

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

**Vliv dehydratace a rehydratace na
dynamiku fytohormonů u rajčat**

Diplomová práce

Autor: Jaromír Janoušek
Studijní program: N0588A030001
Studijní obor: Biologie a ekologie – spec. biologie rostlin
Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Tůma, CSc.

Hradec Králové

srpen 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně, a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, ze kterých jsem čerpal

V Hradci Králové dne 02.08.2022

Jaromír Janoušek

Poděkování:

Na prvním místě bych rád poděkoval svému školiteli panu doc. Ing. Jiřímu Tůmovi, CSc. za spoustu cenných rad a trpělivé vedení mé diplomové práce. Dále bych rád poděkoval paní RNDr. Zuzaně Kovalíkové Ph.D. za poskytnutí rad při analýzách a přípravě vzorků. Velké díky patří také paní RNDr. Radomíře Vaňkové CSc. z Ústavu experimentální botaniky AV ČR – laboratoře hormonálních regulací u rostlin v Praze. Poděkování patří i mé rodině za jejich podporu a pomoc v průběhu studia.

Anotace

JANOŮŠEK J. *Vliv dehydratace a rehydratace na dynamiku fytohormonů u rajčat*. Hradec Králové 2022. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Tůma Jiří CSc. 92 s.

Tato diplomová práce se zabývá vlivem dehydratace a rehydratace na dynamiku fytohormonů u rajčat. Rajčata patří mezi nejrozšířenější plodiny na světě pro své nutriční a komerční hodnoty, a také využití pro vědecké účely. Sucho vyvolává u rostlin vodní stres, který patří k abiotickým faktorům přispívajícím k výraznému poklesu výnosů této plodiny. Pod vlivem stresorů dochází v rostlinách ke změnám v produkci fytohormonů např. kyseliny abscisové (ABA), anebo osmolytů např. prolinu. Jedním z prvních obranných mechanismů je uzavření průduchů, což zabrání dalším ztrátám vody. V důsledku této obranné reakce dochází ke změnám v metabolismu a hromadění ROS, poškozujících rostlinné buňky, které mohou být zmírněny antioxidačními mechanismy. Cílem této práce je zjistit, zda aplikace látek hormonální povahy může přispět ke zvýšené rezistenci rajčat před suchem prostřednictvím sledování hladin důležitých fytohormonů a dalších stresových markerů u rostlin během dehydratace a rehydratace.

Klíčová slova

vodní stres, vodní deficit, metabolismus, ROS, ABA, SA, rajčata

Annotation

JANOŮŠEK J. *Influence of dehydration and rehydration on the dynamics of phytohormones in tomatoes*. Hradec Králové, 2022. Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Assoc. Prof. Ing. Tůma Jiří CSc. 92 p.

This master theses is dealing with influence of dehydration and rehydration of phytohormones dynamic on tomatoes. Tomatoes belongs to the most commonly spread plants all over the globe with high nutrition and commercial values and in addition with scientific value, as an object for research. The drought is causing water stress, which belongs to abiotic factors and contributing to a diminished yield of this plant. There is a decreased phytohormone production, for example abscisic acid (ABA), and or osmolytes for example prolin, under the influence of water stress factors. One of the first plant defense mechanism is stomatal closing, which leads to decreased water loss. In the consequence of this defense mechanism there is a change in metabolism and accumulation of ROS, causing damage to a plant cells, which can be ameliorate with antioxidant mechanisms. The goal of this theses is to clarify, if hormonal compound addition can contribute to increase tomatoes' water resistance, using evaluation of important phytohormones and other plants' stress factors during dehydratation and rehydratation.

Keywords

water stress, water deficit, metabolism, ROS, ABA, SA, tomatoes

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	11
2.1. Význam vody pro rostlinu.....	11
2.1.1. Voda v rostlině.....	11
2.1.2. Ekologický význam	11
2.2. Stres u rostlin	11
2.2.1. Stresová reakce	13
2.2.2. Vodní deficit.....	14
2.2.3. Osmotický stres	15
2.2.4. Oxidační stres.....	15
2.3. Reaktivní formy kyslíku (ROS).....	16
2.3.1. Vliv abiotického stresu na vznik superoxidu a následné produkci malondialdehydu.....	16
2.3.2. Oxidační prostředí v rostlinné buňce	17
2.3.3. Odpověď enzymatických antioxidantů na ROS.....	18
2.3.4. Odpověď neenzymatických antioxidantů na ROS.....	18
2.3.5. Tvorba ROS v buněčných kompartmentech a signalizace	19
Změny v metabolismu ROS a antioxidačního mechanismu u rajčat způsobeného abiotickým stresem	21
2.4. Prolin a jeho význam v metabolismu rostlin	22
2.4.1. Vliv vodního deficitu na akumulaci prolinu	22
2.4.1. Vliv prolinu a antioxidačních enzymů na rostliny rajčat vystavené stresu způsobeného suchem.....	23
2.4.2. Vliv kumulace prolinu a polyaminů na toleranci mírného vodního stresu	23
2.4.3. Vliv vodního stresu na obsah prolinu, glycinbetainu a MDA v cherry rajčatech.....	24
2.5. Fytohormony.....	24
2.5.1. Brassinosteroidy.....	25
Vliv brassinolidů na produkci MDA a ROS.....	25
Vliv epibrassinolidu na rostliny za účinku vodního stresu	26
Vliv epibrassinolidu na rajčata za působení sucha.....	26
2.5.2. Kyselina abscisová a její vliv na rostliny během působení stresu způsobeného nedostatkem vody.....	27
Postřik ABA zmírňující stres ze sucha u rajčat	28

Vliv kyseliny abscisové na sucho a chlad u sazenic rajčat.....	28
Zvýšená tolerance vůči suchu prostřednictvím syntézy ABA a eliminací ROS u rajčat.....	29
Mechanismy H ₂ a ABA zlepšující stres ze sucha u rajčat.....	29
2.5.3. Kyselina jasmonová a její vliv na rostliny během působení stresu způsobeného nedostatkem vody.....	30
Interakce mezi ABA a JA za stresu z nedostatku vody	31
Účinky ABA, JA, PA a aktivity polyaminoxidázy v reakci na sucho u rajčat.....	32
2.5.4. Vliv kyseliny salicylové na rostliny za účinku vodního stresu.....	32
Vliv kyseliny salicylové na fyziologické a biochemické reakce v rajčatech za působení sucha.....	33
Kyselina salicylová poskytuje rajčatům toleranci vůči stresu ze sucha prostřednictvím selenu.....	33
Vliv kyseliny salicylové na zmírnění poškození buněk ROS a MDA v rajčatech za působení sucha.....	34
2.5.5. Auxin a jeho reakce na stres způsobený suchem	34
Auxin a jeho reakce na stres způsobený suchem u rostlin Arabidopsis	35
Kyselina indol-3-octová moduluje metabolismus fytohormonů a polyaminů během vodního stresu	36
Auxinový reakční faktor SIARF4 zvyšuje toleranci vůči suchu u rajčat	37
Fyziologické a anatomické procesy za sucha.....	38
Vliv dlouhodobého sucha na metabolickou odpověď u rajčat.....	39
Inhibice akumulace giberelinu umožňuje rajčatům vyhnout se působení sucha	40
3. Metodika experimentu	41
3.1. Rostlinný materiál.....	41
3.2. Příprava experimentu.....	41
3.3. Odběr vzorků a analýzy.....	44
3.4. Seznam použitých pomůcek, chemikálií a přístrojů	45
3.5. Stanovení stresových markerů	46
Měření absorbance	47
Spektrofotometrie.....	48
3.6. Analýza fytohormonů	50
Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS).....	50
3.7. Statistické zpracování dat	51
4. Výsledky	52

