicméně u citlivého genotypu více než u odolného. Vzhledem k tomu, že aktivita ostatních enzymů vzrostla je otázkou, jestli má CAT v tomto případě na odolnost vůbec vliv (Deng *et al.*, 2012).

Cia *et al.* (2012) poukazují na to, že o odolnosti rostlin vůči suchu spíše rozhodne to, jestli aktivita CAT a APX vydrží zvýšená i do pozdějších fází stresu spíše než pouhý nárůst jejich aktivit na počátku stresu.

Pozitivní vliv CAT při stresu suchem

Vzájemné působení více antioxidantů v buňce a tudíž jejich komplexní souhra v reakci na stres suchem byla popsána v mnoha studiích. Aktivita CAT a většiny ostatních antioxidantů vykazovala velice podobný trend také u *Tagetes erecta* L. v reakci na sucho (Tian *et al.*, 2012b). Z toho autoři vyvozují, že antioxidativní ochrana v těchto rostlinách funguje komplexně. Rostliny *Capsicum annuum* L. vykazovaly ve stresových podmínkách nárůst aktivity CAT (a i ostatních antioxidantů) u odolného i citlivého genotypu, ale s postupujícím suchem docházelo jejímu poklesu. Odolný genotyp se nakonec lišil od citlivého tím, že jeho aktivita CAT neklesla pod hodnoty kontrolních rostlin, zatímco u citlivého tomu tak bylo (Anjum *et al.*, 2012).

Podobné vztahy, v nichž má zvýšená aktivita CAT spolu s ostatními enzymy pozitivní vliv na odolnost rostlin byly popsány v mnoha dalších pracích: *Sesamum indicum* L. (Fazeli *et al.*, 2007), *Zea mays* L. (Chugh *et al.*, 2011), *Cicer arietinum* L. (Mafakheri *et al.*, 2011),

Helianthus annuus L. (Baloglu *et al.*, 2012), *Medicago sativa* L. (Boldaji *et al.*, 2012), *Triticum aestivum* L. (Chakraborty a Pradhan, 2012), *Solanum lycopersicum* L. (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012).

Ne vždy rostliny reagují na abiotické stresory nárůstem aktivit svých antioxidačních enzymů. U *Panicum miliaceum* L. došlo k poklesu aktivit všech sledovaných antioxidantů včetně CAT, nicméně u CAT byly u odolného genotypu i v rámci tohoto poklesu hodnoty nejvyšší. Rostlina si nejspíše vystačí s aktivitou, kterou má stabilně za normálních podmínek (Zhang *et al.*, 2012).

Sucho ovlivňuje nejen aktivitu CAT, ale také zastoupení jednotlivých izoenzymů. U *Gypsophila aucheri* Boiss. byla CAT za normálních podmínek zastoupená dvěma izoenzymy, CAT1 a CAT2, zatímco po navození sucha byla zjištěna pouze CAT1 a to ve sníženém množství (Sekmen Esen *et al.*, 2012). CAT1 byla také hlavní izoformou CAT, jejíž aktivita vzrostla v reakci na sucho u *Pennisetum glaucum* L., jak dokládají Kholová *et al.* (2013). Naopak Hassanpour *et al.* (2012) popisují CAT1 jako hlavní izoformu u kontrolních rostlin *Mentha pulegium* L., zatímco u rostlin stresovaných suchem byla významná především u nejsilnějšího stresu CAT2 a CAT3.

Nízká aktivita CAT bez vlivu na odolnost

Ne vždy však nastupující stres suchem vede ke zvýšení aktivity CAT. V některých studiích byly dokonce popsány zcela opačné vztahy, kdy aktivita mnoha enzymů vzrostla, zatímco aktivita CAT klesla, nebo nebyla ovlivněna. D'Souza a Devaraj (2011) popsali tento jev u *Lablab purpureus* L., kdy při stresu suchem poklesla aktivita CAT, zatímco aktivity APX a GR vzrostly. Z toho, že vzrostly aktivity obou těchto enzymů lze usuzovat, že rostlina využívá k odbourávání spíše cestu přes ASA-GSH cyklus. Současně vzrostly koncentrace askorbátu a glutathionu, což opět svědčí o tom, že došlo k posílení celého tohoto cyklu. Zvýšené množství peroxidu vodíku tak mohlo být způsobené zvýšenou aktivitou SOD a sníženou aktivitou CAT, která má vznikající peroxid vodíku odbourávat.

Nárůst aktivity CAT u citlivých genotypů

V souladu s předpokladem a na základě výsledků mnoha prací je patrné, že zvýšená aktivita CAT souvisí s lepší odolností vůči suchu. Nicméně ani v tomto případě nejsou výsledky zcela jednoznačné a v řadě prací byly zjištěny odlišné vztahy.

Komplexní ochrana rostliny během sucha je patrná u *Cleome gynandra* L. jakožto odolného druhu vůči suchu. Oproti ostatním antioxidantům však jeho aktivita CAT vzrostla až ke konci stresu a i sledovaná exprese odpovídajícího genu byla nezměněna na rozdíl od citlivého *Cleome spinosa* Jacq., kde byla několikanásobně zvýšena a i aktivita byla vyšší. Nicméně je zde patrné, že funkci CAT u odolného druhu převzaly peroxidázy (POX, APX), protože jejich aktivita byla zvýšená a zajistila tak rostlině odolnost (Uzilday *et al.*, 2012). Podobně popisují nárůst aktivity CAT u citlivého genotypu *Phaseolus vulgaris* L. oproti odolnému Rosales *et al.* (2012).

Další příklady obdobných vztahů byly publikovány u *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (Pinheiro *et al.*, 2004), *Oryza sativa* L. (Selote a Khanna-Chopra, 2004). *Musa* L. (Chai *et al.*, 2005).

Obdobná funkce CAT a APX v rostlinné buňce

CAT i APX odbourávají v buňce peroxid vodíku. V porovnání s CAT, má APX k peroxidu vodíku větší afinitu, což je v souladu s větším nárůstem aktivity APX oproti CAT, který byl opakovaně pozorován u mnoha odolných genotypů různých druhů rostlin. Např. u rostlin *Nicotiana tabacum* L., kde byl nárůst aktivity APX větší než CAT (Van Rensburg a Kruger, 1994). Podobně u *Oryza sativa* L., kde došlo u odolného genotypu ke zvýšení aktivity všech antioxidantů kromě CAT, zatímco u citlivého, kde všechny antioxidanty AsA-GSH cyklu vykazovaly pokles, aktivita CAT vykazovala nárůst (Selote a Khanna-Chopra, 2004). U *Sedum album* L. došlo sice k nárůstu aktivity CAT už 4. den stresu, avšak od 8. dne aktivita začala opět klesat až pod hodnoty kontrolních rostlin, zatímco aktivita APX sice vzrostla později, ale svou zvýšenou aktivitu si od 8. dne již udržela až do konce stresu (Habibi a Hajiboland, 2012). Zvýšená aktivita APX doprovázená sníženou nebo nezměněnou aktivitou CAT u odolných genotypů vůči stresu suchem byla zjištěna také u *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (Pinheiro *et al.*, 2004), *Musa* L. (Chai *et al.*, 2005), *Poa pratensis* L. (Xu *et al.*, 2011), *Triticum aestivum* L. (Huseynova, 2012).

3.5.1.4 Peroxidáza

Peroxidáza, označovaná často jako POX nebo POD, je enzym, který spolu s CAT a APX odbourává peroxid vodíku v buňkách. Kromě toho zajišťuje v buňkách i další významné funkce. Je lokalizována do vakuol, buněčných stěn a cytosolu (Vaseva *et al.*, 2012) a podílí se na polymerizaci skořicových alkoholů během tvorby ligninu a suberinu. Ukládání ligninu v reakci na sucho především do buněk kořene, aby tak se tak zabránilo úniku vody, popisují Li *et al.* (2013).

Zvýšené množství POX může být dáno buď de novo syntézou (alespoň v některých případech), nebo uvolňováním z membrán, (kde je normálně asociována) spuštěné zvýšenou koncentrací peroxidu vodíku (Huseynova, 2012).

Nárůst aktivity POX spolu s ostatními antioxidanty

Fungující kooperaci enzymů odbourávajících peroxid vodíku, tj. APX, CAT a POX dokládá Boldaji *et al.* (2012) u rostlin *Medicago sativa* L., u kterých sice došlo vždy ke zvýšení aktivity u obou genotypů, ale u odolného vždy více než u citlivého. Nárůst aktivity POX (spolu s ostatními antioxidanty) v důsledku stresu suchem popisují rovněž Tian *et al.* (2012b) u *Tagetes erecta* L. Ten byl však patrný jak u odolného, tak u citlivého genotypu. U obou však aktivita v průběhu stresu poklesla, ale zatímco u odolného zůstala stále vyšší v porovnání s kontrolními rostlinami, u citlivého klesla až na aktivitu kontrolních rostlin. Také u odolného *Cleome gynandra* L. byl zaznamenán větší nárůst aktivity POX oproti citlivému *Cleome spinosa* Jacq. navíc doprovázen větším počtem POX izoenzymů (Uzilday *et al.*, 2012).

Další podobné výsledky byly publikovány u *Cicer arietanum* L. (Mafakheri *et al.*, 2011), *Triticum aestivum* L. (Devi *et al.*, 2012), (Chakraborty a Pradhan, 2012), *Trifolium repens* L. (Li *et al.*, 2013).

POX ve funkci hlavního antioxidantu

V některých pracích je aktivita POX považována za zásadní co se týče odolnosti vůči suchu. Nejspíše velmi důležitou roli v odolnosti představuje POX u *Medicago sativa* L., kde to byl jediný enzym, jehož aktivita v reakci na sucho vzrostla. Nicméně zvýšená aktivita tohoto antioxidantního enzymu nemusí ještě nutně zaručovat odolnost (He *et al.*, 2012). U *Triticum aestivum* L. byla pozorována silná negativní korelace mezi aktivitou POX a poškozením membrán a naopak pozitivní s množstvím chlorofylu *b*. Takže v případě jeho vysoké aktivity měla rostlina i hodně chlorofylu *b* a naopak málo peroxidu vodíku. Z toho je patrné, že se aktivně a pozitivně podílel při reakci na suchu (Sharifi *et al.*, 2012). Podle Rai *et al.* (2012) však nemůže být samotné POX přičítána odolnost vůči suchu, protože v buňce zastává ještě další funkce během růstu buňky a tvorby ligninu, takže je vhodné jeho aktivitu měřit ještě spolu s dalšími antioxidanty.

POX není určujícím antioxidantem

Zatímco u většiny studovaných rostlin hrála aktivita POX významnou roli spolu se zvýšenými aktivitami ostatních antioxidantů, u *Capsicum annuum* L. byla aktivita POX zvýšená jak u odolného, tak u citlivého genotypu bez rozdílu, takže tento enzym nejspíše nebyl rozhodující, pokud jde o odolnost rostlin vůči stresu suchem (Anjum *et al.*, 2012). Naopak sníženou aktivitu POX a především celkově nejnižší hodnoty u odolného genotypu *Panicum miliaceum* L. popisují Zhang *et al.* (2012), kde by ale tento trend mohl souviset s extrémně dlouhým stresem (42 dní). Autoři také poukazují na možnou funkci POX jakožto spoluúčastníka tvorby ROS a degradace chlorofylu především v pozdějších stádiích senescence. V tom případě by naopak bylo žádoucí, aby jeho aktivita byla nízká. U citlivého genotypu *Oryza sativa* L. byl dokonce zjištěn o jeden izoenzym POX více než u odolného, nicméně i přes to byla aktivita POX u odolného celkově vyšší (Selote a Khanna-Chopra, 2004).

Další rostlinné druhy, ve kterých POX nehrála zásadní roli související s odolností vůči stresu suchem, jsou *Arachis hypogaea* L. (Akçay *et al.*, 2010), *Kochia scoparia* (L.) Schrad. (Masoumi *et al.*, 2010), *Gypsophila aucheri* Boiss. (Sekmen Esen *et al.*, 2012).

3.5.1.5 Superoxid dismutáza

Superoxid dismutáza (SOD) je prvním enzymem detoxifikačního procesu, který katalyzuje reakci přeměny superoxidového radikálu na peroxid vodíku a kyslík. Je to metalloenzym a v závislosti na jeho kovovém kofaktoru se rozděluje SOD do třech typů. Fe-SOD, který je lokalizován v chloroplastech, Mn-SOD, který je lokalizován v mitochondriích, peroxizómech a apoplastu a CuZn-SOD, který je lokalizován v chloroplastech, peroxizómech a cytosolu a s předchozími dvěma je strukturně nepříbuzný (Del Río *et al.*, 2002), (Tan *et al.*, 2011). Změny v rozložení, distribuci a regulaci jednotlivých SOD jsou adaptačním mechanismem na oxidativní stres (Perez-Lopez *et al.*, 2009). Jeho detoxifikační aktivita je důležitá především v chloroplastech a mitochondriích, kde jsou superoxidové radikály produkovány metabolickou nerovnováhou během stresu (Asada, 2006).

Tan *et al.* (2011) sledovali aktivitu SOD v různých kompartmentech buňky u *Zea mays* L. a zjistili, že nejaktivnější byl tento enzym v reakci na sucho v mitochondriích a apoplastech. Nicméně především v mitochondriích dochází v důsledku sucha k největšímu nárůstu oxidace lipidů a tudíž největší produkci ROS (Bartoli *et al.*, 2004). V této souvislosti autoři navrhují, že by případné zvýšení odolnosti rostlin vůči suchu mohlo být směřováno na zvýšenou ochranu mitochondrií před ROS a naopak posílení jejich akumulace do apoplastu, odkud se nemůžou tak snadno dostat do buňky. V porovnání s chloroplasty, v mitochondriích došlo ke zvýšení aktivity izoenzymů SOD již po 4 hodinách působení stresu suchem pomocí PEG, zatímco u chloroplastů byl prokazatelný nárůst zaznamenán až 8 hodin po aplikaci PEG. V cytosolu naopak došlo k největšímu nárůstu aktivit antioxidantů, výrazně většinu než v kterémkoliv jiném subcelulárním kompartmentu (Tan *et al.*, 2011).

Pokles množství (a tudíž aktivity) enzymu je dán buď posílením degradace enzymu, nebo redukcí syntézy. Také akumulace peroxidu vodíku během sucha může snižovat aktivitu SOD (Zhang a Kirkham, 1996). Navíc je několik izoform, které reagují na stres různě (Selote a Khanna-Chopra, 2004).

Nárůst aktivity SOD především na začátku stresu

Jakožto enzym fungující v první linii obrany proti oxidativnímu stresu je aktivita SOD zvýšená často především v počátečních fázích stresu.

Anjum *et al.* (2012) pozorovali u *Capsicum annuum* L. významný nárůst aktivity SOD především na začátku stresu, poté již aktivita klesala, což odráží funkci SOD, jakožto prvního článku detoxifikačního systému. Viditelný nárůst aktivity SOD především na počátku stresu byl popsán také u *Tagetes erecta* L. U těchto rostlin byl však také doprovázen stejným trendem aktivit i ostatních antioxidačních enzymů, které také vykazovaly nárůst aktivity především v počátcích stresu. Ačkoliv poté došlo k poklesu, aktivita u odolného kultivaru nikdy neklesla pod hodnoty kontrolních rostlin (Tian *et al.*, 2012b).

Další práce, ve kterých aktivita SOD u rostlin vzrostla především na počátku stresu: *Triticum aestivum* L. (He *et al.*, 2011), *Helianthus tuberosus* L. (Zhang *et al.*, 2011), *Pulegium vulgare* Mill. (Candan a Tarhan, 2012).

Ne vždy však aktivita SOD vzroste hned na začátku stresové periody. U odolného genotypu *Triticum aestivum* L. vzrostla prudce aktivita SOD až v poslední fázi stresu suchem. Vzhledem k tomu, že aktivita tohoto enzymu nekorelovala s aktivitou nějakého jiného enzymu, lze o důležitosti jeho funkce v tomto případě pochybovat (Huseynova, 2012). Časný nástup působení SOD nemusí vždy znamenat pro citlivé rostliny výhodu. U odolnějšího *Sedum album* L. došlo k nárůstu aktivity SOD až 8. den stresu, zatímco u citlivějšího *Sedum stoloniferum* S. G. Gmel. již 4. den. Nicméně u citlivějšího druhu došlo k výraznějšímu poklesu jeho aktivity s postupujícím suchem (Habibi a Hajiboland, 2012).

Nárůst aktivity SOD je doprovázen zvýšenou aktivitou CAT a peroxidázami

SOD katalyzuje vznik peroxidu vodíku, je tedy žádoucí současná zvýšená aktivita ostatních antioxidantů. Pokud by nárůst aktivity SOD nebyl doprovázen nárůstem ostatních antioxidantů, mohlo by docházet k akumulaci škodlivého peroxidu vodíku. U rostlin *Solanum lycopersicum* L. došlo u odolného genotypu k nárůstu aktivity SOD, která však nebyla následována nárůstem množství peroxidu vodíku. Ten byl efektivně odbourávaný jinými antioxidanty (CAT, GR, APX) (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). Nárůst aktivity SOD byl doprovázen zvýšenou aktivitou CAT, APX a POX, a to ve zvýšené míře, také u odolného

genotypu *Medicago sativa* L. (Boldaji *et al.*, 2012). Další podobné výsledky byly popsány u rostlin *Saccharum officinarum* L., kde došlo ke zvýšení aktivity SOD a dalších enzymů u odolných genotypů (Cia *et al.*, 2012). Nicméně již Inman Bamber (2004) poukazuje na fakt, že *Saccharum officinarum* L. je C4 rostlina, tudíž má své typické mechanismy, jak si optimální koncentraci CO₂ udržet i při zavřených průdušicích. Zavírání průduchů je jedna z prvních reakcí rostlin na sucho a při nastalém nedostatku CO₂ dochází k tvorbě ROS, takže v tomto směru mají C4 rostliny trochu výhodu oproti C3 rostlinám a nemusely by tedy zvýšenou aktivitu antioxidantů potřebovat.

Další příklady spolupráce všech enzymů jsou patrné u *Beta vulgaris* L. (Sayfzadeh *et al.*, 2011), *Medicago sativa* L. (Boldaji *et al.*, 2012), *Triticum aestivum* L. (Chakraborty a Pradhan, 2012), *Phaseolus vulgaris* L. (Rosales *et al.*, 2012).

Vysoká aktivita SOD není doprovázena zvýšenou aktivitou CAT a peroxidázami

Zvýšená aktivita SOD ovšem nemusí být vždy pro buňku prospěšná a to především pokud není následována účinnou detoxikací peroxidu vodíku. Ten se v tom případě v buňce hromadí a může způsobovat vážná poškození. Toto je patrné především u některých citlivých genotypů *Solanum lycopersicum* L. (Ünyayar *et al.*, 2005), *Nicotiana benthamiana* Domin (Deng *et al.*, 2012).

Zvýšená aktivita SOD nemusí být doprovázena zvýšenou aktivitou POX, což bylo publikováno např. u odolného genotypu *Triticum aestivum* L. Vzhledem k tomu, že nebyly studovány žádné další antioxidanty je pravděpodobné, že funkci POX zastal jiný enzym (Bano *et al.*, 2012). Podobné výsledky byly zjištěny u *Guizotia abyssinica* Cass., kde však bylo sledováno více enzymů (APX, CAT), jejichž aktivita na rozdíl od aktivity SOD poklesla. Odolné genotypy však měly i tak nejvyšší hodnoty aktivit studovaných enzymů, což nejspíše zajistilo odolnost rostliny, možná spolu s některými jinými mechanismy (Ghane *et al.*, 2012).

Pokles aktivity SOD a současný nárůst aktivit ostatních měřených antioxidantů

Jak je tedy patrné, aktivita SOD má v rostlinné buňce svou zásadní funkci. Jsou však popsány i případy, kdy se aktivita SOD v reakci na suchu u odolného genotypu nezvyšovala. Například u *Cleome gynandra* L. došlo v reakci na stres suchem k nárůstu všech měřených antioxidantů kromě SOD, jejíž aktivita naopak poklesla. Avšak i přes pokles aktivity SOD byly její hodnoty dost vysoké, aby rostlině zajistily odolnost (Uzilday *et al.*, 2012). Také u rostlin *Medicago sativa* L. způsobil mírný stres pokles aktivity SOD, který byl doprovázený nárůstem aktivity APX a CAT (Rubio *et al.*, 2002). Podobné výsledky byly publikovány u *Musa* L. (Chai *et al.*, 2005), nebo *Atriplex hortensis* L. (Sai *et al.*, 2012). Odbourávání superoxidového radikálu, které nezajišťuje SOD, může být zprostředkováno přes askorbát nebo glutathion, takže u genotypů, u nichž nedošlo ke zvýšení aktivity SOD, může být odbourání zprostředkováno tímto způsobem (Smirnoff, 1995).

Rozdílné reakce izoenzymů SOD na stres suchem

Jak bylo již uvedeno výše, rostlinné SOD se vyskytují v několika formách v závislosti na svém kovovém kofaktoru. Reakce rostlin na stres se proto často posuzuje i z hlediska zastoupení jednotlivých forem.

Například odolný genotyp *Oryza sativa* L. měl o dva izoenzymy SOD více než citlivý genotyp po vystavení stresu suchem (Selote a Khanna-Chopra, 2004). U *Gypsophila aucheri* Boiss. nebyla u kontrolních rostlin vůbec zjištěna aktivita Mn-SOD, na rozdíl od stresovaných rostlin, u nichž naměřena byla a u nichž bylo kromě toho ještě zvýšeno množství Fe-SOD (Sekmen Esen *et al.*, 2012). Naproti tomu Cia *et al.* (2012) považují CuZn-SOD za hlavní izoenzym odpovídající v buňce za odbourávání superoxidového radikálu také proto, že nebyl detekován Fe-SOD. Uzilday *et al.* (2012) porovnávali C3 *Cleome spinosa* Jacq. a C4 *Cleome gynandra* L. Oba druhy mají zastoupeny všechny izoenzymy SOD, ale odolnější *Cleome gynandra* L. měla více izoforem CuZn-SOD, i když celkově aktivita SOD byla u tohoto druhu nižší. To lze vysvětlit tím, že odolnému druhu stačila pro zachování dobrých růstových podmínek stávající aktivita. Navíc u citlivého genotypu sice došlo ke zvýšení aktivity SOD, ale i tak byla rostlina v důsledku působení sucha více poškozena (měřeno množství MDA). Rozdíl mezi těmito dvěma druhy byl ještě také v tom, že u odolného *Cleome gynandra* L. byl zaznamenán nárůst Fe-SOD2 a CuZn-SOD2, z čehož autoři usuzují, že pro rostliny jsou

důležitější při odbourávání superoxidového radikálu kompartmenty cytosol a chloroplasty, zatímco u *Cleome spinosa* Jacq. došlo k nárůstu Mn-SOD, což by odpovídalo spíše mitochondriálnímu uložení SOD.

Také Keles a Ünyayar (2004) sledovali podrobněji změny aktivity CuZn-SOD v jednotlivých kompartmentech. V reakci na sucho došlo k zvýšení aktivity cytosolické CuZn-SOD u *Helianthus annuus* L., zatímco aktivita CuZn-SOD lokalizované v chloroplastech zůstala neovlivněna.

Kholová *et al.* (2011) identifikovali u *Pennisetum glaucum* L. 9 izoforem SOD, nicméně aktivita žádné průkazně v reakci sucho nestoupla.

3.5.1.6 Monodehydroaskorbát reduktáza a dehydroaskorbát reduktáza

Tyto dva enzymy se účastní enzymatické regenerace askorbátu, vyskytují se v chloroplastech, mitochondriích a cytosolu, kde se účastní AsA-GSH cyklu. Nejčastěji studované antioxidační enzymy tohoto cyklu jsou APX a GR a dále glutathion a askorbát, nicméně v některých studiích je věnována pozornost i mono- a dehydroaskorbát reduktáze.

Monodehydroaskorbát reduktáza (MDHAR) je účinný akceptor elektronů a je redukován přímo na askorbát elektrony z elektrontransportního řetězce (Noctor a Foyer, 1998). Spolu s APX pomáhá odbourávat škodlivý peroxid vodíku v mitochondriích a peroxizómech (Del Río *et al.*, 2002).

Dehydroaskorbát reduktáza (DHAR) katalyzuje regeneraci askorbátu z jeho oxidovaného stavu (DHA) a slouží jako důležitý regulátor recyklace askorbátu (Noctor a Foyer, 1998).

Význam celého AsA-GSH cyklu zdůrazňují Xu *et al.* (2011), kteří u odolného genotypu *Poa pratensis* L. v reakci na sucho popsali zvýšení aktivity nejen MDHAR a DHAR, ale také APX a GR, na rozdíl od aktivit SOD, CAT a POD, jejichž aktivity se v důsledku stresu průkazně neměnily. Sánchez-Rodríguez *et al.* (2012) potvrzují nárůst aktivity MDHAR a DHAR odolného genotypu *Solanum lycopersicum* L. spolu s nárůstem aktivity APX a GR, což dokazuje komplexní fungování celého řetězce. Také u citlivého a odolného genotypu *Oryza sativa* L. došlo k nárůstu aktivity DHAR v reakci na 20- ti denní stres suchem, nicméně u odolného byl tento nárůst větší (Ji *et al.*, 2012).

Naopak Pinheiro *et al.* (2004) popisují v reakci na sucho nárůst aktivity DHAR u jednoho citlivého genotypu *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, doprovázený zvýšením

aktivit i ostatních enzymů, s výjimkou GR. U jiného citlivého genotypu a dvou odolných žádné změny aktivit v souvislosti se stresem nepozorovali. Dále zjistili i zvýšené množství MDA, což svědčí o tom, že celkově se rostlina se stresem nevyrovnala dobře. To by mohlo být dáno právě sníženou aktivitou u jediného enzymu, glutathion reduktázy.

3.5.1.7 Ostatní antioxidační enzymy

Mezi antioxidační enzymy se dále řadí např. guaiacol peroxidáza (GPOX), glutathion peroxidáza (GPX) nebo glutathion-S-transferáza (GST). Tyto enzymy jsou však studovány méně často: (Pourtaghi *et al.*, 2011), (Cia *et al.*, 2012), (Ghane *et al.*, 2012), (Shi *et al.*, 2012), (Valifard *et al.*, 2012).

3.5.2 Neenzymatické antioxidanty

3.5.2.1 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová (AsA) je jedním z nejmocnějších antioxidantů. Vyskytuje se většinou typů buněk, v organelách i apoplastu. Za normálních fyziologických podmínek se AsA vyskytuje z 90% v redukované formě. Její schopnost poskytnout elektrony v řadě enzymatických a neenzymatických reakcí jí činí hlavní látkou detoxikující ROS ve vodné fázi (Smirnov, 2000). AsA dokáže přímo odbourávat O_2^- , OH^- , 1O_2 , a redukovat peroxid vodíku na vodu pomocí APX (Noctor a Foyer, 1998). V chloroplastech funguje jako kofaktor violaxantinové deepoxidázy, čímž umožňuje disipaci přebytečné excitační energie. AsA regeneruje tokoferol z tokoferoxylového radikálu, čímž chrání membrány (Smirnov, 2000).

Nárůst množství AsA v reakci na stres suchem

Vzhledem k tomu, že je AsA zásadní článkem AsA-GSH cyklu (Obr. 4), je velice časté, že jeho množství koreluje s aktivitami příslušných enzymů během reakce na stres suchem. K nárůstu množství AsA došlo například u obou genotypů *Tagetes erecta* L. lišících se v citlivosti vůči suchu během 6- ti denního stresu suchem. Množství AsA u obou genotypů rostlo do 4. dne stresu, poté začalo klesat. Pokles množství u odolného genotypu však byl pozvolný a zůstával stále vyšší než u kontrolních rostlin na rozdíl od citlivého genotypu, u něhož po 4. dnu množství kleslo pod hodnoty kontrolních rostlin (Tian *et al.*, 2012b). Rozdílná reakce dvou odlišných genotypů na suchu, pokud jde o změny AsA, byla popsána také u *Phaseolus vulgaris* L. Množství AsA u odolného genotypu během působení stresu suchem vzrostlo, zatímco u citlivého nebyly patrné průkazné změny. V tomto případě však autoři nepřikládají AsA tak velkou váhu, protože její množství vzrostlo u citlivého genotypu také, ale neprůkazně (Rosales *et al.*, 2012).

U dvou genotypů *Nicotiana benthamiana* Domin s rozdílným stupněm ploidie a odolností bylo také studováno množství askorbátu a glutathionu v listech. U obou genotypů množství rostlo se stresem stejně, ale celkově vyšší hodnoty byly u odolného. Tuto vyšší akumulaci neenzymatických antioxidantů autoři vysvětlují lepší schopností oktoploidních rostlin kumulovat sekundární metabolity, jelikož i jejich růst je pomalejší a buňky větší. Výhoda většího množství neenzymatických antioxidantů je ta, že enzymatické antioxidanty

mohou být v případě smrti buňky jednoduše inaktivovány, zatímco neenzymatické ne a mohou déle fungovat při detoxifikaci ROS. Jejich vyšší množství by tedy mohlo být klíčové v odolnosti oktoploidních rostlin *Nicotiana benthamiana* Domin (Deng *et al.*, 2012).

Nárůst množství AsA u citlivých a odolných genotypů byl popsán také u *Zea mays* L. a *Carthamus tinctorius* L., avšak odolné genotypy měly vždy vyšší hodnoty než citlivé (Chugh *et al.*, 2011), (Hojati *et al.*, 2011). U rostlin *Triticum aestivum* L. byl sice pozorován nárůst množství AsA, ale bez rozdílu v závislosti na citlivosti rostlin vůči suchu. Limitujícím faktorem byl pravděpodobně jiný antioxidant (He *et al.*, 2011).

U rostlin *Pulegium vulgare* L. množství AsA v reakci na suchu postupně klesalo v porovnání s kontrolními rostlinami. Relativně vyšší hodnoty na počátku stresové periody naznačují, že se na antioxidantivní ochraně podílel do té doby, než byla jeho dostatečná zásoba v buňce vyčerpána (Hassanpour *et al.*, 2012).

Nezměněné množství AsA v reakci na stres suchem

Žádné rozdíly v množství AsA v závislosti na genotypu a stresu nebyly pozorovány u rostlin *Solanum lycopersicum* L. a to i přes to, že u odolného genotypu došlo k nárůstu aktivit enzymů AsA-GSH cyklu (APX, GR, DHAR) (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). Stejnou reakci popisují i Pinheiro *et al.* (2004) u rostlin *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, nebo Keles a Ünyayar (2004) u rostlin *Helianthus annuus* L. Odolnost u těchto rostlin byla nejspíše zajištěna jinými antioxidanty.

3.5.2.2 Glutathion

Glutathion (GSH) je v buňce hojně zastoupený tripeptid, který je považován za vůbec nejdůležitější intracelulární neenzymatický antioxidant. Můžeme ho najít téměř ve všech buněčných částech a v buňce zastává mnoho funkcí (Noctor a Foyer, 1998). V kombinaci se svou oxidovanou formou (GSSG) udržuje redox rovnováhu v jednotlivých buněčných kompartmentech. Za svůj vysoký redukční potenciál vděčí centrálnímu nukleofilnímu cysteinovému zbytku, který odbourává toxický peroxid vodíku a reaguje neenzymaticky s dalšími ROS jako jsou $^1\text{O}_2$, O_2^- , nebo $\text{OH}\cdot$. Podle poměru jeho redukované a oxidované formy (GSH:GSSG) lze usuzovat na míru oxidativního stresu v rostlině, protože v reakci

na působení stresu dochází k oxidaci GSH a tedy i snižování tohoto poměru. Jeho ústřední role v antioxidačním systému je také dána tím, že se účastní regenerace AsA přes AsA-GSH cyklus (Obr. 4) (Foyer a Noctor, 2005).

Nárůst množství GSH v reakci na stres suchem

Stejně jako u ostatních antioxidantů je i u GSH často pozorována odlišná změna v důsledku působení stresu suchem v závislosti na druhu rostlin, genotypu, podmínkách působení stresu, apod. Nárůst množství GSH spolu s dalšími antioxidanty (AsA, APX, GR) u odolného genotypu na rozdíl od citlivého byl popsán u *Oryza sativa* L. (Selote a Khann-Chopra, 2004), nebo u *Tagetes erecta* L. U této rostliny však nedošlo k poklesu jeho množství u citlivého genotypu, jako tomu bylo u *Oryza sativa* L., nýbrž jeho koncentrace zůstala po dobu stresu stejná jako u kontrolních rostlin (Tian *et al.*, 2012b).

Nárůst množství GSH u odolného genotypu doprovázený nárůstem také u citlivého genotypu byl popsán u *Carthamus tinctorius* L., ale s tím rozdílem, že odolný genotyp měl celkově více GSH, což zřejmě přispělo jeho lepšímu prospívání během sucha (Hojati *et al.*, 2011). Obdobné výsledky popisují Deng *et al.* (2012) u odolných a citlivých rostlin *Nicotiana benthamiana* Domin.

Pokles/nezměněné množství GSH v reakci na stres suchem

Ne vždy odolné genotypy reagují na stres suchem zvýšením množství GSH, nicméně i přes to si zachovávají odolnost. U *Solanum lycopersicum* L. se u odolného genotypu množství GSH v reakci na sucho sice nezměnilo, místo toho však zareagoval citlivý genotyp poklesem množství GSH, což byl projev jeho citlivosti vůči suchu. Spolu s GSH odpovídala odolnosti zvýšená aktivita i ostatních antioxidantů (APX, GR, DHAR, CAT) (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012).

Opačný trend oproti ostatním měřeným antioxidantům (AsA, APX, CAT) byl pro GSH popsán u rostlin *Zea mays* L., kdy se v reakci na sucho u odolného genotypu jeho množství nezměnilo, zatímco u citlivého vzrostlo (Chugh *et al.*, 2011).

V literatuře byl popsán i pokles GSH v reakci na stres suchem. To dokazují Loggini *et al.* (1999) u rostlin *Triticum durum* Desf., nicméně u citlivého genotypu byl pokles větší než u odolného.

3.5.2.3 Prolin

Během sucha klesá vodní potenciál půdy a spolu s ním se zpomaluje tok vody z kořenů do apikálních částí. Nastupující osmotický stres pak může negativně ovlivnit řadu metabolických, fyziologických a vývojových procesů v rostlině (produkci ROS, pokles fotosyntézy, inhibici růstu, apod.). Reakce na osmotický stres je u rostlin doprovázena akumulací kompatibilních solutů, např. prolinu, glycinbetainu, mannitolu, sorbitolu, sacharózy, trehalózy atd. Jsou to malé nenabitě molekuly rozpustné ve vodě při fyziologickém pH. V buňce může docházet k jejich akumulaci do vysokých koncentrací, bez toho aniž by docházelo k poškození buněčných struktur, protože jsou obvykle vyřazeny z hydratační vrstvy makromolekul (Hare a Cress, 1997). Tyto kompatibilní soluty snižují vodní potenciál buňky pod hodnoty vnějšího prostředí, aby docházelo k příjmu vody buňkou, nebo nedocházelo k jejím ztrátám a buňka si tak udržela dostatečný turgor pro růst. Prolin je jednou z nejvýznamnějších látek této skupiny a jeho zvýšené množství v reakci na stres bylo popsáno u mnoha rostlinných druhů (Trovato *et al.*, 2008) (Obr. 5).

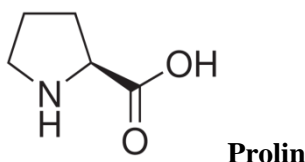
Kromě své funkce jakožto osmolyt je prolin především účinnou antioxidační látkou a možným inhibitorem programované buněčné smrti (Chen a Dickman, 2005). Volný prolin funguje jako osmoprotektant, udržuje správné konformace proteinů, je inhibitorem peroxidace lipidů (stabilizuje membrány), je také zdrojem energie, vyvazuje těžké kovy, odbourává $^1\text{O}_2$ a OH^\cdot (Kishor *et al.*, 2005). S volnými kyslíkovými radikály vytváří komplexy, které spolu dokáží být dlouho asociované a tím zmírňuje jejich negativní dopad na buňku (Floyd a Zsnagy, 1984).

Akumulace této aminokyseliny je využívána jako fyziologicko-biochemický indikátor vodního stresu, takže zvýšení její koncentrace je spojováno s větší odolností vůči suchu (Molinari *et al.*, 2007). To potvrzují Moustakas *et al.* (2011) na rostlinách *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., na které byl exogenně aplikován prolin, a u kterých následně došlo nárůstu množství sacharidů (mají obdobnou funkci jako prolin), poklesu peroxidace lipidů (měřeno MDA), tyto rostliny také vykazovaly větší toleranci k fotoinhibici. Význam prolinu jako indikátoru vodního stresu byl potvrzený u různých druhů rostlin Van Heerden a Krüger (2002), Akcay *et al.* (2010), He *et al.* (2011), Baloglu *et al.* (2012), Shi *et al.* (2012).

Nárůst množství prolinu v reakci na stres suchem

Na rozdíl od výše popsaných antioxidantů, množství prolinu v reakci na stres suchem neklesalo, naopak ve většině případů rostlo. Rozdíl mezi genotypy byl tedy většinou dán rozsahem tohoto nárůstu (větší u odolných). To potvrzuje jasné zapojení prolinu do protistresových reakcí rostlin a jeho význam při určování odolnosti (Van Heerden a Krüger, 2002), (Moussa a Abdel-Aziz, 2008), (Akcaý *et al.*, 2010).

Reakce dvou odlišných genotypů *Helianthus tuberosus* L. lišících se odolností vůči stresu suchem navozeným PEG (48 hodin) měla stejný trend. U obou genotypů došlo k výraznému nárůstu koncentrace prolinu až po 24 hodinách stresu, ale u odolného bylo jeho množství na konci stresové periody mírně vyšší než u citlivého, ačkoliv výchozí množství se u obou genotypů nelišila (Zhang *et al.*, 2011). Stejně výsledky publikovali u *Triticum aestivum* L. He *et al.* (2011). Přes počáteční stejné množství prolinu u obou genotypů došlo u odolného v důsledku stresu suchem k většímu nárůstu oproti citlivému a spolu s CAT měly hlavní vliv na odolnost. U rostlin *Cynodon dactylon* (L.) Pers. došlo k nárůstu množství u všech genotypů, nicméně stejně jako u ostatních antioxidantů (SOD, CAT), byl tento nárůst největší u odolného genotypu a nejnižší u citlivého. U všech však došlo k nejvýznamnějšímu nárůstu až poslední, 21. den stresu (Shi *et al.*, 2012). Podobný nárůst množství prolinu u obou genotypů a i u dalšího antioxidantu (CAT) byl pozorován u *Triticum aestivum* L. U těchto rostlin však došlo u odolného genotypu k většímu a konstantnímu nárůstu, zatímco u citlivého byl nárůst menší a na závěr desetidenního stresu jeho množství pokleslo (Valifard *et al.*, 2012). Na významnější roli neenzymatických antioxidantů (prolin) u rostlin *Guizotia abyssinica* Cass. poukazují Ghane *et al.* (2012), protože zatímco aktivity většiny studovaných antioxidačních enzymů (CAT, APX) klesly, množství prolinu vzrostlo. Největší nárůst byl zaznamenán právě u odolných genotypů a to především u rostlin, které byly podrobené nejsilnějšímu stresu (dlouhodobé pěstování při 60% nasycenosti substrátu).