4.1. Obsah superoxidu.....	52
4.2. Obsah malondialdehydu	54
4.3. Obsah prolinu.....	56
4.4. Obsah kyseliny abscisové.....	58
4.5. Obsah kyseliny jasmonové.....	60
4.6. Obsah kyseliny salicylové.....	62
4.7. Obsah auxinu.....	63
4.8. Korelační analýza	65
5. Diskuze	66
5.1. Změny v hodnotách superoxidu a malondialdehydu vyvolané dehydratací a následnou rehydratací.....	66
5.2. Změny v hodnotách prolinu vyvolané dehydratací a následnou rehydratací	67
5.3. Změny v hodnotách kyseliny abscisové (ABA) vyvolané dehydratací a následnou rehydratací.....	67
5.4. Změny v hodnotách kyseliny jasmonové (JA) vyvolané dehydratací a následnou rehydratací.....	68
5.5. Změny v hodnotách kyseliny salicylové (SA) vyvolané dehydratací a následnou rehydratací.....	68
5.6. Změny v hodnotách auxinu kyseliny indol-3-octové (IAA) vyvolané dehydratací a následnou rehydratací	69
6. Závěr.....	70
Seznam použité literatury.....	72
Přílohy.....	83

1. Úvod

Rostliny jsou na naší planetě nedílnou součástí přírody a jsou nezbytné pro život na Zemi. Poskytují potravu nejen živočichům, ale i lidem. Jedná se o organismy, které pomocí slunečního světla dokážou přeměňovat anorganické sloučeniny na organické látky, přičemž využívají fotosyntézu, jejímž produktem je životně důležitý kyslík, vyskytující se jako druhý nejzastoupenější plyn v naší atmosféře.

Na rozdíl od živočichů jsou rostliny odkázány k přisedlému životnímu stylu, a proto jsou neustále vystaveny proměnlivými podmínkám životního prostředí (Suzuki et al., 2014). Ze všech abiotických faktorů, které omezují růst a produktivitu rostlinstva na naší planetě je nejvýznamnější nedostatek vody. Voda, na rozdíl od minerálních živin, má velmi rychlý koloběh v ekosystémech a její zásoba v rostlinách i v půdě stačí jen na poměrně krátkou dobu (Gloser, 1998). Stres způsobený nedostatkem vody spouští širokou škálu rostlinných reakcí, od pozměnění genové exprese a buněčného metabolismu až po změny v rychlosti růstu a výnosech plodin (Reddy et al., 2004).

Rajčata, pocházející ze Střední Ameriky, jsou jednou z nejdůležitějších ekonomických plodin na světě. Růst a vývoj rajčat (*Solanum lycopersicum* L.) vyžaduje dostatečné zásobování vodou, a proto vodní stres může vážně omezit výnosy této plodiny. Rostliny rajčat však reagují na nedostatek vody změnou morfologických, fyziologických a biochemických procesů, mezi které patří zvýšená antioxidační aktivita, produkce osmolytů, endogenních hormonů a syntéza sekundárních metabolitů, za účelem obrany a minimalizace poškození rostlin (Chen et al., 2021).

Nedostatek srážek je obvykle hlavní příčinou stresu ze sucha, přičemž vysoká teplota, intenzita světla a suchý vítr, mohou stávající stres způsobený suchem ještě umocnit. Globální změna klimatu přispívá k převládajícím podmínkám sucha v rozsáhlých oblastech v celosvětovém měřítku. Navíc se očekává, že tato změna v budoucnu povede ke zvýšené teplotě a CO₂ v atmosféře, což vyvolá změny v distribuci a dostupnosti srážek. V důsledku toho bude sucho jednou z nejkritičtějších

hrozeb pro zajištění dostatku potravin ve světě. Pro uspokojení budoucí poptávky po potravinách bude důležité podporovat výzkum zabývající se odolností rostlin vůči suchu, zejména zvýšením efektivity využití vody (Seleiman et al., 2021).

Tato práce se zabývá problematikou vodního deficitu u rostlin balkónových rajčat *Solanum lycopersicum* odrůdy VILMA. Konkrétně změnami v hladinách stresových markerů superoxidu, malondialdehydu, prolinu a fytohormonů kyseliny abscisové (ABA), kyseliny jasmonové (JA), kyseliny salicylové (SA) a auxinu kyseliny indol-3-octové (IAA) u jednotlivých variant během dehydratace a následné rehydratace.

Teoretická část zpracovává dostupné vědecké články, které souvisí se stresem způsobeným nedostatkem vody. Zde je obecně popsán stres u rostlin a vodní deficit, který je následně doplněn základními mechanismy působení a produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) v rostlinách, úlohy malondialdehydu (MDA) během stresu ze sucha a rolí enzymatických a neenzymatických antioxidantů působících na ROS. Dále je obecně popsána funkce osmolytu prolinu v rostlinách a konkrétně v rajčatech při vodním deficitu. Nakonec jsou zde rozebrány účinky zkoumaných fytohormonů obecně na rostlinách a na rajčatech během stresu způsobeného suchem.

Cílem práce je v nádobovém pokusu s rostlinami rajčat sledovat dynamiku fytohormonů a vybraných markerů stresu v závislosti na dehydrataci a následné rehydrataci u rostlin rajčat. Posoudit vliv aplikace fyziologicky aktivních látek kyseliny abscisové a brassinolidů. Výzkum probíhal ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky – Laboratoří hormonálních regulací u rostlin v Praze.

2. Teoretická část

2.1. Význam vody pro rostlinu

2.1.1. Voda v rostlině

Na stavbě rostlinného těla se ze všech látek nejvíce uplatňuje voda. Listy zeleniny obsahují 85-95 % vody, dužnaté plody 90-99%, méně obsahují xylémové části stonků a nejméně vody je v semenech (5-15 %). Krátkodobý pokles vody v listech pod 60 % vede k nevratnému poškození pletiva a k smrti orgánu (Šantrůček et al., 1998). Celkový obsah vody přitom představuje značně proměnlivou veličinu, přičemž je ovlivňována zejména vnějším prostředím, stářím rostliny a vegetačním obdobím. Nenahraditelná úloha vody v životě rostlin se projevuje v řadě funkcí (Schneider et al., 2011). Voda je nezbytná pro metabolismus rostlin, neboť je univerzálním rozpouštědlem látek, médiem pro rozvod minerálních a organických látek, celkově vodivým systémem rostlin, zdrojem elektronů a protonů v procesu fotosyntézy a významně se podílí na teplotní regulaci rostlin (Hrudová, 2011).

2.1.2. Ekologický význam

Bohatost vegetačního pokryvu souše na naší planetě je ovlivněna především množstvím dostupné vody. Tam, kde je dostatek srážek rovnoměrně rozdělen do vegetační periody, roste bujná vegetace. Příkladem jsou deštné pralesy a lesy na severozápadě USA a Kanady. Naopak kde jsou častá letní sucha, tak se vytvářejí savany, prairie a pampy. Častější redukce vede k mozaikovitému výskytu keřů a trav až k přechodu v poušť. Nicméně teplota může ovlivnit vegetační poměry při nízké dostupnosti vody, v teplém klimatu jen pro stepní vegetaci, v chladnějším i pro rozvoj lesů (Šantrůček et al., 1998).

2.2. Stres u rostlin

Vzhledem ke svému přisedlému životnímu stylu jsou rostliny neustále vystaveny proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Nicméně účinky těchto stresů na rostliny jsou studovány za podmínek kontrolovaného růstu v laboratořích. Venkovní prostředí se od kontrolovaných podmínek používaných v laboratorních studiích často odlišují, neboť zahrnuje vystavení rostlin více než jednomu stresu. Současný výskyt různých stresů má navíc za následek vysoký stupeň složitosti

reakcí rostlin, protože reakce na kombinované stresy jsou z velké části řízeny různými a někdy protichůdnými signálními cestami, které se mohou vzájemně ovlivňovat a vzájemně se inhibovat (Suzuki et al., 2014). Vlivy vnějšího prostředí se označují jako stresové faktory neboli stresory. Termín stres je používán pro souhrnné označení stavu, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem stresorů. Začneme-li na rostlinu působit stres, dojde ke spuštění řetězce změn, který bývá označován jako stresová reakce (Procházka et al., 1998). Stresory působící na rostlinu můžeme rozdělit na biotické, způsobené okolními živými organismy, a abiotické, způsobené chemickými nebo fyzikálními faktory (Hála, 2021). Abiotické stresory lze dělit podle povahy (fyzikálně-chemické, mechanické), podle původu stresu (kosmické, atmosférické, hydrosférické, pedosférické) a podle doby poškození rostlin (během vegetace, v průběhu sklizně, po sklizni a během skladování) (Hrudová, 2011). Mezi nejčastěji studované abiotické stresory patří sucho, horko, chlad, zasolení a jejich kombinace (Suzuki et al., 2014). Z hlediska obecně biologického působí stresor na různých úrovních rostliny a v různých časových dimenzích. Tedy na úrovni organel, buňky či pletiva, individuální rostliny, celého rostlinného společenstva a na úrovni ekosystému (Bláha et al., 2003). Proto si rostliny vyvinuly složité mechanismy obrany proti proměnlivým a často potenciálně škodlivým podmínkám prostředí (Vaňková, 2010). Různé rostliny vykazují jistou míru adaptace, která se liší různou citlivostí ke stresovým faktorům. Adaptace rostlin na stres může být stabilní, která vzniká v průběhu fylogeneze nebo nestabilní, kdy je závislá na vývojové fázi rostliny a vnějších faktorech prostředí (Hrudová, 2011). Bláha et al. (2003) uvádí, že veškeré biologické regulace adaptací rostlin ve stresových podmínkách se uskutečňují vždy na molekulární úrovni. Přechodné zvýšení odolnosti pod vlivem stresoru se nazývá aklimace, které může být založeno na změnách rychle pomíjivých (tvorba specifických metabolitů) nebo změnách trvalejších (změny v tvorbě nových orgánů a jejich vnitřní struktury) (Procházka et al., 1998). Je nutné zmínit, že řada rostlinných druhů se dokáže vyhnout působení stresů, ale většinou se pokouší o nastolení tzv. tolerance vůči stresu, přičemž většina mechanismů tolerance je stále neznámá a je potřeba je objasnit (Bláha et al., 2003; Suzuki et al., 2014).

2.2.1. Stresová reakce

Průběh a výsledek stresové reakce závisí na délce a intenzitě působení stresového faktoru, ale i na samotné rostlině, zejména na jejím genotypu, na stádiu vývoje, vitalitě a adaptačních schopnostech.

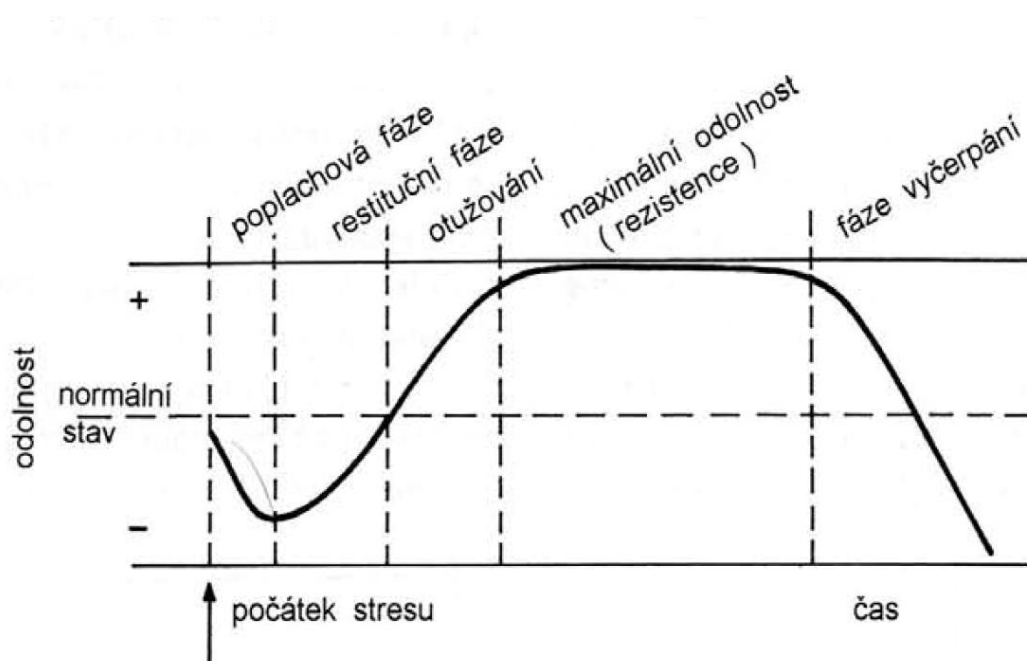
Poplachová fáze - narušení buněčných struktur a funkcí bezprostředně po začátku působení stresového faktoru

Restituční fáze - mobilizace kompenzačních mechanismů (od této fáze přechází stresová reakce v případě, že intenzita stresu nepřekračuje letální úroveň)

Fáze rezistence - zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům; většinou je spojeno se zvýšenou spotřebou energie na úkor jiných životních funkcí (např. růst či produkce potomstva)