Obrázek 5. Konstituční vzorec prolinu.

Převzato z <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p0380?lang=en®ion=CZ>

Velmi výrazný (až desetinásobný), nárůst množství prolinu byl v reakci na stres simulovaný PEG pozorován u odolného genotypu *Helianthus annuus* L., zatímco u citlivého genotypu byl tento nárůst mírně nižší (Baloglu *et al.*, 2012). Větší nárůst množství prolinu a celkově vyšší hodnoty byly pozorovány rovněž u odolného genotypu *Capsicum annuum* L. v porovnání s citlivým (Anjum *et al.*, 2012).

Vysoké množství prolinu u citlivých genotypů

I přesto, že je zvýšené množství prolinu často spojováno s odolností rostlin vůči suchu, neplatí ani tyto vztahy obecně. Ne vždy dochází k nárůstu množství prolinu u odolného genotypu na rozdíl od citlivého. Zcela opačný trend popisují u rostlin *Astragalus membranaceus* Fisch. Yong *et al.* (2006).

Velmi podobné množství prolinu u všech genotypů bylo pozorováno na počátku (3. den stresu) a i na konci stresu suchem (20. den) *Saccharum officinarum* L. Nicméně, rozdíl mezi odrůdami byl zjištěn v průběhu stresové periody (10. den), kdy bylo u citlivých genotypů zaznamenáno téměř dvojnásobné množství prolinu v porovnání s odolnými. Následující měřený den (20. den) množství prolinu u citlivého genotypu kleslo v porovnání s předchozím měřeným dnem (10. den), zatímco u odolného mírně vzrostlo. Množství prolinu u odolného genotypu tedy vykazovalo stabilnější trend oproti citlivému. U citlivého genotypu mohlo jít o mobilizaci veškerých jeho sil a jeho následné vyčerpání. Během stresu také mohlo docházet k rozkladu prolinu za účelem získání energie (Cia *et al.*, 2012). Na podobný jev poukazují rovněž Rosales *et al.* (2012) u rostlin *Phaseolus vulgaris* L., u nichž množství prolinu vzrostlo u citlivého genotypu a naopak zůstalo nezměněno u odolného.

Reakce rostlin *Glycine max* (L.) Merrill. na stres suchem byla v závislosti na genotypu a odolnosti nejednotná a to nejen u prolinu, ale také u dalších sledovaných antioxidantů (CAT, GR). U všech genotypů (2 odolné, 3 citlivé) sice došlo k nárůstu množství prolinu a např. u jednoho odolného byl tento nárůst největší a dosahoval i nejvyšších hodnot. Nicméně u druhého byl nárůst jen mírný a dokonce dosahoval téměř nejnižších hodnot. Naopak nárůst množství prolinu u jednoho citlivého genotypu byl srovnatelný s prvně zmíněným odolným. Zásadní roli prolinu v reakci na suchu tedy autoři potvrdili, nicméně závislost na odolnosti spíše ne (Masoumi *et al.*, 2011).

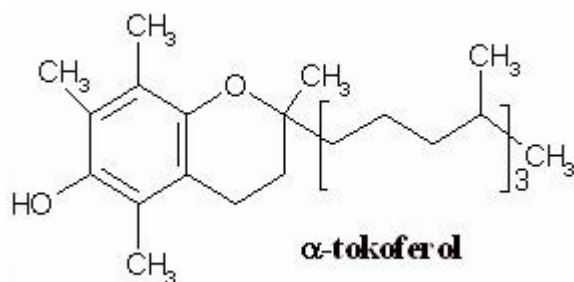
Nárůst množství prolinu u citlivých i odolných genotypů v důsledku stresu popsali Grzesiak *et al.* (2013) u rostlin *Triticum aestivum* L. Zajímavé je, že na rozdíl od předchozích

popsaných antioxidantů, odolný genotyp měl během normálních podmínek celkově méně prolinu než citlivý. Nicméně po navození stresu jeho množství vzrostlo tak, že výrazně převýšilo množství u citlivého genotypu. Zřejmě tedy více záleželo na aktivaci syntézy prolinu, než na jeho latentní koncentraci.

3.5.2.4 α -Tokoferol

Tokoferoly jsou antioxidanty rozpustné v tucích, které se považují za možné detoxikátory ROS a lipidových radikálů. Zásadní roli hrají v biomembránách (u rostlin v tylakoidní), do kterých jsou lokalizované a zajišťují jejich stabilitu, chrání polynenasycené mastné kyseliny před peroxidací. Ze čtyř izomerů (α -, β -, γ -, δ -), které se vyskytují v rostlinách, má α -tokoferol (Obr. 6) největší antioxidantivní aktivitu a tedy i význam (Hollander-Czytko *et al.*, 2005).

Nárůst množství α -tokoferolu v reakci na sucho byl zjištěn např. v listech pšenice. Autoři poukazují na to, že zvýšené množství tokoferolu je možná první reakcí na sucho a vyjadřuje vyšší antioxidantivní obrannou kapacitu chloroplastu (Herbinger *et al.*, 2002). Pozitivní vliv zvýšeného množství α -tokoferolu v souvislosti s reakcí rostlin na stres suchem byl potvrzen u různých druhů rostlin, např. u *Helianthus annuus* L. (Keles a Ünyayar, 2004), *Zea mays* L. (Ali *et al.*, 2010), *Carthamus tinctorius* L., (Hojati *et al.*, 2011).



Obrázek 6. Konstituční vzorec α -tokoferolu.

Převzato z http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/tokoferol.html

3.5.2.5 Ostatní neenzymatické antioxidanty

Ve stresové reakci rostlin se uplatňují i další neenzymatické antioxidanty, mezi něž se řadí flavonoidy, fenolické látky, nebo karotenoidy. S výjimkou karotenoidů nejsou ani tyto tak často studovány a získané výsledky nepřinesly obecnější závěry.

Vliv flavonoidů studovali např. (Ali *et al.*, 2010), (Rosales *et al.*, 2012), vliv fenolických látek (Ali *et al.*, 2010), (Rosales *et al.*, 2012) a vliv karotenoidů (Saglam *et al.*, 2011), (Candan a Tarhan, 2012), (Tian *et al.*, 2012b), nebo (Valifard *et al.*, 2012).

3.6 Další měřené parametry (podle kterých lze posuzovat odolnost/citlivost rostlin vůči suchu)

3.6.1 Peroxid vodíku

Jednou z hlavních ROS, které v rostlinné buňce vznikají v reakci na stres suchem, je peroxid vodíku (Obr. 3). V buňce je produkován především enzymem SOD, který ho vytváří během redukování superoxidového radikálu, a jeho hlavními detoxikátory jsou enzymy CAT, APX nebo POX. Nadměrné množství peroxidu vodíku může v buňce způsobovat oxidativní stres, například inaktivaci enzymů oxidováním jejich thiolových skupin, který může vést až k programované buněčné smrti. Účastní se také Fentonovy reakce, kdy oxiduje oxid železnatý za vzniku velmi toxického OH \cdot . Nicméně v nízkých koncentracích působí peroxid vodíku jako signální molekula účastnící se aklimačního signalizování při spouštění tolerance rostlin vůči biotickým a abiotickým stresům (Quan *et al.*, 2008). Peroxid vodíku je sice středně reaktivní na rozdíl od ostatních ROS, ale má delší poločas rozpadu (1 ms), zatímco O $_2^{\cdot-}$, OH \cdot , $^1\text{O}_2$ ho mají výrazně kratší (2-4 μs) (Bhattacharjee, 2005). Navíc bylo popsáno několik enzymatických systémů na povrchu rostlinných buněk produkujících peroxid vodíku, který by tak mohl být jednodušeji distribuován do dalších částí pletiva (Scandalios *et al.*, 1997). Také funguje jako regulátor v jiných fyziologických procesech jako je senescence, fotorespirace, fotosyntéza, pohyb prùduchů nebo růst a vývoj rostliny. Tvorba peroxidu vodíku v mezofylových buňkách způsobená suchem může být spojena se změnami ve struktuře buněčné stěny. Peroxid vodíku je také potřebný pro oxidativní polymerizaci skořicových alkoholů při tvorbě ligninu. Jeho zvýšené množství tak může souviset s přestavbami buněčné stěny během sucha. Ukládání ligninu do buněk kořene v reakci na sucho potvrdili Li *et al.*

(2013). Rostlina se tak brání únikům vody, ale zároveň si mechanicky brání růstu buňky, což může být důvodem menšího vzrůstu rostlin. Nicméně toto bylo prokázáno jen u buněk kořene, nikoliv listu.

Díky těmto vlastnostem je peroxid vodíku velice často studovanou látkou, častěji než ostatní ROS, a v mnoha případech je spolu s antioxidanty a malondialdehydem (MDA) měřena jeho koncentrace v souvislosti s odolností vůči suchu (Tian *et al.*, 2012b), (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012), (Huseynova, 2012), (Shi *et al.*, 2012). Je však potřebné jeho změny koncentrace v buňce porovnávat i s antioxidantními enzymy a celkovým prospíváním rostliny, aby bylo možné rozlišit, jestli je jeho zvýšené množství odrazem signalační role, nebo už oxidativního stresu.

Zhang *et al.* (2001) popsali zavírání průduchů v reakci na exogenně přidaný peroxid vodíku a jeho odbourání po přidání CAT u *Vicia faba* L. Peroxid vodíku může v tomto případě působit jako sekundární posel v hormonálně zprostředkované odpovědi průduchů na suchu. Stejně výsledky popsali u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Bright *et al.* (2006).

He *et al.* (2011) přisuzují peroxidu vodíku signalační funkci spíše než jeho toxický vliv. U rostlin *Triticum aestivum* L. došlo totiž v reakci na stres suchem k výraznému zvýšení množství peroxidu vodíku u odolného genotypu na počátku stresu a poté k následnému poklesu. Během dalšího průběhu stresu si již odolný genotyp udržoval nižší množství peroxidu vodíku než citlivý. Jeho počáteční nárůst koreloval s nárůstem aktivit antioxidantních enzymů (SOD, CAT), z čehož autoři usuzují, že bude mít signalační funkci během aktivace těchto enzymů. Autoři tak potvrzují to, na co upozornili již Foyer *et al.* (1997).

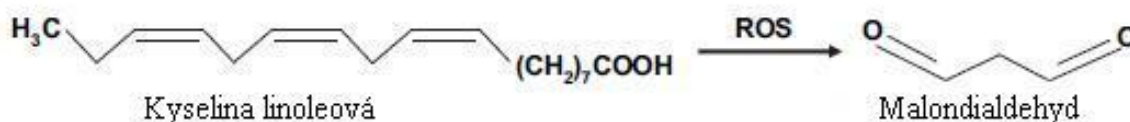
Naopak snížení množství peroxidu vodíku s postupujícím stresem suchem bylo zaznamenáno u rostlin *Triticum durum* (Desf.). U nich došlo v reakci na 35- ti denní stres suchem k poklesu množství peroxidu vodíku u obou genotypů. To vysvětlují autoři pomalým nástupem sucha, kdy se rostlina stihne aklimatizovat. Možná tímto pozvolným nástupem sucha nebo tím, že nebyl podrobně zaznamenán průběh stresu, nýbrž až 35. den stresu, nebyla patrná případná prvotní reakce. Nebo zkrátka rostlina netrpěla natolik, aby musela aktivovat obranné mechanismy, protože nedošlo ani k průkaznému zvýšení aktivity GR. Nicméně u citlivého genotypu byla pozorována nižší čerstvá i suchá hmotnost stresovaných rostlin (Loggini *et al.*, 1999).

Podobný případ byl popsán např. u rostlin *Arachis hypogaea* L., kde autoři pokles množství peroxidu vodíku vysvětlují účinným fungováním antioxidantních enzymů, především APX a CAT (Akçay *et al.*, 2010), nebo u *Phaseolus vulgaris* L. (Saglam *et al.*, 2011).

3.6.2 Malondialdehyd

Malondialdehyd (MDA) je jakožto finální produkt peroxidace lipidů (polynenasycených mastných kyselin) (Obr. 7) v buněčných membránách považován také za měřítko oxidativního poškození vzniklého z důvodu zvýšeného množství ROS. Měření tohoto parametru tak poskytuje poměrně přesnou představu o tom, jak moc rostlina trpí oxidativním stresem (Liu *et al.*, 2009) a jeho zvýšené množství v reakci na sucho bylo popsáno ve většině studovaných případů.

Poškození intracelulárních membrán může následně poškodit dýchací řetězec v mitochondriích, fixaci uhlíku v chloroplastech a tím způsobit degradaci chlorofylu. Zatímco poškození plasmatické membrány vede ke ztrátě osmolytů a smrti buňky (Scandalios, 2005).



Obrázek 7. Oxidace polynenasycené mastné kyseliny linoleové za vzniku malondialdehydu. Upraveno dle Gill a Tuteja (2010).

Nízké množství MDA spolu s vysokou aktivitou antioxidantů u odolných genotypů

Velice často je množství MDA v těsné negativní korelaci s aktivitou antioxidantů. Odolné genotypy, které mají v reakci na sucho zvýšenou aktivitu antioxidantů, efektivně odbourávají ROS a tak nedochází k peroxidaci lipidů a ke vzniku MDA. Na rozdíl od citlivých genotypů, kterým se při méně účinné antioxidantní ochraně ROS v buňkách hromadí a umožňují vznik MDA.

Tato korelace byla potvrzena u mnoha odlišných druhů rostlin, např. u *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (Lima *et al.*, 2002), *Phaseolus vulgaris* L. (Zlatev *et al.*, 2006), *Sesamum indicum* L. (Fazeli *et al.*, 2007), *Carthamus tinctorius* L. (Hojati *et al.*, 2011), *Capsicum annuum* L. (Anjum *et al.*, 2012), *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Shi *et al.*, 2012), *Trifolium repens* L. (Li *et al.*, 2013).

Často také vrůstajícímu množství MDA odpovídá i vzrůstající množství peroxidu vodíku. Akumulace těchto dvou látek je znakem špatné antioxidantní ochrany rostliny (Shi *et al.*, 2012), (Baloglu *et al.*, 2012).

Pinheiro *et al.* (2004) popisují odlišný jev, kdy u citlivých genotypů *Coffea canephora* Pierre ex Froehner došlo ke zvýšení aktivity antioxidantních enzymů (SOD, CAT, APX), které však bylo doprovázené i zvýšeným množstvím MDA. Citlivý genotyp potřeboval pro odbourání ROS zapojit více antioxidantů, ale ani tak mu to nestačilo k potlačení negativního účinku stresu suchem.

Těsný vztah hladiny MDA s aktivitou antioxidantů byl popsán u *Pulegium vulgare* Mill., u kterého množství MDA vzrostlo až ve chvíli, kdy s postupujícím stresem klesla aktivita antioxidantních enzymů (Candan a Tarhan, 2012).

Vysoké množství MDA u odolných, nebo nízké množství MDA u citlivých genotypů

Odlišná reakce na stres byla zjištěna u rostlin *Arachis hypogaea* L. Odolný genotyp měl navzdory vyšším aktivitám antioxidantních enzymů (GR, CAT) větší i nárůst množství MDA. Autoři tento jev u odolného genotypu vysvětlují rychlou výměnou fosfolipidů v poškozené membráně u odolného genotypu (Akçay *et al.*, 2010).

Na rozdíl od výše zmíněných souvislostí mezi množstvím MDA a funkcí antioxidantů Nikolaeva *et al.* (2012) popisují nejnižší nárůst množství MDA právě u citlivého genotypu *Triticum aestivum* L. v porovnání s odolnými genotypy. Tento rozdíl byl však patrný až poslední, sedmý, den stresu. U odolných genotypů korelovalo zvýšené množství MDA s poklesem aktivit studovaných enzymů (APX, GR), které u nich do té doby rostly, zatímco u citlivého od počátku klesaly.

Kontinuální růst MDA a pokles antioxidantů s postupujícím stresem je také vysvětlován postupnou senescencí a nerovnováhou v ROS, které přibývají a rostlina se jich už neumí zbavovat (Zhang *et al.*, 2012).

3.7 Závěr

Z výše uvedeného přehledu je patrné, že reakce rostlin na stres suchem závisí na rostlinném druhu, genotypu, na délce a charakteru stresu. Jeho projevy mohou být studovány na různých úrovních a vždy je žádoucí porovnávat více parametrů, aby bylo možné vyvozovat obecnější závěry. Odpověď rostlin na stresové podmínky je komplexní a zahrnuje jak morfologické a fyziologické projevy, tak změny na úrovni antioxidantů. Z publikovaných prací je patrné, že vyšší aktivita antioxidantních enzymů, nebo větší množství antioxidantů bylo ve většině případů po navození stresu pozorováno u odolných genotypů různých druhů rostlin. Nicméně vzhledem k četným výjimkám, opačným trendům a neprůkazným vztahům, nemusí nárůst nebo pokles aktivity/množství antioxidantů vždy jasně vypovídat o reakci na stres.

Tabulka 1. **Reakce antioxidantů na stres suchem.** Souhrnná tabulka studií porovnávajících aktivity/množství antioxidantů u různých genotypů jednotlivých druhů rostlin. Genotypy se známou citlivostí/odolností vůči suchu jsou označeny „odolný“, nebo „citlivý“. Genotypy, jejichž citlivost/odolnost byla zjištěna daným pokusem a předem nebyla známa, jsou označeny „(odolný)“, „(citlivý)“. Genotypy, jejichž citlivost/odolnost nebyla určena, jsou označeny „-“. Změny aktivity/množství antioxidantů jsou porovnávány v rámci dané studie mezi sebou. Aktivity nebo množství antioxidantů buď rostly („nárůst“), nebo klesaly („pokles“) nebo nebyly změněny („NZ“). Nárůst/pokles aktivit nebo množství antioxidantů mohl být v rámci daných studií u jednotlivých genotypů větší („+“), menší („-“), a jejich celková aktivita/množství mohla být vyšší („v“) nebo nižší („n“) u daných genotypů v porovnání s ostatními v rámci dané studie.

Rostlinný druh	Genotyp	odolný/ citlivý/ neurčeno	AsA	GSH	DHAR	APX	GR	POX	CAT	SOD	prolin	MDA	Publikace	
<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench.	Okr-6, Okr-67, Okr-105	odolný				nárůst +	nárůst +						Kusvuran, (2012)	
	Okr-47, Okr-112	citlivý				nárůst -	nárůst -							
	Okr-36, Okr-39, Okr-89, Okr-105	-				nárůst	nárůst							
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Flonspan Gazipasa	odolný citlivý				nárůst - nárůst +	nárůst + nárůst -	NZ NZ	nárůst pokles		nárůst + nárůst -	nárůst + nárůst -	Akcay et al., (2010)	
<i>Astragalus membranaceus</i> Fisch.	Mongolia	odolný						nárůst	nárůst	nárůst	nárůst		Yong et al., (2006)	
	Wild	středně odolný						nárůst	nárůst	nárůst	nárůst			
	Hebei	citlivý						nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst +		
<i>Atriplex hortensis</i> L.	var.purpurea	(citlivý)				nárůst	pokles		nárůst	pokles			Sai et al., (2012)	
	var.rubra	(odolný)				nárůst	nárůst		nárůst	pokles				
<i>Avena sativa</i> L.	JHO 884	odolný						nárůst	nárůst				Chandra et al., (1998)	
	JHO 888	citlivý						pokles	pokles					
<i>Beta vulgaris</i> L.	7112	-							nárůst	nárůst			Sayfzadeh et al., (2011)	
	BP-Karaj	-							nárůst v	nárůst v				
	BP-Mashhad	-							nárůst	nárůst				
<i>Capsicum annum</i> L.	Shanshu-2001	(odolný)						nárůst	nárůst -	nárůst +	nárůst +	nárůst -	Anjum et al., (2012)	
	Nongchengjia o-2	(citlivý)						nárůst	nárůst +	nárůst -	nárůst -	nárůst +		
<i>Carthamus tinctorius</i> L.	IL 111	(odolný)	nárůst v	nárůst v				nárůst +	nárůst	nárůst +		nárůst	Hojati et al., (2011)	
	Isfahan	(citlivý)	nárůst n	nárůst n				nárůst -	nárůst +	nárůst		nárůst +		
<i>Cicer arietinum</i> L.	Pirouz	citlivý						nárůst -	nárůst -				Mafakheri et al., (2011)	
	ILC482	odolný						nárůst +	nárůst +					
	Bivanfej	odolný						nárůst +	nárůst +					
<i>Cleome gynandra</i> L.	C4	(odolný)				nárůst +	nárůst	nárůst +	nárůst	pokles v		NZ	Uzilday et al., (2012)	
<i>Cleome spinosa</i> Jacq.	C3	(citlivý)				nárůst -	nárůst	nárůst v-	nárůst	nárůst		nárůst		
<i>Coffea canephora</i> Pierre ex Froehner	120	odolný				nárůst +			nárůst +	nárůst +		nárůst	Lima et al., (2002)	
	109a	citlivý				nárůst -			nárůst -	nárůst		nárůst +		
<i>Coffea canephora</i> Pierre ex Froehner	120	odolný	NZ		NZ	NZ	pokles		NZ	nárůst +		NZ	Pinheiro et al., (2004)	
	14	odolný	NZ		NZ	nárůst v	NZ		NZ	NZ		NZ		
	109a	citlivý	NZ		nárůst	nárůst	pokles		nárůst +	nárůst		nárůst		
	46	citlivý	NZ		NZ	nárůst	nárůst		nárůst	NZ		NZ		
<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	Tifgreen	odolný					nárůst	nárůst +	nárůst +	nárůst +	nárůst +	nárůst -	Shi et al., (2012)	
	SR9554	mimě odolný					nárůst	nárůst -	nárůst -	nárůst	nárůst -	nárůst +		
	Yukon	citlivý					nárůst	nárůst -	nárůst -	nárůst	nárůst -	nárůst +		
<i>Glycine max</i> (L.) Merrill.	L17	odolný					nárůst		nárůst -		nárůst	nárůst	Masoumi et al., (2011)	
	Clean	citlivý					NZ		nárůst -		nárůst	nárůst		
	T.M.S	citlivý					NZ		nárůst		nárůst +	NZ		
	Williams x Chippewa	odolný					nárůst		nárůst +		nárůst	nárůst		
	M9	citlivý					nárůst		nárůst +		nárůst +	nárůst		

Rostlinný druh	Genotyp	odolný/ citlivý/ neurčeno	AsA	GSH	DHAR	APX	GR	POX	CAT	SOD	prolin	MDA	Publikace
<i>Glycine max</i> (L.) Merill.	Maple Arrow	odolný				nárůst +	nárůst				nárůst +		Van Heerden a Kruger, (2002)
	Fiskeby V	citlivý				nárůst -	NZ				nárůst -		
<i>Guizotia abyssinica</i> Cass.	IGP 76	(odolný)				pokles v			pokles v	nárůst +	nárůst +	nárůst	Ghane et al., (2012)
	GA 10,	(citlivý)				pokles			pokles	NZ	nárůst -	nárůst +	
	No.71	(citlivý)				pokles			pokles	nárůst -	nárůst -	nárůst	
	IGPN 200	(odolný)				pokles v			pokles v	nárůst	nárůst -	nárůst	
<i>Helianthus annuus</i> L.	Aydın	(odolný)				nárůst	NZ		nárůst		nárůst +	nárůst	Baloglu et al., (2012)
	Musala	(citlivý)				NZ	NZ		nárůst		nárůst -	nárůst	
<i>Helianthus annuus</i> L.	Nantio F1	-	NZ						NZ	NZ			Keles a Ünyayar,
	Özdemirbey	-	NZ						pokles	NZ			
<i>Helianthus annuus</i> L.	Azargol	-					NZ		nárůst	NZ			Pourtaghi et al., (2011)
	Euroflor	(odolný)					NZ		nárůst	NZ			
	Allestar	(odolný)					nárůst			NZ			
	Karaj	-					NZ		nárůst	nárůst			
<i>Helianthus tuberosus</i> L.	Xiuyan	odolný							nárůst +	nárůst	nárůst +	nárůst -	Zhang et al., (2011)
	Yulin	citlivý							nárůst -	NZ	nárůst -	nárůst +	
<i>Kochia scoparia</i> L.	Birjand	(odolný)				nárůst +	nárůst	NZ	nárůst +	nárůst			Masoumi et al., (2010)
	Borujerd	(citlivý)				nárůst -	nárůst	NZ	nárůst	NZ			
<i>Medicago sativa</i> L.	Yazdi	odolný				nárůst +		nárůst +	nárůst +	nárůst +		nárůst	Boldaji et al., (2012)
	Gharayonje	citlivý				nárůst -		nárůst	nárůst -	nárůst -		nárůst v	
<i>Medicago sativa</i> L.	Algonquin	-						nárůst +	NZ	pokles		nárůst	He et al., (2012)
	Xinjiang-daye	-						nárůst +	pokles	pokles		nárůst	
	Longdong	-						nárůst -	pokles	pokles		nárůst +	
<i>Musa</i> L.	Berangan	odolný				nárůst	nárůst		nárůst -	pokles +		nárůst	Chai et al., (2005)
	Mas	citlivý				NZ	nárůst +		nárůst +	pokles -		nárůst v	
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin.	allotetraploid	(citlivý)	nárůst n	nárůst n		pokles	nárůst		pokles +	nárůst			Deng et al., (2012)
	oktaploid	(odolný)	nárůst v	nárůst v		nárůst	nárůst		pokles -	nárůst			
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	GS 46	odolný				nárůst +	nárůst +		nárůst	nárůst +			Van Rensburg a Kruger, (1994)
	ELSOMA	odolný				nárůst +	nárůst +		nárůst	nárůst +			
	TL 33	citlivý				nárůst -	nárůst		nárůst	nárůst -			
	CDL 28	citlivý				nárůst -	nárůst		nárůst	nárůst -			
<i>Oryza sativa</i> L.	Jim 23B	odolný							nárůst	NZ	NZ	NZ	Fu et al., (2011)
	Zhenshan97B	citlivý							NZ	pokles	pokles	nárůst	
<i>Oryza sativa</i> L. ssp. Indica	IRAT109	odolný			nárůst +					nárůst			Ji et al., (2012)
	Zhenshan97B	citlivý			nárůst -					nárůst -			
<i>Oryza sativa</i> L.	N 22	odolný	nárůst	nárůst		nárůst	nárůst	nárůst +	pokles	nárůst +			Selote a Khanna- Chopra,(2004)
	N 118	citlivý	pokles	pokles		pokles	pokles	nárůst	nárůst	nárůst -			
<i>Oryza sativa</i> L.	Brown Gora	odolný	NZ	NZ	nárůst	nárůst	NZ						Pyngrope et al., (2013)
	Malviya-36	citlivý	pokles	NZ	pokles	NZ	NZ						
<i>Panicum miliaceum</i> L.	Ningmi 13	(odolný)							pokles n	pokles v	pokles v	nárůst n	Zhang et al., (2012)
	Neimi 5	-							pokles	pokles	pokles	nárůst	
	Jimmi 4	-							pokles v	pokles n	pokles n	nárůst v	
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Bayo Madero	citlivý	NZ			nárůst			nárůst +	nárůst +	nárůst	nárůst	Rosales et al., (2012)
	Pinto Saltillo	odolný	nárůst			nárůst			nárůst -	nárůst -	NZ	nárůst	
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Yakutiye	(odolný)				pokles	nárůst		nárůst	nárůst		NZ	Saglam et al., (2011)
	Pinto Villa	odolný				NZ	NZ v		NZ v	nárůst -		NZ	
	Ozayse	(citlivý)				nárůst	nárůst		nárůst	nárůst +		nárůst	
	Zulbiye	(citlivý)				nárůst	nárůst		NZ	nárůst		nárůst	
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Plovdiv 10	(odolný)				NZ v			nárůst	nárůst		nárůst	Zlatev et al., (2006)
	Prelom	(odolný)				nárůst +			nárůst	nárůst		nárůst	
	Dobrudjanski ran	(citlivý)				nárůst			pokles	nárůst +		nárůst +	
<i>Poa pratensis</i> L.	Midnight	odolný			nárůst +	nárůst +	nárůst +	nárůst	nárůst	nárůst			Xu et al., (2011)
	Brilliant	citlivý			nárůst -	nárůst -	nárůst -	nárůst	nárůst	nárůst			
<i>Saccharum officinarium</i> L.	SP83-2847	odolný				nárůst	NZ		nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	Cia et al., (2012)
	SP83-5073	odolný				nárůst	nárůst		NZ	nárůst	nárůst	nárůst	
	SP90-3414	citlivý				pokles v	nárůst		nárůst +	NZ	nárůst	nárůst +	
	SP90-1638	citlivý				nárůst	nárůst		pokles	NZ	nárůst	nárůst +	

Rostlinný druh	Genotyp	odolný/ citlivý/ neurčeno	AsA	GSH	DHAR	APX	GR	POX	CAT	SOD	prolin	MDA	Publikace
<i>Sesamum indicum</i> L.	Yekta	odolný						nárůst v	nárůst +	nárůst +		nárůst	Fazeli et al., (2007)
	Darab 14	citlivý						nárůst n	nárůst	nárůst -		nárůst v	
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Zarina	odolný	NZ	NZ	nárůst	nárůst	nárůst		nárůst	nárůst		pokles	Sánchez-Rodríguez et al., (2012)
	Josefina	citlivý	NZ	pokles	NZ	NZ	NZ		pokles	NZ		nárůst	
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Lukullus	citlivý				pokles	pokles		pokles	nárůst +			Ůnyayar et al., (2005)
<i>Solanum peruvianum</i> L.		odolný				pokles	nárůst		nárůst	nárůst -			
<i>Tagetes erecta</i> L.	Chokdee	odolný	nárůst v	nárůst		nárůst +		nárůst +	nárůst	nárůst +		nárůst -	Tian et al., (2012b)
	Discovery	citlivý	nárůst n	NZ		nárůst -		nárůst -	pokles	nárůst -		nárůst +	
<i>Trifolium repens</i> L.	PI 288084	odolný				nárůst v		nárůst v	nárůst v	nárůst		nárůst n	Li et al., (2013)
	Chuanyin Ladino	citlivý				nárůst		nárůst n	nárůst n	nárůst		nárůst v	
<i>Triticum aestivum</i> L.	Chakwal-97	odolný						NZ		nárůst			Bano et al., (2012)
	Punjab-96	citlivý						NZ		NZ			
<i>Triticum aestivum</i> L.	Mohan	(citlivý)				nárůst	nárůst	pokles	pokles	pokles			Chakraborty a Pradhan, (2012)
	Wonder	(odolný)				nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst			
	Kedar	(citlivý)				nárůst	nárůst	pokles	pokles	pokles			
	Gayetri	(odolný)				nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst			
<i>Triticum aestivum</i> L.	C306, NI5439, PBW299, PBW396	odolný				nárůst	nárůst	nárůst	nárůst				Devi et al., (2012)
	PBW175	odolný				pokles	nárůst	nárůst	pokles				
	HD2329	citlivý				nárůst	nárůst	nárůst	pokles				
	HUW234, LOK1	citlivý				nárůst	nárůst	nárůst	pokles				
	PBW343	citlivý				nárůst	pokles	pokles	pokles				
	WL711	citlivý				nárůst	nárůst	pokles	nárůst				
<i>Triticum aestivum</i> L.	Nawra	odolný					NZ	nárůst +	nárůst	NZ	nárůst +		Grzesiak et al., (2013)
	Parabola	odolný					nárůst -	nárůst v+	nárůst	NZ	nárůst +		
	Radunia	citlivý					nárůst +	nárůst	nárůst	pokles	nárůst -		
	Raweta	citlivý					nárůst +	nárůst	nárůst	pokles	nárůst -		
	Manu	-					NZ	nárůst	nárůst +	pokles	nárůst +		
<i>Triticum aestivum</i> L.	Jinmai 47	odolný	nárůst						vyšší	nížší	nárůst +		He et al., (2011)
	Shunmai 1718	citlivý	nárůst						nížší	vyšší	nárůst -		
<i>Triticum aestivum</i> L.	Azamatli-95	odolný				nárůst	nárůst		NZ	nárůst			Huseynova, (2012)
	Gymatli-2/17	citlivý				nárůst	NZ		nárůst	pokles			
<i>Triticum aestivum</i> L.	Ballada	odolný				pokles v	pokles				nárůst	nárůst	Nikolaeva et al., (2010)
	Belchanka Beltskaya	citlivý				pokles	pokles				nárůst	nárůst -	
<i>Triticum aestivum</i> L.	C 306	odolný	pokles			nárůst	nárůst	nárůst	nárůst v	nárůst		nárůst	Sairam et al., (1997), (1998), (2001), Sairam a Saxena (2000), Sairam a Srivastava (2001)
	HD 2285	středně odolný				NZ	nárůst	nárůst				nárůst	
	HD 2329	citlivý	pokles			NZ	nárůst		nárůst	nárůst		nárůst	
	PBW 175	odolný	pokles			nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	nárůst		nárůst	
	HD 2402	středně odolný				nárůst	nárůst	nárůst					
	WH 542	citlivý				nárůst	nárůst	nárůst					
	DL 153-2	odolný	pokles				nárůst	nárůst	nárůst	nárůst		nárůst	
	Raj 3077	citlivý					nárůst	nárůst					
	HD 2428	citlivý	pokles				nárůst		nárůst	nárůst		nárůst	
	Hira	citlivý						nárůst	nárůst	nárůst		nárůst	

Rostlinný druh	Genotyp	odolný/ citlivý/ neurčeno	AsA	GSH	DHAR	APX	GR	POX	CAT	SOD	prolin	MDA	Publikace
<i>Triticum aestivum</i> L.	SHARK	citlivý						nárůst -	pokles +				Sharifi et al., (2012)
	Ohadi	odolný						nárůst +	nárůst				
	Unknown 11, Homa	odolný						nárůst +	pokles -				
	Sabalan	středně odolný						NZ	nárůst				
	Rasad	středně odolný						nárůst +	pokles +				
<i>Triticum aestivum</i> L.	Zagros	odolný							nárůst		nárůst +	nárůst -	Valifard et al., (2012)
	Pishtaz	citlivý							nárůst -		nárůst -	nárůst +	
<i>Triticum aestivum</i> L.	Heshangtou	odolný						NZ	nárůst v	nárůst		nárůst -	Wu et al., (2012)
	Longchun	citlivý						nárůst	nárůst	nárůst		nárůst +	
<i>Triticum durum</i> Desf.	Barakati-95	odolný				nárůst	nárůst		nárůst +	NZ			Huseynova, (2012)
	Garagylchyg-2	citlivý				pokles	NZ		nárůst -	pokles			
<i>Triticum durum</i> Desf.	Ofanto	odolný		pokles			NZ						Loggini et al., (1999)
	Adamello	citlivý		pokles			nárůst						
<i>Zea mays</i> L.	Agaiti-2002	odolný											Ali et al., (2010)
	EV-1098	citlivý											
<i>Zea mays</i> L.	2023	citlivý				pokles	pokles		pokles	nárůst			Benešová et al., (2012)
	CE704	odolný				nárůst	nárůst		nárůst	nárůst			
<i>Zea mays</i> L.	LM5, Parkash	odolný	nárůst v	NZ		nárůst	nárůst	nárůst	nárůst	NZ		NZ	Chugh et al., (2011)
	PMH2, JH3459, Paras, LM14	citlivý	nárůst n	nárůst		pokles	nárůst	nárůst	pokles	pokles		nárůst	
<i>Zea mays</i> L.	Chang 7-2	odolný						nárůst		nárůst v			Li et al., (2009)
	Huangzao 4	citlivý						nárůst		nárůst n			
<i>Zea mays</i> L.	Giza 2	odolný						nárůst v+	nárůst	nárůst	nárůst +	nárůst -	Moussa a Abdel Aziz, (2008)
	Trihybrid 321	citlivý						nárůst	nárůst	nárůst	nárůst -	nárůst +	
<i>Zea mays</i> L.	LIZA	odolný					nárůst +						Pastori a Trippi, (1992)
	LG11	citlivý					nárůst -						
<i>Zea mays</i> L.	Shaandan 9	odolný						NZ	nárůst	NZ			Xin et al., (2011)
	Shaandan 911	citlivý						pokles	NZ	pokles			
<i>Zea mays</i> L.	Shaandan 9	odolný						NZ	NZ	nárůst		nárůst -	Zhang et al., (2007)
	Shaandan 911	citlivý						pokles	nárůst	pokles		nárůst +	
<i>Oryza sativa</i> L.	Brown Gora	odolný	NZ	NZ	nárůst	nárůst	NZ						Pyngrope et al., (2013)
	Malviya-36	citlivý	pokles	NZ	pokles	NZ	NZ						

4 Materiál a metody

4.1 Pokusný materiál

Pokusný materiál tvořily dvě odrůdy *Vicia faba* L. (též *Faba vulgaris* Moench, *Vicia vulgaris* Gray). Česky se tento druh nazývá bob obecný, bob polní, bob setý, bob zahradní, nebo vikev bob. Jeho taxonomické zařazení je: říše *Plantae* (rostliny), oddělení *Magnoliophyta* (rostliny krytosemenné), třída *Rosopsida* (vyšší dvouděložné rostliny), řád *Fabales* (bobotvaré), čeleď *Fabaceae* (bobovité). Tato rostlina původem ze severní Afriky a jihozápadní Asie se využívá především jako zelené hnojení (rostliny mají velkou biomasu a dokáží fixovat atmosférický dusík, po dosažení určité velikosti se zaorají a slouží jako hnojivo). Dále se využívá jako krmivo pro hospodářská zvířata zejména kvůli svému vysokému obsahu bílkovin.

Pro pokusy jsem použila dvě odrůdy pěstované v České republice. Odrůda „**Piešťanský**“ je středně raná, středně vysoká odrůda s bílými květy a vysokou potravinářskou kvalitou semen. Byla vyšlechtěna v Šlechtitelské stanici Horná Streda, a.s. Slovensko a ve Státní odrůdové knize je zapsána od roku 2004 (www.agritec.cz). Odrůda „**Merkur**“ je polopozdní s červeně žíhanými květy, se zlepšenou odolností poléhání a s vysokými stabilními výnosy semene. Vyrůstem je menší a drobnější v porovnání s odrůdou Piešťanský. Tato odrůda byla vyšlechtěna ve Šlechtitelské stanici Chlumec nad Cidlinou, Selgen, Česká republika a registrovaná byla v roce 1997. Podle předchozích výsledků z naší laboratoře (Fridrichová, 2010) u ní bylo zjištěno lepší prospívání při stresu suchem.