Fáze vyčerpání - může nastoupit při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru

(Larcher, 1995)



Obr. 1 Průběh stresové reakce (Larcher, 1995)

2.2.2. Vodní deficit

Sucho patří k nejvýznamnějším světovým faktorům, které ovlivňují produktivitu rostlin, přičemž očekávané globální oteplování povede k dalšímu zesílení těchto vlivů (Vaňková, 2010). Příčinou nedostatku dostupné vody pro rostliny jsou tedy nejčastěji klimatické poměry a průběh počasí. Příjem vody samotnou rostlinou je závislý na obsahu živin a solí v půdě, ale i na půdní reakci. Vodní stres snižuje především růst, fotosyntézu a aktivitu všech enzymů v rostlině. Důležitou úlohou vody je udržování turgoru, neboť růst rostlin je na snižování turgoru citlivější než fotosyntéza. Turgor má hlavní úlohu při růstu a prodlužování buněk, otevírání průduchů, pohybu listů a květních obalů (Bláha et al., 2003). Klesající rychlost růstu je také propojena se zvětšující se transpirační plochou. Jakmile se množství transpirované vody vyrovná nebo zvětší oproti množství vody přijaté z půdy anebo vzduchu, tak přestává rostlina růst (Kincl et al., 2000).

Existují proto rozdíly mezi plodinami v jejich toleranci vůči suchu, které jsou založeny na celkovém množství transpirovatelné vody, kterou může rostlina extrahovat. U brambor bylo pozorováno, že musí existovat souvislost mezi odsáváním menšího množství půdní vody a expanzí listů. Růst listů začal klesat až po ztrátě 40% polní vodní kapacity, přičemž transpirace byla ovlivněna vodním stresem teprve poté, kdy se polní vodní kapacita snížila na hodnoty 64 – 80% (Weisz et al., 1994).

Rostliny tedy mohou disponovat obranými mechanismy a strategiemi, kterými se brání. Jednou z mnoha strategií je krátký životní cyklus, přičemž rostlina dokončí vývoj svých citlivých částí, ještě před nástupem sucha. Dalším mechanismem může být zamezení odpařování vody z listů pomocí uzavření průduchů, což zabrání dalším ztrátám vody, ale i omezí proces fotosyntézy. Tlusticovité (*Crassulaceae*) si vyvinuly specifický typ ekonomického hospodaření s vodou, nazývaný CAM (*Crassulacean acid metabolism*), který časově odděluje příjem CO₂ a průběh fotosyntézy. Velice zvláštní je tolerance k suchu, vyvinutá u pouštní rostliny *Craterostigma plantagineum*, která umožní rostlině úplně vyschnout a po opětovné rehydrataci znovu žít a růst (Vaňková, 2010).

2.2.3. Osmotický stres

Osmotický stres je často vnímán jako pouhý nedostatek vody, ve skutečnosti se jedná o komplexní stav, který je vyvolán nejméně třemi složkami, jako je sucho, iontový stres, nebo-li salinita a alkalita z nedostatku živin. Tyto složky mohou působit samostatně anebo v různých kombinacích. Adaptace rostlin na tyto složky jsou založené na buněčných a fyziologických reakcích, které se částečně odlišují podle dominující složky stresu. To znamená, že například sucho může primárně ovlivnit turgiditu buněk, to způsobí zastavení růstu a uzavření průduchů, což má za následek fotosyntetickou nerovnováhu a zhoršenou redoxní homeostázu. Salinita narušuje iontovou homeostázu. Zde tedy adaptace nebude založená pouze na obnovení turgoru, ale také na navrácení rovnováhy mezi důležitými ionty, jako je sodík a draslík. Specifické adaptivní rostlinné reakce jsou spouštěny specifickými signálními kaskádami, které zahrnují specifické molekulární složky. Avšak počet molekulárních přenašečů stresových signálů je dosti omezený, proto jsou tyto přenašeče sdílené při různých stresech (Ismail et al., 2014).

2.2.4. Oxidační stres

Produktivita plodin je narušena biotickými nebo abiotickými stresovými faktory. Mezi hlavní faktory patří patogeny, nemoci, hmyz, chlad, teplo, zasolení, sucho, záření a další. Mezi těmito nepříznivými podmínkami je sucho jedním z hlavních nežádoucích faktorů, které se negativně podílí na vývoji plodin. Tento nepříznivý vliv prostředí obecně vyvolává akumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS) (Schneider, 2019). V důsledku nadprodukce a akumulace ROS se spouští komplexní chemický a fyziologický jev, který nazýváme oxidační stres. Jedná o stav, kdy ztráta elektronů převyšuje jejich přírůstek, což vede k oxidačnímu poškození buněčných sloučenin, proto je oxidační stres spojen se závažnou a dlouhodobou redoxní nerovnováhou způsobenou nedostatkem elektronů (Demidchik, 2015). Vysoké hladiny molekul ROS vedou ke ztrátě funkcí organel, k úniku elektrolytů a snížení metabolické účinnosti. Stále vysoká koncentrace ROS v buňkách může způsobit molekulární poškození, které zahrnuje poškození proteinů, aminokyselin a lipidů, a dokonce může vést až k buněčné smrti. Za účelem zmírnění tohoto poškození rostliny zvyšují enzymatickou antioxidační aktivitu a obsah

neenzymatických antioxidantů. Pro život rostlin jsou ROS nezbytné, vykonávají buněčné funkce, jako jsou signalizace a obranné reakce (Schneider, 2019).

2.3. Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Reaktivní formy kyslíku, častěji nazývané jako „volné kyslíkové radikály“ jsou reaktivní sloučeniny, které vznikají z kyslíku. Zkratka ROS je převzata z angličtiny: „Reactive oxygens species“. ROS jsou schopné uvolňovat a přeměňovat energii nezbytnou pro život, jsou součástí enzymů a plní významnou funkci v buňce. Tyto látky mohou být i prospěšné, ale vymknou-li se kontrole mechanismu v buňce, tak napadají a poškozují zdravé buňky (Richterová, 2008). Schieber et Chandel (2014) říkají, že naše chápání role ROS se značně rozšířilo od pouze škodlivých druhů způsobujících oxidační stres k názoru, že jsou zásadními posly zapojenými do redoxní signalizace. Mignolet-Spruyt et al. (2016) poukazují na fakt, že ROS se mohou iniciovat a integrovat se signálními sítěmi, a tím regulovat širokou škálu procesů, jako je růst, vývoj, obrana a aklimatizační reakce na biotické a abiotické stresy.

2.3.1. Vliv abiotického stresu na vznik superoxidu a následné produkci malondialdehydu

Reaktivní formy kyslíku (ROS), jejichž akumulace způsobují oxidační poškození, fungují jako signální transdukční molekuly k urychlené reakci rostlin v podmínkách abiotického stresu (Zhou et al., 2019). ROS také ovlivňují expresi řady genů, a proto ovlivňují mnoho procesů, jako je růst a vývoj, buněčný cyklus, programovanou buněčnou smrt či obranu proti patogenům (Gill et Tuteja, 2010). Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) je volný radikál, který vzniká oxidací vzdušného kyslíku v dýchacím řetězci, přičemž touto cestou může vznikat i hydroxylový radikál (OH^{\bullet}). Poločas existence ($O_2^{\bullet-}$) je 10^{-5} sekund, po uplynutí krátké reakce se setká buď s antioxidantem, který reakci přibrzdí anebo s jiným volným radikálem, s nímž vytvoří elektronový pár. Radikál superoxid se účinkem enzymu superoxidodismutázy zpracovává na peroxid vodíku, který škodí úplně stejně, ne-li více. Radikály s krátkým poločasem trvání stačí poškodit pouze molekuly v blízkém okolí. Jednou z reakcí způsobených volnými radikály je lipoperoxidace, která postihuje lipidy, přičemž vznikají metabolity např. malondialdehyd (Rokyta et al., 2006).

Malondialdehyd (MDA) je tedy produkován membránovými lipidy v reakci na ROS. Je jedním z konečných produktů peroxidace polynenasycených mastných kyselin v buňkách, a proto je hojně používaným a spolehlivým markerem pro stanovení stupně poškození stresované rostliny. Čím více je rostlina poškozena, tím vyšší je její obsah MDA, což znamená, že rostliny produkují ROS za podmínek abiotického či biotického stresu, a tak se zhoršuje produkce biomolekul, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny či zmíněné lipidy. To vše zvyšuje obsah MDA a propustnost plazmatické membrány, která vede k extravazaci obsahu buněk. Proto může být MDA použit jako indikátor sucha k vyhodnocení stupně poškození plazmatické membrány a schopnosti rostlin snášet stres vůči suchu (Zhang et al., 2021).

2.3.2. Oxidační prostředí v rostlinné buňce

Vystavení rostlinných buněk oxidačnímu buněčnému prostředí vede k tvorbě toxických ROS. Za účelem detoxikace škodlivých ROS si rostliny vyvinuly různé strategie, včetně jejich vychytávání a antioxidačních mechanismů (Das et al., 2015). Pro kontrolu produkce vysoce toxických ROS mají vyšší rostliny enzymatické a neenzymatické antioxidační obranné systémy, které pomáhají při odstraňování ROS a ochraně rostlinných buněk před oxidačním poškozením. Tyto antioxidační systémy představují velmi flexibilní jednotku, která může řídit akumulaci ROS časově i prostorově (Foyer et Noctor, 2005). Různé molekuly antioxidantů jsou lokalizované v různých buněčných kompartmentech a hrají klíčovou roli během tohoto procesu, který zahrnuje jak redoxní signalizaci, tak redoxní homeostázu (Das et al., 2015). Ačkoliv vysoká koncentrace ROS má negativní vliv na rostliny, tak specifické koncentrace ROS hrají zásadní roli v buněčné signalizaci. Neustálá expozice ROS vytváří oxidační prostředí, které ovlivňuje redoxní rovnováhu buňky. Změny redoxního stavu v intracelulární oblasti mají vliv na buněčné funkce, neboť různé buněčné signální dráhy regulující buněčné dělení a systémy stresové reakce jsou citlivé na redoxní situaci (Chiu et Dawes, 2012). Informace o redoxním stavu buňky přináší antioxidanty, které řídí expresi genů spojených s abiotickým a biotickým stresem pro zvýšení obranyschopnosti proti stresu. Rostliny, tak využívají různých buněčných mechanismů, kterými udržují hladiny ROS v rovnovážném stavu, což je pro ně klíčové (Das et al., 2015).

2.3.3. Odpověď enzymatických antioxidantů na ROS

Hlavní rolí antioxidantních enzymů, jako je kataláza (CAT), superoxid dismutáza (SOD), glutathion reductáza (GR), askorbát peroxidáza (APX), glutathion peroxidáza (GPX) a monodehydroaskorbát reductáza (MDAR), je odstraňování toxických ROS uvnitř rostlinné buňky. Peroxidázy vázané na buněčnou stěnu, APX, CuZn-SOD, a nízké hladiny askorbátu odstraňují ROS v apoplastu. CAT a GPX jsou přítomny v peroxisomech. SOD je přítomná ve všech buněčných organelách včetně apoplastu, mitochondrií, chloroplastů a peroxisomů. Tento enzym přeměňuje superoxid ($O_2^{\bullet-}$) na H_2O_2 , následně detoxikační úlohu přebírá CAT a několik různých peroxidáz, které rozkládají H_2O_2 na molekulární kyslík a vodu. Kromě toho glutathion-askorbátový cyklus (Foyer-Haliwell-Asadův cyklus), který je také zapojen do odstraňování různých ROS, funguje v mitochondriích, chloroplastech, peroxisomech a cytosolu (Shao et al., 2006; Wang et al., 2016; Miller, 2012; Mittler, 2017).

2.3.4. Odpověď neenzymatických antioxidantů na ROS

Co se týče neenzymatických lapačů ROS, tak tuto roli vykonává kyselina askorbová, tokoferoly, redukovaný glutathion a karotenoidy. Kyselina askorbová nebo-li vitamín C je jedním z nejvíce studovaných neenzymatických antioxidantů, nacházejících se ve většině typů rostlinných buněk, konkrétně organelách a apoplastech. Vitamín C může přímo vychytávat 1O_2 , $O_2^{\bullet-}$ a OH^{\bullet} , stejně jako regenerovat tokoferol z tokoferoxylových radikálů, čímž chrání membrány (Shao et al., 2006; Horemans et al., 2000; Davey et al., 2000).

Tokoferoly jsou biologicky nejaktivnější a nejvýznamnější antioxidanty v membránách chloroplastů, přičemž jsou primárně zodpovědné za jejich ochranu před fotooxidačním poškozením. Schopnost uhasit singletový kyslík procesem přenosu náboje mu dává antioxidantní vlastnosti. Je známo, že jedna molekula α -tokoferolu může neutralizovat až 120 molekul singletového kyslíku. Dále mohou sloužit jako terminátory řetězové reakce pro radikály polynenasycených mastných kyselin, které vznikají během oxidace lipidů, například interakcí s askorbátem nebo jinými antioxidanty, α -tokoferoly vychytávají lipidové peroxyradikály a

vytvářejí tokoferoxylový radikál, který lze recyklovat zpět na původní α -tokoferol (Yu et Tang, 2004).

Glutathion je tripeptid, který se nachází téměř ve všech buněčných kompartmentech, včetně cytosolu, chloroplastů, endoplazmatického retikula, vakuol a mitochondrií. Bylo zjištěno, že přispívá k udržení hladin ROS pod kontrolou. Tento antioxidant je využíván enzymaticky i neenzymaticky k redukci dehydroaskorbátu (DHA) na askorbát-glutathionového cyklu, následně je oxidován na oxidovaný glutathion (GSSG), přičemž glutathion reduktáza katalyzuje přeměnu GSSG na glutathion (Yu et Tang, 2004; Foyer et Noctor, 2003).