Semena odrůdy Piešťanský byla poskytnuta od firmou Agritec, s.r.o., Šumperk. Semena odrůdy Merkur nám poskytla ŠS Chlumec nad Cidlinou.

Rostliny pro pokusy byly pěstovány ve sklenících Brožkovy genetické zahrady Katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze, Studničkova N12 buď v kontrolních podmínkách se standardní zálivkou, nebo po určitou dobu stresované suchem. Vycházela jsem ze zkušeností z dřívějších prací naší skupiny s pěstováním tohoto rostlinného druhu ve skleníkových podmínkách (Fridrichová, 2010). Hlavní měření přímo na rostlinách a na čerstvě odebraných listech jsem prováděla ve dvou velkých pokusných blocích v období let 2011 a 2012. Další charakteristiky jsem měřila průběžně v obou letech na vzorcích listového pletiva uložených v hlubokomrazicím boxu.

4.2 Schéma pokusů

Pro podzimní pokusy roku 2011 bylo vyseto 357 semen od každé odrůdy, z nichž bylo vybráno a zpracováno 264 pro každou odrůdu. 18. den po výsevu (rostliny odrůdy Piešťanský byly ve fázi 4 plně vyvinutých listů a Merkur 3 plně vyvinutých listů) jsem rostliny každé odrůdy rozdělila do dvou skupin, z nichž jednu jsem přestala zalévat. Tento den jsem ve svém pokusu označila jako „den 0“. Pokusnými dny, ve kterých jsem měřila vybrané parametry a odebírala rostlinné pletivo pro pozdější zpracování a měření dalších charakteristik, byly kromě výchozího dne 0 dále 2., 4., 6., 8. a 10. den po rozdělení rostlin zahájení stresu suchem (ve výsledcích označeny jako „den 2“, „den 4“, „den 6“, „den 8“, „den 10“). V těchto pokusných dnech jsem měřila zvolené morfologické parametry vždy osmi rostlin z každé varianty (ve výsledcích označeny jako Piešťanský-zálivka, Piešťanský-sucho, Merkur-zálivka, Merkur-sucho) a odebírala vzorky z listového pletiva pro stanovení relativního obsahu vody (RWC) a obsahu pigmentů. Poté jsem rostliny umyla a oddělila nadzemní část od kořenů a každou část zvlášť jsem usušila pro stanovení suché hmotnosti. Z dalších dvanácti rostlin od každé varianty jsem odebírala vzorky listového pletiva pro pozdější biochemické analýzy (množství prolinu, aktivita APX a CAT). Vzorky pletiva byly bezprostředně po odběru zmrazeny v tekutém dusíku a poté uloženy v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C (Tab. 2). Tyto vzorky jsem zpracovávala průběžně v období let 2011 a 2012. V den 0, kdy ještě nebyly rostliny stresované suchem, byly zpracovány pouze „zalévané“ varianty.

Pro podzimní pokusy v roce 2012 jsem vysela 290 semen od každé odrůdy pro stanovení vybraných fotosyntetických parametrů listů a izolovaných chloroplastů. Vzhledem k tomu, že by nebylo možné v jednom dni zpracovat požadované množství rostlin z důvodu velké časové náročnosti těchto měření, jsem polovinu rostlin vysela o jeden den dříve a stres suchem jsem u této předsazené skupiny navodila také o jeden den dříve. Měření jsem tak mohla rozložit do dvou po sobě následujících dnů a zpracovat potřebný počet vzorků nezbytný pro statistické hodnocení u rostlin stejného stáří a stejně dlouho stresovaných suchem. Den 0 byl opět dnem zahájení stresové periody a ukončení zalévání rostlin ze skupiny „sucho“. Měření jsem prováděla vždy s odstupem dvou dnů stejně jako v roce 2011. Každý pokusný den jsem odebírala z každé varianty dva vzorky 4 listů (1 rostlina=1 list), které jsem následovně použila pro stanovení aktivity fotosyntetického řetězce, obsahu fotosyntetických pigmentů a specifické hmotnosti listu (Tab. 3). O 14 dní později, na podzim roku 2012, byla vyseta semena obou odrůd pro další rozsáhlá srovnávací měření. Pokusy byly uspořádány a rostliny pěstovány za naprosto stejných podmínek jako rostliny pro měření

fotochemických parametrů. Část těchto rostlin jsem využila pro měření dvou parametrů fluorescence chlorofylu (F_v/F_m , Q_Y), abych mohla tyto dva parametry porovnat s parametry fotochemické účinnosti izolovaných chloroplastů.

4.3 Podmínky pěstování

Semena jsem vysévala do květináčů (vždy po jednom semeni) o průměru 12 cm, a výšce 8 cm. Jako substrát jsem použila rašelinu (Baltisches substrat, HAWITA Baltic, Německo) smíchanou s kompostovou zeminou v poměru 1:15, kterou jsem v květináčích předem zalévala, aby byla dostatečně vlhká a umožnila bezprostřední klíčení semen. Květináče pro pokusy v roce 2011 a 2012 byly umístěny nejprve bez podmisek na parapetech ve skleníku s teplotou v rozpětí (den 15-30 °C / noc 10-20 °C). Po vysetí byly květináče pravidelně zalévány a vlhkost půdy byla kontrolována (v hloubce 5 cm v květináčích) u deseti náhodně vybraných květináčů (Moisture Meter type HH2, Delta T Devices Ltd., Velká Británie) (Obr. 10, Obr. 11). Týden před začátkem stresové periody jsem květináče s vyklíčenými rostlinami přesunula na podmisky (vždy po osmi) a pokračovala jsem v zalévání všech rostlin již do podmisek. Rostliny byly ve skleníku rozmístěny tak, aby vždy v každé části skleníku byly všechny varianty (odrůdy i ošetření) a eliminoval se tak vliv možných rozdílných podmínek v rámci skleníku. Počínaje dnem 0 jsem přestala zalévat polovinu rostlin každé odrůdy (stres suchem) a druhou polovinu jsem nadále pravidelně nebo podle potřeby zalévala do podmisek.

Časové schéma pokusu (výsev, zahájení stresu, pokusné dny) je uvedeno na Obrázku 8 a 9.

Tabulka 2. **Schéma pokusů v roce 2011.** Popis jednoho pokusného dne, ve kterém byly od každé odrůdy a ošetření odebrány vzorky daného počtu rostlin (každá rostlina měřena zvlášť) pro stanovení uvedených charakteristik.

2011 - jeden pokusný den

odrůda	pěstování	počet rostlin	charakteristika
Merkur	kontrola	4 rostliny	prolin
		4 rostliny	CAT
		4 rostliny	APX
		8 rostlin	morfologické parametry, RWC, obsah pigmentů
	sucho	4 rostliny	prolin
		4 rostliny	CAT
		4 rostliny	APX
		8 rostlin	morfologické parametry, RWC, obsah pigmentů
Piešťanský	kontrola	4 rostliny	prolin
		4 rostliny	CAT
		4 rostliny	APX
		8 rostlin	morfologické parametry, RWC, obsah pigmentů
	sucho	4 rostliny	prolin
		4 rostliny	CAT
		4 rostliny	APX
		8 rostlin	morfologické parametry, RWC, obsah pigmentů

2011 září

			1	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30		

výsev
pokusný den 0
hlavní pokusné dny

Obrázek 8. Časové schéma pokusů v roce 2011.

Tabulka 3. **Schéma pokusů v roce 2012.** Popis jednoho pokusného dne, ve kterém byly od každé odrůdy a ošetření odebrány vzorky (vzorek=směsný vzorek ze 4 rostlin) pro stanovení uvedených charakteristik. Zobrazena je pouze polovina rostlin z důvodu postupného výsevu 15. a 16. 8. Celkově tedy byly pro jednu variantu odebrány 4 vzorky.

2012 - jeden pokusný den

odrůda	pěstování	vzorek	charakteristika
Merkur	kontrola	vzorek	2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení obsahu pigmentů
			2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení specifické hmotnosti listu
			zbytek listu- izolace chloroplastů pro měření fotochemické aktivity
		vzorek	2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení obsahu pigmentů
			2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení specifické hmotnosti listu
			zbytek listu- izolace chloroplastů pro měření fotochemické aktivity
	sucho	vzorek	2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení obsahu pigmentů
			2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení specifické hmotnosti listu
			zbytek listu- izolace chloroplastů pro měření fotochemické aktivity
		vzorek	2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení obsahu pigmentů
			2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení specifické hmotnosti listu
			zbytek listu- izolace chloroplastů pro měření fotochemické aktivity
Piešťanský	kontrola	vzorek	2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení obsahu pigmentů
			2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení specifické hmotnosti listu
			zbytek listu- izolace chloroplastů pro měření fotochemické aktivity
		vzorek	2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení obsahu pigmentů
			2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení specifické hmotnosti listu
			zbytek listu- izolace chloroplastů pro měření fotochemické aktivity
	kontrola	vzorek	2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení obsahu pigmentů
			2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení specifické hmotnosti listu
			zbytek listu- izolace chloroplastů pro měření fotochemické aktivity
		vzorek	2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení obsahu pigmentů
			2x4 terčíky (o průměru 5 mm) na stanovení specifické hmotnosti listu
			zbytek listu- izolace chloroplastů pro měření fotochemické aktivity

2012 srpen

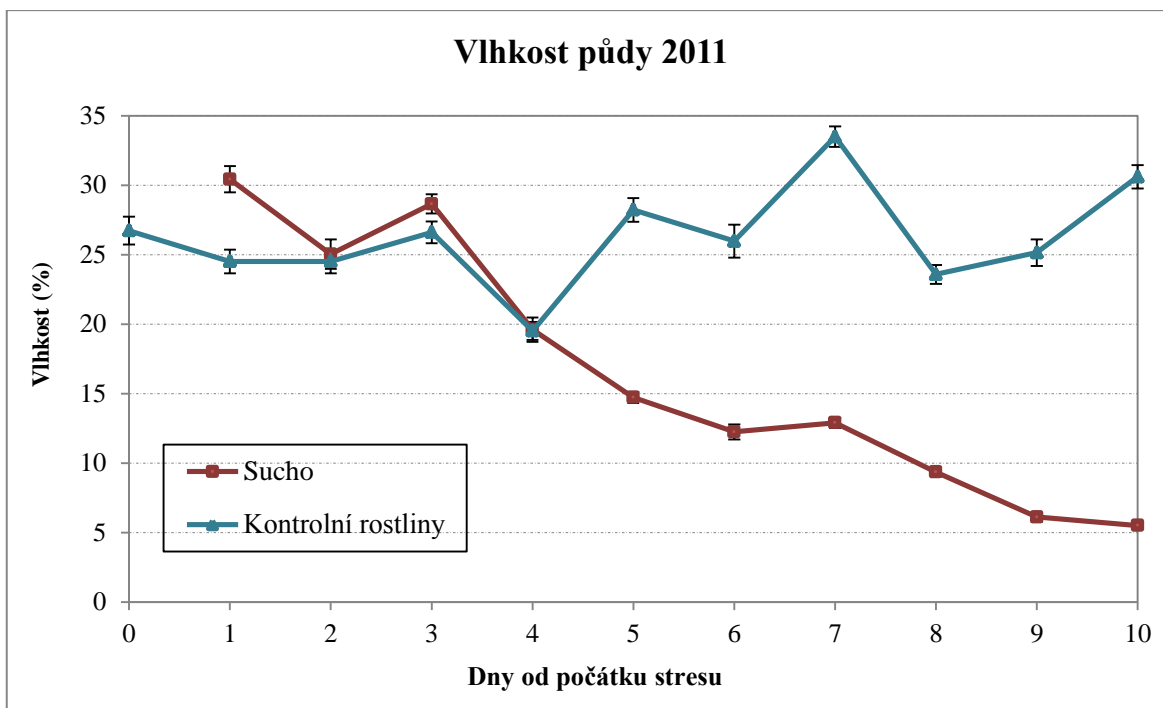
		1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31		

výsev první poloviny rostlin
výsev druhé poloviny rostlin
výsev rostlin pro měření fluorescenčních parametrů
pokusný den 0
hlavní pokusné dny rostlin vyšetých 15. 8.
hlavní pokusné dny rostlin vyšetých 16. 8.
pokusný den 0 pro měření fluorescenčních parametrů
dny měření fluorescenčních parametrů

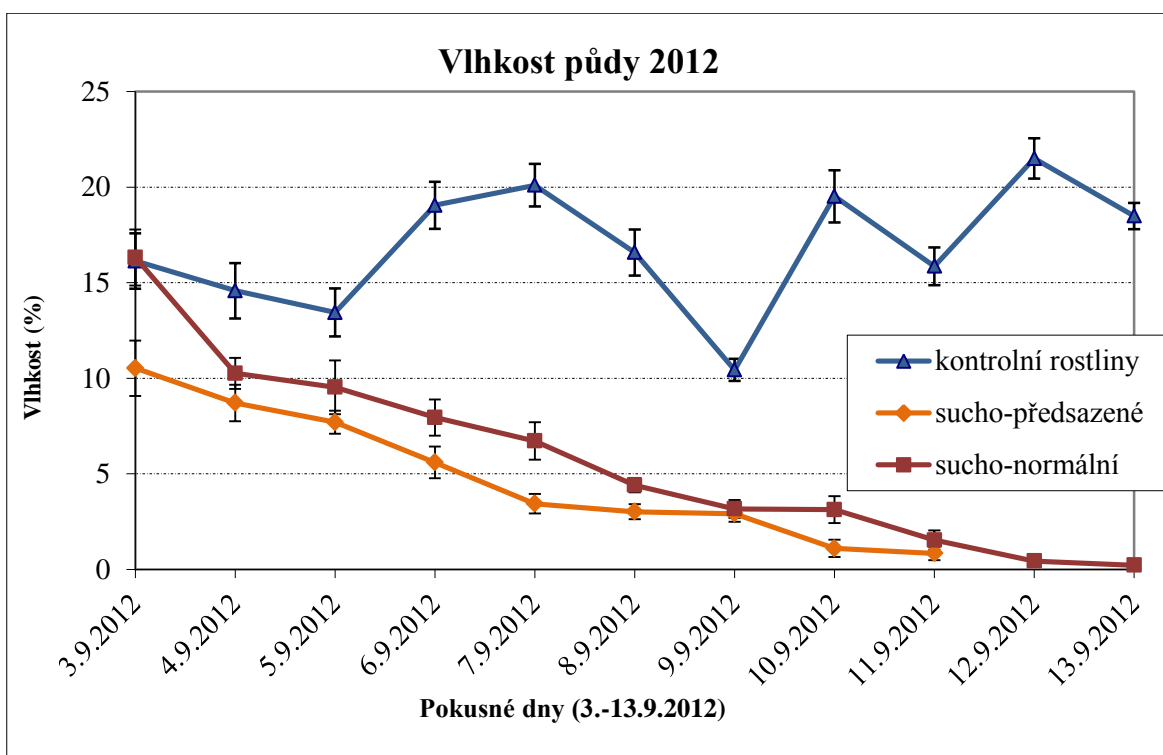
2012 září

					1	2
3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29	30

Obrázek 9. Časové schéma pokusů v roce 2012.



Obrázek 10. **Vlhkost půdy měřená v sezoně 2011** od počátku (den 0) do konce (den 10) stresové periody u kontrolních a stresovaných rostlin (sucho). Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=112) a střední chyby průměru.



Obrázek 11. **Vlhkost půdy měřená v sezoně 2012** od počátku (3.9.2012) do konce (13.9.2012) stresové periody u kontrolních a stresovaných rostlin (sucho). Uvedeny jsou průměrné hodnoty (n=10) a střední chyby průměru.

4.4 Metody

V rámci svých pokusů jsem studovala, jak reagují odlišné odrůdy *Vicia faba* L. na stres suchem podle změn aktivity nebo množství některých antioxidantů a vybraných fyziologických a morfologických parametrů rostlin. Metody určení množství prolinu a fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů jsem vyzkoušela a modifikovala podle postupů, které byly v naší laboratoři vypracované v minulosti. Metody určení aktivity APX a CAT jsem vypracovávala ve spolupráci s Lenkou Tůmovou a využila a modifikovala jsem metodiky popsané v literatuře u jiných druhů rostlin. Pro stanovení morfologických parametrů *Vicia faba* L. jsem využila stejné postupy, které v laboratoři používáme pro posouzení reakce rostlin na stresové faktory. Pro studium jednotlivých charakteristik byl použit list, který byl den 0 určen u všech rostlin *Vicia faba* L. jako nejstarší ne zcela plně vyvinutý list (tj. u odrůdy Piešťanský většinou 4., u odrůdy Merkur většinou 3.) a v popisu metod je vždy označen jako „měřený list“.

Postupy měření jednotlivých charakteristik jsou uvedeny v dalších částech práce. Metody, které byly v roce 2012 stejné, jako v roce 2011, jsou uvedené pouze jednou (obsah chlorofylu, specifická hmotnost listu). V průběhu obou pokusných sezon jsem používala stejnou centrifugu i spektrofotometr, jejich názvy uvádím jen při prvním zmínění.

4.1.1 Antioxidanty

Odběr vzorků

Odběr vzorků pro spektrofotometrické stanovení antioxidantů jsem prováděla každý pokusný den. Pro každou charakteristiku jsem odebrala měřený list čtyř rostlin od každé varianty (1 list=1 rostlina), který jsem bezprostředně poté vložila samostatně zabalený v alobalu do nádoby s tekutým dusíkem a do doby, než jsem listy zpracovávala, byly skladovány v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C.

Aktivita APX

Pro stanovení aktivity APX jsem navázila 0,5 g listového pletiva z jednoho listu, které jsem ihned ve třecí misce zalila tekutým dusíkem, aby se teplota udržovala po celou dobu pod 0 °C. Listové pletivo jsem poté rozetřela na jemný prášek, přidala jsem 10 ml 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,5) obsahujícího 0,5 mM EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová) a 1 mM kyselinu askorbovou. Tuto směs jsem přefiltrovala přes 8 vrstev gázy a nechala usadit dvacetiminutovou centrifugací při 15000x g a 4 °C v centrifuze Universal 320R (Hettich, Německo). Supernatant jsem odebrala a nadále jsem ho udržovala při teplotě 4 °C. Aktivita APX je měřena jako pokles absorbance kyseliny askorbové při $\lambda = 290$ nm v důsledku její oxidace na mono- a dehydroaskorbovou kyselinu. Metoda byla upravena podle Sairam a Saxena (2000). Reakční směs (3 ml) jsem do kyvety přidávala v pořadí fosfátový pufr, kyselinu askorbovou, destilovaná voda, EDTA, vzorek. Jako poslední jsem přidávala peroxid vodíku, který reakci spouští. Pokles absorbance jsem sledovala 30 s na spektrofotometru Anthelie Advanced 2 (Secomam, Francie). Aktivitu APX jsem spočítala podle rovnice:

$$A_{APX} = \Delta A_{290} \cdot a_{k.p. \text{ askorbát}} \left(\frac{A_{595}}{b_{k.p. \text{ albumin}}} \right)$$

ΔA_{290} pokles absorbance při vlnové délce 290 nm za 60 s

$a_{k.p. \text{ askorbát}}$ koeficient zjištěný z kalibrační přímky pro kyselinu askorbovou (roztok 3 mM)

A_{595} naměřená absorbance při vlnové délce 595 nm směsi vzorku a reakčního Bradfordova činidla

$b_{k.p. \text{ albumin}}$ koeficient zjištěný z kalibrační přímky pro albumin (roztoku o koncentraci 1 mg·ml⁻¹)

za použití kalibrační přímky pro kyselinu askorbovou (stejně složení reakční směsi, ale místo vzorku jsem přidávala postupně 0, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 μ l kyseliny askorbové). Výslednou aktivitu APX jsem vztáhla na celkové množství proteinů (mg) ve vzorku určené pomocí metody Bradfordové (Bradford, 1976).

reakční směs v kyvetě	
složka	konc.v kyvetě
fosfátový pufr (pH 7,0)	50 mM
kyselina askorbová	0,5 mM
destilovaná voda	0,7 ml
EDTA	0,1 mM
vzorek	0,1 ml
peroxid vodíku	0,1 mM

Aktivita CAT

Pro stanovení aktivity CAT jsem postupovala podobně jako při stanovení aktivity APX. Navážila jsem 0,5 g listového pletiva z jednoho listu, které jsem ihned ve třecí misce zalila tekutým dusíkem, abych teplotu udržovala po celou dobu pod 0 °C. Listové pletivo jsem rozetřela na jemný prášek a přidala jsem 10 ml 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,5) obsahujícího 0,5 mM EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová). Tuto směs jsem přefiltrovala přes 8 vrstev gázy a nechala usadit dvacetiminutovou centrifugací při 15000x g a 4 °C. Supernatant jsem odebrala a nadále jsem ho udržovala při teplotě 4 °C. Aktivita CAT je měřena jako pokles absorbance peroxidu vodíku při $\lambda = 240$ nm v důsledku jeho rozkladu na kyslík a vodu, který je zprostředkovaný CAT. Metoda byla upravena podle Sairam a Srivastava (2001). Reakční směs (3 ml) v kyvetě se skládala z fosfátového pufru, destilované vody, vzorku a peroxidu vodíku přidávaných přesně v tomto pořadí, protože přidáním peroxidu vodíku se spustila reakce. Pokles absorbance jsem sledovala 1 minutu. Aktivitu APX jsem spočítala podle rovnice:

$$A_{CAT} = \Delta A_{240} \cdot a_{k.p. H_2O_2} \left(\frac{A_{595}}{b_{k.p. albumin}} \right)$$

ΔA_{240} pokles absorbance při vlnové délce 240 nm za 60 s

$a_{k.p. H_2O_2}$ koeficient zjištěný z kalibrační přímky pro peroxid vodíku (roztok 75 mM)

A_{595} naměřená absorbance při vlnové délce 595 nm směsi vzorku a reakčního Bradfordova činidla

$b_{k.p. albumin}$ koeficient zjištěný z kalibrační přímky pro albumin (roztoku o koncentraci 1 mg·ml⁻¹)

za použití kalibrační přímky pro peroxid vodíku (ke směsi destilované vody a pufru o pH 7,0 jsem přidávala postupně 0, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 μ l peroxidu vodíku). Výslednou aktivitu APX jsem vztáhla na celkové množství proteinů (mg) ve vzorku určené pomocí metody Bradfordové (Bradford, 1976).

reakční směs v kyvetě	
složka	konc. v kyvetě
fosfátový pufr (pH 7,0)	50 mM
destilovaná voda	0,95 ml
vzorek	0,05 ml
peroxid vodíku	12,5 mM

Obsah prolinu

Vlastnímu určení obsahu prolinu u odebraných listů předcházela příprava navážek vzorků. Z jednoho listu jsem po odstranění řapíku připravila dvě zhruba stejně velké navážky, jedna z nich sloužila pro vlastní stanovení obsahu prolinu, druhá byla usušena při 80 °C pro stanovení suché hmotnosti. V závislosti na velikosti listu se hmotnosti navážek pohybovaly v rozmezí 0,15 - 0,6 g. Tato metoda je již v naší laboratoři zavedená a vychází z metody spektrofotometrického stanovení obsahu prolinu u suchem stresovaných rostlin (Bates *et al.*, 1973).

Navážku listového pletiva určenou pro stanovení obsahu prolinu jsem rozetřela v 5 ml 0,22 M kyseliny sulfosalicylové a roztok jsem přefiltrovala do zkumavky. Z filtrátu jsem odebrala 1 ml vzorku (ve dvou technických opakováních), který jsem přidala do reakční směsi 1 ml kyseliny octové a 1 ml ninhydrinové směsi (4,45 M ninhydrin, 2,84 M kyselina trihydrogenfosforečná, 10,8M kyselina octová). Po promíchání směsi jsem zkumavky vložila do vodní lázně a 30 minut vařila a následně zchladila na pokojovou teplotu. Ke směsi jsem přidala čistý toluen (v poměru 1:1), směs jsem promíchala a po oddělení fází (cca 20 minut) jsem měřila absorbanci při $\lambda=520$ nm odebrané horní fáze. Současně se vzorky izolovanými z listového pletiva byly připraveny i vzorky pro kalibrační přímku obsahující místo 1ml filtrátu z rozetřeného listového pletiva známý objem (0, 20, 50, 100, 250 μ l) 1 mM prolinu doplněný do objemu 1 ml 0,22 M kyselinou sulfosalicylovou. Výsledný obsah prolinu byl vztažen na hmotnost sušiny listu a stanoven podle vzorce:

$$Pro[ng \cdot g^{-1}] = (m_{nav.sušiny} / (m_{nav.Pro} \cdot m_{sušiny} (A_{520} \cdot a_{k.p.}))$$

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

$m_{nav. Pro}$ hmotnost navážky měřeného vzorku (g)

$m_{sušiny}$ hmotnost sušiny (g)

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

$a_{k.p.}$ koeficient zjištěný z kalibrační přímkou pro roztok 1mM prolin (μ g)

4.4.2 Morfologické a fyziologické parametry

Morfologické parametry

Z morfologických parametrů byla každý pokusný den u osmi rostlin z každé varianty měřena výška rostliny, počet plně vyvinutých a viditelných listů a po usušení byla stanovena hmotnost kořenů a nadzemní části rostliny.

Výška rostliny byla měřena od země po špičku vzrostného vrcholu rostliny, **počet plně vyvinutých listů** jako počet listů, které byly již plně odkloněné od stonku a povrch přechodu mezi stonkem a řapíkem listu byl již rovný bez hrbolku a **počet viditelných listů** jako počet všech listů, které již byly pouhým okem patrné.

Po změření uvedených parametrů byly rostliny umyty a rozděleny na **kořeny** a **nadzemní část**, které byly poté týden sušené při 80 °C v sušárně, a následně byla zvážena jejich **suchá hmotnost**.

Relativní obsah vody v listu (RWC)

Každý pokusný den bylo z měřeného listu osmi rostlin od každé varianty vyseknuto deset terčků o průměru 6 mm, u kterých byla bezprostředně poté zvážena jejich čerstvá hmotnost, a které byly následně umístěny do Petriho misky na čtverec gázy a zality vodovodní vodou. Po pěti hodinách byla u terčků zvážena jejich nasycená hmotnost a následující dva dny byly sušeny v sušárně při teplotě 80 °C. Po jejich vysušení byla zvážena jejich suchá hmotnost na torzních vahách Sartorius 7085011 (Sartorius GmbH, Německo). RWC byl vypočítán podle vzorce:

$$RWC[\%] = \frac{\text{čerstvá hmotnost}(g) - \text{suchá hmotnost}(g)}{\text{nasycená hmotnost}(g) - \text{suchá hmotnost}(g)} \cdot 100$$

Specifická hmotnost listu (SLW nebo také SpHm)

Usušené terčíky vyseknuté z listového pletiva byly zváženy a jejich hmotnost byla vztažena na jednotku listové plochy podle vzorce:

$$SLW[g \cdot m^{-2}] = \frac{\text{suchá hmotnost terčků}(g)}{\text{listová plocha terčků}(m^2)}$$

Obsah fotosyntetických pigmentů

Každý pokusný den byly z měřeného listu osmi rostlin od každé varianty vyseknuty kruhovým razidlem 4 terčíky o průměru 6 mm, které byly posléze zality 5 ml N,N-dimethylformamidem (Wellburn, 1994). V případě pokusů z roku 2012 byly odebrány 4 terčíky o průměru 5 mm. Pigmenty (chlorofyl *a*, *b*, karotenoidy) z terčků byly extrahovány v průběhu sedmi dnů v temnu a chladu a vždy druhý den po odběru byly promíchány. Absorbance jednotlivých vzorků byla změřena spektrofotometrem Anthelie Advanced 2 (Secomam, Francie) při vlnových délkách $\lambda = 664$ nm (A_{664}), 647 nm (A_{647}), 710 nm (A_{710}), 480 nm (A_{480}) a obsahy jednotlivých fotosyntetických pigmentů byly vypočítány podle vzorců:

$$\begin{aligned} \text{Chl } a \text{ [g.m}^{-3}] &= 11,65 \cdot (A_{664} - A_{710}) - 2,69 \cdot (A_{647} - A_{710}) \\ \text{Chl } b \text{ [g.m}^{-3}] &= 20,81 \cdot (A_{647} - A_{710}) - 4,53 \cdot (A_{664} - A_{710}) \\ \text{Kar [g.m}^{-3}] &= [1000 \cdot (A_{480} - A_{710}) - 0,89 \cdot \text{chl } a - 52,02 \cdot \text{chl } b] / 245 \end{aligned}$$

a přepočteny na jednotku listové plochy podle vzorce:

$$\text{Pigm (LP) [g.m}^{-2}] = 10 \cdot \text{pigm/celková plocha terčků}$$

Chl *a* obsah chlorofylu *a*
Chl *b* obsah chlorofylu *b*
Kar obsah karotenoidů
Pigm..... obsah Chl *a*, Chl *b* nebo Kar

4.4.3 Fotosyntetické parametry

Měření fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů

Odběr vzorků

Pro izolaci chloroplastů a měření jejich aktivity jsem odebírala každý pokusný den v 7:30 letního času z každé varianty dvě čtveřice měřených listů, které reprezentovaly dvě samostatná biologická opakování. Společně s dalšími dvěma opakováními z předsazených rostlin jsem získala celkem 4 biologická opakování pro každou studovanou variantu. Z listových čepelí jsem vyrazila kruhovým razidlem dvakrát 4 terčíky o průměru 5 mm (1 list=1 terčík) pro stanovení množství pigmentů (bylo stanoveno stejně jako v sezoně 2011 po extrakci v N,N-dimethylformamidu) a dvakrát 4 terčíky o stejném průměru pro stanovení specifické hmotnosti listu. Následně jsem ze zbytků listové čepele odstranila střední žilku a připravila jsem směsný vzorek (ze čtyř listů), jehož hmotnost byla u všech variant 1 – 2 g v závislosti na množství pletiva.

Izolace chloroplastů

Nejprve jsem si metodickými pokusy ověřila, že postupy izolace chloroplastů vypracované v naší laboratoři pro jiné druhy rostlin (Kočová 1980, Holá *et al.*, 2003) jsou vhodné i pro rostliny *Vicia faba* L.

Zvážený směsný vzorek jsem homogenizovala v 50 ml vychlazeného (0 – 4°C) izolačního roztoku v homogenizátoru OV5 (Velp Scientifica, Itálie) po dobu 18 s při 18000 rpm. Následně jsem homogenát přefiltrovala přes osmivrstvou gázu a chloroplasty jsem nechala usadit deseti minutovou centrifugací při 1000x g a teplotě 0°C. Usazeninu jsem rozetřela v malém objemu (1 – 1,2 ml v závislosti na množství sedimentu) resuspendačního roztoku. Takto připravené vzorky jsem uchovávala v temnu a při teplotě 0 - 4°C po celou dobu měření.

roztok pro izolaci chloroplastů	
složka	koncentrace
sacharóza	0,4 M
MgCl ₂	2 mM
Tris-HCl	50 mM
pH	7.0

roztok pro resuspendaci	
složka	koncentrace
sacharóza	0,4 M
MgCl ₂	2 mM
Tris-HCl	50 mM
glycerol	40% (w/v)
pH	7.0

Příprava na měření aktivity fotosyntetického řetězce

Před vlastním měřením aktivity chloroplastů jsem v získaných suspenzích změřila obsah chlorofylu spektrofotometricky v 80% (v/v) vodném roztoku acetonu (Porra *et al.*, 1989) v poměru 1/100 (v/v) suspenze izolovaných chloroplastů/aceton (ve dvou technických opakováních pro každý vzorek) po předchozí 10 min centrifugaci při 1000x g pro odstranění nečistot. V supernatantu jsem měřila absorbanci při vlnových délkách $\lambda = 663$ nm (A_{663}), 645 nm (A_{645}), 710 nm (A_{710}) a obsah chlorofylu jsem vypočetla podle vzorce:

$$Chl = 8,02 (A_{663} - A_{710}) + 20,2 (A_{645} - A_{710})$$

Aktivitu elektron-transportního řetězce jsem měřila polarograficky kyslíkovou elektrodou Clarkova typu (Theta'90, Česká republika) jako změnu koncentrace kyslíku v reakčním roztoku v expoziční komůrce (objem 5 ml) po přidání suspenze izolovaných chloroplastů po osvětlení „bílým světlem“ (170 W m^{-2} FAR) (Bartoš *et al.*, 1975). Směs v komůrce je po celou dobu míchána magnetickým míchadlem a je udržována teplota 25 °C.

Před začátkem měření jsem prováděla kalibraci soustavy tak, že jsem expoziční komůrku naplnila destilovanou vodou a vpustila jsem vzduch. Počkala jsem, až se na zapisovacím zařízení ustálil zápis, poté jsem zapojila přívod dusíku a opět jsem počkala, až se zápis ustálí. Rozdíl mezi těmito hodnotami udával rozpětí 0 – 22,99 % kyslíku při zvolené citlivosti elektrody. Tuto kontrolní kalibraci jsem prováděla na začátku a konci pokusného dne a jejich hodnoty jsem zprůměrovala.

Aktivita fotosystému I

Aktivitu fotosystému I (PSI) jsem měřila jako úbytek koncentrace kyslíku během 2 minut osvětlení v přítomnosti umělého donoru a akceptoru elektronů.

Jednotlivými složkami reakční směsi byl reakční roztok pro PSI, umělý donor elektronů pro PSI 2,6-dichlorofenolindolfenol (DCPIP) redukovaný askorbátem sodným, umělý akceptor elektronů z PSI metylviologen, blokátor elektronového transportu z PSII 3-(3',4'-dichlorfenyl)-1,1-dimetylmočovina (DCMU), dále chlorid amonný (NH_4Cl), který zabraňuje návaznosti fotofosforylace na elektronový transport, azid sodný (NaN_3), který inhibuje katalázy a vzorek, jehož objem odpovídal množství 7 μg chlorofylu.

Během vlastního měření jsem do komůrky postupně přidávala v tomto pořadí 4,45 ml reakčního roztoku, askorbát, DCPIP, metylviologen, DCMU, chlorid amonný, azid sodný a vzorek. Poté jsem komůrku rychle uzavřela a po 1 minutě ustálení vzorku ve tmě jsem vzorek na 3 minuty osvětlila. Úbytek kyslíku v reakční směsi jsem stanovovala z 2. a 3. Minuty

osvětlení. Měření každého vzorku jsem prováděla minimálně 2x a pro statistické hodnocení jsem použila průměr těchto měření.

reakční roztok	
složka	koncentrace
sacharóza	0,4 M
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	50 mM
pH	6,5

reakční směs v komůrce	
složka	Konečná konc.v komůrce
DCPIP	0,25 mM
askorbát sodný	10mM
metylviologen	0,1 mM
DCMU	0,01 mM
NH ₄ Cl	5 mM
NaN ₃	5 mM
reakční roztok	4,45 ml

Aktivita fotosystému II

Aktivitu fotosystému II (PSII) jsem měřila jako nárůst koncentrace kyslíku během 2 minut osvětlení v přítomnosti umělých akceptorů elektronů (donorem je v tomto případě voda).

Jednotlivými složkami reakční směsi byl reakční roztok pro PSII, akceptory elektronů ferrikyanid draselný ($K_3[Fe(CN)_6]$) a 2,6-dimetylbenzochinon (DMBQ, rozpuštěný v 96% ethanolu) a vzorek (jeho objem byl stejný jako v případě PSI). Do 5 ml reakčního roztoku jsem nejprve přidala vzorek, který jsem probublala dusíkem, dokud nebyl téměř všechen kyslík vytěsněn. Poté jsem do směsi přidala postupně ferrikyanid draselný a DMBQ a komůrku jsem uzavřela. Po jedné minutě ustálení ve tmě jsem vzorek na 3 minuty osvětlila. Nárůst koncentrace kyslíku v reakční směsi jsem stanovovala z 2. a 3. minuty osvětlení. Měření každého vzorku jsem, stejně jako v případě měření aktivity PSI, prováděla minimálně 2x a pro statistické hodnocení jsem použila průměr těchto měření

reakční roztok	
složka	koncentrace
sacharóza	0,4 M
MgCl ₂	2 mM
Tris-HCl	50 mM
pH	7.0

reakční směs v komůrce	
složka	Konečná konc.v komůrce
K ₃ [Fe(CN) ₆]	2 mM
DMBQ	1 mM
reakční roztok	5 ml

Aktivita celého elektron-transportního řetězce

Aktivitu celého řetězce jsem měřila jako úbytek koncentrace kyslíku během 2 minut osvětlení v přítomnosti umělých akceptorů elektronů (donorem je v tomto případě voda).

Jednotlivými složkami reakční směsi byl reakční roztok, umělý akceptor elektronů metylviologen, inhibitor kataláz azid sodný (NaN₃) a vzorek (jeho objem byl stejný jako v případě PSI). Do 4,85 ml reakční směsi jsem přidala v tomto pořadí nejprve metylviologen, poté azid sodný a nakonec vzorek. Po jedné minutě ustálení ve tmě jsem vzorek na 4 minuty osvětlila. Úbytek koncentrace kyslíku v reakční směsi jsem stanovovala z 3. a 4. minuty osvětlení. Měření každého vzorku jsem opět prováděla minimálně 2x a pro statistické hodnocení jsem použila průměr těchto měření.

reakční roztok	
složka	koncentrace
Tricin	50 mM
NaCl	30 mM
pH	8.0

reakční směs v komůrce

složka	Konečná konc.v komůrce
metylviologen	0,1 mM
NaN ₃	5 mM
reakční roztok	4,85 ml

Přepočet fotochemických aktivit

Fotochemická aktivita byla vztažena na jednotku času a na:

1- jednotku množství chlorofylu v suspenzi chloroplastů

$$FotA (chl)[mmol O_2 \cdot kg^{-1} \cdot chl \cdot s^{-1}] = \frac{50 \cdot 0,258 \cdot a \cdot 10^6}{V \cdot b \cdot c \cdot 120}$$

2- jednotku listové plochy

$$FotA (LP)[\mu mol O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}] = FotA (chl) \cdot Chl (a + b)$$

3- jednotku suché hmotnosti listu

$$FotA (S)[\mu mol O_2 \cdot g^{-1} \cdot s^{-1}] = FotA (LP)/SpHm$$

FotA fotochemická aktivita izolovaných chloroplastů
0,258 konstanta rozpustnosti kyslíku při normálním tlaku a teplotě 25°C [mol O₂ · m⁻³]
120 počet vteřin, během kterých byla měřena koncentrace kyslíku
a počet dílků stupnice odečtený během druhé a třetí min. po osvětlení reakční komůrky
b počet dílků stupnice naměřených při kalibraci aparatury
c koncentrace chlorofylu (a+b) v reakční komůrce [g · m⁻³]
V objem přidávané suspenze izolovaných chloroplastů
Chl (a+b) obsah chlorofylu a + b [g · m⁻²]
SpHm specifická hmotnost listu spočítaná ze suché hmotnosti vyražených terčů [g · m⁻²]

Měření hodnot F_v/F_m a Q_Y

Fotosyntetická účinnost byla dále určena dvěma parametry fluorescence chlorofylu F_v/F_m a Q_Y . Tyto parametry byly měřeny každý pokusný den ráno na měřeném listu osmi rostlin z každé varianty v případě Q_Y okamžitě, v případě F_v/F_m po 20 minutové adaptaci ve tmě. Parametr F_v/F_m udává maximální kvantový výtěžek fotochemických procesů fotosystému 2 u listu v temnotně adaptovaném stavu a Q_Y udává kvantový výtěžek fotochemických procesů fotosystému 2 u listu ve světelně adaptovaném stavu. Oba parametry byly měřeny přenosným fluorimetrem FluorPen FP100u (Photon System Instruments, Česká republika). Tyto hodnoty byly vypočteny podle vzorců:

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

$$Q_Y = \frac{F_m' - F_0'}{F_m'}$$

F_mmaximální výtěžek fluorescence chlorofylu *a* u listu v temnotně adaptovaném stavu

F_0minimální výtěžek fluorescence chlorofylu *a* u listu v temnotně adaptovaném stavu

F_m'maximální výtěžek fluorescence chlorofylu *a* u listu ve světelně adaptovaném stavu

F_0'minimální výtěžek fluorescence chlorofylu *a* u listu ve světelně adaptovaném stavu

4.5 Statistické hodnocení výsledků

Statistickou průkaznost rozdílů jsem pro každý parametr zjišťovala mezi odrůdami a způsobem pěstování vždy v rámci jednoho pokusného dne. Hodnotila jsem ji analýzou variance (ANOVA) jednoduchého třídění a rozdíly mezi odrůdami/způsoby pěstování jsem testovala Tukey-Kramerovým testem. Pro statistické hodnocení výsledků jsem použila statistický program CoStat, verze 6.204, ©1998-2003 CoHort Software (Monterey, California, USA). Pokud jsem prováděla více opakování měření jednoho vzorku pro zpřesnění, zahrnuje do statistiky průměrnou hodnotu těchto technických opakování jednoho biologického opakování.