Rostliny a mikroorganismy obsahují karotenoidy, což jsou pigmenty. V přírodě existuje více než 600 karotenoidů. Jejich antioxidační aktivita je primárně způsobena jejich schopností konjugované struktury s dvojitou vazbou delokalizovat nepárové elektrony, jenž jsou u karotenoidů schopny potlačit singletový kyslík bez degradace, a také jeho chemickou reaktivitu s volnými radikály, jako je peroxy (ROO•) a hydroxyl (HYD•). Navíc mohou karotenoidy chránit lipidy před poškozením peroxidem v dostatečně vysokých dávkách (Gonzalez et al., 2021).

2.3.5. Tvorba ROS v buněčných kompartmentech a signalizace

Reaktivní formy kyslíku (ROS), včetně superoxidového aniontu ($O_2^{\bullet-}$), peroxidu vodíku (H_2O_2) a hydroxylového radikálu ($HO\cdot$), stejně jako singletového kyslíku (1O_2), se tvoří v buněčných kompartmentech (chloroplast, mitochondrie, peroxizom a cytoplazma) během reakcí přenosu elektronů, při fotosyntéze a dýchání a jako vedlejší produkty enzymatických reakcí při fotorespiraci a dalších metabolických pochodech. Produkovány jsou také enzymaticky v apoplastu lignifikačních buněk a jako odpověď na vnější podněty. Prvním produktem specializovaných reakcí produkujících vodu katalyzovaných oxidázami je superoxid, ze kterého následně vznikají další ROS. (Das et al., 2015; Demidchik, 2015).

Chloroplasty

Abiotické stresy jako sucho, slanost, nízká teplota nebo vysoká teplota často omezují fixaci CO_2 a snižují tvorbu NADP^+ prostřednictvím Calvinova cyklu. To vede k nadměrné redukci fotosyntetického elektronového transportního řetězce (ETC), který vytváří superoxidové radikály a singletový kyslík v chloroplastech (Li et al., 2007). Za účelem nadměrného snížení ETC za stresových podmínek si vyšší rostliny upravily dráhu fotorespirace, aby obnovily tvorbu NADP^+ (Shao et al., 2006).

Peroxisomy

V peroxisomech jsou ROS produkovány jako H_2O_2 a O_2 . Oxidace xanthinu a hypoxantinu na kyselinu močovou v matrici peroxizomů má za následek produkci O_2 (Reumann et al., 2016). Různé metabolické procesy jako je fotorespirační reakce, enzymatická reakce flavinoxidáz, β -oxidace mastných kyselin a disproportionace kyslíkových radikálů jsou zodpovědné hlavně za tvorbu H_2O_2 v peroxisomech. Za stresových podmínek je tvorba ROS způsobena především zvýšenou rychlostí fotorespirace, která vede díky glykolát oxidáze ke zvýšeným hladinám H_2O_2 (Kerchev et al., 2016).

Mitochondrie

V mitochondriích jsou místem s nejvyšší produkcí ROS komplex I a komplex III ETC (Steffens, 2014). Reakcí mezi Fe^{2+} a Cu^+ (Fentonova reakce) v mitochondriích vzniká H_2O_2 , což má za následek uvolnění letálního $\text{HO}\cdot$, který prochází membránou mitochondrií a způsobuje peroxidaci membránových lipidů a oxidační poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin (Rhoads et al., 2006). Ve stresových podmínkách je tato produkce urychlena v důsledku úniku elektrolytu v obou zmíněných komplexech za vzniku $\text{O}_2^{\cdot-}$, který je detoxifikován opět na H_2O_2 enzymem MnSOD (mangan superoxidismutáza) (Huang et al., 2016).

Appoplast

Dalšími aktivními místy tvorby ROS v rostlinách jsou buněčné stěny a appoplast. Plazmatická membrána obsahující NADPH oxidázy, které jsou také nazývané respiratory burst oxidase homologs (RBOHs), jsou důležitými proteiny generujícími ROS (O'Brien et al., 2012; Suzuki et al., 2011). Vnitřní membránové proteiny RBOHs

způsobují během podmínek produkci ROS (Oda et al., 2010). Tyto proteiny, které mají N-terminální část obsahující dva motivy EF-hand, jsou závislé na Ca^{2+} a aktivují se, jakmile se Ca^{2+} naváže na jejich N-terminální oblast (Ogasawara et al., 2008; Sumimoto, 2008). Oxalát oxidáza je apoplastický protein produkující ROS. Tento protein může za produkci H_2O_2 v kořenových buňkách, navíc je dobře znám pro svůj účinek vůči toleranci stresu během sucha (Voothuluru et Sharp, 2013). Signalizace ROS je silně propojena s reakcí na rostlinné hormony, včetně kyseliny salicylové (SA), kyseliny jasmonové (JA), ethylenu, kyseliny abscisové (ABA) a auxinu (Mignolet-Spruyt et al., 2016).

Změny v metabolismu ROS a antioxidačního mechanismu u rajčat způsobeného abiotickým stresem

Zhou et al. (2019) zkoumali dynamické změny v metabolismu ROS a antioxidačního mechanismu u rajčat za působení stresu vyvolaného suchem, horkem a jejich kombinací. Pro experiment byly použity dva kultivary rajčat (Sufen 14: CV1 a Jinlingmeiyu: CV2). Šest dní sucha a kombinovaného stresu vedlo k prudkému nárůstu obsahu H_2O_2 (peroxidu vodíku) a $O_2^{\bullet-}$ (superoxidového radikálu) u obou kultivarů, i když hladiny těchto ROS kolísaly od prvního do pátého dne. Třetí den došlo u obou kultivarů k dramatickému nárůstu aktivity superoxid dismutázy (SOD) a askorbát peroxidázy (APX) a poklesu aktivity katalázy (CAT) během všech stresových podmínek. Šestý den se významně snížila aktivita peroxidázy (POD) a CAT u obou kultivarů. Významné zvýšení obsahu MDA bylo pozorováno u CV1 za působení stresu způsobeného suchem a kombinací sucha a horka. U rostlin CV2 byl zvýšený obsah MDA pozorován u všech variant působení stresu. Zatímco kombinovaný stres způsobil pokles obsahu prolinu u kultivaru CV1. Plocha zápoje a průměr stonku byl menší při působení kombinovaného stresu než při působení jednotlivých stresů. Bylo zjištěno, že odolnost rajčat vůči stresu ze sucha a horka je spojena s jejich schopností reagovat na oxidační poškození a regulovat vylučování ROS pomocí vyvolané reakce na ROS kombinovaným stresem