5 Výsledky

Jednotlivé parametry byly měřeny u dvou odrůd *Vicia faba* L., lišících se citlivostí vůči stresu suchem ve dvou pokusných blocích (2011, 2012). Současně byly odebírány vzorky listového pletiva, které byly bezprostředně hluboce zmrazeny pro následné analýzy. V každém pokusném bloku jsem prováděla měření a odběry s odstupem dvou dnů a v každém dnu jsem hodnotila rozdíly mezi odrůdami (odolná odrůda Merkur x citlivá odrůda Piešťanský) a podmínkami pěstování (kontrola x stres suchem).

5.1 Sezona 2011

5.1.1 Antioxidanty

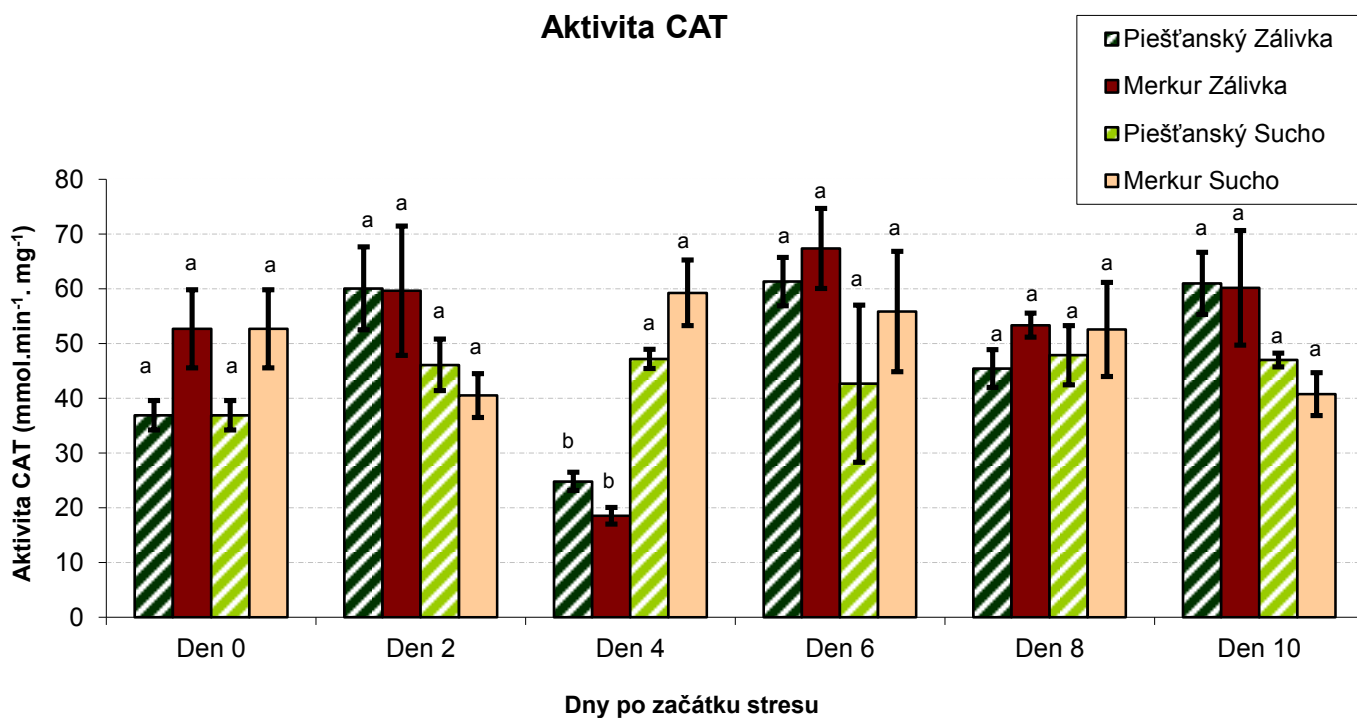
V aktivitě **katalázy** se odrůdy průkazně nelišily ani v kontrolních, ani ve stresových podmínkách (Obr. 12, Tab. 4), nicméně odrůda Merkur vykazovala častěji vyšší hodnoty ve srovnání s odrůdou Piešťanský. První sledovaný den byly pozorovány výrazně vyšší hodnoty u odrůdy Merkur, ale v průběhu stresu aktivita značně kolísala jak v kontrole, tak ve stresu a nevykazovala žádný kontinuální trend. V reakci rostlin na stres je patrný pokles u obou stresovaných odrůd v den 2 ve srovnání s kontrolními rostlinami. Naopak den 4 došlo u stresovaných rostlin k výraznému nárůstu aktivity CAT oproti kontrolním a u obou odrůd byly zjištěné rozdíly statisticky průkazné. Ode dne 6 až do konce stresové periody se hodnoty CAT ve stresu příliš neměnily, zatímco u kontrolních rostlin se hodnoty zvýšily na úroveň srovnatelnou s počátkem stresu.

Počáteční aktivita **askorbát peroxidázy** (Obr. 13, Tab. 4) měla přesně opačný trend než aktivita CAT, neprůkazně vyšší byla u odrůdy Piešťanský. Podobně jako u CAT odrůda Merkur často vykazovala vyšší aktivitu než odrůda Piešťanský a to především s postupujícím suchem. V reakci na stres došlo den 2, stejně jako u CAT, k poklesu aktivity APX u všech stresovaných rostlin, který byl v obou případech statisticky průkazný. Po dnu 4, kdy byly aktivity APX u obou odrůd v kontrole i ve stresu vyrovnané, došlo den 6 ke stejnému nárůstu aktivit u odrůdy Merkur bez ohledu na způsob pěstování, zatímco u odrůdy Piešťanský byl již patrný mírný (statisticky neprůkazný) pokles aktivity ve stresu, který pokračoval až do konce stresové periody a poslední den působení stresu byl nejvýraznější. Rovněž u odrůdy Merkur byl poslední den stresu patrný výrazný, i když stejně, jako u odrůdy Piešťanský neprůkazný, pokles aktivity ve stresu.

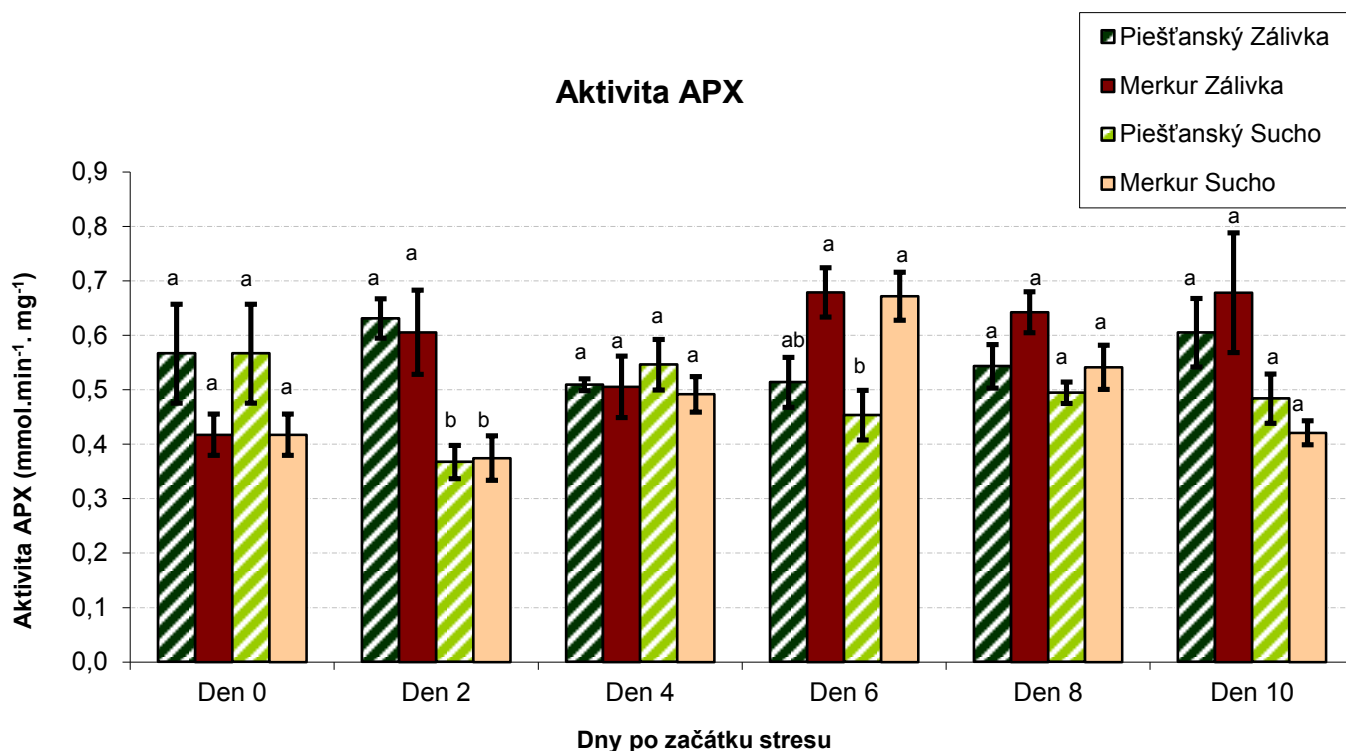
Na rozdíl od předchozích dvou měřených antioxidantů, nebyly u množství **prolinu** pozorovány tak výrazné rozdíly mezi odrůdami (Obr. 14, Tab. 4). Především na počátku stresové periody bylo jeho množství u obou odrůd velmi vyrovnané. Statisticky průkazné rozdíly byly pozorovány až poslední den stresu, kdy měly rostliny citlivé odrůdy Piešťanský vystavené stresu suchem výrazně vyšší množství prolinu ve srovnání s kontrolními i ve srovnání s odolnými rostlinami odrůdy Merkur. Množství prolinu s postupem stresu a vývojem rostlin celkově klesalo a to u obou odrůd.

Tabulka 4. Výsledky analýzy rozptylu jednoduchého třídění pro hodnoty parametrů měřených v roce 2011 u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních a stresových podmínkách. Parametry byly měřeny a hodnoceny samostatně od začátku stresové periody (den 0) s odstupem dvou dnů do konce stresové periody (den 10). Uvedeny jsou hladiny statistické významnosti (zeleně jsou vyznačeny statisticky průkazné rozdíly).

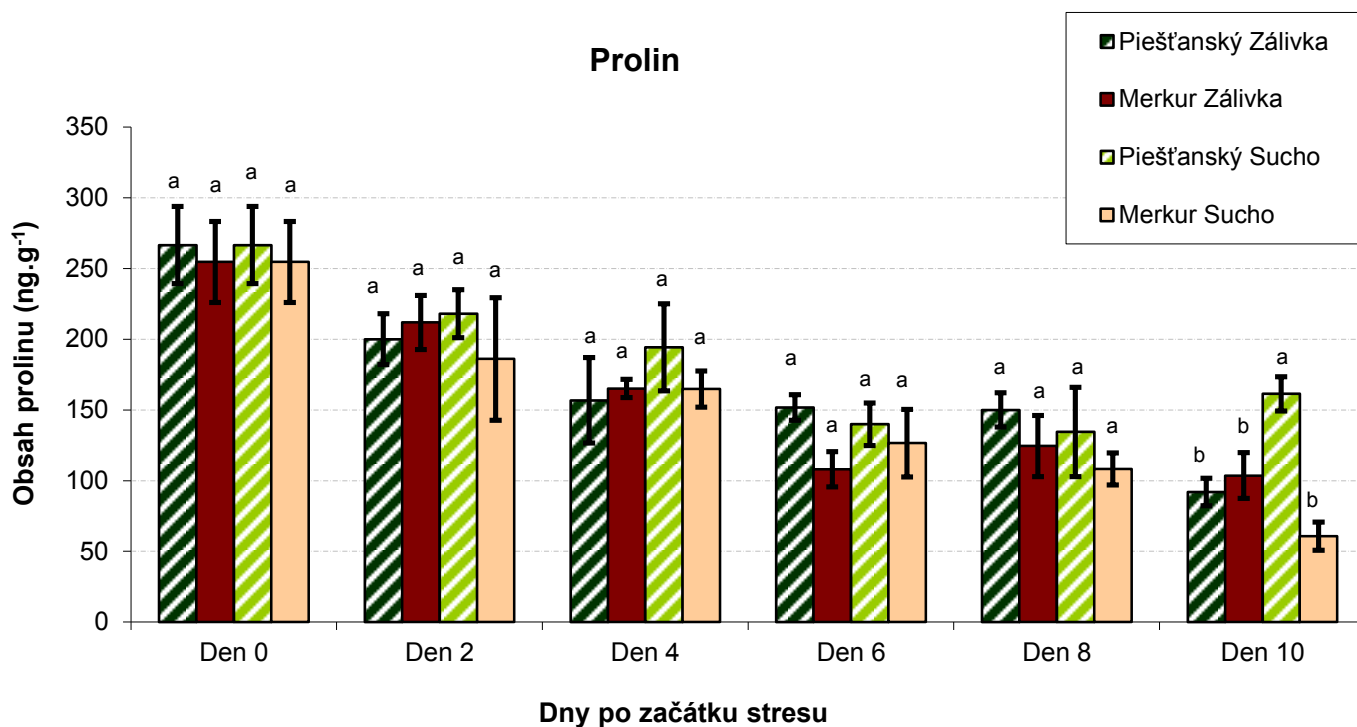
Charakteristika	Den 0	Den 2	Den 4	Den 6	Den 8	Den 10
CAT	0,0842	0,2317	0,0000	0,3842	0,7016	0,1072
APX	0,1824	0,0030	0,8030	0,0082	0,0701	0,0787
Prolin	0,7734	0,8390	0,6740	0,3024	0,5677	0,0007
Výška rostliny	0,2164	0,0729	0,0008	0,0231	0,0029	0,0020
Poč.plně vyv.listů	0,0040	0,0001	0,0022	0,0000	0,0033	0,0012
Poč.viditelných listů	0,0017	0,0009	0,0012	0,0000	0,0000	0,0003
Hmotnost sušiny kořenů	0,0019	0,0073	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000
Hmotnost sušiny prýtu	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
RWC	0,5307	0,8630	0,5871	0,0061	0,0384	0,0014
SLW	0,0061	0,0007	0,0315	0,0113	0,0012	0,0009
Karotenoidy	0,0325	0,0557	0,5643	0,1926	0,0009	0,0059
Chlorofyl a	0,0874	0,1248	0,6306	0,1212	0,0007	0,0025
Chlorofyl b	0,1569	0,2807	0,8133	0,1506	0,0006	0,0068
Chlorofyl a+b	0,0970	0,1628	0,7006	0,1248	0,0006	0,0024
Chlorofyl a/b	0,7196	0,0908	0,1338	0,4652	0,2946	0,7926
Chl/Kar	0,8576	0,0230	0,4546	0,5601	0,1078	0,1483



Obrázek 12. **Aktivita CAT** dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách vztažená na celkové množství proteinu ve vzorku. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.



Obrázek 13. **Aktivita APX** dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách, vztažená na celkové množství proteinu ve vzorku. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.



Obrázek 14. **Množství prolinu** dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách vztažené na jednotku sušiny listu. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.

5.1.2 Morfologické a fyziologické parametry

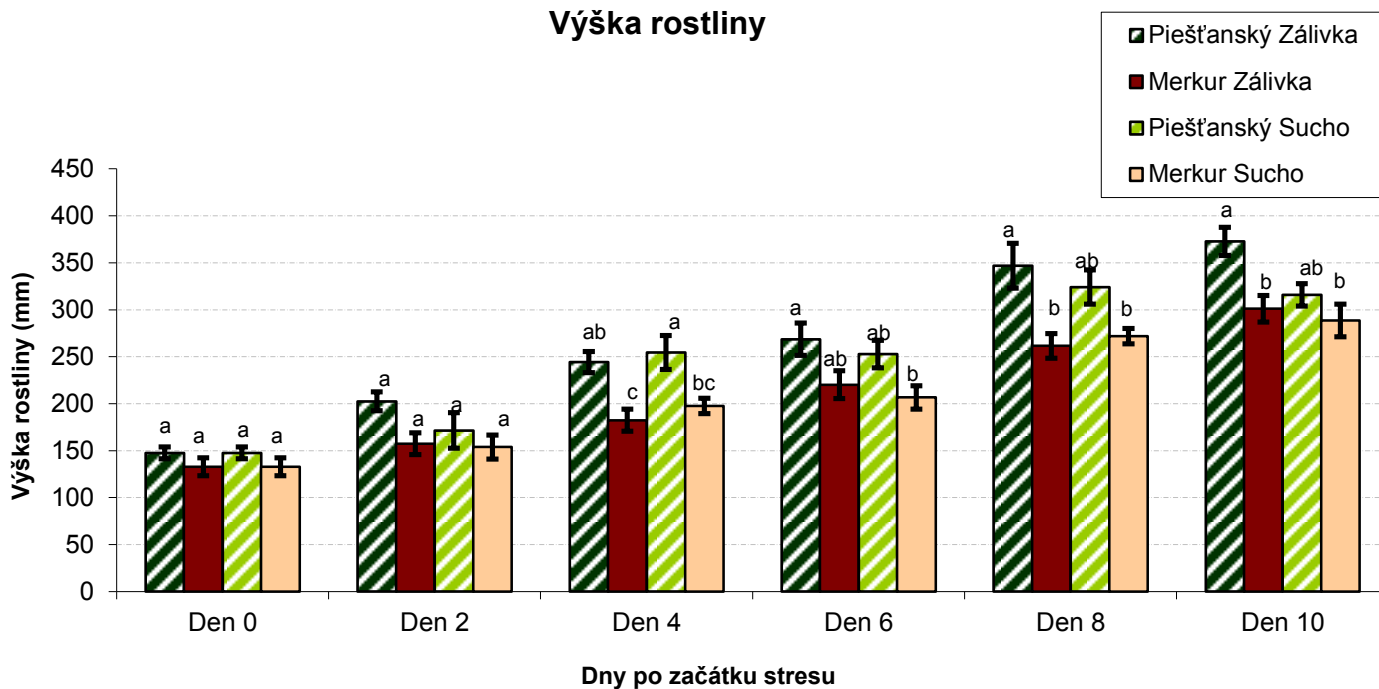
Vývoj morfologie rostlin jsem sledovala především za účelem posouzení různého dopadu stresu suchem (podle případných změn těchto parametrů) na obě odrůdy a potvrzení jejich rozdílné citlivosti.

Výška rostlin byla na počátku stresové periody (Den 0) u obou odrůd stejná (Obr. 15, Tab. 4). S postupujícím stresem a stářím rostlin se rozdíly mezi odrůdami začaly zvětšovat, nejprve neprůkazně den 2 a poté průkazně den 4 a to jak mezi kontrolními rostlinami, tak mezi stresovanými (odrůda Piešťanský byla v obou případech vyšší). S postupujícím stresem se tyto rozdíly mezi kontrolními rostlinami obou odrůd zachovaly a naopak rozdíly mezi stresovanými se snižovaly a 10. den stresu byly velmi podobné. Rozdíly v souvislosti se suchem jsou patrné především u odrůdy Piešťanský. Od 4. dne stresu začal být patrný rozdíl mezi kontrolními a stresovanými rostlinami, který byl poslední den stresu velmi výrazný, nicméně statisticky neprůkazný. Výška odrůdy Merkur se v závislosti na pěstování neměnila a v průběhu celé stresové periody je velice vyrovnaná.

Odrůda Piešťanský měla od počátku stresu větší **počet plně vyvinutých listů** (Obr. 16, Tab. 4), a to jak v kontrolních podmínkách, tak ve stresu. Rozdíly byly ve většině případů statisticky průkazné. Rozdíl mezi odrůdami se během deseti dnů pěstování rostlin v podstatě neměnil ani u kontrolních ani u stresovaných rostlin. Změna v rámci odrůd v závislosti na stresu patrná také nebyla.

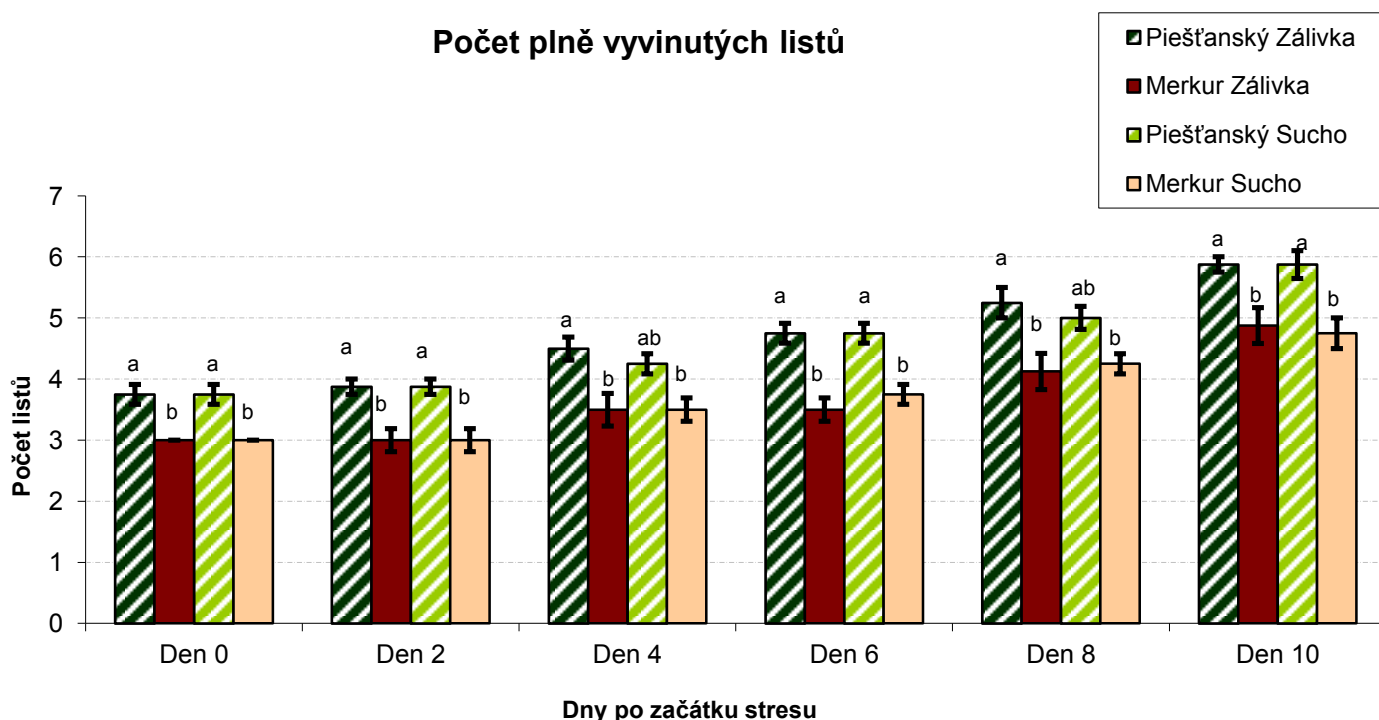
Podobný trend vykazovaly rostliny také v **počtu viditelných listů** (Obr. 17, Tab. 4), který byl u odrůdy Piešťanský průkazně vyšší než u odrůdy Merkur a se stresem se neměnil s výjimkou dnů 2 a 4 v případě stresovaných rostlin. Tyto dny nebyl rozdíl u stresovaných rostlin statisticky průkazný. Počet viditelných listů byl v reakci na stres u odrůdy Merkur stále stejný až do posledního dne, což platí pro Piešťanský také, nicméně 10. den stresu jsou patrné neprůkazně nižší hodnoty u stresovaných rostlin.

Výška rostliny

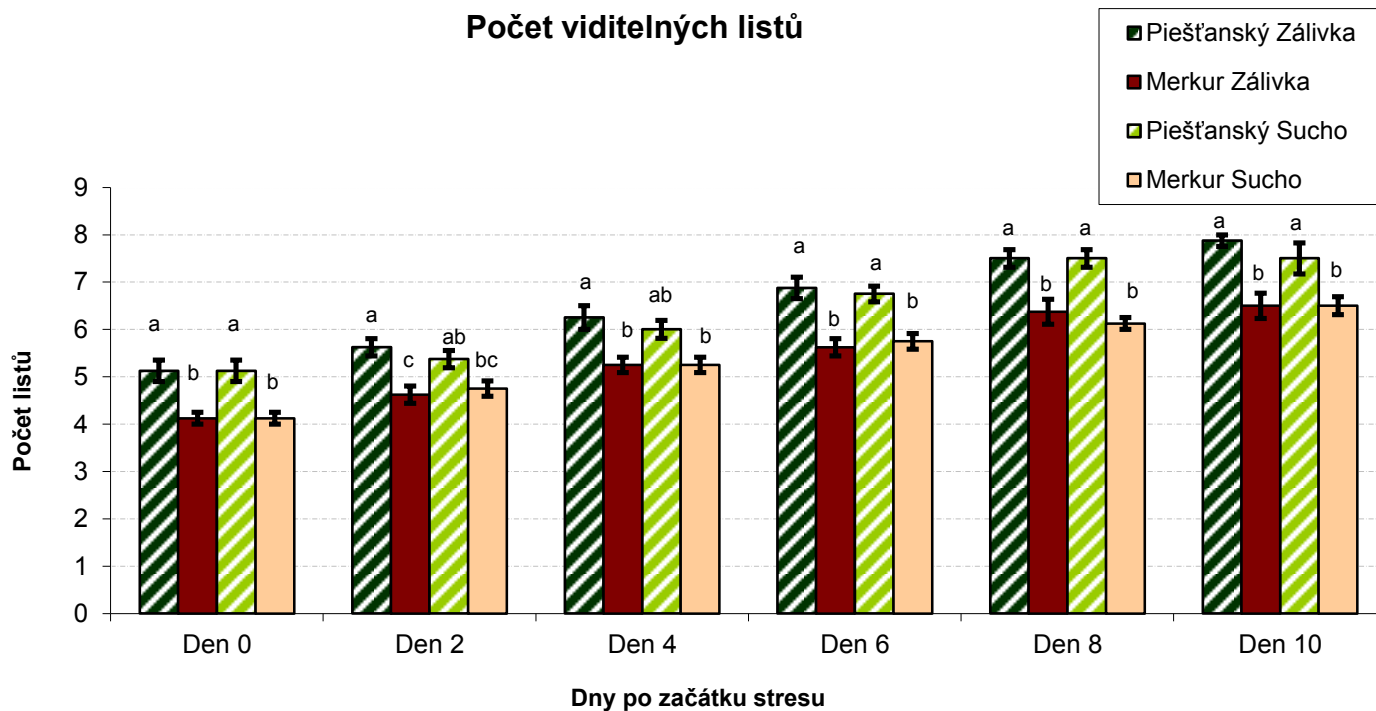


Obrázek 15. **Výška rostlin** dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Výška byla měřena v mm od země po špičku posledního viditelného listu. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.

Počet plně vyvinutých listů



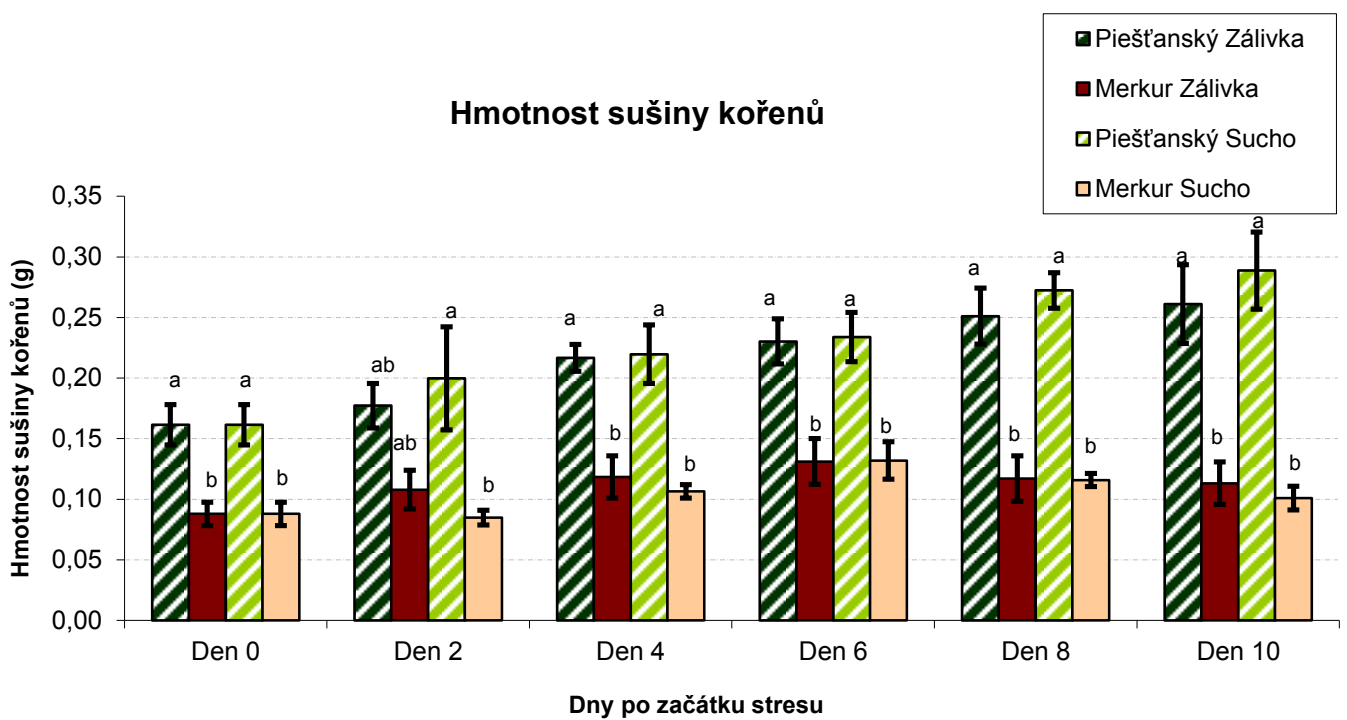
Obrázek 16. **Počet plně vyvinutých listů** dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.



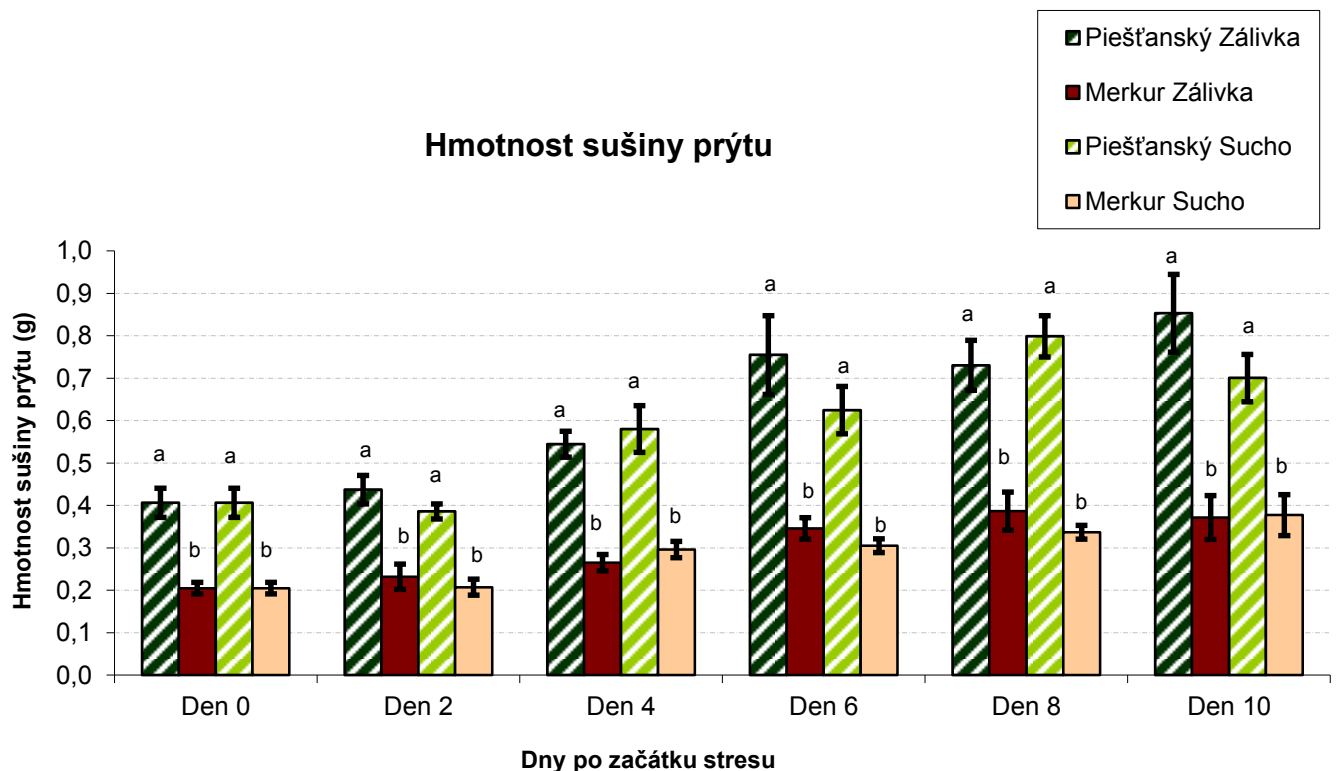
Obrázek 17. **Počet viditelných listů** dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.

V **hmotnosti sušiny kořenů** (Obr. 18, Tab. 4) byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly pouze mezi odrůdami. Po celou dobu stresové periody byla hmotnost kořenů jak u stresovaných, tak kontrolních rostlin odrůdy Piešťanský vyšší než u Merkur. V důsledku stresu se průběžně mírně zvyšovala hmotnost sušiny kořenů u citlivé odrůdy Piešťanský, zatímco u Merkur byla bez výraznějších změn. Stres způsobil pouze neprůkazné rozdíly v rámci odrůd, například ke konci stresové periody nepatrný nárůst hmotnosti kořenů u stresovaných rostlin citlivé odrůdy Piešťanský.

Podobný trend byl patrný rovněž u **hmotnosti sušiny prýtu** rostlin (Obr. 19, Tab .4). Od počátku stresu je hmotnost sušiny prýtu statisticky průkazně vyšší u citlivé odrůdy Piešťanský oproti Merkur a to v rámci obou pěstování. Nicméně v reakci na sucho nebyly průkazné rozdíly zjištěny. Rozdíly mezi kontrolou a stresem byly výraznější u citlivé odrůdy Piešťanský a to především den 6 a 10. Stejně jako v případě suché hmotnosti kořenů během vývoje rostla suchá hmotnost nadzemní části rostlin u citlivé odrůdy, zatímco nárůst u odolné byl méně výrazný.



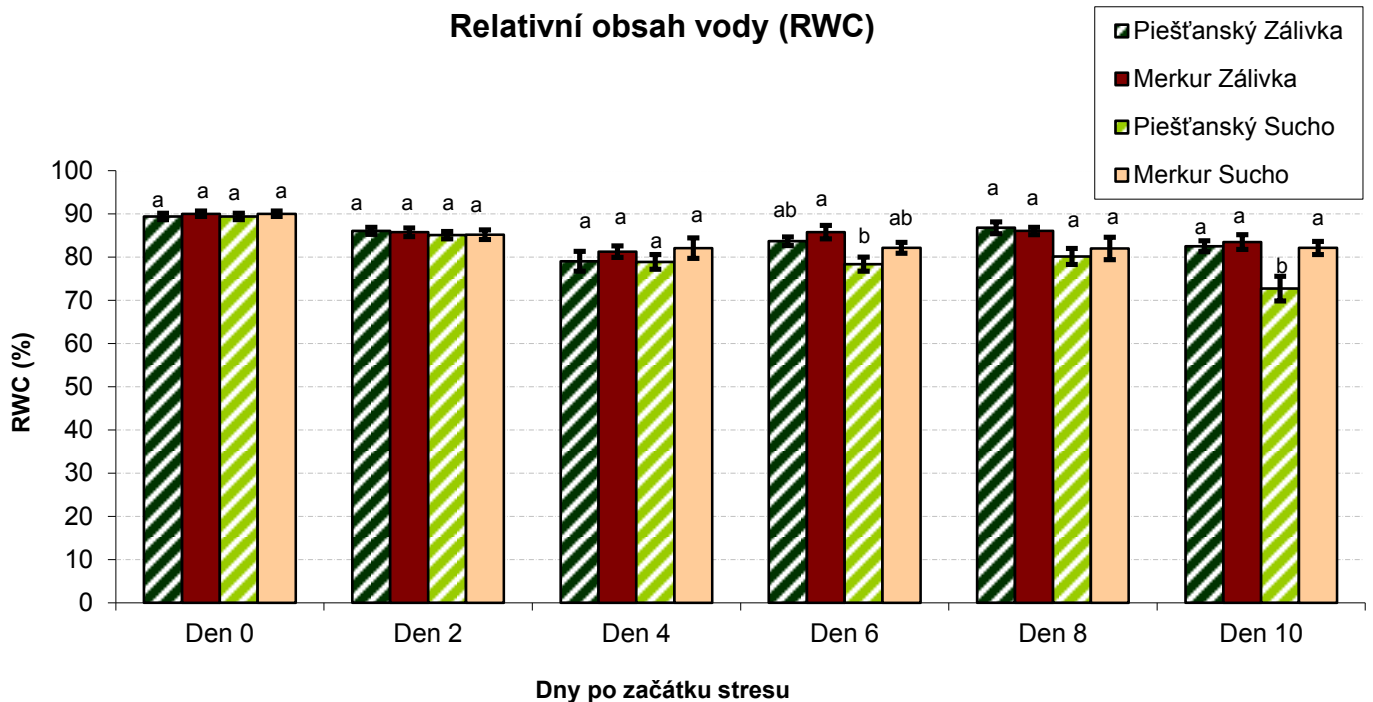
Obrázek 18. **Hmotnost sušiny kořenů** dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.



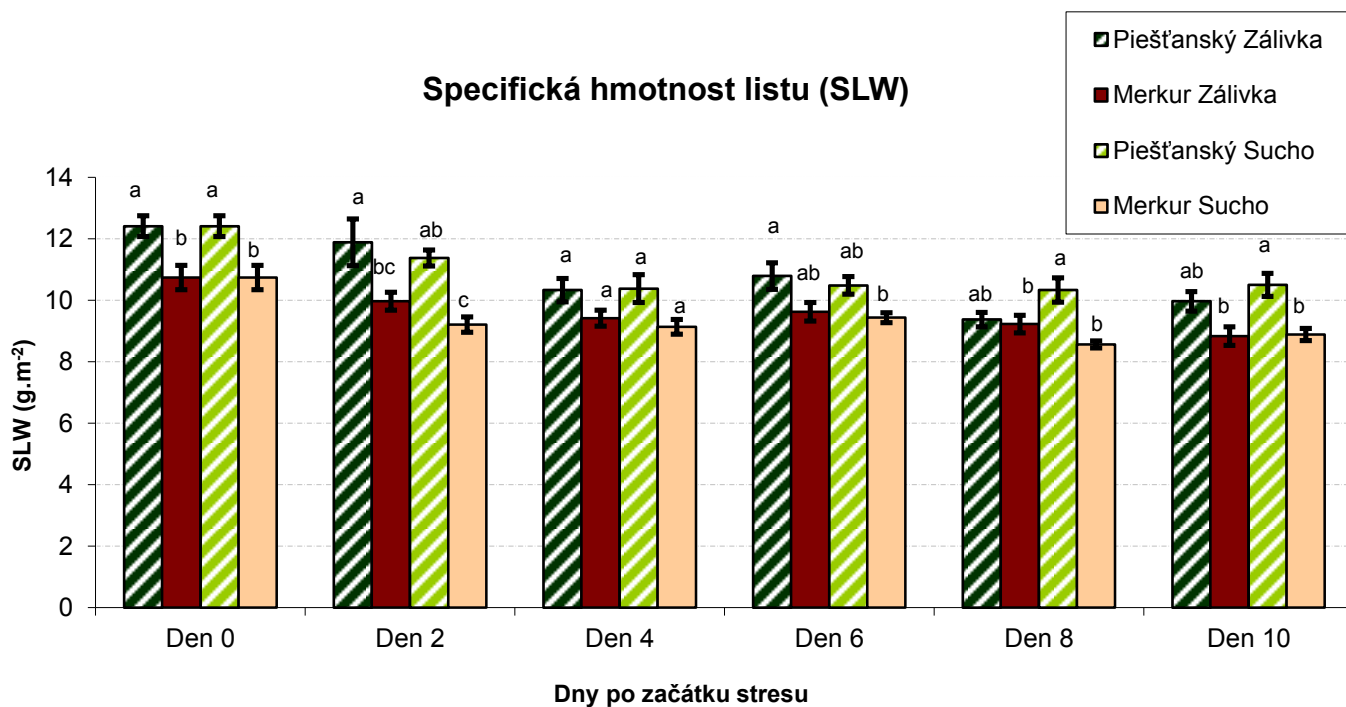
Obrázek 19. **Hmotnost sušiny prýtu** dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.

Relativní obsah vody (RWC) v listu se na počátku stresové periody průkazně nelišil jak v rámci odrůd, tak v rámci pěstování. S postupujícím stresem klesaly hodnoty RWC u odrůdy Piešťanský a po deseti dnech stresu se již průkazně lišily stresované rostliny od kontrolních. Naproti tomu u odrůdy Merkur nebyl ani po deseti dnech stresu patrný průkazný rozdíl v závislosti na pěstování (Obr. 20, Tab. 4).

Rozdíl mezi odrůdou Piešťanský a Merkur ve **specifické hmotnosti listu (SLW)** (Obr. 21, Tab. 4), vypovídající především o síle listu, byl statisticky průkazný na počátku stresové periody (den 0 a den 2). S průběhem stresové periody se však snižoval a na závěr (den 8 a 10) byl patrný pouze mezi stresovanými rostlinami obou odrůd. Odezva na stres suchem nebyla ani u jedné odrůdy průkazná a 10. den stresu byly hodnoty velmi vyrovnané. Celkově hodnoty obou odrůd v průběhu stresu klesaly.



Obrázek 20. **Relativní obsah vody (RWC)** v listu u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.



Obrázek 21. **Specifická hmotnost listu (SLW)** u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách vyjádřená jako hmotnost listového pletiva vztahovaná na jednotku plochy. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.

5.1.3 Fotosyntetické parametry

Z fotosyntetických parametrů jsem v roce 2011 zařadila do srovnávacích měření množství fotosyntetických pigmentů a jejich poměry. Všechny tyto parametry byly vyjadřovány v přepočtu na jednotku listové plochy.

V průběhu stresu se množství všech měřených fotosyntetických pigmentů měnilo velmi málo a i trendy těchto změn byly u všech tří – chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů, velice podobné. Nejvíce změn bylo pozorováno u karotenoidů, průběh u chlorofylu *a* a *b* byl téměř identický.

Počáteční průkazně vyšší množství **karotenoidů** (Obr. 22, Tab. 4) u odrůdy Piešťanský se v průběhu stresové periody téměř vyrovnalo s množstvím u odrůdy Merkur. Na závěr se obě odrůdy opět průkazně odlišovaly. Celkově množství karotenoidů u všech rostlin mírně vzrůstalo. Nárůst množství karotenoidů v důsledku stresu se projevil u rostlin odrůdy Piešťanský, stejně jako u následujících dvou parametrů (chlorofyl *a*, *b*) v den 8. Poslední den stresu se množství karotenoidů u stresovaných rostlin odrůdy Piešťanský zvýšilo už pouze mírně, ale na stejnou hodnotu se zvýšilo množství i u kontrolních rostlin. Nicméně oproti předchozímu dni (den 8), poslední den už nebyl průkazný rozdíl mezi stresovanými rostlinami obou odrůd, zatímco mezi kontrolními tento rozdíl průkazný byl.

Statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami byly v případě **chlorofylu *a*** patrné především ke konci stresu (Obr. 23, Tab. 4). Nicméně, větší množství chl *a* si po celou dobu vývoje udržovala odrůda Piešťanský a to jak v kontrolních, tak stresových podmínkách pěstování. Rozdíly v obsahu chl *a* mezi rostlinami vystavenými stresu suchem a rostlinami kontrolními nebyly, s jedinou výjimkou (den 8, odrůda Piešťanský), zjištěny. Jiné změny stres suchem nezpůsobil.

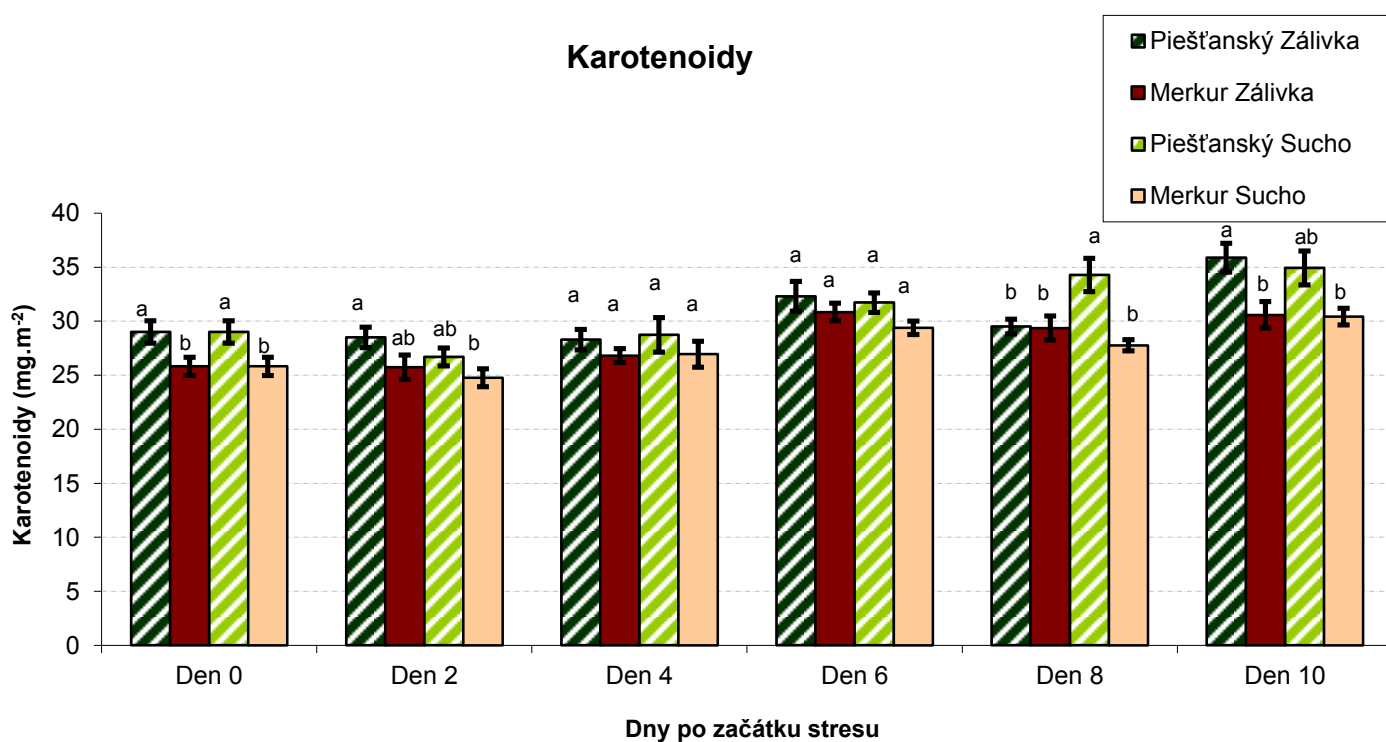
Stejný trend je patrný u **chlorofylu *b*** (Obr. 24, Tab. 4) kromě posledního dne stresu, kdy po plynulém mírném nárůstu množství chl *b* v průběhu sledovaného období množství výrazněji kleslo na úroveň výchozího dne. Větší množství chl *b* u odrůdy Piešťanský ve srovnání s odrůdou Merkur se udržovalo (s výjimkou stresu ve dnech 2 a 4) po celé období stresové periody. Průkazné bylo 8. den stresu u stresovaných rostlin a 10. den stresu u rostlin kontrolních.

Celkové množství **chlorofylu *a+b*** (Obr. 25, Tab. 4) vykazovalo stejný trend jako obsah chlorofylu *a*. Vyšší hodnoty si udržovala odrůda Piešťanský oproti Merkur po celou dobu stresové periody, nicméně průkazně pouze 10. den. Stejně jako v případě samostatně hodnocených pigmentů byl ve dnu 8 zaznamenán nárůst celkového množství chl *a+b* u rostlin

odrůdy Piešťanský vystavených stresu suchem. Jiný rozdíl v závislosti na stresu pozorován nebyl.

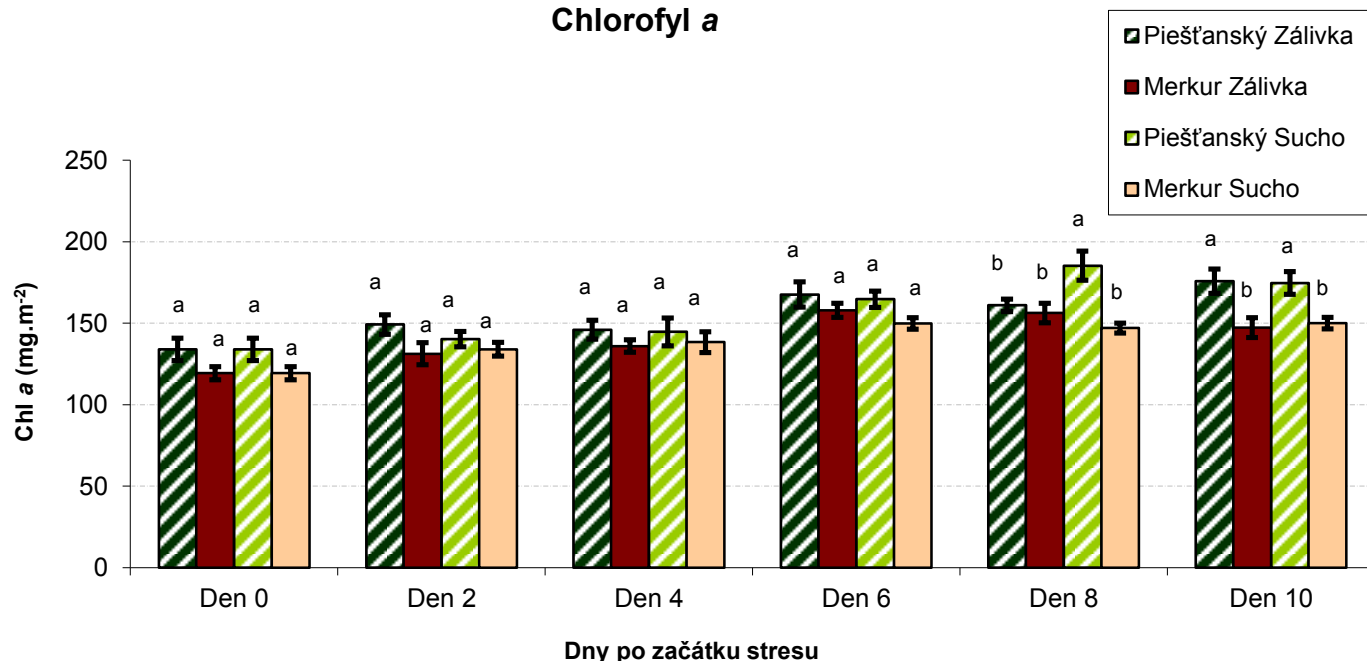
Poměr chlorofylu a/b (Obr. 26, Tab. 4) se až do posledního dne téměř neměnil a ani jednotlivé varianty v rámci dnů se mezi sebou nelišily. Výrazný nárůst všech hodnot je patrný u dne 10 v důsledku poklesu množství chl *b*.

Poměr množství chlorofylu/karotenoidů (Obr. 27, Tab. 4) je po celou dobu stresu velice vyrovnaný a mírné změny v průběhu sledovaného období jsou spíše důsledkem změn obsahu chlorofylu. Jediný průkazný rozdíl je patrný ve 2. dni stresu, kde došlo v reakci na sucho ke zvýšení tohoto poměru u odrůdy Merkur.



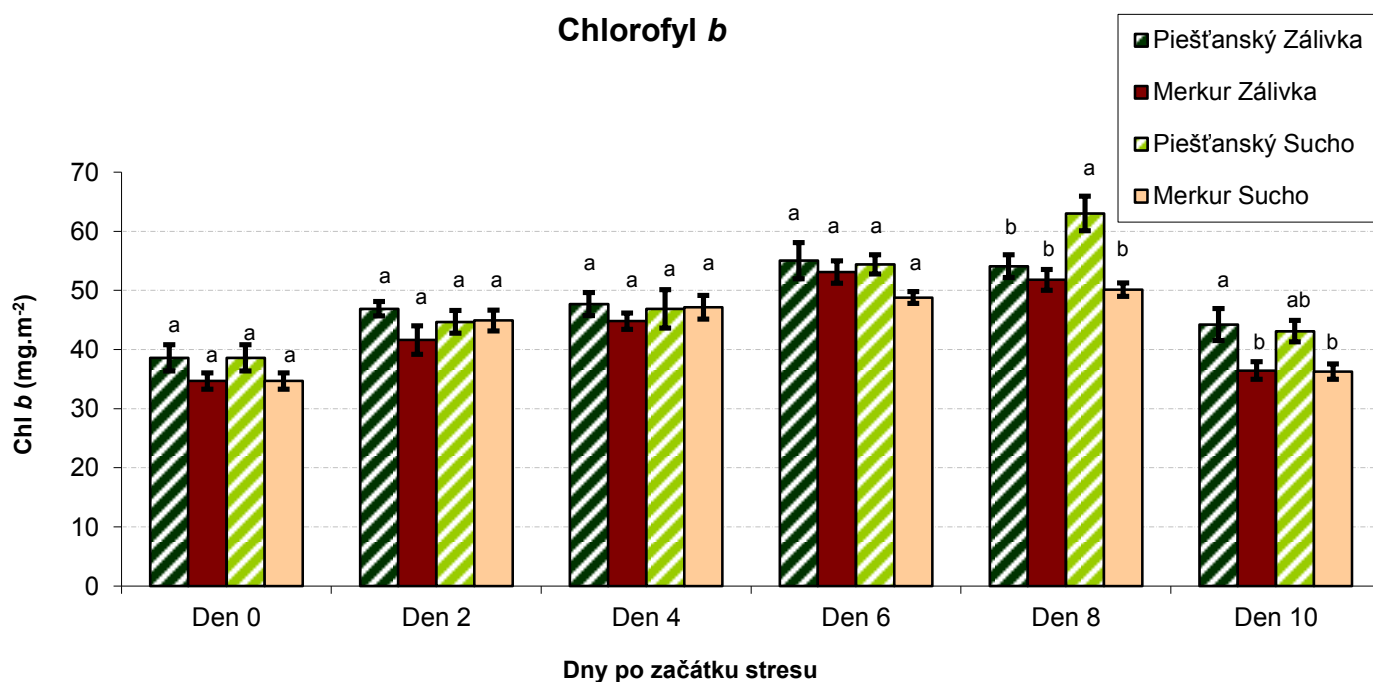
Obrázek 22. **Obsah karotenoidů** vztažený na jednotku listové plochy u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.

Chlorofyl a

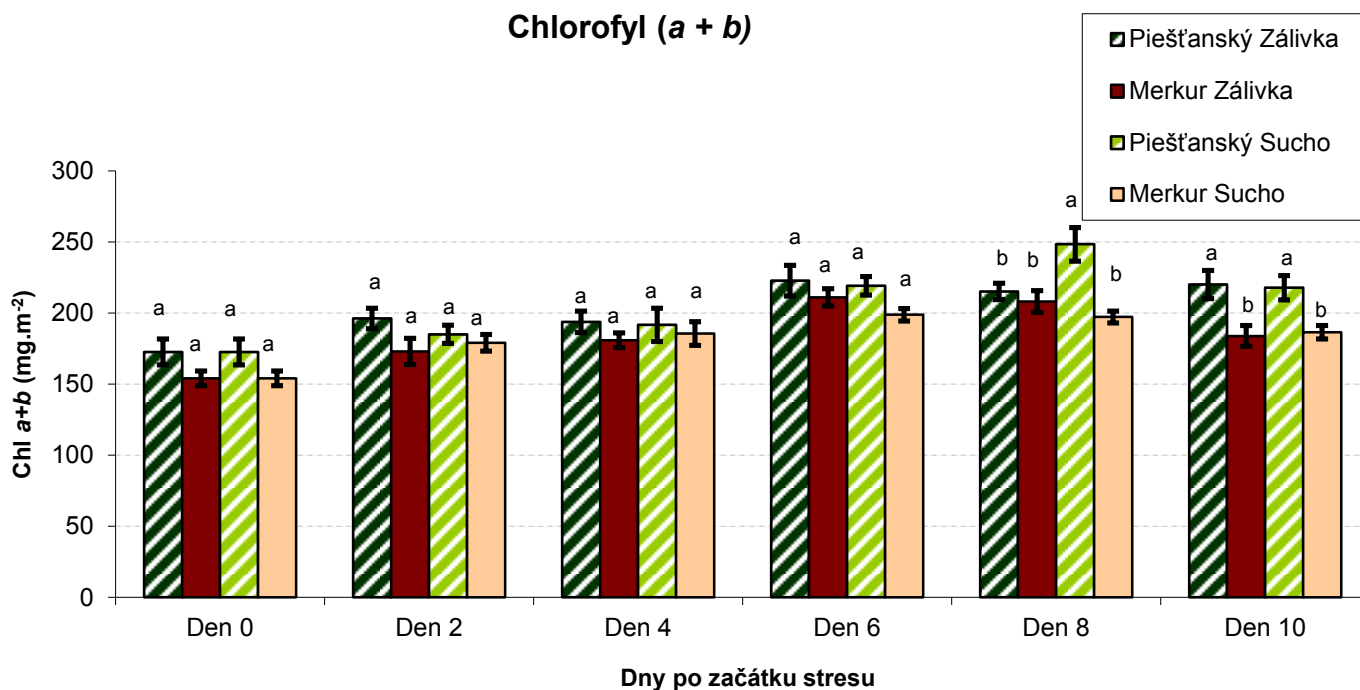


Obrázek 23. **Množství chlorofylu a** vztažené na jednotku listové plochy u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.

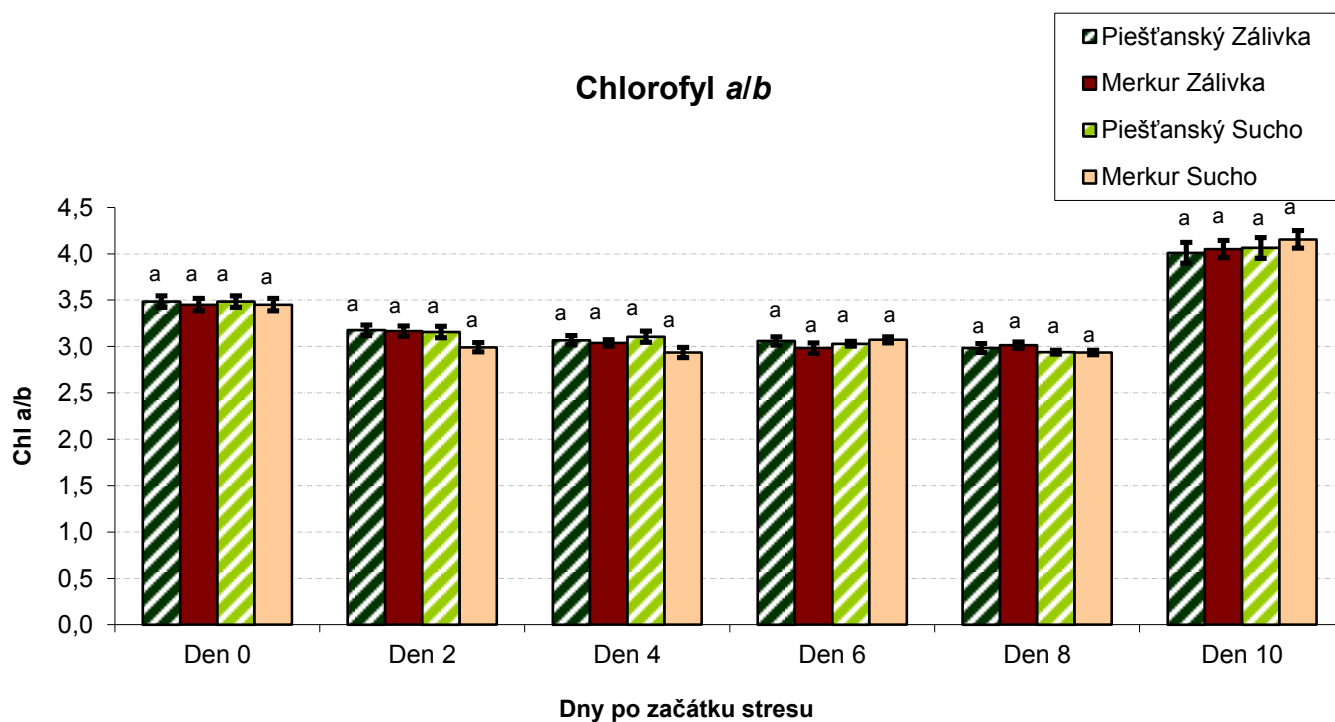
Chlorofyl b



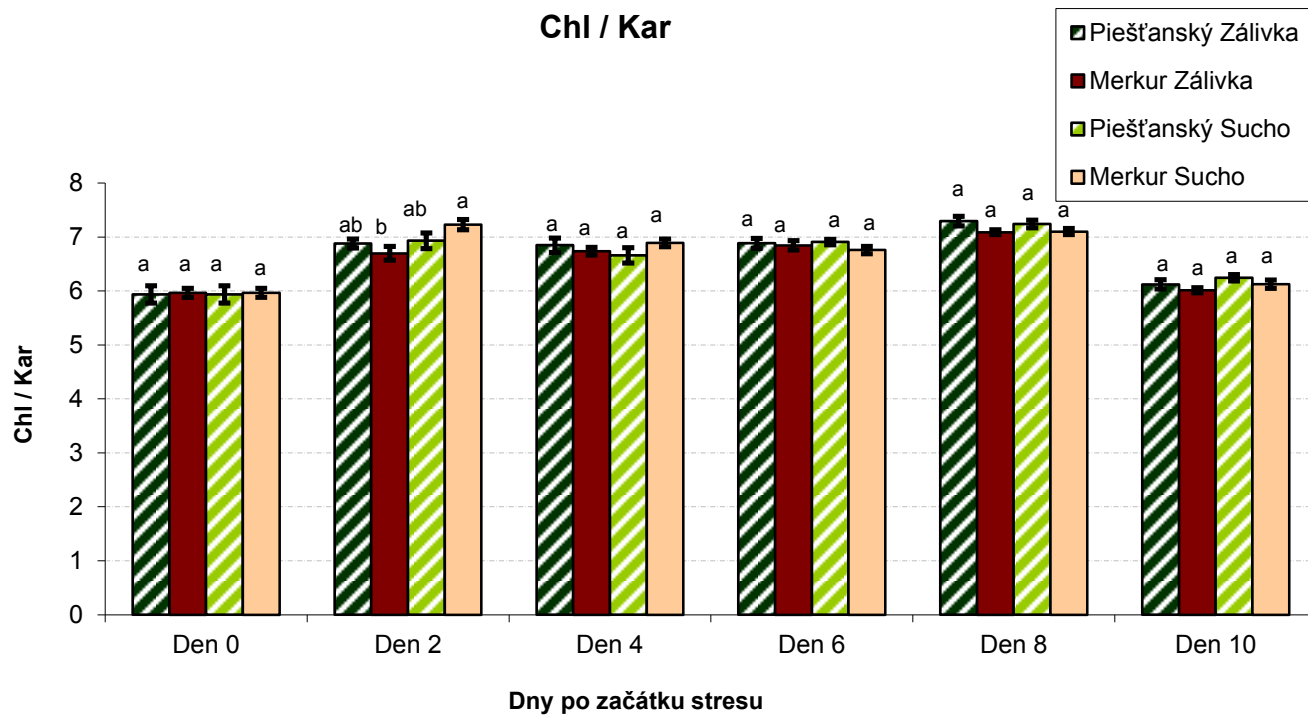
Obrázek 24. **Množství chlorofylu b** vztažené na jednotku listové plochy u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.



Obrázek 25. **Množství chlorofylu a+b** vztažené na jednotku listové plochy u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.



Obrázek 26. **Poměr množství chlorofylu a/b** u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.



Obrázek 27. **Poměr množství chlorofylu/karotenoidů** u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.

5.2 Sezona 2012

5.2.1 Aktivita elektron-transportního řetězce izolovaných chloroplastů

V sezoně 2012 jsem u citlivé a odolné odrůdy bobu pěstované za stejných podmínek, jako v předchozím roce měřila vybrané fotosyntetické parametry vyjadřující účinnost fotosyntézy. Jednalo se především o aktivity elektron-transportního řetězce chloroplastů a vybrané parametry fluorescence chlorofylu. Dále to byly parametry obsahu fotosyntetických pigmentů chlorofylu *a*, *b* a specifická hmotnost listu. Výsledky jsem hodnotila stejným způsobem jako v předchozím roce a hodnoty statistické průkaznosti uvádím v Tabulce 5.

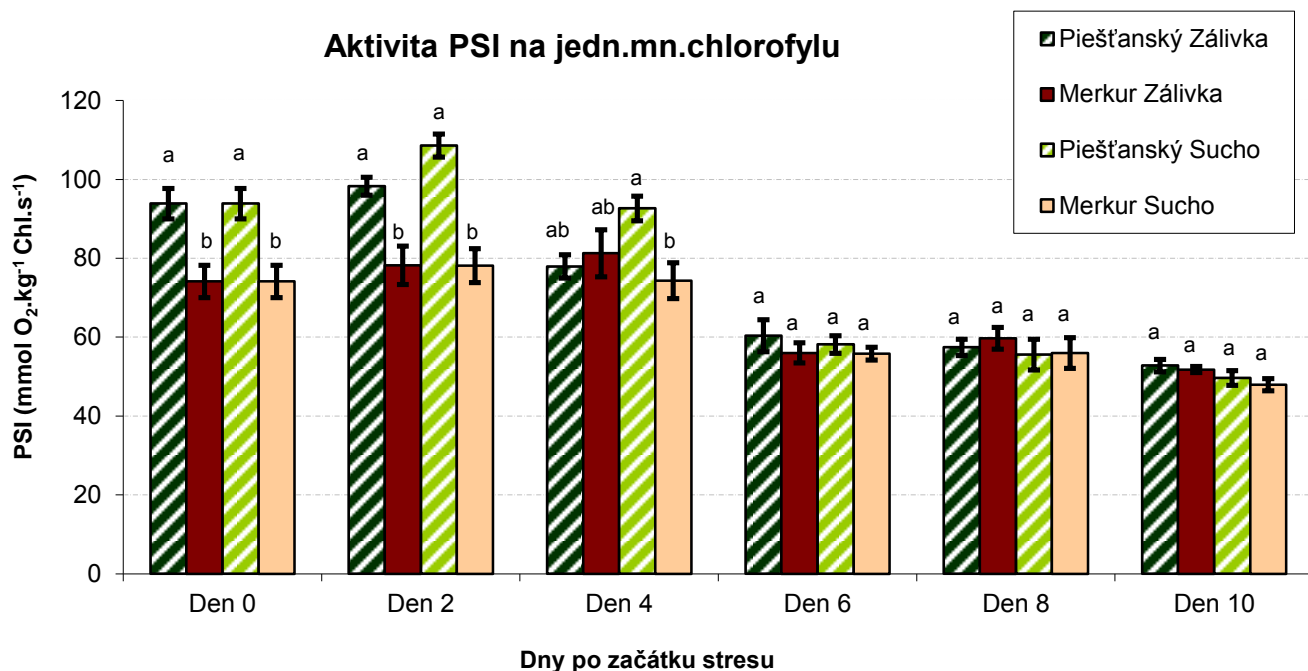
Aktivita PSI vztažená na jednotku množství chlorofylu (Obr. 28, Tab. 5) byla na začátku stresové periody průkazně vyšší u odrůdy Piešťanský ve srovnání s Merkur a to jak v kontrolních, tak stresových podmínkách. Od 4.dne, kdy již nebyl patrný rozdíl mezi kontrolními rostlinami obou odrůd, ale pouze mezi rostlinami vystavenými stresu suchem, se aktivity PSI vyrovnávaly a celkově v průběhu stresu klesaly. Vliv sucha je možný pozorovat u odrůdy Piešťanský den 2 a den 4, kdy byla aktivita PSI mírně vyšší (neprůkazně) u rostlin vystavených stresu suchem. V následujících třech dnech již nebyly patrné velké rozdíly a aktivita byla velice vyrovnaná.

Srovnatelné výsledky byly získány při vyjádření hodnot **aktivity PSI na jednotku plochy listu** (Obr. 29, Tab. 5). Statisticky průkazné rozdíly mezi odrůdami na počátku stresu se v průběhu stresu zmenšovaly, ale na rozdíl od předchozího vyjádření, byly patrné i na konci stresu, i když neprůkazné. V souvislosti se stresem byl pozorován průkazný rozdíl pouze ve dni 4 (Piešťanský). Do 6. dne byly u stresovaných rostlin pozorovány mírně vyšší hodnoty u obou odrůd v porovnání s kontrolami, zatímco po dni 6 byly vyrovnané.

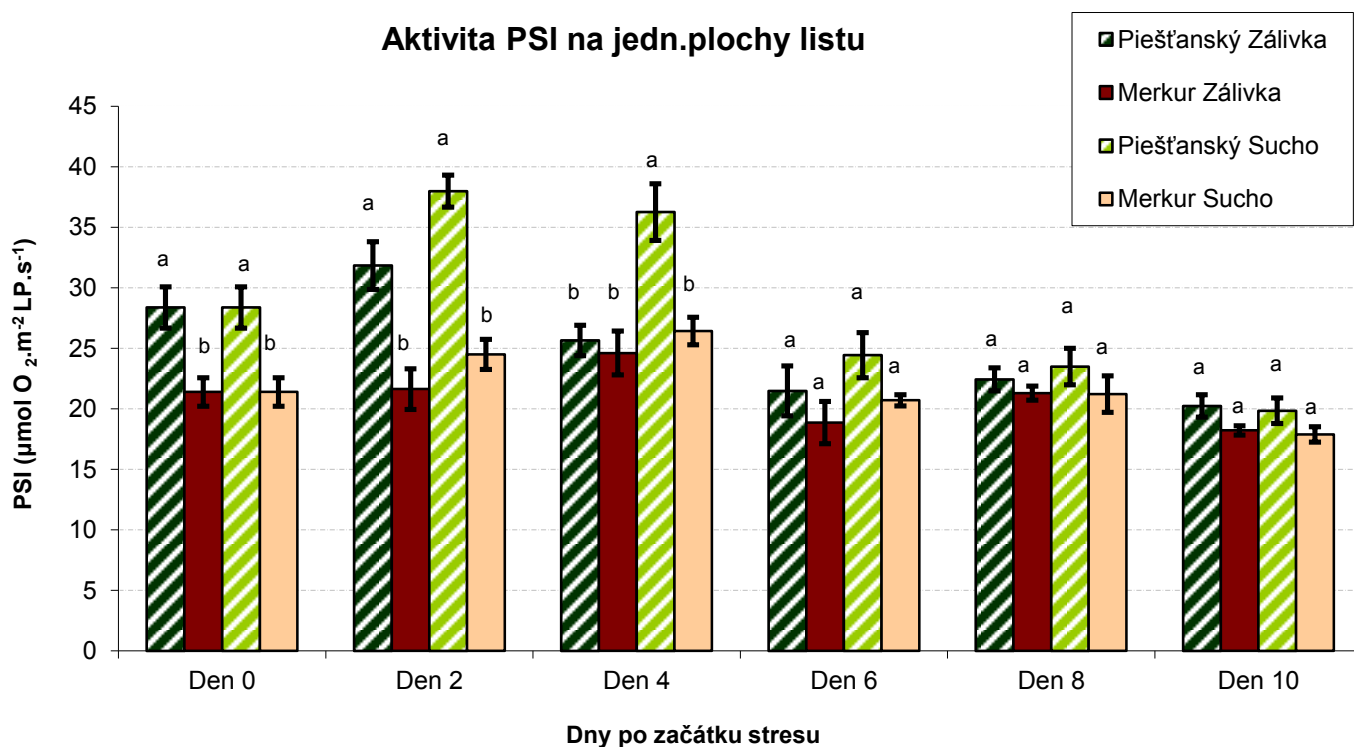
V **aktivitě PSI vztažené na jednotku hmotnosti sušiny listu** (Obr. 30, Tab. 5) byly na rozdíl od předchozích dvou charakteristik hned od počátku stresu neprůkazné rozdíly mezi odrůdami. Nicméně další průběh byl stejný jako u předchozích dvou přepočtů.

Tabulka 5. Výsledky analýzy rozptylu jednoduchého třídění pro hodnoty parametrů měřených v roce 2012 u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních a stresových podmínkách. Parametry byly měřeny a hodnoceny samostatně od začátku stresové periody (den 0) s odstupem dvou dnů do konce stresové periody (den 10). Uvedeny jsou hladiny statistické významnosti (zeleně jsou vyznačeny statisticky průkazné rozdíly).

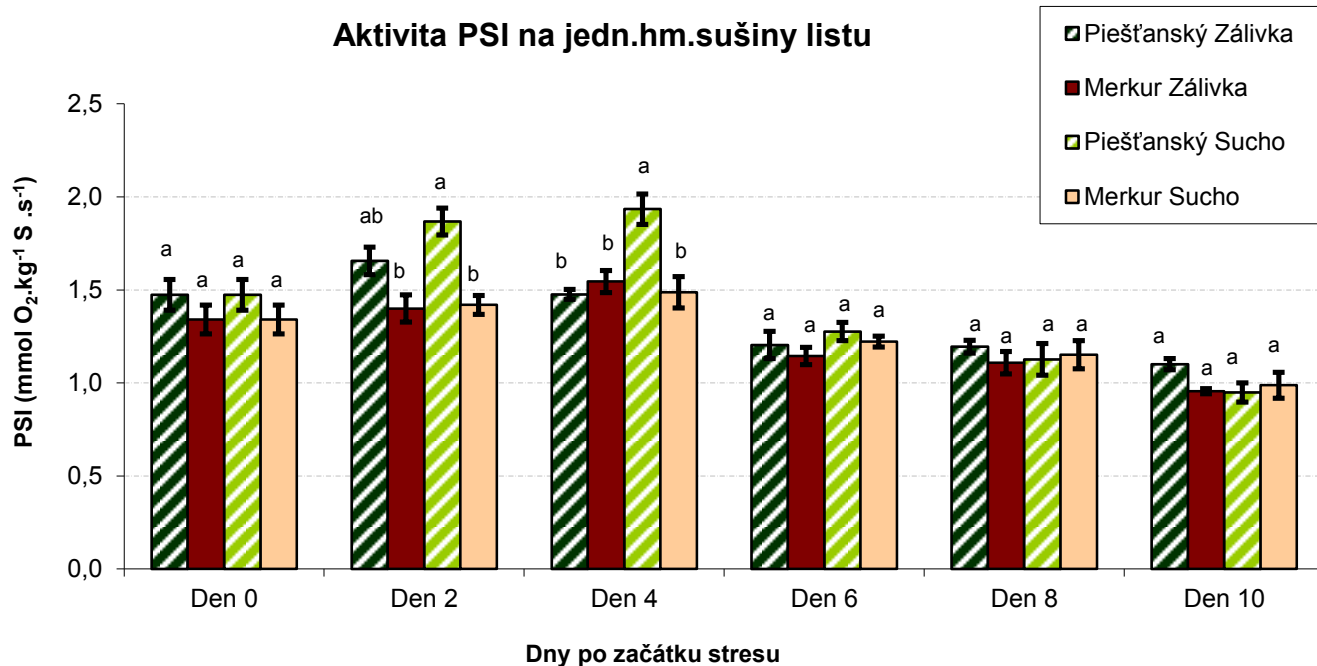
Charakteristika	Den 0	Den 2	Den 4	Den 6	Den 8	Den 10
PSI (mmol O₂.kg⁻¹ Chl.s⁻¹)	0,0126	0,0001	0,0544	0,6252	0,8025	0,1576
PSI (mmol O₂.m⁻² LP.s⁻¹)	0,0151	0,0000	0,0014	0,1755	0,5122	0,1470
PSI (mmol O₂.kg⁻¹ S.s⁻¹)	0,2936	0,0011	0,0011	0,3900	0,8225	0,1364
PSII (mmol O₂.kg⁻¹ Chl.s⁻¹)	0,7277	0,8776	0,1566	0,0007	0,1186	0,0915
PSII (mmol O₂.m⁻² LP.s⁻¹)	0,2394	0,0123	0,0019	0,1757	0,2053	0,1498
PSII (mmol O₂.kg⁻¹ S.s⁻¹)	0,0202	0,3572	0,0142	0,6358	0,4845	0,0436
WC (mmol O₂.kg⁻¹ Chl.s⁻¹)	0,1788	0,1067	0,5059	0,2590	0,2298	0,0236
WC (mmol O₂.m⁻² LP.s⁻¹)	0,1333	0,0134	0,3248	0,1577	0,3473	0,0487
WC (mmol O₂.kg⁻¹ S.s⁻¹)	0,9213	0,3953	0,8015	0,2278	0,1827	0,0307
Chlorofyl a	0,0265	0,0007	0,0004	0,0165	0,0205	0,0038
Chlorofyl b	0,3064	0,0053	0,0028	0,0238	0,0061	0,0138
Chl a+b (mg m⁻²)	0,2026	0,0010	0,0005	0,0178	0,0150	0,0048
SLW	0,0001	0,0001	0,0905	0,1682	0,0562	0,0152
Fv/Fm	0,6782	0,6401	0,2764	0,6711	0,0102	0,0001
Qy	0,1624	0,3752	0,0384	0,2324	0,0140	0,8543



Obrázek 28. Aktivita PSI vztažená na jednotku množství chlorofylu u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.