2.4. Prolin a jeho význam v metabolismu rostlin

Prolin je klíčová a multifunkční aminokyselina, která může hrát významnou roli nejen ve vývojových procesech rostlin, ale také v reakcích na biotický a abiotický stres (Szepesi et Szóllósi, 2018). Jeho obsah v buňkách závisí na jeho syntéze, degradaci, exportu do jiných buněk, syntéze proteinů bohatých na prolin, a také jeho uvolňování z buněk pomocí prolinových iminopeptidáz (Tarchevsky et Egorová, 2022). Metabolismus prolinu hraje roli při redoxním utlumení přenosu energie a je zapojen do interakce rostlinných patogenů a programované buněčné smrti. Zároveň se hromadí v rostlinách s omezeným množstvím vody, přičemž jeho přítomnost umožňuje rostlinám zvýšit buněčnou osmolaritu během nedostatku vody. Jeho velkou akumulaci lze vysvětlit pomocí chemických vlastností, jelikož prolin je z aminokyselin nejvíce rozpustný ve vodě a většinou existuje ve stavu zwitteriontů a má slabé negativní i pozitivní náboje na karboxylové a dusíkové skupině. Nicméně zvýšený obsah prolinu v relativně malém objemu cytoplasmy může zvýšit nárůst jiných rozpuštěných látek ve větším objemu vakuoly. Navíc dřívější studie mutantů s deficitem ABA a exogenní aplikací ABA prokázaly, že akumulace prolinu ve stresových podmínkách je částečně regulovaná ABA, ale když na rostliny nepůsobí žádný stres, tak aplikace ABA nestačí k akumulaci vysokých hladin prolinu (Verslues et Sharma, 2010). Studium exogenní aplikace ukázalo, že prolin zlepšuje minerální výživu, enzymatickou i neenzymatickou aktivitu antioxidantních systémů, dále zvyšuje hladiny GA, IAA, koncentrace rozpustných cukrů a organických kyselin a může za expresi několika genů (Szepesi et Szóllósi, 2018).

2.4.1. Vliv vodního deficitu na akumulaci prolinu

Knipp et Honermeier (2006) se rozhodli prozkoumat vliv vodního stresu na akumulaci prolinu v listech transgenních linií brambor vytvářejících fruktany. Výsledky ukázaly, že se zvýšily hladiny prolinu v listech u všech linií brambor, které byly vystaveny stresu způsobeného nedostatkem vody. Zároveň bylo pozorováno zvýšení koncentrace prolinu i během vývoje rostlin. Obsah prolinu souvisel s vodním potenciálem a relativním obsahem vody (RWC) v listech, což ukazuje, že prolin by se mohl podílet na osmoregulaci rostlin. Překvapením bylo, že hladina prolinu byla nejnižší u většiny transgenních linií, jenž generovaly molekuly fruktanu s vysokým stupněm polymerace. Překvapivě při nedostatku vody byla hladina

prolinu nejvyšší u většiny transgenních SST/FFT linií, které generují molekuly fruktanu s vysokým stupněm polymerace. Výsledky experimentu naznačily, že modifikaci metabolismu sacharidů, zejména vysoký obsah rozpustných sacharidů, může ovlivnit akumulace prolinu, která je vyvolaná vodním stresem.

2.4.1. Vliv prolinu a antioxidačních enzymů na rostliny rajčat vystavené stresu způsobeného suchem

Vodní stres často vede k hromadění ROS a jejich nadměrná produkce mění aktivitu enzymů podílejících se na jejich odstraňování. ZAT12 je protein, o kterém se uvádí, že řídí expresi několika stresem aktivovaných genů v rostlinách prostřednictvím signalizace ROS. Rai et al. (2013) vystavili ZAT12-transformované linie rajčat (kultivace H-86 odrůda Kashi Vishesh) nedostatku vody po dobu 7, 14 a 21 dnů. V rostlinách byly odhaleny významné změny v aktivitě enzymů SOD, CAT, APX, GR a PO současně se zvýšením hladiny prolinu, což vedlo k neměnné koncentraci superoxidu a peroxidu vodíku v listech. To naznačuje, že transformované rostliny dokážou regulovat tvorbu těchto radikálů, a tím snižují oxidační stres u rajčat. Výsledky naznačují, že gen ZAT12 je spouštěčem pro zvýšení antioxidačních reakcí a akumulace osmolytu prolinu.

2.4.2. Vliv kumulace prolinu a polyaminů na toleranci mírného vodního stresu

Účinky prolinu a polyaminu za stresových podmínek na udržení osmotické rovnováhy byly široce popsány u mnoha druhů rostlin. Montesinos-Pereira D et al, (2014) provedli studii na kultivarech rajčete cherry (*Solanum lycopersicum* L.) za účelem objasnění metabolismu prolinu a polyaminu na mechanismus tolerance mírného vodního stresu. Kultivar (Zarina) nejvíce odolný vůči stresu z nedostatku vody vykazoval zvýšený pokles prolinu spojený se zvýšenou syntézou polyaminu, s vyšší koncentrací spermidinu a sperminu. Naopak kultivar (Josefina), nejcitlivější na vodní stres, vykazoval po vystavení vodnímu stresu hromadění prolinu spojené se zvýšenou syntézou po vystavení stresu. V tomto kultivaru nebyl detekován žádný nárůst syntézy polyaminu. Závěrem lze říci, že metabolismus polyaminu se více podílí na toleranční reakci na mírný vodní stres.

2.4.3. Vliv vodního stresu na obsah prolinu, glycinbetainu a MDA v cherry rajčatech

Hassan et al. (2015) zkoumali u rostlin cherry rajčete účinky vodního stresu na růst a několik stresových markerů. Vodní stres inhiboval růst rostlin. Obsah prolinu se zvýšil v listech stresovaných rostlin a dosáhl dostatečně vysoké úrovně, aby hrál hlavní roli v osmotické úpravě buněk. Stresem indukovaná akumulace osmolytu glycinbetainu byla detekována v cherry rajčeti, i když v nižší koncentraci než u prolinu. To naznačuje, že rostliny jsou schopny syntetizovat glycinbetain jako sekundární osmolyt za silných stresových podmínek. Hladiny celkových cukrů se naopak snížily u rostlin vystavených stresu. Působící stres vyvolal oxidační stres, který byl indikován významným zvýšením obsahu MDA. Vodní stres vedl ke zvýšení celkového obsahu fenolických látek a flavonoidů a ke snížení hladiny karotenoidů v listech.

2.5. Fytohormony

Desítky let výzkumů nám objasnily molekulární základy fytohormonů, jejich biosyntetických drah, primární signální složky a jejich transkripční výstupy. Dle klasického pohledu každý hormon reguluje soubor diskretních procesů nebo usnadňuje reakce na specifické stimuly, nicméně bylo prokázáno, že společně fungují jako propojená síť, která je schopna regulovat růst a vývoj rostlin. Jeden hormon tedy přímo ovlivňuje aspekt jiného hormonu, aby reguloval určitý proces. Na odpovědi na podněty se tedy podílí více rostlinných hormonů (Emenecker et Strader, 2020). Fytohormony hrají ústřední roli v integraci různých signálů do různých adaptivních výstupů, jako jsou změny v aktivitě iontových kanálů, modifikace proteinů, degradace proteinů a genová exprese (Rieman, 2015). Dále hrají zásadní roli při regulaci různých jevů v rostlinách, například aklimatizace na měnící se prostředí sucha. Kyselina abscisová (ABA) je považována za hlavní hormon, který zesiluje odolnost rostlin vůči suchu prostřednictvím různých morfologických, fyziologických a molekulárních procesů včetně regulace průduchů, vývoje kořenů a zahájení dráhy závislé na ABA. Dále kyselina jasmonová (JA), kyselina salicylová (SA), ethylen (ET), auxiny (IAA), gibereliny (GAs), cytokininy (CK), a brassinosteroidy (BR) jsou také velmi důležité fytohormony, které sdružují

problémy se stresem způsobeným suchem. Tyto hormony se však obvykle vzájemně prolínají, aby zvýšily přežití rostlin v podmínkách sucha (Ullah et al., 2018).