Obrázek 29. Aktivita PSI vztažená na jednotku plochy listu u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.



Obrázek 30. **Aktivita PSI vztažená na jednotku hmotnosti sušiny listu** u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.

Na rozdíl od aktivity PSI nebyly mezi citlivou a odolnou odrůdou zjištěny žádné průkazné rozdíly v **aktivitě PSII**, nicméně v několika případech patrné byly. Také trend aktivity PSII byl spíše vyrovnaný na rozdíl od PSI, u kterého aktivita výrazněji klesala. Vztaženo na **jednotku množství chlorofylu** (Obr. 31, Tab. 5) byla hned od počátku stresu až do 4. dne aktivita u obou odrůd vyrovnaná a to jak v kontrolních tak ve stresových podmínkách. Reakce obou odrůd na stres se projevila ve druhé polovině stresové periody průkazným (den 6) nebo neprůkazným (den 8, 10) poklesem aktivity. Výraznější pokles byl patrný u odrůdy Merkur.

Hned od počátku stresové periody byl patrný rozdíl mezi odrůdami v **aktivitě PSII vztažené na jednotku plochy listu** (Obr. 32, Tab. 5). Odrůda Piešťanský měla vyšší aktivitu jak v kontrole, tak i ve stresu, ale většinou neprůkazně. Na rozdíl od předchozího přepočtu je zde patrné zvýšení aktivity PSII v reakci na stres u citlivé odrůdy Piešťanský po celou dobu stresu (s výjimkou 10. dne), průkazně jen 4. den. U odolné odrůdy Merkur je nárůst patrný do 4. dne, pak spíše pokles (oba neprůkazné).

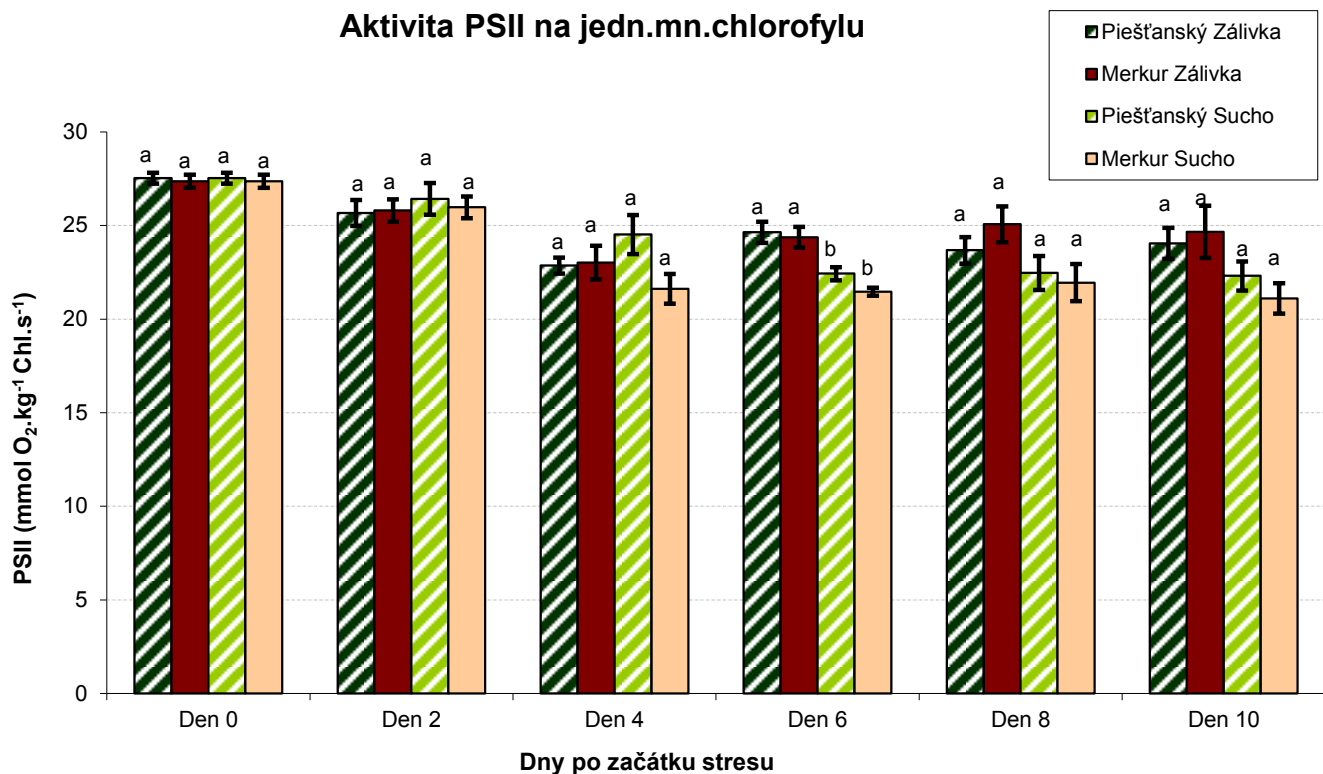
Rozdílný počátek stresové periody je patrný u posledního přepočtu aktivity PSII na **jednotku hmotnosti sušiny listu** (Obr. 33, Tab. 5). Aktivita je zde průkazně vyšší u odrůdy Merkur. Po 2. dni se aktivity obou odrůd vyrovnávají a ke konci stresu je aktivita u odrůdy Merkur (především v kontrole) spíše nižší. Mírný nárůst aktivity v reakci na stres je patrný

neprůkazně u obou odrůd ve dni 4, průkazně pak u odrůdy Piešťanský den 6. Od 6. dne je zatím neprůkazně u odrůdy Merkur patrný pokles u stresovaných rostlin následovaný 8. den odrůdou Piešťanský. Na rozdíl od odrůdy Merkur, tento pokles je u odrůdy Piešťanský 10. den průkazný.

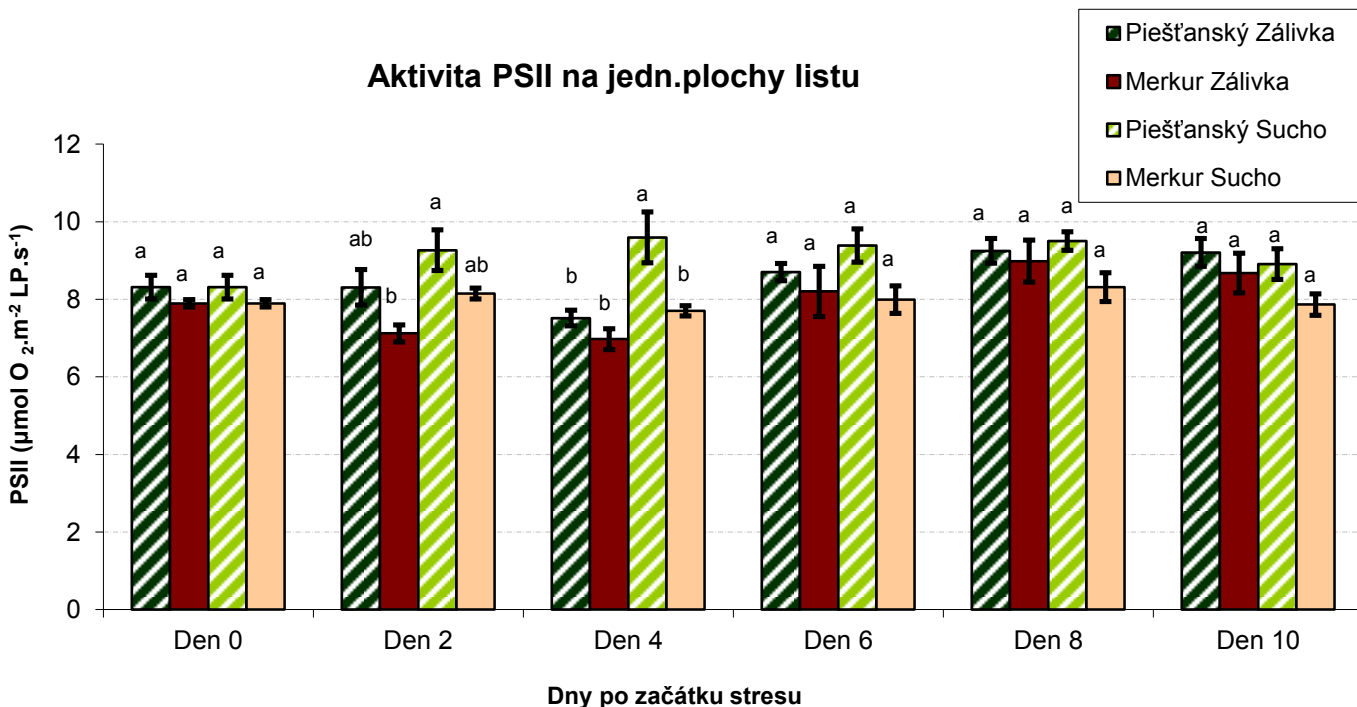
Aktivita celého elektron-transportního řetězce vztažená na jednotku množství chlorofylu (Obr. 34, Tab. 5) vykazovala obdobný průběh, jako aktivita PSI, ale rozdíly nebyly, s výjimkou posledního dne, statisticky průkazné. Téměř po celou dobu stresové periody byla aktivita neprůkazně vyšší u odrůdy Piešťanský. V reakci na stres byl od 2. dne až do konce stresu pozorovaný pokles (neprůkazný) aktivity u stresovaných rostlin odrůdy Piešťanský, zatímco u odrůdy Merkur byl patrný pouze dny 4, 8 a 10 (poslední zmíněný již průkazně).

Aktivita celého řetězce vztažená na jednotku plochy listu (Obr. 35, Tab. 5) byla velice podobná jako u předchozí charakteristiky, rozdíly mezi odrůdami byly větší, ale stále neprůkazné. Až do 6. dne je v reakci na sucho patrný u obou odrůd nárůst, poslední dva dny je patrný u obou pokles (ve všech případech neprůkazný).

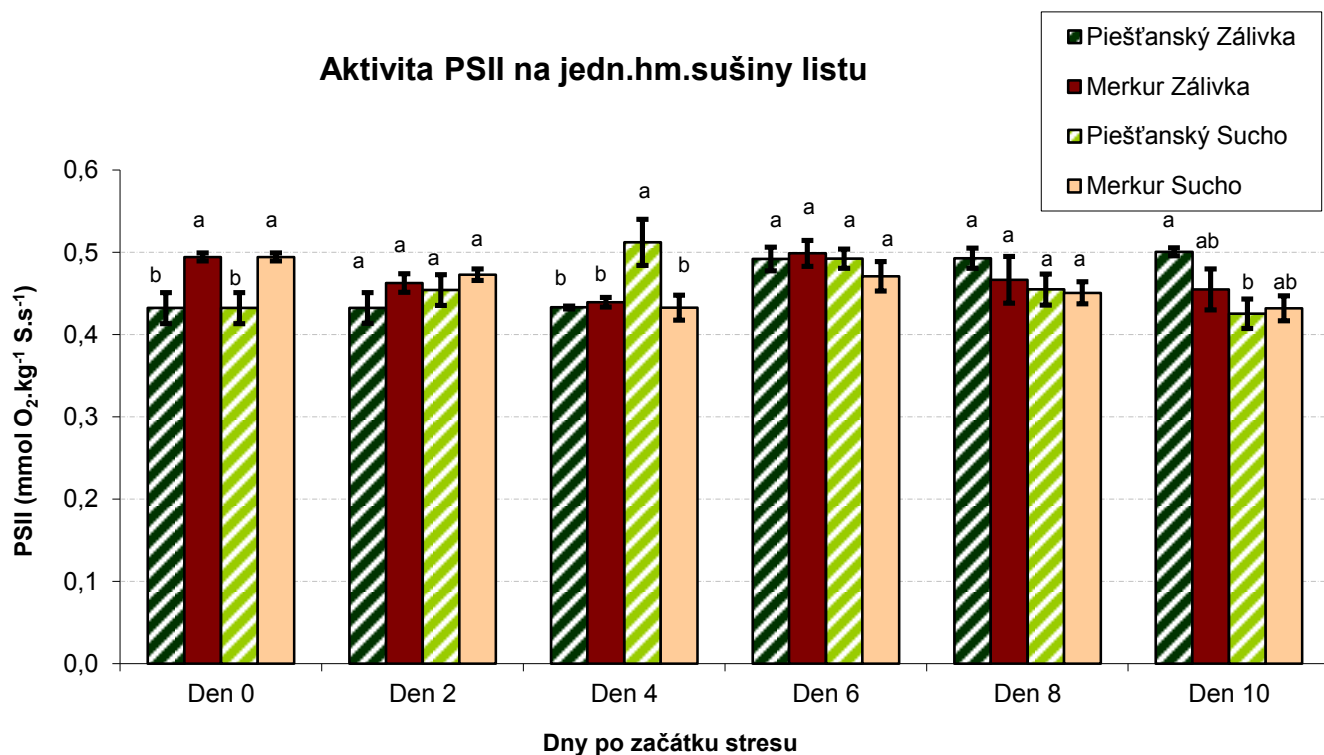
V aktivitě celého řetězce vztažené na jednotku hmotnosti sušiny listu (Obr. 36, Tab. 5) byly rozdíly (neprůkazné) mezi odrůdami patrné až od 2. dne stresu. U kontrolních rostlin odrůdy Piešťanský přetrvávaly vyšší hodnoty až do konce stresové periody. V reakci na stres docházelo u odrůdy Piešťanský po celou dobu stresu (kromě dne 8) k poklesu aktivity u stresovaných rostlin. Tento pokles byl ve všech případech, s výjimkou dne 10, neprůkazný. Naopak u odrůdy Merkur byl po celou dobu patrný nárůst aktivity u stresovaných rostlin, kromě posledního dne, nicméně vždy byl neprůkazný.



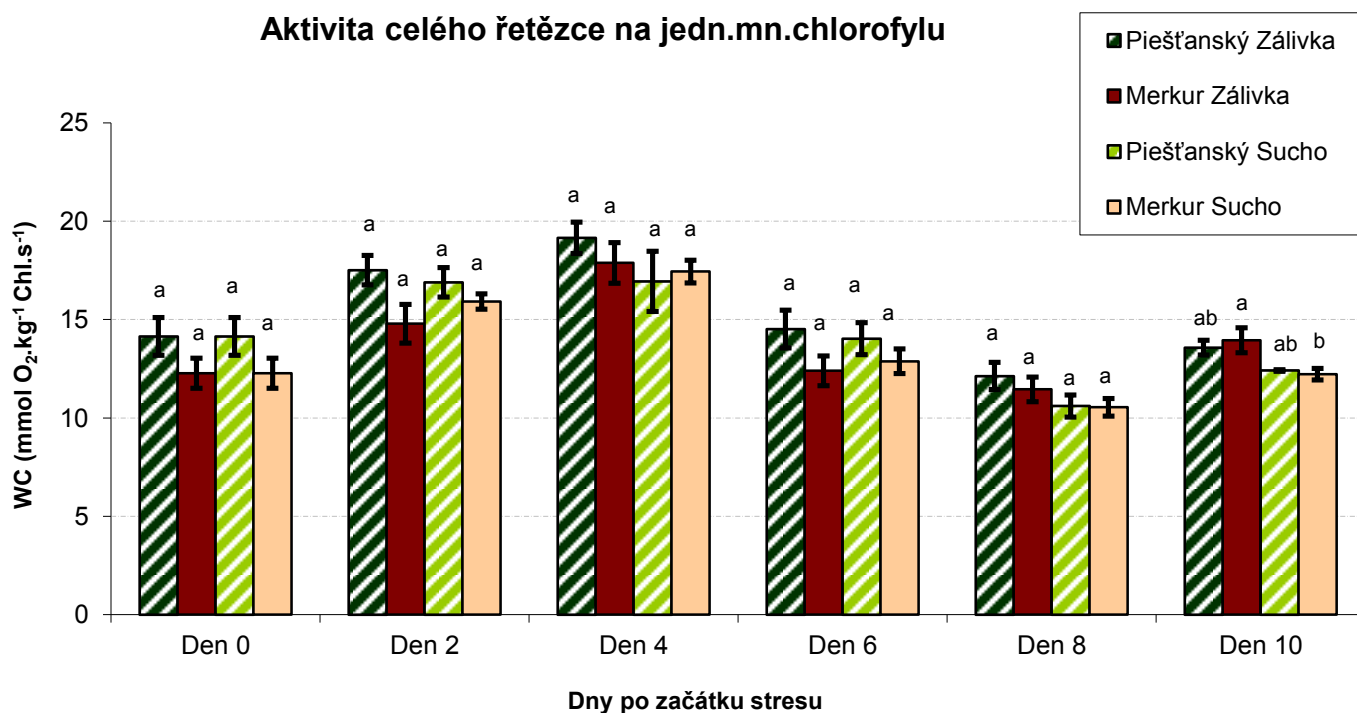
Obrázek 31. Aktivita PSII vztahovaná na jednotku množství chlorofylu u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.



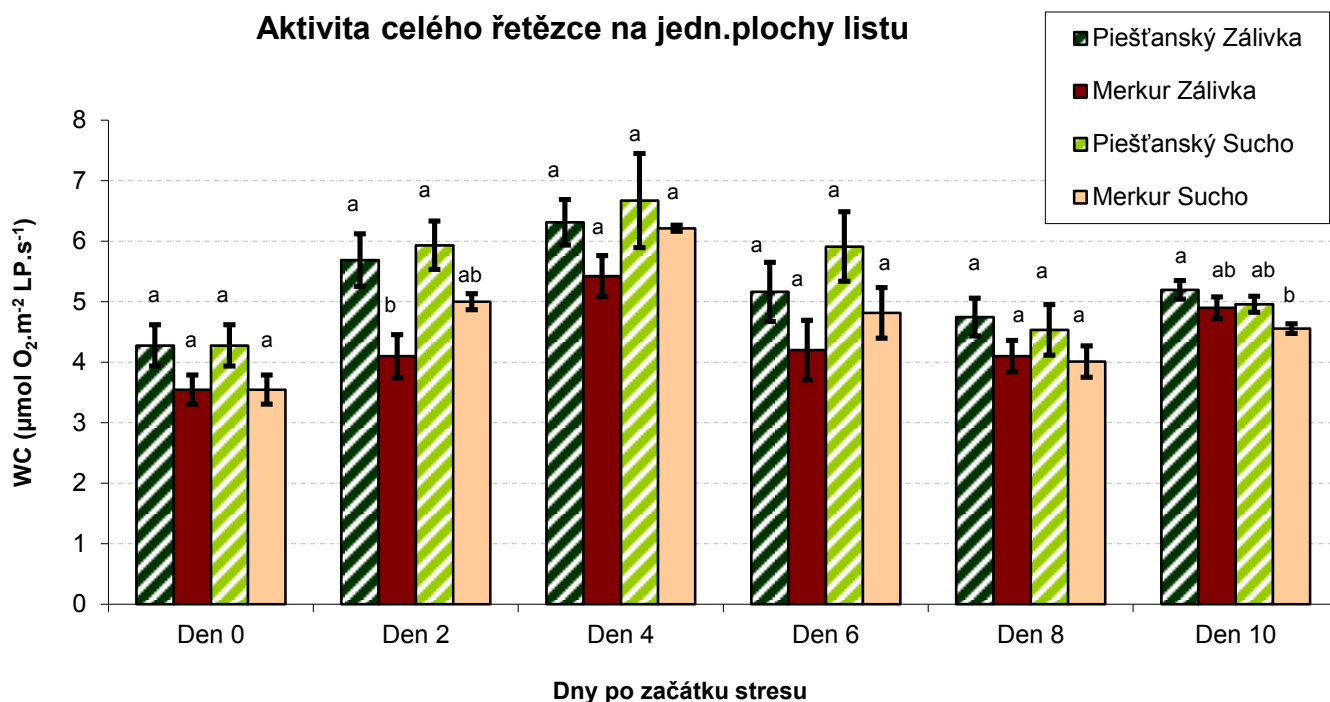
Obrázek 32. Aktivita PSII vztahovaná na jednotku plochy listu u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.



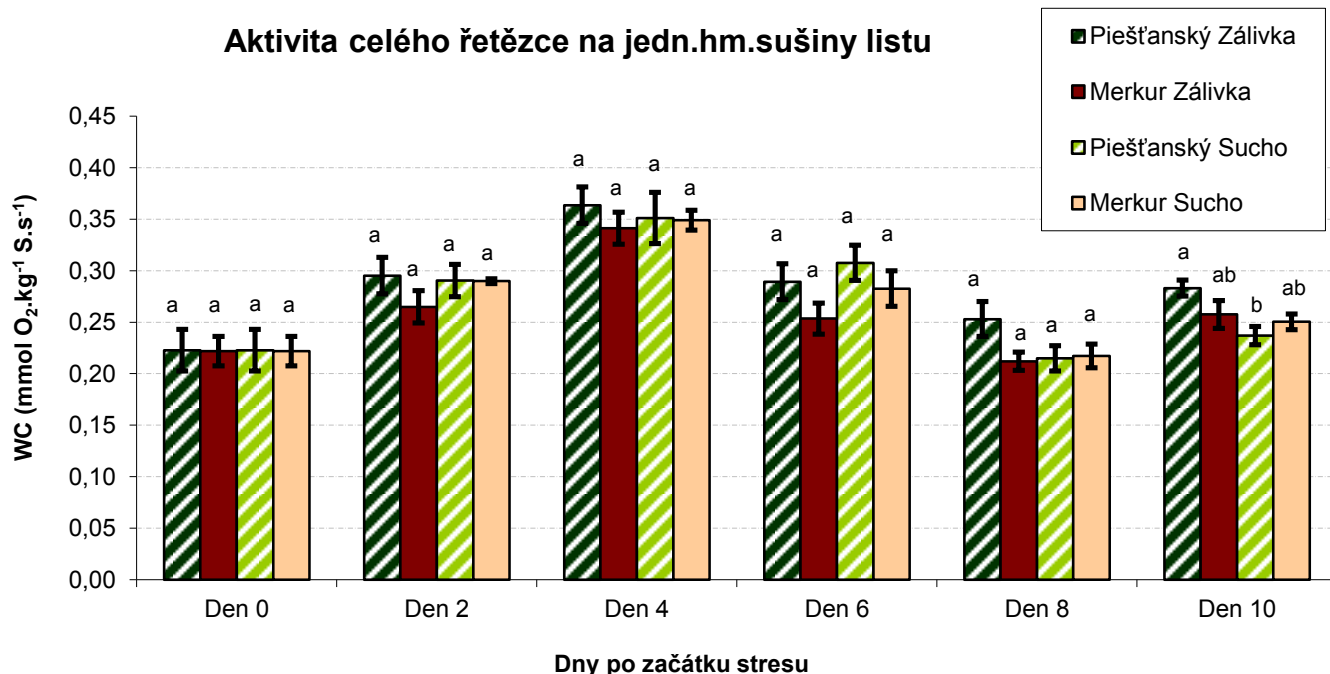
Obrázek 33. Aktivita PSII vztažená na jednotku hmotnosti sušiny listu u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.



Obrázek 34. Aktivita celého elektron-transportního řetězce vztažená na jednotku množství chlorofylu u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.



Obrázek 35. Aktivita celého elektron-transportního řetězce vztažená na jednotku plochy listu u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.



Obrázek 36. Aktivita celého elektron-transportního řetězce vztažená na jednotku hmotnosti sušiny listu u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.

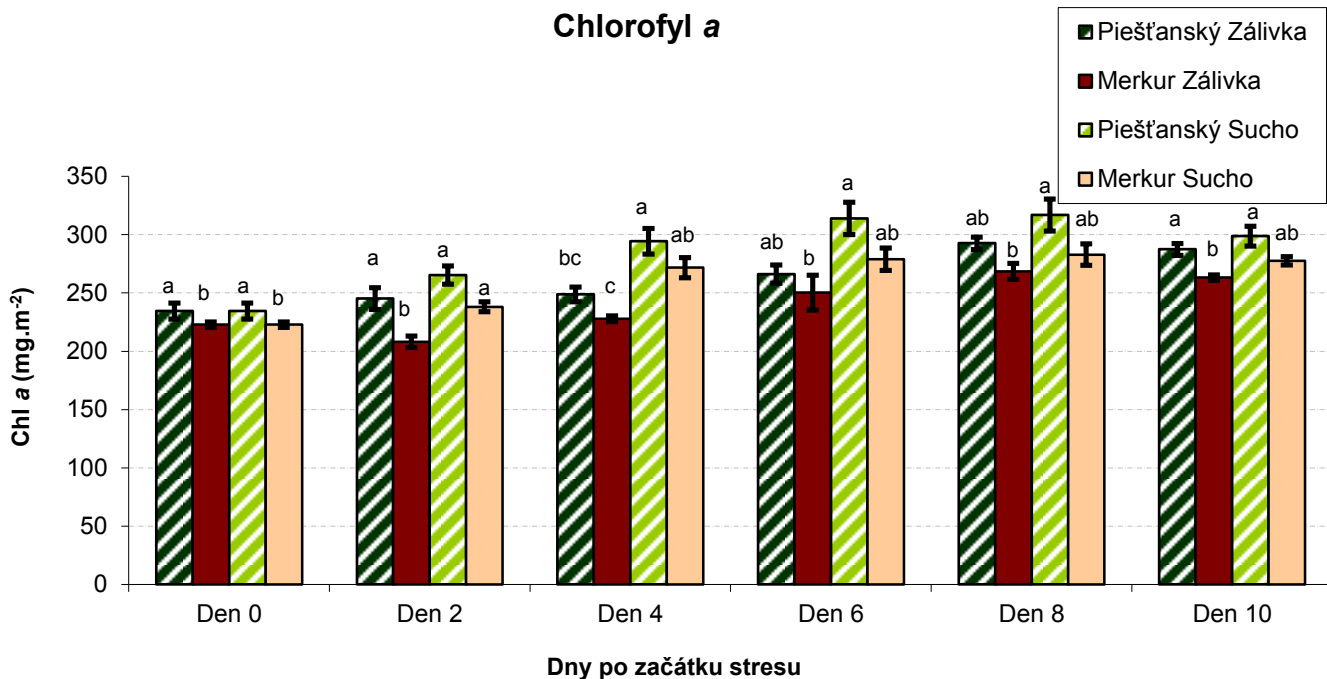
5.2.2 Fotosyntetické a ostatní parametry

Množství **chlorofylu a** vztažené na jednotku listové plochy (Obr. 37, Tab. 5) bylo po celou dobu stresové periody vyšší u odrůdy Piešťanský a to jak v kontrolních, tak ve stresových podmínkách. Průkazné byly tyto rozdíly ve dnech 0, 2 a 10 především u kontrolních rostlin. V reakci na stres byl patrný nárůst množství chlorofylu *a* u odrůdy Piešťanský po celou dobu stresu, nicméně průkazný byl pouze 4. den. U odrůdy Merkur byl tento nárůst patrný také po celou dobu stresu, průkazně kromě dne 4 ještě i den 2. Oproti sezoně 2011, kdy se množství chlorofylu *a* příliš neměnilo, v roce 2012 u obou odrůd spíše rostlo. Nicméně v obou letech bylo vyšší u odrůdy Piešťanský.

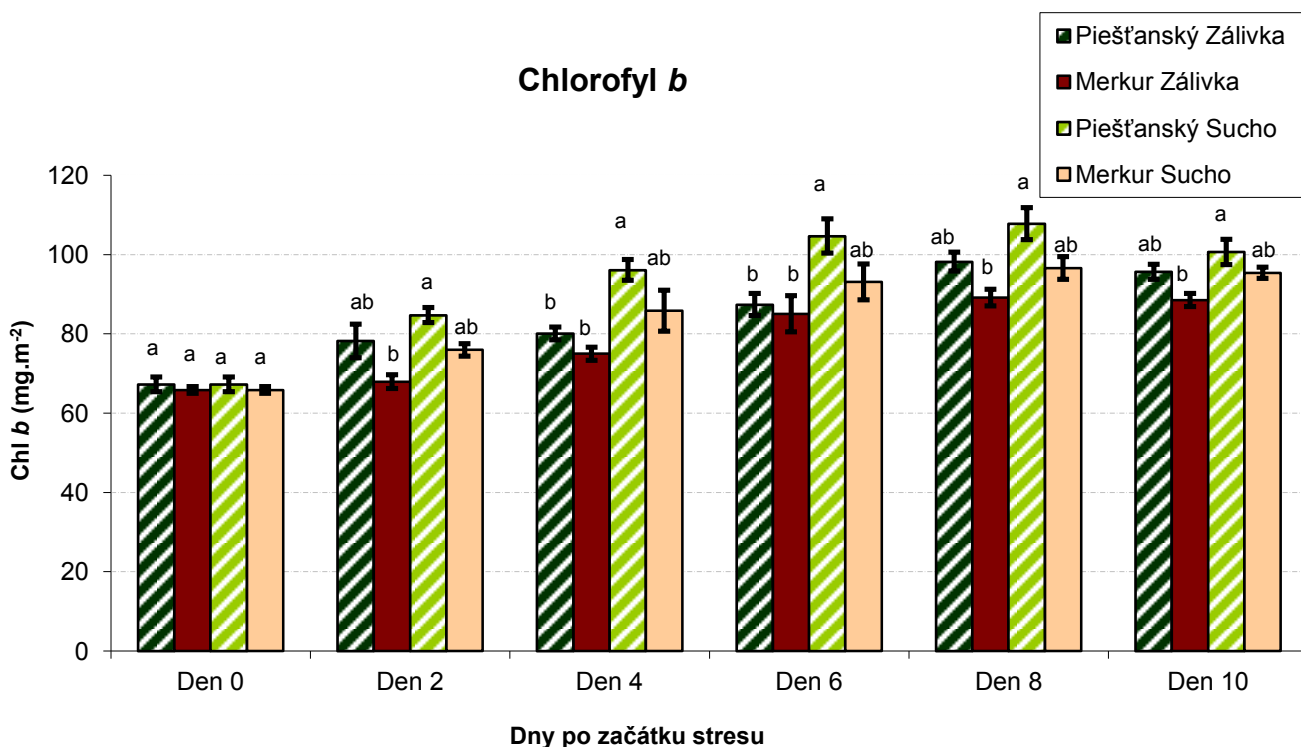
Množství **chlorofylu b** vztažené na jednotku listové plochy (Obr. 38, Tab. 5) bylo na počátku stresu u všech variant přibližně stejné. V průběhu stresu bylo neprůkazně vyšší u odrůdy Piešťanský a to jak v kontrolních, tak ve stresových podmínkách. V důsledku stresu suchem docházelo k nárůstu množství chlorofylu *b* u obou odrůd, který byl u odrůdy Piešťanský výraznější (ve dnech 4 a 6 statisticky průkazný), ale s průběhem stresu se tento nárůst zmenšoval. V porovnání se sezonou 2011 nebyl patrný výrazný pokles poslední den stresu u všech rostlin, ale vyšší množství chlorofylu *b* u odrůdy Piešťanský bylo patrné v obou letech.

Množství **chlorofylu (a+b)** vztažené na jednotku listové plochy (Obr. 39, Tab. 5) odpovídalo výše uvedenému trendu. V průběhu stresu bylo celkově vyšší množství u odrůdy Piešťanský ve srovnání s odrůdou Merkur v obou typech pěstování, průkazně ve dnech 2 a 10 u kontrolních rostlin. V reakci na sucho došlo ke zvýšení množství chlorofylů u stresovaných rostlin obou genotypů, tento rozdíl byl průkazný pouze v den 4 u obou odrůd.

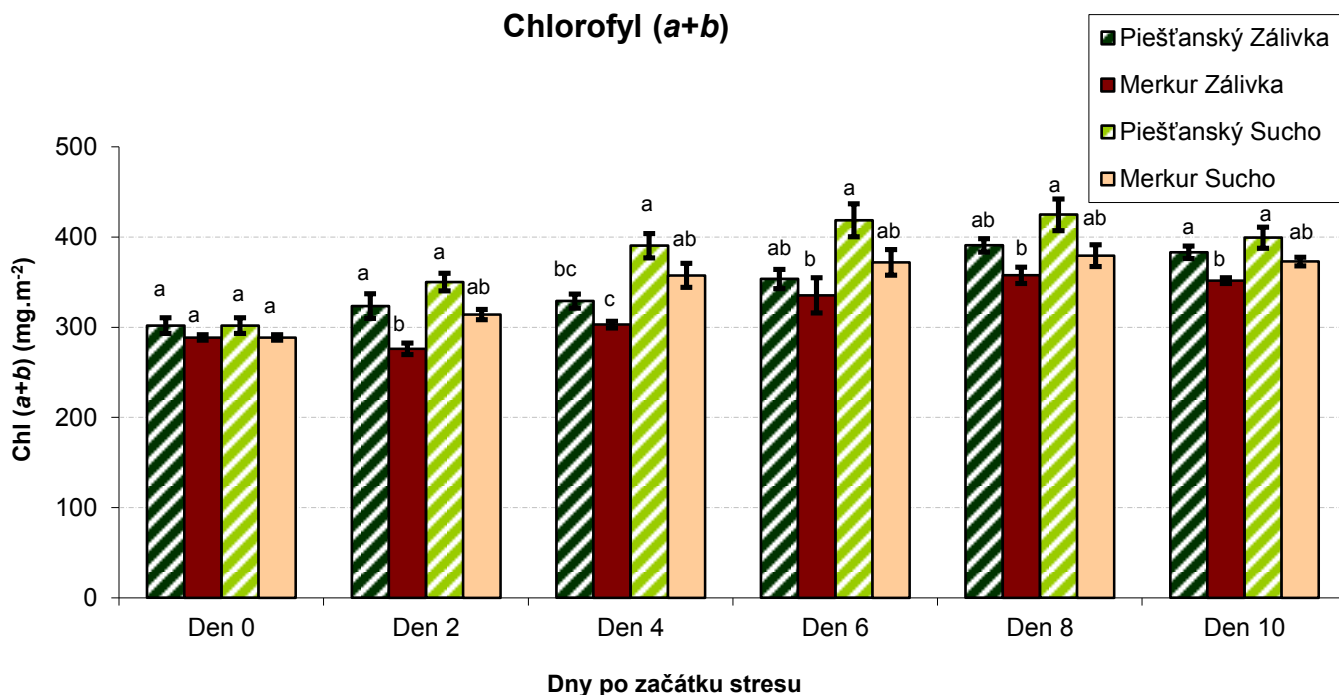
Specifická hmotnost listu (SLW) (Obr. 40, Tab. 5) byla první dva sledované dny v případě obou typů pěstování průkazně vyšší u genotypu Piešťanský. V průběhu stresu se rozdíl mezi odrůdami u kontrolních rostlin snižoval (především díky nárůstu hodnot odrůdy Merkur) a na závěr byly naopak patrné vyšší hodnoty u odrůdy Merkur (neprůkazně). U stresovaných rostlin byly hodnoty po celou dobu vyšší u odrůdy Piešťanský, poslední den průkazně. Zatímco u odrůdy Merkur byl v reakci na sucho pozorován na počátku stresu spíše nárůst a ke konci mírný pokles, u odrůdy Piešťanský byl po celou dobu patrný nárůst, který byl poslední den průkazný.



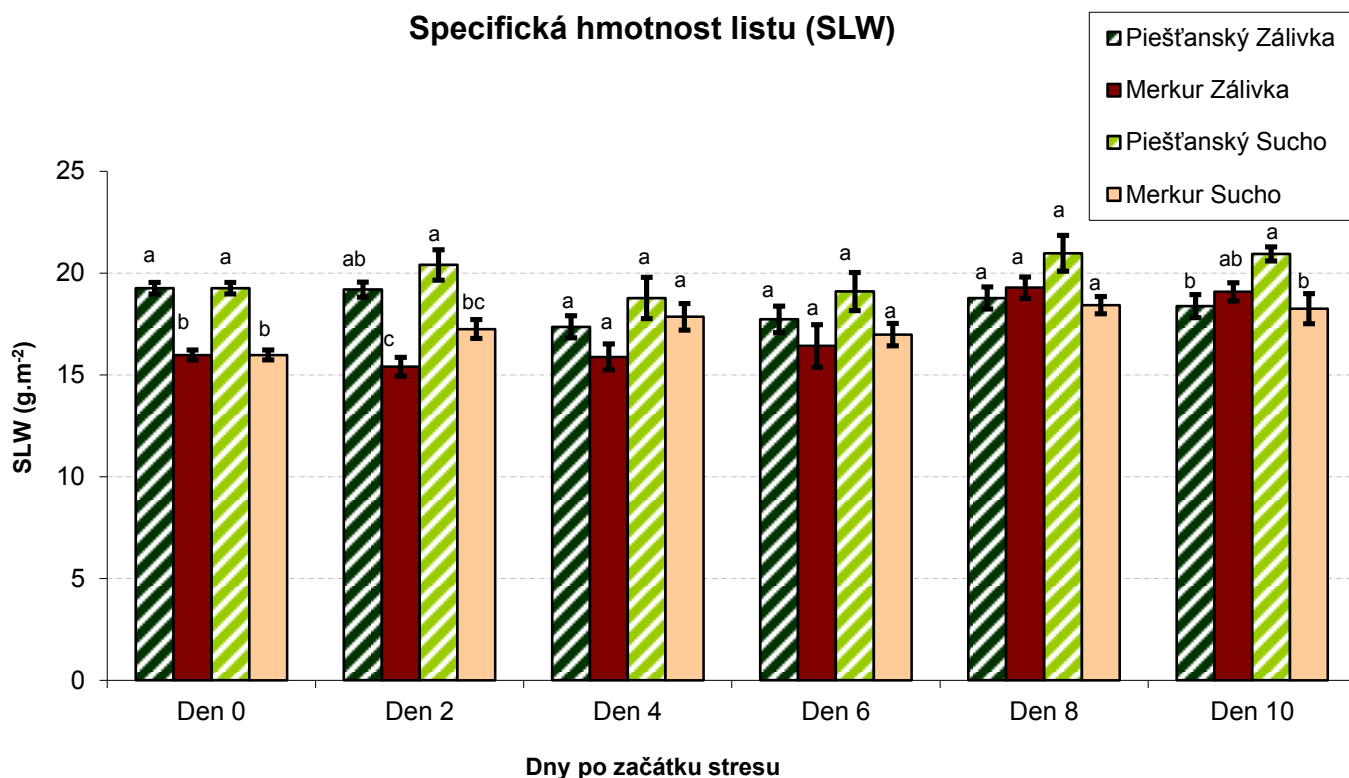
Obrázek 37. **Množství chlorofylu a** vztažené na jednotku listové plochy u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.



Obrázek 38. **Množství chlorofylu b** vztažené na jednotku listové plochy u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.



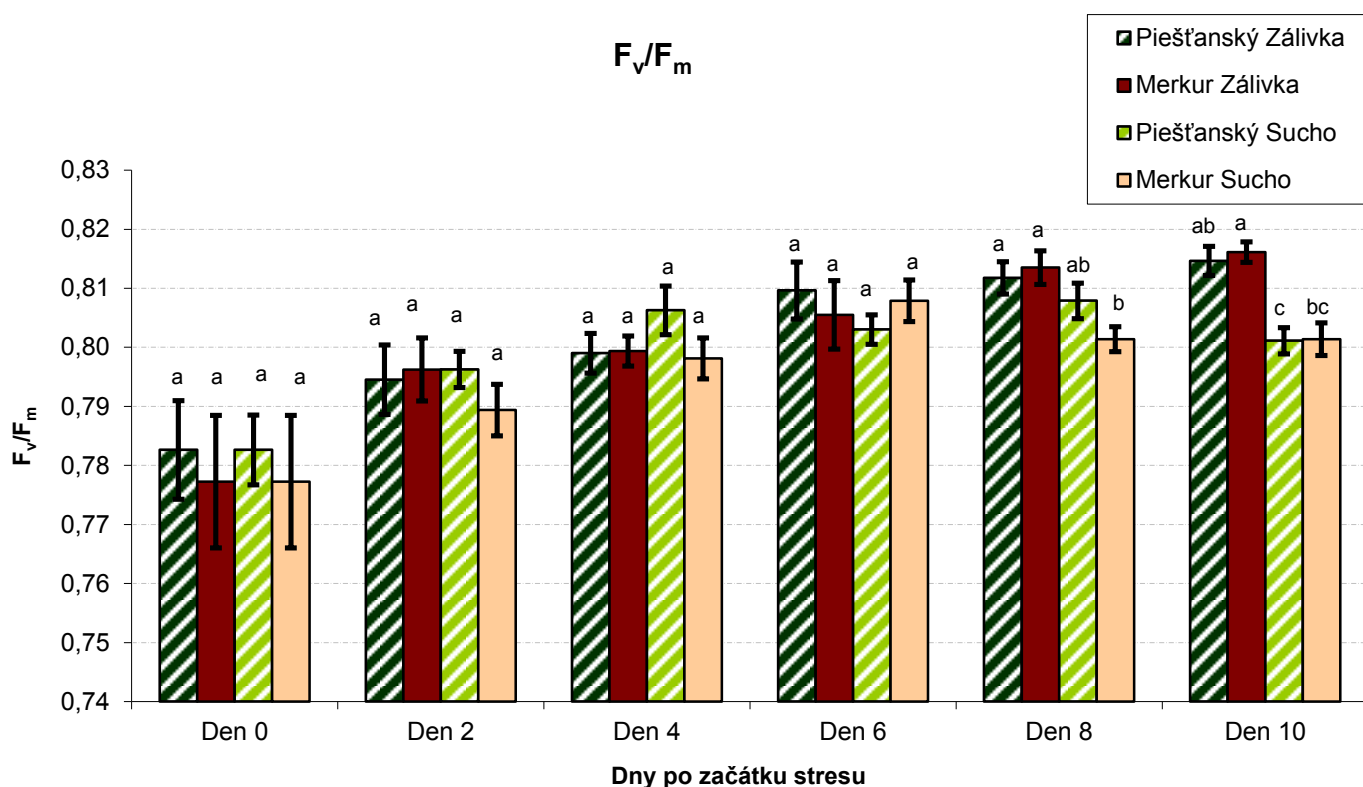
Obrázek 39. **Množství chlorofylu a+b** vztažené na jednotku listové plochy u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.



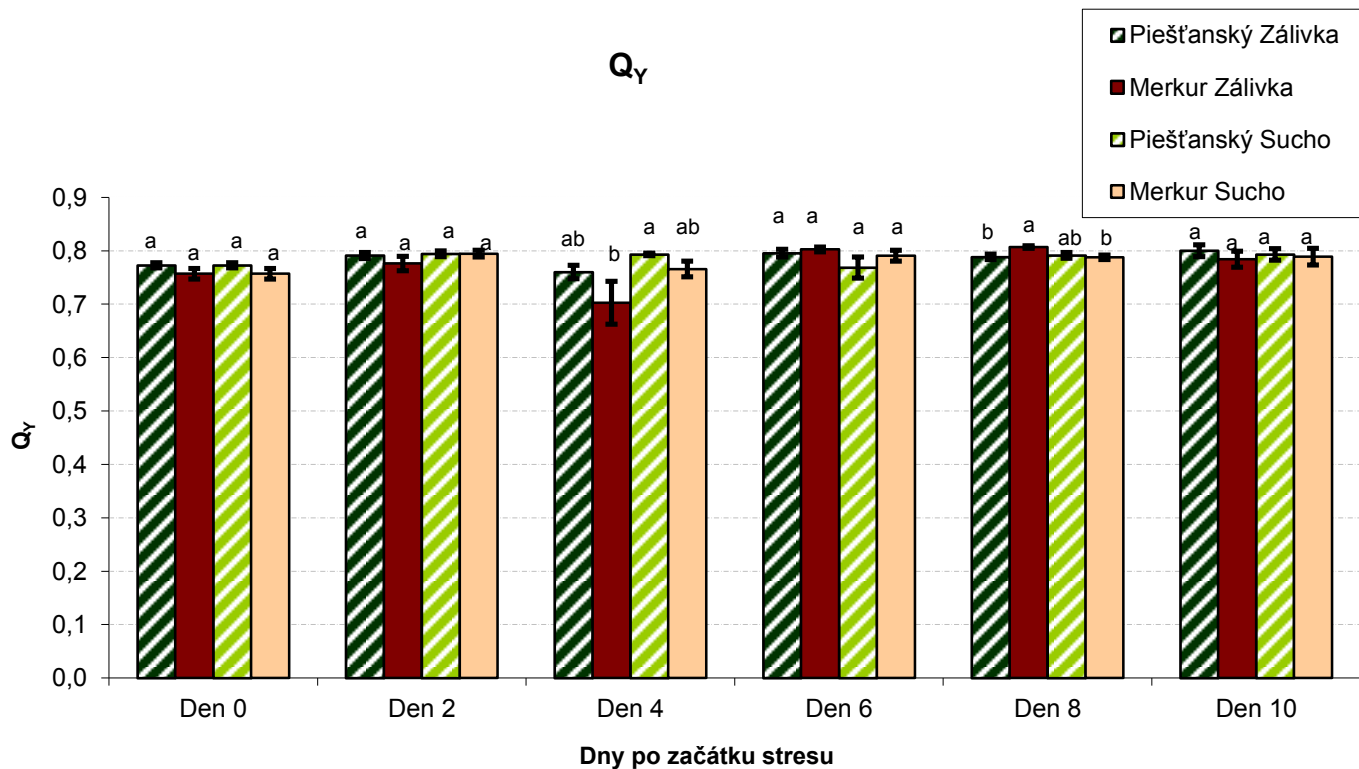
Obrázek 40. **Specifická hmotnost listu (SLW)** u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách vyjádřená jako hmotnost listového pletiva vztažená na jednotku plochy. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=4$) a střední chyby průměru.

Maximální kvantový výtěžek fotochemických procesů fotosystému II v temnotně adaptovaném stavu (F_v/F_m) (Obr. 41, Tab. 5) byl až do 6. dne stresu velmi vyrovnaný u všech sledovaných variant. Nicméně už od 6. dne docházelo k mírnému poklesu u stresovaných rostlin Piešťanského genotypu, který byl až 10. den průkazný. Ve dnech 8 a 10 byl průkazný pokles také u stresovaných rostlin genotypu Merkur. Rozdíly mezi genotypy patrné nebyly.

Hodnoty kvantového výtěžku fluorescence Q_Y (Obr. 42, Tab. 5) byly během celého sledovaného období velmi vyrovnané a nebyl patrný žádný trend, který by charakterizoval rozdíly mezi odrůdami nebo jejich reakci na stres.



Obrázek 41. Maximální kvantový výtěžek fotochemických procesů fotosystému II u listu v temnotně adaptovaném stavu (F_v/F_m) u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.



Obrázek 42. Efektivní kvantový výtěžek fotochemických procesů PSII u listu ve světelně adaptovaném stavu (Q_Y) u dvou odrůd *Vicia faba* L. pěstovaných v kontrolních (zálivka) a stresových (sucho) podmínkách. Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly ($P = 0,05$). Hodnoceno Tukey-Kramerovým testem samostatně pro každý pokusný den. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n=8$) a střední chyby průměru.

6 Diskuze

Cílem této práce bylo zjistit, zda dvě vybrané odrůdy *Vicia faba* L. reagují rozdílně na stres suchem v aktivitě/množství antioxidantů a zda je případná reakce rostlin v souladu s faktem, že odrůda Piešťanský je podle některých růstových charakteristik více citlivá ke stresu suchem a odrůda Merkur odolnější. Tento parametr nebyl u tohoto rostlinného druhu v souvislosti se stresem suchem dosud studován a výsledky by přinesly nové informace, které jsem chtěla porovnat s doposud publikovanými výsledky u jiných rostlinných druhů.

Hlavní charakteristikou, která mě zajímala, byla antioxidační ochrana rostlin. Je to účinný systém, který rostliny využívají pro ochranu před reaktivními formami kyslíku, které přirozeně v buňce vznikají. Během stresu však jejich koncentrace narůstá a bez účinné ochrany jsou pro rostliny velice nebezpečné. Přesné množství ROS, antioxidantů nebo přesná aktivita antioxidačních enzymů je druhově specifická, nicméně jsou popsány obecnější trendy, které je možné pozorovat ve stylu reakce rostlin odolných a citlivých vůči stresu suchem nezávisle na druhu. Spolu s nárůstem množství toxických látek je často u různých rostlinných druhů popisován také nárůst aktivity/množství antioxidantů. Ten je velice často vyšší u odolných odrůd, zatímco u citlivých je spíše trend opačný.

Dále mě zajímaly některé fyziologické a morfologické charakteristiky, které měly doložit rozdílnou citlivost rostlin vůči stresu suchem a také poukázat na reálný růst a vývoj rostlin ve stresových podmínkách. Výsledky by tak měly podávat komplexní obraz toho, jak daná odrůda během stresu prospívala.

6.1 Antioxidanty

Očekávaný nárůst aktivity **CAT** u odolné odrůdy stresovaných rostlin *Vicia faba* L., který byl popsán u mnoha jiných druhů např. u *Lycopersicon esculentum* Mill. (Unyayar *et al.*, 2005), *Zea mays* L. (Chugh *et al.*, 2011), nebo *Triticum aestivum* L. (Chakraborty a Pradhan, 2012), jsem pozorovala pouze ve 4. dni stresové periody a to navíc u obou odrůd. Nárůst aktivity **CAT** zároveň u odolné a citlivé odrůdy popisují také Yong *et al.* (2006) u *Astragalus membranaceus* (Fisch.), Anjum *et al.* (2012) u *Capsicum annuum* L. nebo Grzesiak *et al.* (2013) u *Triticum aestivum* L. Tuto nejednoznačnou souvislost mezi odolností rostlin vůči suchu a zvýšenou aktivitou **CAT** autoři často vysvětlují tím, že **CAT** není jediný enzym odbourávající v rostlinné buňce toxický peroxid vodíku. Tuto funkci mají ještě i

peroxidázy, ze kterých APX má k peroxidu vodíku vyšší afinitu než CAT. Tudíž ochranná reakce na stres suchem je poté jasněji vidět na nárůstu aktivity APX v porovnání s CAT (*Nicotiana tabacum* L., Van Rensburg a Kruger, 1994), (*Oryza sativa* L., Selote a Khanna Chopra, 2004), (*Musa* L., Chai *et al.*, 2005). Velký nárůst aktivity CAT jsem pozorovala 4. den stresu, což je poměrně brzy po zahájení stresové periody. Nicméně, v literatuře je pozitivní vliv CAT především na počátcích stresu také často popisován (*Zea mays* L., Xin *et al.*, 2011) a někdy je patrný i trend, kdy nejprve v důsledku stresu dojde k nárůstu aktivity CAT, která později poklesne a současně dojde k nárůstu APX (*Sedum album*, L., Habibi a Hajiboland, 2012). Tito autoři také poukazují na pozdější pokles aktivity CAT až pod hodnoty kontrolních rostlin, což nastalo i v případě rostlin *Vicia faba* L. s postupujícím stresem. Rozdíl mezi odrůdou Merkur a Piešťanský není sice ani jeden den statisticky průkazný, nicméně patrný je velice dobře na počátku stresu a poté ještě 6. a 8. den. Celkově vyšší hodnoty byly častěji pozorovány u odrůdy Merkur, která je odolnější. Často je nositelem odolnosti rostlin celkově vyšší aktivita antioxidantů a v reakci na sucho nemusí dojít u odolných odrůd k nárůstu aktivit. Ty dokonce můžou u stresovaných rostlin obou odrůd s průběhem stresu klesat a odrůdy se tak od sebe liší pouze různými absolutními hodnotami, jak popisují u *Helianthus tuberosus* L. Zhang *et al.* (2011), nebo u *Guizotia abyssinica* Cass. Ghane *et al.* (2012) a jak je patrné z mých výsledků. Neprůkazně větší nárůst aktivity CAT u stresovaných rostlin odolné odrůdy Merkur 4. den stresu by odpovídal předpokládanému trendu většího nárůstu aktivity u odolných genotypů, který je popisován u jiných druhů rostlin (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner, Lima *et al.*, 2002), (*Cicer arietinum* L. Mafakheri *et al.*, 2011). Současný nárůst aktivity u odolné odrůdy a pokles u citlivé nebyl pozorován ani v jednom pokusném dnu, naopak aktivita CAT u stresovaných rostlin vždy buď vzrostla, nebo klesla u obou odrůd současně.

Odolná odrůda Merkur si tedy častěji udržela vyšší aktivitu CAT a 4. den byl u ní nárůst větší než u citlivé odrůdy. Celkově není vidět jasný trend a z výše uvedeného tedy není možné potvrdit jasný pozitivní vliv CAT na odolnost rostlin, stejně jako to popisují D'Souza a Devaraj (2011).

APX je dalším enzymem rozkládajícím peroxid vodíku v buňce. Spolu s aktivitou CAT vykazovaly u rostlin *Vicia faba* L. v průběhu stresu velice podobný trend a to především v druhé polovině stresové periody. Velice často je odolnost rostlin spojená s celkově vyšší aktivitou antioxidantů u odolných odrůd (např. u *Phaseolus vulgaris* L., Zlatev *et al.*, 2006), nicméně v mém pokuse byla ve dni 0 zjištěna neprůkazně vyšší aktivita APX u citlivé odrůdy Piešťanský. Takto výrazně vyšší hodnoty u odrůdy Piešťanský byly

pozorovány pouze v tomto dni. Vyšší aktivitu na počátku stresu u jednoho citlivého genotypu *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench v porovnání s odolným popisuje také Kusvuran (2012). Jak již bylo zmíněno, na počátku stresu je často důležitější především funkce CAT. V případě rostlin *Vicia faba* L. je patrný velký nárůst aktivity CAT u stresovaných rostlin obou odrůd 4. den stresu, zatímco od následujícího dne docházelo už převážně k poklesu, což by mohlo vypovídat o jeho důležitější funkci v počátečních fázích stresu. V aktivitě APX došlo 2. den stresu k výraznému poklesu u obou odrůd, který může být dán opožděnou reakcí tohoto antioxidantu na stres. Čtvrtý den stresu však došlo k vyrovnání aktivit u odolných a stresovaných rostlin obou odrůd. Z toho, že aktivita APX byla průkazně vyšší u stresovaných rostlin odolné odrůdy Merkur 6. den stresu a dále neprůkazně 8. den stresu je možné usuzovat, že převzala hlavní funkci rozkládání peroxidu vodíku po CAT, jejíž aktivita byla zásadní především 4. den stresu. Ovšem v 6. a 8. dni byla aktivita APX vyšší i u kontrolních rostlin. Jak již bylo popsáno výše, ne vždy rostliny reagují nárůstem aktivit enzymů, často odolným genotypům „stačí“ vyšší aktivity v porovnání s citlivými i když v reakci na sucho dochází u obou odrůd k poklesu, což je patrné i u *Vicia faba* L. Pokles aktivity APX v reakci na stres suchem u všech genotypů *Triticum aestivum* L. bez rozdílu odolnosti popisují také Nikolaeva *et al.* (2010), nicméně odolné genotypy mají celkově vyšší aktivitu. Podobné výsledky publikovali Ghane *et al.* (2012) u rostlin *Guizotia abyssinica* Cass. V literatuře je popsán i jev, kdy u odolného druhu *Solanum peruvianum* L. stejně jako u citlivého *Solanum lycopersicum* L. došlo v reakci na sucho k poklesu aktivity APX a celkově nižší hodnoty byly naměřeny právě u odolného druhu (Unyayar *et al.*, 2005). Podobnou reakci na sucho vykazovaly odrůdy *Vicia faba* L. poslední den stresu, kdy jsem zjistila pokles aktivity APX u obou odrůd, přičemž výraznější je u odolné odrůdy Merkur.

Celkově lze tedy konstatovat, že v reakci na stres suchem obě odrůdy reagovaly spíše poklesem aktivit antioxidantních enzymů, což je v rozporu s velkým množstvím studií u jiných druhů rostlin, kde byl popsán nárůst (Van Heerden a Kruger, 2002, Chai *et al.*, 2005, Boldaji *et al.*, 2012, Chakraborty a Pradhan, 2012, Li *et al.*, 2013). V literatuře jsou však i práce, v nichž také nebyl potvrzený nárůst aktivity nebo množství antioxidantů v souvislosti se stresem suchem (Unyayar *et al.*, 2005), (Nikolaeva *et al.*, 2010), Zhang *et al.* (2011), (Ghane *et al.*, 2012). Reakce rostlin závisí na druhu rostlin, na genotypu, citlivosti nebo odolnosti vůči stresu a na mnoha dalších faktorech. Jak bylo uvedeno v kapitole 3.5 antioxidantní ochrana může záviset někdy pouze na jedné složce nebo formě celého řetězce reakcí a nemusí se projevit na úrovni jednoho antioxidantu. Jasný trend rozdílné reakce obou odrůd sice patrný nebyl, ale dílčí rozdíly (např. častější celkově vyšší aktivita antioxidantních enzymů,

zejména v případě CAT), pozorovány byly. Často malé a tudíž neprůkazné změny v aktivitách CAT a APX, které jsem u *Vicia faba* L. zjistila, by mohly být způsobeny i tím, že na tomto rostlinném druhu ještě nebyly aktivity antioxidantů měřeny a větší variabilita měření je příčinou neprůkaznosti zjištěných rozdílů. U příbuzného druhu *Phaseolus vulgaris* L. byly použity jen mírně modifikované metodiky a reakce aktivit antioxidantů u rozdílných genotypů nebyla jednotná. To si autoři vysvětlují tím, že každý genotyp má vlastní fyziologické adaptivní mechanismy regulace ROS, nikoliv špatnou metodikou měření antioxidantů (Saglam *et al.*, 2011). Autoři u rostlin sledovali pouze 10. den stresu v porovnání s kontrolními rostlinami, takže trend reakce rostlin v průběhu stresové periody není zřejmý.

Množství **prolinu** během sledovaného období klesalo a to jak u rostlin v kontrolních, tak ve stresových podmínkách. Nicméně, určité změny mezi odrůdami jsem během stresové periody zaznamenala přesto, že kromě 10. dne stresové periody nebyly průkazné. Tento den průkazně vzrostlo množství prolinu u stresovaných rostlin citlivé odrůdy Piešťanský, zatímco u odolné kleslo. Toto popisují také Rosales *et al.* (2012) na blízkce příbuzném druhu *Phaseolus vulgaris* L. U odolného genotypu nedošlo ani po 22 dnech stresu k nárůstu množství prolinu, naopak neprůkazně jeho množství pokleslo. U citlivého po 13 dnech také nebyl nárůst průkazný, ale po 22 již ano.

I při celkově klesajícím trendu množství prolinu v průběhu sledovaného období jsem při porovnání kontrolních a stresovaných rostlin zjistila neprůkazný nárůst množství prolinu u citlivé odrůdy ve dnech 2 a 4, neprůkazný nárůst u odolné odrůdy pouze ve dni 6. Neprůkazný pokles množství prolinu jsem pozorovala u citlivé odrůdy ve dnech 6 a 8 a u odolné odrůdy ve dnech 2, 8 a 10. Všechny tyto rozdíly však byly velmi malé.

Výrazný rozdíl v množství prolinu mezi třemi genotypy *Triticum aestivum* L. nepozorovali ani Nikolaeva *et al.* (2010), nárůst byl u všech téměř stejný. Velmi podobné množství prolinu u citlivého a odolného genotypu bylo pozorováno také u stresovaných rostlin *Saccharum officinarum* L. a to jak na počátku stresové periody (3. den od počátku stresu), tak i na konci stresové periody (20. Den). Dále byl ještě měřen 10. den stresu, ve kterém byly zaznamenány výrazně nižší hodnoty u odolných genotypů v porovnání s citlivými (Cia *et al.*, 2012).

Postupný pokles obsahu prolinu jak u kontrolních, tak u stresovaných rostlin není v literatuře příliš popisován. Důvodem je fakt, že postupný průběh stresu není často zaznamenáván (Moussa a Abdel-Aziz, 2008), (Akçay *et al.*, 2010), (He *et al.*, 2011) a pokud ano, tak často není měřeno množství prolinu u kontrolních rostlin každý den stresu, ale pouze na počátku jako den 0 a je otázkou, jak by se s průběhem stresu měnilo (Yong *et al.*, 2008),

(Zhang *et al.*, 2011), (Cia *et al.*, 2012). Pokles množství prolinu u kontrolních rostlin všech genotypů byl ale zaznamenán u *Triticum aestivum* L. 5. den stresu oproti dnu 3, ale další měřený den již došlo k nárůstu u všech genotypů (Nikolaeva *et al.*, 2010). Podobně u citlivého genotypu *Phaseolus vulgaris* L. došlo 22. den stresu oproti 13. dnu stresu k mírnému poklesu množství prolinu u kontrolních rostlin (Rosales *et al.*, 2012). Ze studie Shi *et al.* (2012) je také patrný mírný pokles množství prolinu u kontrolních rostlin dvou genotypů *Cynodon dactylon* (L.) Pers. 14. den stresu v porovnání se 7. dnem stresu. Nicméně např. u Nikolaeva *et al.* (2010), Cia *et al.* (2012) a Shi *et al.* (2012) dochází u všech genotypů k nárůstu množství prolinu u stresovaných rostlin v porovnání s kontrolami, což v mých výsledcích není průkazné (pouze den 10 u citlivé odrůdy). Například Zhang *et al.* (2011) popisuje nárůst množství prolinu u *Helianthus tuberosus* L. již v průběhu 48 hodin.

Množství prolinu je podobně jako aktivita enzymů závislé na rostlinném druhu, genotypu a způsobu navození stresu. Délka stresové periody mohla být krátká na projevení změn množství prolinu, nicméně ani při déle trvajícím stresu se změny nemusejí projevit (Cia *et al.*, 2012), (Rosales *et al.*, 2012). Rosales *et al.* (2012) dále zvažují možnost, že by větší akumulace prolinu v reakci na sucho u citlivých genotypů mohla být příznakem stresu a ne přímo osmotickým přizpůsobením, ale jasné vysvětlení nepodávají. Celkový pokles množství prolinu může být dán také jeho rozkladem a využitím jakožto zdroje energie jak popisují např. Cia *et al.* (2012).

6.2 Morfologické parametry

Morfologicko-fyziologické parametry pokusných rostlin dobře charakterizují rozdíly růstu a vývoje rostlin vystavených stresu suchem ve srovnání s rostlinami normálně zásobovanými vodou. **Relativní obsah vody (RWC)** je jasným ukazatelem stresu suchem používaným velice hojně při porovnávání odolných a citlivých genotypů. Vypovídá o tom, na kolik je rostlina schopná si udržet vodu. Nejistila jsem žádné rozdíly mezi kontrolními rostlinami obou odrůd po celý stresový interval, což je ve shodě např. s Masoumi *et al.* (2010) u rostlin *Kochia scoparia* L., nebo Rosales *et al.* (2012) u rostlin *Phaseolus vulgaris* L. V reakci na sucho byl zjištěný výrazný pokles RWC u stresovaných rostlin citlivé odrůdy Piešťanský. U rostlin odolné odrůdy Merkur byl pokles také zaznamenán, nicméně ve srovnání s citlivou odrůdou byly rozdíly mezi kontrolními a stresovanými rostlinami vždy nižší a neprůkazné. U citlivé odrůdy byl pokles v RWC patrný již od 6. dne a poslední den stresu byl tento rozdíl průkazný. Relativní obsah vody většinou klesá v důsledku stresu u

obou genotypů, nicméně u citlivého více než u odolného (*Triticum aestivum* L., He *et al.*, 2011), (*Triticum aestivum* L., Bano *et al.*, 2012), (*Saccharum officinarum* L., Cia *et al.*, 2012). Pokles hodnot však opět závisí na mnoha vnitřních (metabolické aktivity, schopnost udržet vodu, apod.) a vnějších (podmínky pěstování rostlin a délka a intenzita stresu) faktorech.

Výška rostlin, která je na počátku stresu u odrůd vyrovnaná, se s průběhem stresu nebo spíše s vývojem rostlin pochopitelně zvyšuje a rychlejší růst je patrný u citlivé odrůdy Piešťanský, protože tato odrůda je celkově robustnější. Na sucho reaguje zpomalením růstu právě citlivá odrůda Piešťanský. Toto zpomalení je výrazné především poslední den stresu, zatímco stresované rostliny odolné odrůdy Merkur si udržují po celou dobu stresové periody v podstatě stejnou výšku jako rostliny kontrolní. Výraznější pokles výšky u citlivé odrůdy *Triticum aestivum* L. popisují také autoři Sairam *et al.* (2001). Také autoři Unyayar *et al.* (2005) popisují větší vzrůst citlivých rostlin *Solanum lycopersicum* L. pěstovaných v podmínkách s normálním přísunem vody, než rostlin *Solanum peruvianum* L., které jsou odolnější vůči stresu suchem. V reakci na stres byl však pozorován nižší vzrůst rostlin právě citlivého genotypu.

V **počtu listů** se od sebe průkazně odrůdy lišily, celkově mohutnější odrůda Piešťanský měla vyšší počet listů, což popisuje na stejných odrůdách i Fridrichová (2010) a v souladu s touto prací je i fakt, že v reakci na sucho nedošlo k průkazným změnám u obou odrůd. S postupujícím stresem je patrný malý trend nižšího počtu viditelných listů u stresovaných rostlin citlivé odrůdy, což může znamenat, že větší rozdíly by se mohly projevit až s déletrvající stresovou periodou.

Hmotnost sušiny kořenů i nadzemní části byla opět celkově vyšší u robustnější odrůdy Piešťanský a v důsledku stresu se průkazně neměnila. Zatímco hmotnost sušiny kořenů u citlivé odrůdy mírně ke konci stresu vzrostla, hmotnost sušiny nadzemní části u této citlivé odrůdy mírně poklesla (neprůkazně). Podobné výsledky na stejných odrůdách v případě nadzemní části popsala Fridrichová (2010), nicméně v případě hmotnosti sušiny kořenů jsou její výsledky rozdílné (hmotnost kořenů citlivé odrůdy klesá, zatímco u odolné stoupá), nebo u rostlin *Arachis hypogaea* L. Akcay *et al.* (2010). Průkazný pokles hmotnosti celkové biomasy v reakci na stres suchem nebyl pozorovaný ani u dvou odrůd *Phaseolus vulgaris* L. po 13- ti denním stresu. Nicméně po 22 dnech sucha už byla nižší hmotnost stresovaných rostlin patrná u obou genotypů lišících se odolností vůči suchu (Rosales *et al.*, 2012). Dá se tedy předpokládat, že výraznější rozdíly by mohly být patrné opět až při déle trvající období sucha.

Specifická hmotnost listu (SLW) není v literatuře příliš často samostatně zpracovávána. Vypovídá o tloušťce listu, která byla opět vyšší u citlivé odrůdy Piešťanský v obou pokusných sezonách. V důsledku stresu se v obou pokusných sezónách, v nichž byla měřena, příliš neměnila, což popisují i Benešová *et al.* (2012) a nárůst, který je v souladu s výsledky Fridrichové (2010) u stejných odrůd *Vicia faba* L., je patrný pouze v některých dnech a to především v sezoně 2012.

Výsledky morfologické analýzy jsou v souladu s předpokladem, že citlivá odrůda Piešťanský bude nepříznivými podmínkami postižená více než odolná odrůda Merkur a odpovídají údajům publikovaným v literatuře (Akçay *et al.*, 2010), (He *et al.*, 2011), (Ghane *et al.*, 2012), (Ji *et al.*, 2012).

Z morfologických parametrů je tedy vhodným parametrem pro posouzení míry postižení rostlin suchem rozhodně RWC a dále pak celková výška rostliny a hmotnosti sušiny kořenů a prýtu. Především u posledních dvou zmíněných by ale pro lepší vypovídací hodnotu bylo zapotřebí delšího stresu. V porovnání dvou parametrů, které spolu úzce souvisí – RWC a obsah prolinu, lze pozorovat poslední den stresu u stresovaných rostlin pokles RWC a současný nárůst množství prolinu. Prolin je osmolyt, který buňce pomáhá udržet si vodu, tudíž jeho zvýšené množství by mělo být v korelaci s vyšším RWC, což v případě citlivé odrůdy není. Z toho je jasně vidět, že citlivá odrůda má i přes zvýšené množství tohoto osmoprotektantu větší problémy s udržením vody v listech. Podobný jev pozorovali Akçay *et al.* (2010) u rostlin *Arachis hypogaea* L. Citlivý genotyp měl celkově vyšší RWC i ve stresu, ale i přes počáteční vyšší množství, měl na konci stresu menší množství prolinu než odolný genotyp. RWC v důsledku stresu pokleslo u obou odrůd, u citlivé byl tento pokles mírně vyšší. Souvislost vyššího množství prolinu spolu s vyššími hodnotami RWC u stresovaných rostlin odolného genotypu *Zea mays* L. potvrzují při silném stresu také Moussa a Abdel-Aziz (2008).

6.3 Fotosyntetické parametry

Reakce na stres suchem pozorovaná u množství pigmentů vykazovala každou pokusnou sezonu trochu jiný trend. Tento rozdíl lze přisuzovat především rozdílným vnějším vlivům (počasí), jelikož způsob pěstování a zpracování rostlin byl v obou případech totožný. Nicméně v obou sezonách je patrné větší množství pigmentů u citlivé odrůdy Piešťanský v porovnání s odolnou odrůdou Merkur.

V průběhu stresu nebyl patrný trend průkazně vyššího množství **pigmentů** u stresovaných rostlin odolné odrůdy, jak by odpovídalo mému předpokladu. Rozdíly mezi odrůdami pozorovány byly, po celou dobu stresu bylo mírně vyšší množství fotosyntetických pigmentů u citlivé odrůdy Piešťanský, což je popsáno také u citlivého genotypu *Solanum lycopersicum* L. (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). Odrůdy na stres suchem reagovaly každou sezónu mírně odlišně. Zatímco v sezóně 2011 docházelo v reakci na stres suchem častěji k poklesu množství pigmentů u obou odrůd, v sezóně 2012 docházelo převážně k nárůstu množství pigmentů také u obou odrůd, avšak pouze v několika málo případech byly tyto změny průkazné. V sezóně 2011 je 8. pokusný den patrný náhlý nárůst množství všech sledovaných pigmentů u stresovaných rostlin citlivé odrůdy Piešťanský. Jiné průkazné změny související se stresem suchem pozorovány nebyly. Naopak v sezóně 2012 je možné hned od počátku stresové periody pozorovat nárůst množství pigmentů u obou odrůd, v některých dnech je tento nárůst i statisticky průkazný. S postupujícím stresem se však snižuje, nicméně rozdíl mezi odrůdami v kontrolních i ve stresových podmínkách zůstává a odrůda Piešťanský si stále udržuje vyšší hodnoty. Ojedinelý nárůst celkového množství chlorofylu u stresovaných rostlin citlivého genotypu popisuje také Huseynova (2012) u rostlin *Triticum durum* Desf. přesto, že zejména v pozdějších fázích stresu pozorovala typický pokles obsahu fotosyntetických pigmentů, který byl ale s ohledem na délku stresu spíše důsledkem stárnutí rostliny. Pokles obsahu fotosyntetických pigmentů může být výsledkem vážných poškození a destabilizace pigment-proteinových komplexů v důsledku fotoinhibice navozené stresem. Míra poklesu obsahu pigmentů je tedy rovněž závislá na intenzitě a trvání stresu a na míře antioxidační ochrany rostlin. Unyayar *et al.* (2005) dokládá ve své práci neprůkazný nárůst množství chl *a*, chl *b* v reakci na sucho u odolného genotypu *Solanum peruvianum* L., což koresponduje s mými výsledky pokusné sezony 2012. Dále nárůst množství pigmentů v reakci na sucho popisují i Keles a Unyayar (2004) nebo Teixeira a Pereira (2007).

Většinou je tedy v souvislosti se stresem suchem popisován pokles množství pigmentů (Sairam *et al.*, 1998). Sánchez-Rodríguez *et al.* (2012) popisuje výraznější pokles množství pigmentů u citlivého genotypu *Solanum lycopersicum* L. v porovnání s odolným. V některých případech se množství pigmentů se stresem neměnilo (Loggini *et al.*, 1999), což odpovídá výsledkům mých pokusů ze sezony 2011.

Stejný trend jako vykazovaly jednotlivé chlorofyly v daných pokusných sezónách, vykazovalo i celkové množství **chlorofylu a+b**, tj. v sezóně 2011 spíše vyrovnané hodnoty, případně mírný pokles v reakci na sucho a v sezóně 2012 spíše nárůst.

Poměrné zastoupení pigmentů v rostlině, které vyjadřuje parametr **chl a/b** je stejné u všech variant. Z toho je vidět, že výkyvy v množství jednotlivých pigmentů byly vždy u obou pigmentů stejné, takže i jejich poměrové zastoupení zůstalo stejné, i v průběhu stresové periody. Je to v souladu s výsledky, které publikovali např. Unyayar *et al.* (2005) u citlivých rostlin *Solanum lycopersicum* L., u kterých došlo sice k poklesu množství obou pigmentů chl *a* i *b*, ale jejich poměrové zastoupení bylo stejné jako u kontrolních rostlin. Stejně vztahy jsem získala i v případě poměru **chlorofyl/karotenoidy**. Množství **karotenoidů** je celkově vyšší u citlivé odrůdy Piešťanský, což je v souladu s Valifard *et al.* (2012) u rostlin *Triticum aestivum* L. U citlivého genotypu bylo popsáno vyšší množství karotenoidů, které se silnějším stresem právě u citlivého ještě rostlo, zatímco u odolného se neměnilo, což v mém případě odpovídá především nárůstu množství karotenoidů u stresovaných rostlin citlivé odrůdy koncem období sucha. Opak popisují Saglam *et al.* (2011), kteří dokládají vyšší množství karotenoidů u odolných rostlin *Phaseolus vulgaris* L. a v reakci na sucho popisují u všech rostlin pokles množství karotenoidů. U odolné odrůdy jsem výraznější změny v obsahu karotenoidů v souvislosti se stresem nezjistila, byl patrný pouze nevýznamný pokles v pozdějších fázích stresu.

Ze získaných výsledků jen patrné, že obě odrůdy mohly být v obsahu fotosyntetických pigmentů vůči suchu odolné, což by vysvětlovalo vyrovnané a stabilní hodnoty pigmentů (především v roce 2012), kdy se rozdíl mezi odrůdami po celou dobu stresu víceméně neměnily. To, že jsou rostliny dobře chráněné a nedochází u nich k poškození pigment-proteinových komplexů, je navíc patrné i z ostatních výsledků, kde není patrný jednoznačný rozdíl mezi odrůdami v reakci na stres suchem.

Stres suchem je limitujícím faktorem mnoha procesů v rostlinách, včetně fotosyntézy. Měřením fluorescence chlorofylu lze získat informace o účinnosti fotosyntézy. Parametr F_v/F_m vypovídá o maximálním kvantovém výtěžku fotochemických procesů fotosystému 2 u listu v temnotně adaptovaném stavu. Pokles hodnot tohoto parametru vypovídá o poklesu schopnosti zachycovat a přeměňovat excitační energii v reakčním centru fotosystému II a snížení fotochemické účinnosti. K němu došlo u obou odrůd, mezi kterými v kontrole nebyl výrazný rozdíl, v případě citlivé odrůdy už od 6. dne stresu a v případě odolné odrůdy až od 8. dne stresu. Při déle trvajícím stresu byly zjištěné rozdíly i statisticky průkazné. Je tedy patrný negativní vliv sucha na rostliny, který se projevil dříve u citlivé odrůdy. Velký pokles hodnot F_v/F_m ke konci stresu popisuje také Huseynova (2012). Ten může být dán s postupujícím stresem sníženou schopností zpracování světelné energie reakčními centry

PSII, čím se snižuje jejich účinnost. Výraznější pokles hodnot F_v/F_m u citlivých genotypů ve srovnání s tolerantními vůči suchu popsali např. Liu *et al.* (2006) a Koscielniak *et al.* (2006). Naopak Lima *et al.* (2002) nebo Akcay *et al.* (2010) nezjistili významné změny účinnosti fotosystému II a rostliny si tak během stresu zřejmě dokáží udržet úroveň fotosyntézy v požadovaném stavu. Významný vliv stresu suchem na parametr F_v/F_m nezjistili ani Saglam *et al.* (2011) u *Phaseolus vulgaris* L., nicméně efektivní kvantový výtěžek, posuzovaný podle parametru ϕ_{PS2} klesal, zejména u citlivých genotypů.

Hodnoty parametru Q_Y udávají efektivní kvantový výtěžek fotochemických procesů fotosystému 2 u listu ve světelně adaptovaném stavu a vypovídají o aktuální fotochemické účinnosti PSII. Hodnoty tohoto parametru se v průběhu stresu liší mezi variantami jen minimálně. Výrazný a ojedinělý výkyv 4. den stresu u kontrolních rostlin odrůdy Merkur bych spíše připisovala náhodě. Další rozdíl je patrný už jen ve dni 8 a to pokles u stresovaných rostlin odrůdy Merkur v porovnání s kontrolními. Průkazné rozdíly mezi citlivými a tolerantními genotypy hybridů *Lolium-Festuca* po déletrvajícím stresu suchem popsali Koscielniak *et al.* (2006). Podobné výsledky získali také Subrahmanyam *et al.* (2006) u *Triticum aestivum* L. Měření toho parametru není v literatuře příliš časté a obvykle se používají pro detailní popis účinnosti fotochemických procesů jiné odvozené parametry fluorescence chlorofylu, které vyžadují jiné přístrojové vybavení. Nepřítomnost rozdílů u studovaných odrůd *Vicia faba* L. v tomto parametru může souviset s celkově malou variabilitou i některých dalších měřených parametrů a může být charakteristické pro vybrané odrůdy. Teprve testování širšího spektra odrůd by mohlo ukázat, zda existuje významnější variabilita v takovýchto parametrech, která by mohla být případně ještě umocněna působením stresových faktorů.

Aktivitu elektron-transportního řetězce jsem měřila v suspenzi izolovaných chloroplastů u obou odrůd a vyjadřovala jsem jí na jednotkové množství chlorofylu, jednotku plochy listu a jednotku suché hmotnosti listu. Každý z těchto přepočtů charakterizuje částečně odlišnou vlastnost pletiva listu, každý má své opodstatnění a při interpretaci výsledků je proto užitečné tyto vlastnosti zohlednit. V literatuře se nejčastěji používá přepočet na jednotku obsahu chlorofylu, i přesto, že ostatní dva přepočty charakterizují stav pletiva a případné genotypové rozdíly v obsahu pigmentů. V souvislosti se stresem jsou fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů studovány spíše výjimečně a údaje v literatuře jsou ojedinělé.

Při všech způsobech vyjádření aktivity **PSI** jsem v důsledku stresu zaznamenala buď mírný nárůst aktivit, zejména u citlivé odrůdy nebo se aktivity neměnily. To by znamenalo, že

PS I není suchem poškozený a může fungovat dokonce i s mírně vyšší účinností. Podobné výsledky publikovali Sanda *et al.* (2011) u *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai.

U aktivity **PSII** jsou patrné větší rozdíly v závislosti na způsobu vyjádření. Při vyjádření hodnot aktivity na jednotku obsahu chlorofylu je v reakci na stres patrný mírný, většinou neprůkazný pokles u obou odrůd především ke konci stresu, což popisují také Barathi *et al.* (2001). Při přepočtu aktivity na jednotku plochy listu častěji dochází k nárůstu aktivity PSII v souvislosti se stresem suchem, mírný pokles nebo hodnoty beze změny jsem zaznamenala až v posledních fázích stresu. Pokles aktivity PSII u izolovaných chloroplastů *Tritium aestivum* L. popsali také Liu *et al.* (2006) jako důsledek silnějšího stresu suchem, který narušuje rovnovážný stav primárních funkčních proteinových komplexů v chloroplastech. I přesto, že jsem zaznamenala rozdíly v aktivitě PSII v důsledku stresu, nebyly většinou statisticky průkazné a nesvědčí o vážnějším narušení aktivity PSII, podobně, jako tomu bylo v případě PSI. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky, které publikovali Sanda *et al.* (2011).

Informaci o fotochemické aktivitě chloroplastů v reakci na stres podává také měření aktivity **celého elektron-transportního řetězce** od PSII k PSI. V reakci na sucho dochází v první polovině stresové periody u stresovaných rostlin obou odrůd spíše k nárůstu aktivity celého řetězce, hodnoty beze změny nebo mírný pokles byl patrný koncem stresu. Výsledky těchto měření, stejně jako v případě samostatného měření aktivity PSI a PSII opět neukazují na vážnější poškození struktur a komplexů chloroplastů v důsledku vystavení rostlin stresu suchem, které by vedlo ke zpomalení transportu elektronů mezi oběma fotosystémy. Pokles aktivity obou fotosystémů popisují Van Rensburg a Kruger (1993) u *Nicotiana tabacum* L. a jako citlivější vůči stresu označují PSII.

6.4 Závěr

Z výsledků mých pokusů i z literatury vyplývá, že různé druhy rostlin i různé genotypy téhož druhu mohou reagovat na stres a podmínky pěstování zcela odlišně a pouze pro některé platí obecnější trend, který by bylo možné využít při posuzování odolnosti nebo citlivosti vůči suchu pomocí měření daných parametrů. I zdánlivě jasné souvislosti odolnosti s některým parametrem (např. morfologické parametry, množství fotosyntetických pigmentů, aktivita fotosystémů) nemusejí u některých rostlin platit, i když si rostlina evidentně v průběhu sucha svou odolnost udržuje. Nebo naopak rostlina v daném parametru může vykazovat zvýšené hodnoty, které by měly vést ke zvýšení její odolnosti, ale stále je k suchu

citlivá. Pokud se odolnost odrůdy projevila v jednom parametru, není samozřejmé, že se také projeví i ve všech ostatních. V případě parametrů, které jsem studovala v souvislosti se suchem u rostlin *Vicia faba* L., bych kladla důraz z morfologických parametrů především na RWC, a v případě delší stresové periody i na výšku a hmotnost sušiny nadzemní části rostlin. Z antioxidačních parametrů bohužel na základě těchto mých pokusů není možné vyvodit jasné a obecně platné souvislosti, které by vypovídaly o odolnosti nebo citlivosti rostlin vůči suchu. Tyto charakteristiky nevykazovaly jasně definovaný trend, což však není v rozporu s literárními údaji u jiných rostlinných druhů. Pokud by se v tomto tématu pokračovalo, doporučovala bych prodloužit stresovou periodu, pokud jí rostliny přežijí, a zjistit, jestli se to projeví na zvětšení rozdílů mezi studovanými variantami. Také měření dalších antioxidačních případně i jiných parametrů by mohlo přispět k zodpovězení otázek, zda existuje u tohoto rostlinného druhu nějaká specifická odezva na stres suchem, která se projeví pouze v určitých parametrech.

7 Souhrn

- Dvě odrůdy *Vicia faba* L. s předpokládanou odlišnou citlivostí vůči stresu suchem, pěstované v podmínkách optimálního zásobování vodou a bez zálivky, se lišily ve většině sledovaných charakteristik a rozdíly byly patrné jak za kontrolních, tak stresových podmínek, nicméně velice často nebyly průkazné. Vyšší hodnoty vykazovala častěji citlivá odrůda Piešťanský, která byla celkově mohutnější a v době nástupu stresu byla vyvinutější z důvodu dřívějšího klíčení a rychlejšího vývoje a růstu.
- V případě CAT byl předpokládaný nárůst aktivity průkazný pouze 4. den stresu, ostatní dny byl patrný pokles. Vyšší hodnoty vykazovala častěji odolná odrůda.
- Aktivita APX také v reakci na sucho spíše klesala u obou odrůd, ale po počáteční vyšší aktivitě u rostlin citlivé odrůdy Piešťanský, byla v pozdějších fázích stresu patrná vyšší aktivita u rostlin odolné odrůdy Merkur.
- U množství prolinu nebyl zaznamenán výrazný rozdíl mezi odrůdami, u obou docházelo k neprůkazným výkyvům hodnot během stresu, celkově byl patrný klesající trend.
- Z fyziologických parametrů vykazovaly rostliny odolné odrůdy Merkur ve stresu lepší prospívání v případě RWC, ale v případě fotosyntetických parametrů byla reakce obou odrůd velmi podobná a i přes pokles účinnosti fotosyntézy ke konci stresu, si obě odrůdy zachovaly vysoké množství fotosyntetických pigmentů.
- Změny morfologických parametrů se ve stresu více negativně projeví u citlivé odrůdy, zejména u výšky rostlin, hmotnosti nadzemní části a počtu viditelných listů.
- Předpokládaný nárůst aktivity/množství antioxidantů u odolné odrůdy jsem nepotvrdila, dopad stresu na fotosyntetické parametry nebyl rovněž významný. Ve většině případů si rostliny dokázaly během stresu udržet vysokou účinnost fotosyntézy a ani obsah pigmentů nebyl výrazně negativně ovlivněn.
- Reakce odrůd *Vicia faba* L. na stres suchem nebyla příliš výrazná a u mnoha parametrů nebyly zjištěny předpokládané změny. Rostliny jsou buď vybaveny dostatečně účinnými obrannými mechanismy, nebo sledované období sucha představovalo pouze mírný stres a změny by mohl navodit až déletrvající silnější stres.
- Na základě získaných výsledků nelze žádný ze studovaných parametrů doporučit jako spolehlivý marker odolnosti vůči stresu suchem, nicméně nejlepší reakce byla zaznamenána z antioxidantů u CAT a z dalších parametrů u RWC, výšky a hmotnosti nadzemní části rostliny.

8 Seznam použité literatury

- Akçay, U. C., Ercan, O., Kavas, M., Yildiz, L., Yilmaz, C., Oktem, H. A. & Yucel, M. 2010. Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation*, **61**, 21-28.
- Alam, R., Iqbal, A., Khan, I., Ali, I., Munir, I., Javed, A., Inayat ur, R. & Swati, Z. A. 2011. Enhanced antioxidant defense after exogenous application of Ca²⁺ and K⁺ in *Brassica napus* seedlings under water deficit stress. *African Journal of Biotechnology*, **10**, 14052-14060.
- Ali, Q., Ashraf, M. & Anwar, F. 2010. Seed Composition and Seed Oil Antioxidant Activity of Maize Under Water Stress. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **87**, 1179-1187.
- Anjum, S. A., Farooq, M., Xie, X. Y., Liu, X. J. & Ijaz, M. F. 2012. Antioxidant defense system and proline accumulation enables hot pepper to perform better under drought. *Scientia Horticulturae*, **140**, 66-73.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase - A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, **85**, 235-241.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, **141**, 391-396.
- Badiani, M., Debiasi, M. G., Colagnola, M. & Artemi, F. 1990. Catalase, peroxidase and superoxide-dismutase activities in seedlings submitted to increasing water deficit. *Agrochimica*, **34**, 90-102.
- Baloglu, M. C., Kavas, M., Aydin, G., Oktem, H. A. & Yucel, A. M. 2012. Antioxidative and physiological responses of two sunflower (*Helianthus annuus*) cultivars under PEG-mediated drought stress. *Turkish Journal of Botany*, **36**, 707-714.
- Bano, A., Ullah, F. & Nosheen, A. 2012. Role of abscisic acid and drought stress on the activities of antioxidant enzymes in wheat. *Plant Soil and Environment*, **58**, 181-185.
- Barathi, P., Sundar, D. & Reddy, A. R. 2001. Changes in mulberry leaf metabolism in response to water stress. *Biologia Plantarum*, **44**, 83-87.
- Bartoli, C. G., Gomez, F., Martinez, D. E. & Guamet, J. J. 2004. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany*, **55**, 1663-1669.
- Bartos, J., Berkova, E. & Setlik, I. 1975. Versatile chambre for gas-exchange measurements in suspensions of algae and chloroplasts. *Photosynthetica*, **9**, 395-406.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, **39**, 205-207.
- Beis, A. & Patakas, A. 2012. Relative contribution of photoprotection and anti-oxidative mechanisms to differential drought adaptation ability in grapevines. *Environmental and Experimental Botany*, **78**, 173-183.
- Benešová, M., Holá, D., Fischer, L., Jedelský, P. L., Hnilička, F., Wilhelmová, N., Rothová, O., Kočová, M., Procházková, D., Honnerová, J., Fridrichová, L. & Hniličková, H. 2012. The Physiology and Proteomics of Drought Tolerance in Maize: Early Stomatal Closure as a Cause of Lower Tolerance to Short-Term Dehydration? *Plos One*, **7**, 17.
- Bhattacharjee, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, **89**, 1113-1121.
- Boldaji, S. A. H., Khavari-Nejad, R. A., Sajedi, R. H., Fahimi, H. & Saadatmand, S. 2012. Water availability effects on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and reducing sugar contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, **34**, 1177-1186.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J. T., Weir, I. S. & Neill, S. J. 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant Journal*, **45**, 113-122.
- Candan, N. & Tarhan, L. 2012. Tolerance or sensitivity responses of *Mentha pulegium* to osmotic and waterlogging stress in terms of antioxidant defense systems and membrane lipid peroxidation. *Environmental and Experimental Botany*, **75**, 83-88.

- Chai, T. T., Fadzillah, N. M., Kusnan, M. & Mahmood, M. 2005. Water stress-induced oxidative damage and antioxidant responses in micropropagated banana plantlets. *Biologia Plantarum*, **49**, 153-156.
- Chakraborty, U. & Pradhan, B. 2012. Drought stress-induced oxidative stress and antioxidative responses in four wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Archives of Agronomy and Soil Science*, **58**, 617-630.
- Chandra, A., Bhatt, R. K. & Misra, L. P. 1998. Effect of water stress on biochemical and physiological characteristics of oat genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau*, **181**, 45-48.
- Chen, C. B. & Dickman, M. B. 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 3459-3464.
- Chen, G. X. & Asada, K. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves – occurrence of 2 isozymes and the differences in their enzymatic and molecular-properties. *Plant and Cell Physiology*, **30**, 987-998.
- Chugh, V., Kaur, N. & Gupta, A. K. 2011. Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, **48**, 47-53.
- Cia, M. C., Guimaraes, A. C. R., Medici, L. O., Chabregas, S. M. & Azevedo, R. A. 2012. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. *Annals of Applied Biology*, **161**, 313-324.
- D'Souza, M. R. & Devaraj, V. R. 2011. Specific and non-specific responses of Hyacinth bean (*Dolichos lablab*) to drought stress. *Indian Journal of Biotechnology*, **10**, 130-139.
- Dat, J. F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C. H. & Scott, I. M. 1998. Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology*, **116**, 1351-1357.
- Del Rio, L. A., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Gomez, M. & Barroso, J. B. 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1255-1272.
- Deng, B. L., Du, W. C., Liu, C. L., Sun, W. W., Tian, S. & Dong, H. S. 2012. Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: low resource requirement confers polytolerance in polyploids? *Plant Growth Regulation*, **66**, 37-47.
- Devi, R., Kaur, N. & Gupta, A. K. 2012. Potential of antioxidant enzymes in depicting drought tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, **49**, 257-265.
- Faize, M., Burgos, L., Faize, L., Piqueras, A., Nicolas, E., Barba-Espin, G., Clemente-Moreno, M. J., Alcobendas, R., Artlip, T. & Hernandez, J. A. 2011. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 2599-2613.
- Farfan-Vignolo, E. R. & Asard, H. 2012. Effect of elevated CO₂ and temperature on the oxidative stress response to drought in *Lolium perenne* L. and *Medicago sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, **59**, 55-62.
- Fazeli, F., Ghorbanli, M. & Niknam, V. 2007. Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum*, **51**, 98-103.
- Floyd, R. A. & Zsnagy, I. 1984. Formation of long-lived hydroxyl free-radical adducts of proline and hydroxyproline in a Fenton reaction. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **790**, 94-97.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H. F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D. G., Davies, J. M. & Dolan, L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, **422**, 442-446.
- Foyer, C. H., Descourvieres, P. & Kunert, K. J. 1994. Protection against oxygen radicals – an important defense-mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell and Environment*, **17**, 507-523.
- Foyer, C. H., LopezDelgado, H., Dat, J. F. & Scott, I. M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, **100**, 241-254.
- Foyer, C. H. & Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface

- between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, **17**, 1866-1875.
- Fridrichová, L. 2010 Inter- a intraspecifická variabilita v odezvě *Vicia faba* L. a *Zea mays* L. na nedostatek vody, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Fu, G. F., Song, J., Xiong, J., Li, Y. R., Chen, H. Z., Le, M. K. & Tao, L. X. 2011. Changes of Oxidative Stress and Soluble Sugar in Anthers Involve in Rice Pollen Abortion Under Drought Stress. *Agricultural Sciences in China*, **10**, 1016-1025.
- Ghane, S. G., Lokhande, V. H. & Nikam, T. D. 2012. Differential growth, physiological and biochemical responses of niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) cultivars to water-deficit (drought) stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, **34**, 215-225.
- Gill, S. S. & Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**, 909-930.
- Grzesiak, M., Filek, M., Barbasz, A., Kreczmer, B. & Hartikainen, H. 2013. Relationships between polyamines, ethylene, osmoprotectants and antioxidant enzymes activities in wheat seedlings after short-term PEG- and NaCl-induced stresses. *Plant Growth Regulation*, **69**, 177-189.
- Habibi, G. & Hajiboland, R. 2012. Comparison of photosynthesis and antioxidative protection in *Sedum album* and *Sedum stoloniferum* (Crassulaceae) under water stress. *Photosynthetica*, **50**, 508-518.
- Hare, P. D. & Cress, W. A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, **21**, 79-102.
- Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R. A., Niknam, V., Najafi, F. & Razavi, K. 2012. Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, **34**, 1537-1549.
- He, L. H., Jia, X. Y., Gao, Z. Q. & Li, R. Z. 2011. Genotype-dependent responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings to drought, UV-B radiation and their combined stresses. *African Journal of Biotechnology*, **10**, 4046-4056.
- He, S., Liu, G. & Yang, H. 2012. Water use efficiency by alfalfa: Mechanisms involving anti-oxidation and osmotic adjustment under drought. *Russian Journal of Plant Physiology*, **59**, 348-355.
- Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G., Sorger, A. & Grill, D. 2002. Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**, 691-696.
- Hertwig, B., Streb, P. & Feierabend, J. 1992. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiology*, **100**, 1547-1553.
- Hojati, M., Modarres-Sanavy, S. A. M., Karimi, M. & Ghanati, F. 2011. Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**, 105-112.
- Hola, D., Langrova, K., Kocova, M. & Rothova, O. 2003. Photosynthetic parameters of maize (*Zea mays* L.) inbred lines and F-1 hybrids: their different response to, and recovery from rapid or gradual onset of low-temperature stress. *Photosynthetica*, **41**, 429-442.
- Hollander-Czytko, H., Grabowski, J., Sandorf, I., Weckermann, K. & Weiler, E. W. 2005. Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in *Arabidopsis* under stress conditions. *Journal of Plant Physiology*, **162**, 767-770.
- Huseynova, I. M. 2012. Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1817**, 1516-1523.
- Inman-Bamber, N. G. 2004. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. *Field Crops Research*, **89**, 107-122.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Lakshmanan, G. M. A., Gomathinavaam, M. & Panneerselvam, R. 2008. Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **61**, 298-303
- Ji, K. X., Wang, Y. Y., Sun, W. N., Lou, Q. J., Mei, H. W., Shen, S. H. & Chen, H. 2012. Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *Journal of Plant Physiology*, **169**, 336-344.
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., delRio, L. A. & Sevilla, F. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*,

- Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K. & Kim, W. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, **5**, 709-725.
- Keles, Y. & Unyayar, S. 2004. Responses of antioxidant defense system of *Helianthus annuus* to abscisic acid treatment under drought and waterlogging. *Acta Physiologiae Plantarum*, **26**, 149-156.
- Kholová, J., Hash, C. T., Kočová, M. & Vadez, V. 2011. Does a terminal drought tolerance QTL contribute to differences in ROS scavenging enzymes and photosynthetic pigments in pearl millet exposed to drought? *Environmental and Experimental Botany*, **71**, 99-106.
- Kholová, J. & Vadez, V. 2013. Water extraction under terminal drought explains the genotypic differences in yield, not the anti-oxidant changes in leaves of pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Functional Plant Biology*, **40**, 44-53.
- Kishor, P. B. K., Sangam, S., Amrutha, R. N., Laxmi, P. S., Naidu, K. R., Rao, K., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan, P. & Sreenivasulu, N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, **88**, 424-438.
- Kočová, M. 1980. Simulace heterózního efektu v aktivitě Hillovy reakce u směsných vzorků chloroplastů kukuřice. Písemná rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Koscielniak, J., Filek, W. & Biesaga-Koscielniak, J. 2006. The effect of drought stress on chlorophyll fluorescence in *Lolium-Festuca* hybrids. *Acta Physiologiae Plantarum*, **28**, 149-158.
- Koyama, R., Itoh, H., Kimura, S., Morioka, A. & Uno, Y. 2012. Augmentation of Antioxidant Constituents by Drought Stress to Roots in Leafy Vegetables. *Horttechnology*, **22**, 121-125.
- Kusvuran, S. 2012. Influence of Drought Stress on Growth, Ion Accumulation and Antioxidative Enzymes in Okra Genotypes. *International Journal of Agriculture and Biology*, **14**, 401-406.
- Li, D. M., Zhang, J., Sun, W. J., Li, Q., Dai, A. H. & Bai, J. G. 2011. 5-Aminolevulinic acid pretreatment mitigates drought stress of cucumber leaves through altering antioxidant enzyme activity. *Scientia Horticulturae*, **130**, 820-828.
- Li, Y. Z., Sun, C. B., Huang, Z. B., Pan, J. L., Wang, L. & Fan, X. W. 2009. Mechanisms of Progressive Water Deficit Tolerance and Growth Recovery of Chinese Maize Foundation Genotypes Huangzao 4 and Chang 7-2, Which are Proposed on the Basis of Comparison of Physiological and Transcriptomic Responses. *Plant and Cell Physiology*, **50**, 2092-2111.
- Li, Z., Peng, Y. & Ma, X. 2013. 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 Physiologiae Plantarum*, **35**, 213-222.
- Lima, A. L. S., DaMatta, F. M., Pinheiro, H. A., Totola, M. R. & Loureiro, M. E. 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, **47**, 239-247.
- Liu, W. J., Yuan, S., Zhang, N. H., Lei, T., Duan, H. G., Liang, H. G. & Lin, H. H. 2006. Effect of water stress on photosystem 2 in two wheat cultivars. *Biologia Plantarum*, **50**, 597-602.
- Liu, Z. J., Zhang, X. L., Bai, J. G., Suo, B. X., Xu, P. L. & Wang, L. 2009. Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves. *Scientia Horticulturae*, **121**, 138-143.
- Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E. & Navari-Izzo, F. 1999. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology*, **119**, 1091-1099.
- Lokhande VH, Nikam TD, Suprasanna P. 2010. Differential osmotic adjustment to iso-osmotic NaCl and PEG stress in the in vitro cultures of *Sesuvium portulacastrum* (L.) L. *J Crop Sci Biotechnol* **13**(4):251-256
- Lu, Y. Y., Deng, X. P. & Kwak, S. S. 2010. Over expression of CuZn superoxide dismutase (CuZn SOD) and ascorbate peroxidase (APX) in transgenic sweet potato enhances tolerance and recovery from drought stress. *African Journal of Biotechnology*, **9**, 8378-8391.
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. C. & Sohrabi, Y. 2011. Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase

- activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, **5**, 1255-1260.
- Mao, S. S., Islam, M. R., Hu, Y. G., Qian, X., Chen, F. & Xue, X. Z. 2011. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in corn (*Zea mays* L.) following soil application of superabsorbent polymer at different fertilizer regimes. *African Journal of Biotechnology*, **10**, 10000-10008.
- Masoumi, A., Kafi, M., Khazaei, H. & Davari, K. 2010. Effect of drought stress on water status, electrolyte leakage and enzymatic antioxidants of *Kochia* (*Kochia scoparia*) under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany*, **42**, 3517-3524.
- Masoumi, H., Darvish, F., Daneshian, J., Nourmohammadi, G. & Habibi, D. 2011. Chemical and biochemical responses of soybean (*Glycine max* L.) cultivars to water deficit stress. *Australian Journal of Crop Science*, **5**, 544-553.
- Moghadam, H. R. T., Zahedi, H., Ghooshchi, F. & Lak, S. 2011. Effect of super absorbent application on destructive oxidative stress in canola (*Brassica napus* L.) cultivars under water stress conditions. *Research on Crops*, **12**, 393-401.
- Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Daros, E., de Campos, M. K. F., de Carvalho, J., Bessalho, J. C., Pereira, L. F. P. & Vieira, L. G. E. 2007. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, **130**, 218-229.
- Moussa, H. R. & Abdel-Aziz, S. M. 2008. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science*, **1**, 31-36.
- Moustakas, M., Sperdoulis, I., Kouna, T., Antonopoulou, C. I. & Therios, I. 2011. Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Growth Regulation*, **65**, 315-325.
- Munne-Bosch, S. & Alegre, L. 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, **31**, 203-216.
- Nikolaeva, M. K., Maevskaya, S. N., Shugaev, A. G. & Bukhov, N. G. 2010. Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. *Russian Journal of Plant Physiology*, **57**, 87-95.
- Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev, S. I., Inaba, M., Yokota, A. & Murata, N. 2001. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *Embo Journal*, **20**, 5587-5594.
- Noctor, G. & Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**, 249-279.
- Ozfidan, C., Turkan, I., Sekmen, A. H. & Seckin, B. 2012. Abscisic acid-regulated responses of *aba2-1* under osmotic stress: the abscisic acid-inducible antioxidant defence system and reactive oxygen species production. *Plant Biology*, **14**, 337-346.
- Pastori, G. M. & Trippi, V. S. 1992. Oxidative stress induces high-rate of glutathione-reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. *Plant and Cell Physiology*, **33**, 957-961.
- Pei, Z. M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G. J., Grill, E. & Schroeder, J. I. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, **406**, 731-734.
- Perez-Lopez, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Sgherri, C., Munoz-Rueda, A., Navari-Izzo, F. & Mena-Petite, A. 2009. The oxidative stress caused by salinity in two barley cultivars is mitigated by elevated CO₂. *Physiologia Plantarum*, **135**, 29-42.
- Pinheiro, H. A., DaMatta, F. M., Chaves, A. R. M., Fontes, E. P. B. & Loureiro, M. E. 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science*, **167**, 1307-1314.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. & Kriedemann, P. E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents – verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **975**, 384-394.
- Pourtaghi, A., Darvish, F., Habibi, D., Nourmohammadi, G. & Daneshian, J. 2011. Effect of irrigation water deficit on antioxidant activity and yield of some sunflower hybrids. *Australian Journal of Crop Science*, **5**, 197-204.

- Procházková, D., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. & Singh, D. V. 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, **161**, 765-771.
- Pyngrope, S., Bhoomika, K. & Dubey, R. S. 2013. Reactive oxygen species, ascorbate-glutathione pool, and enzymes of their metabolism in drought-sensitive and tolerant indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings subjected to progressing levels of water deficit. *Protoplasma*, **250**, 585-600.
- Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W. & Li, H. Y. 2008. Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**, 2-18.
- Rai, A. C., Singh, M. & Shah, K. 2012. Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in ZAT12-transformed transgenic tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **61**, 108-114.
- Rosales, M. A., Ocampo, E., Rodriguez-Valentin, R., Olvera-Carrillo, Y., Acosta-Gallegos, J. & Covarrubias, A. A. 2012. Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, **56**, 24-34.
- Rubio, M. C., Gonzalez, E. M., Minchin, F. R., Webb, K. J., Arrese-Igor, C., Ramos, J. & Becana, M. 2002. Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum*, **115**, 531-540.
- Saglam, A., Saruhan, N., Terzi, R. & Kadioglu, A. 2011. The relations between antioxidant enzymes and chlorophyll fluorescence parameters in common bean cultivars differing in sensitivity to drought stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, **58**, 60-68.
- Sai, K. S., Karray, B. N., Jaffel, K., Rejeb, M. N., Leclerc, J. C. & Ouerghi, Z. 2012. Water Deficit-Induced Oxidative Stress in Leaves of Garden Orach (*Atriplex hortensis*). *Research Journal of Biotechnology*, **7**, 46-52.
- Sairam, R. K., Chandrasekhar, V. & Srivastava, G. C. 2001. Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their responses to water stress. *Biologia Plantarum*, **44**, 89-94.
- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S. & Saxena, D. C. 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotype tolerance to water stress. *Biologia Plantarum*, **41**, 387-394.
- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S. & Shukla, D. S. 1997. Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau*, **178**, 171-177.
- Sairam, R. K. & Saxena, D. C. 2000. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: Possible mechanism of water stress tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau*, **184**, 55-61.
- Sairam, R. K. & Srivastava, G. C. 2001. Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): Variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **186**, 63-70.
- Sanchez-Rodriguez, E., Rubio-Wilhelmi, M. D., Blasco, B., Leyva, R., Romero, L. & Ruiz, J. M. 2012. Antioxidant response resides in the shoot in reciprocal grafts of drought-tolerant and drought-sensitive cultivars in tomato under water stress. *Plant Science*, **188**, 89-96.
- Sanda, S., Yoshida, K., Kuwano, M., Kawamura, T., Munekage, Y. N., Akashi, K. & Yokota, A. 2011. Responses of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused by water deficit in wild watermelon. *Physiologia Plantarum*, **142**, 247-264.
- Sayfzadeh, S., Habibi, D., Taleghani, D. F., Kashani, A., Vazan, S., Qaen, S. H. S., Khodaei, A. H., Mashhadi, M., Boojar, A. & Rashidi, M. 2011. Response of Antioxidant Enzyme Activities and Root Yield in Sugar Beet to Drought Stress. *International Journal of Agriculture and Biology*, **13**, 357-362.
- Scandalios, J.G., Guan, L., Polidoros, A.N. 1997 Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. - In: Scandalios, J.G. (ed.): Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Pp. 343-398. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1997
- Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38**, 995-1014.
- Sedghi, M., Sharifi, R. S., Pirzad, A. R. & Amanpour-Balaneji, B. 2012. Phytohormonal Regulation of Antioxidant Systems in Petals of Drought Stressed Pot Marigold (*Calendula officinalis* L.).

- Journal of Agricultural Science and Technology*, **14**, 869-878.
- Sekmen Esen, A. H., Ozgur, R., Uzilday, B., Tanyolac, Z. O. & Dinc, A. 2012. The response of the xerophytic plant *Gypsophila aucheri* to salt and drought stresses: the role of the antioxidant defence system. *Turkish Journal of Botany*, **36**, 697-706.
- Selote, D. S. & Khanna-Chopra, R. 2004. Drought-induced spikelet sterility is associated with an inefficient antioxidant defence in rice panicles. *Physiologia Plantarum*, **121**, 462-471.
- Sgherri, C., Navari-Izzo, F., Pardossi, A., Soressi, G. P. & Izzo, R. 2007. The influence of diluted seawater and ripening stage on the content of antioxidants in fruits of different tomato genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 2452-2458.
- Sgherri, C. L. M. & Navariizzo, F. 1995. Sunflower seedlings subjected to increasing water - deficit stress—oxidative stress and defense-mechanisms. *Physiologia Plantarum*, **93**, 25-30.
- Sharifi, P., Amirnia, R., Majidi, E., Hadi, H., Roustaii, M., Nakhoda, B., Alipoor, H. M. & Moradi, F. 2012. Relationship between drought stress and some antioxidant enzymes with cell membrane and chlorophyll stability in wheat lines. *African Journal of Microbiology Research* **6**, 617-623.
- Shi, H. T., Wang, Y. P., Cheng, Z. M., Ye, T. T. & Chan, Z. L. 2012. Analysis of Natural Variation in Bermudagrass (*Cynodon dactylon*) Reveals Physiological Responses Underlying Drought Tolerance. *Plos One*, **7**, 12.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. & Yoshimura, K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1305-1319.
- Smirnoff, N. 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. *Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation*, 217-243.
- Smirnoff, N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 229-235.
- Smirnoff, N. & Colombe, S. V. 1988. Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen-peroxide scavenging system. *Journal of Experimental Botany*, **39**, 1097-1108.
- Subrahmanyam, D., Subash, N., Haris, A. & Sikka, A. K. 2006. Influence of water stress on leaf photosynthetic characteristics in wheat cultivars differing in their susceptibility to drought. *Photosynthetica*, **44**, 125-129.
- Sun, W. J., Nie, Y. X., Gao, Y., Dai, A. H. & Bai, J. G. 2012. Exogenous cinnamic acid regulates antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, **34**, 641-655.
- Tan, M. P., Lu, J., Zhang, A. Y., Hu, B., Zhu, X. W. & Li, W. B. 2011. The Distribution and Cooperation of Antioxidant (Iso)enzymes and Antioxidants in Different Subcellular Compartments in Maize Leaves during Water Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, **30**, 255-271.
- Teixeira, J. & Pereira, S. 2007. High salinity and drought act on an organ-dependent manner on potato glutamine synthetase expression and accumulation. *Environmental and Experimental Botany*, **60**, 121-126.
- Tian, F. X., Gong, J. F., Wang, G. P., Wang, G. K., Fan, Z. Y. & Wang, W. 2012a. Improved drought resistance in a wheat stay-green mutant *tasg1* under field conditions. *Biologia Plantarum*, **56**, 509-515.
- Tian, Z. G., Wang, F., Zhang, W. N., Liu, C. M. & Zhao, X. M. 2012b. Antioxidant Mechanism and Lipid Peroxidation Patterns in Leaves and Petals of Marigold in Response to Drought Stress. *Horticulture Environment and Biotechnology*, **53**, 183-192.
- Trovato, M., Mattioli, R. & Costantino, P. 2008. Multiple Roles of Proline in Plant Stress Tolerance and Development. *Rendiconti Lincei-Scienze Fisiche E Naturali*, **19**, 325-346.
- Ünyayar S, Keles Y, Cekic FÖ. 2005. The anti-oxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations. *Plant Soil and Environment* **51**: 57–64
- Uzilday, B., Turkan, I., Sekmen, A. H., Ozgur, R. & Karakaya, H. C. 2012. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C-4) and *Cleome spinosa* (C-3) under drought stress. *Plant Science*, **182**, 59-70.
- Valifard, M., Moradshahi, A. & Kholdebarin, B. 2012. Biochemical and Physiological Responses of Two Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars to Drought Stress Applied at Seedling Stage.

- Journal of Agricultural Science and Technology*, **14**, 1567-1578.
- Van Heerden, P. D. R. & Kruger, G. H. J. 2002. Separately and simultaneously induced dark chilling and drought stress effects on photosynthesis, proline accumulation and antioxidant metabolism in soybean. *Journal of Plant Physiology*, **159**, 1077-1086.
- Van Rensburg, L. & Kruger, G. H. J. 1993. Differential inhibition of photosynthesis (in vivo and invitro), and changes in chlorophyll a fluorescence induction kinetics of 4 tobacco cultivars under drought stress. *Journal of Plant Physiology*, **141**, 357-365.
- Van Rensburg, L. & Kruger, G. H. J. 1994. Evaluation of components of oxidative stress metabolism for use in selection of drought tolerant cultivars of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology*, **143**, 730-737.
- Varga, B., Janda, T., Laszlo, E. & Veisz, O. 2012. Influence of abiotic stresses on the antioxidant enzyme activity of cereals. *Acta Physiologiae Plantarum*, **34**, 849-858.
- Vaseva, I., Akiscan, Y., Simova-Stoilova, L., Kostadinova, A., Nenkova, R., Anders, I., Feller, U. & Demirevska, K. 2012. Antioxidant response to drought in red and white clover. *Acta Physiologiae Plantarum*, **34**, 1689-1699.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophyll-a and chlorophyll-b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, **144**, 307-313.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., VanMontagu, M., Inze, D. & VanCamp, W. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *Embo Journal*, **16**, 4806-4816.
- Wu, G. Q., Zhang, L. N. & Wang, Y. Y. 2012. Response of growth and antioxidant enzymes to osmotic stress in two different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars seedlings. *Plant Soil and Environment*, **58**, 534-539.
- Xin, Z. L., Gao, M., Li, S. Q., Li, S. X. & Liang, Z. S. 2011. Modulations of plant growth, water status and antioxidant system of two maize (*Zea mays* L.) cultivars induced by exogenous glycinebetaine under long term mild drought stress. *Pakistan Journal of Botany*, **43**, 1587-+.
- Xu, C. P. & Huang, B. R. 2012. Proteins and Metabolites Regulated by Trinexapac-ethyl in Relation to Drought Tolerance in Kentucky Bluegrass. *Journal of Plant Growth Regulation*, **31**, 25-37.
- Xu, L. X., Han, L. B. & Huang, B. R. 2011. Antioxidant Enzyme Activities and Gene Expression Patterns in Leaves of Kentucky Bluegrass in Response to Drought and Post-drought Recovery. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **136**, 247-255.
- Yong, T., Zongsuo, L., Hongbo, S. & Feng, D. 2006. Effect of water deficits on the activity of antioxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of *Radix Astragal* at seeding stage. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **49**, 60-65.
- Yuan, G. F., Jia, C. G., Li, Z., Sun, B., Zhang, L. P., Liu, N. & Wang, Q. M. 2010. Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. *Scientia Horticulturae*, **126**, 103-108.
- Zhang, J. X. & Kirkham, M. B. 1996. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist*, **132**, 361-373.
- Zhang, L. X., Li, S. X., Zhang, H. & Liang, Z. S. 2007. Nitrogen rates and water stress effects on production, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in two maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **193**, 387-397.
- Zhang, M. D., Chen, Q. A. & Shen, S. H. 2011. Physiological responses of two Jerusalem artichoke cultivars to drought stress induced by polyethylene glycol. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**, 313-318.
- Zhang, P. P., Feng, B. L., Wang, P. K., Dai, H. P., Song, H., Gao, X. L., Gao, J. F., Chen, J. & Chai, Y. 2012. Leaf senescence and activities of antioxidant enzymes in different broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) cultivars under simulated drought condition. *Journal of Food Agriculture & Environment*, **10**, 438-444.
- Zhang, X., Zhang, L., Dong, F. C., Gao, J. F., Galbraith, D. W. & Song, C. P. 2001. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology*, **126**, 1438-1448.
- Zlatev, Z. S., Lidon, F. C., Ramalho, J. C. & Yordanov, I. T. 2006. Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biologia Plantarum*, **50**, 389-394.