2.5.1. Brassinosteroidy

Brassinosteroidy (BR) a jejich analogy tvoří šestou třídu fytohormonů. Nacházejí se v různých rostlinných pletivech a orgánech, včetně pylu, semen, stonků a listů (Yaqoob et al., 2022). Jedná se o skupinu přirozeně se vyskytujících rostlinných polyhydroxysteroidních sloučenin s rozmanitou škálou biologických funkcí. Tyto steroidní rostlinné hormony hrají klíčovou roli v regulaci mnoha fyziologických a vývojových procesů rostlin včetně fotomorfogeneze, prodlužování buněk, klíčení semen a diferenciace xylému (Ahammed et al., 2020). BR ovlivňují fotosyntézu, aktivitu ATPázy, koncentraci rozpustných proteinů, syntézu nukleových kyselin a proteinů, fixaci CO₂, aktivitu ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxylázy (RuBPCase) a fosfoenol-pyruvátkarboxylázy (PEPCase) (Derevyanchuk et al., 2016; Nolan et al., 2020; Xia et al., 2009). BR mají také ochrannou roli při zmírňování škodlivých účinků způsobených abiotickými stresy, jako je sucho, chlad, slanost, teplo, organické polutanty, herbicidy, těžké kovy a biotické stresy, jako jsou útoky patogenů (Ahammed et al., 2020). Lee et al. (2018) zjistili, že exogenní aplikace brassinosteroidů zcela odstranila poruchy růstu a uzavírání průduchů u rajčat (*Solanum lycopersicum*) citlivých na sucho. Dále naznačují, že signální dráhy BR se podílejí na zprostředkování reakce na abiotický stres prostřednictvím jemného ladění genových sítí souvisejících s abiotickým stresem v rostlinách rajčat.

Vliv brassinolidů na produkci MDA a ROS

Role exogenní aplikace brassinolidu při zmírňování škodlivých účinků sucha se také zabýval Gill et al., (2017), který vystavil sazenice ječmene hladinám polyethylenglykolu (PEG) po dobu 2 týdnů a následně aplikaci postřiku BR na list za účelem vyhodnocení změn v růstu, výměně plynu, obsahu chlorofylu, antioxidační enzymové aktivitě a ultrastrukturální změny. Vyvolané sucho PEG výrazně potlačovalo růst ječmene, obsah chlorofylu, rychlost fotosyntézy, rychlost transpirace, stomatální vodivost a výměnu plynů. Po exogenní aplikaci BR došlo k výraznému zlepšení výměny plynů, obsahu chlorofylu a růstu rostlin jak u exponovaných PEG, tak i u kontrolních sazenic. Postřik snížil produkci MDA a ROS

v listech a kořenech zvýšením enzymatických antioxidačních aktivit při stresu ze sucha. Zkoumáním mikroskopických struktur se ukázalo, že exogenní aplikace BR u rostlin postižených suchem zlepšila buněčnou strukturu a umožnila buňce vlastnit dobře vyvinutý chloroplast s thylakoidními membránami. Z výsledků lze usoudit, že exogenní aplikace BR by mohla zmírnit stres ze sucha u ječmene zmírněním fotosyntetických parametrů a zlepšením enzymatických aktivit antioxidantů.

Vliv epibrassinolidu na rostliny za účinku vodního stresu

Aktivní vedlejší produkt biosyntézy brassinolidu, 24-epibrassinolid (EBL), má schopnost stimulovat různé metabolické procesy rostlin, jako je rychlost fotosyntézy, biosyntéza proteinů a nukleových kyselin. Dále může zvyšovat aktivitu ATPázy, fixaci oxidu uhličitého, aktivitu fosfoenol-pyruvátcarboxylázy a ribulóza-1,5-bisfosfátcarboxylázy. Podílí se na zvyšování výnosů zemědělských plodin, normálním růstu a vývoji rostlin. V nepříznivých podmínkách pomáhá zmiřňovat různé abiotické stresy včetně sucha, kde se účastní role v různých metabolických a fyziologických procesech. V rostlinách poškozených suchem, tak dokáže zlepšit celkový růst, strukturu buněčné stěny, obsah chlorofylu, výměnu dýchacích plynů, iontovou homeostázu. Zároveň zvyšuje aktivitu enzymatických antioxidantů, což vede ke snížení obsahu ROS a MDA v listech a kořenech rostlin (Gill et al., 2017; Tanveer et al., 2018).

Vliv epibrassinolidu na rajčata za působení sucha

Yuan et al. (2010) podrobili sazenice rajčat (*Lycopersicon esculentum*) Ailsa Craig (AC) a ABA-deficientní mutant notabilis (not) zkoumání vlivu brassinosteroidu na relativní obsah vody (RWC), vodivost průduchů, čistou rychlost fotosyntézy (PN), mezibuněčnou koncentraci CO₂, hladinu peroxidace lipidů, aktivitu antioxidačních enzymů a koncentraci kyseliny abscisové (ABA) během vodního stresu. Rostlin AC a not byly vystaveny absenci zálivky, přičemž byly ošetřeny 1 μM 24-epibrassinolidu (EBR). Kontrolní rostliny byly zalévány destilovanou vodou. Při vodním stresu došlo ke snížení vodivosti průduchů, RWC, PN a koncentraci mezibuněčného CO₂. Ošetření rostlin EBR významně zmírnilo účinky vodního stresu a zvýšilo RWC a PN. Naopak vodivost průduchů, koncentrace mezibuněčného CO₂ byla snížena.

Navíc aplikace EBR výrazně zvýšila aktivitu antioxidantních enzymů (katalázy, askorbátperoxidázy a superoxiddismutázy), přičemž se zároveň snížil obsah H₂O₂ a MDA. Koncentrace ABA v rostlinách AC a not byla po ošetření EBR výrazně zvýšená, zatímco zvyšující se míra a amplituda ABA byla u not rostlin významně nižší než AC. Zmírnění účinků sucha u sazenic rajčat může být tedy způsobeno zvýšením endogenní koncentrace ABA anebo aktivity antioxidantních enzymů prostřednictvím EBR.

2.5.2. Kyselina abscisová a její vliv na rostliny během působení stresu způsobeného nedostatkem vody

Kyselina abscisová (ABA) je klíčový isoprenoidní rostlinný hormon, který reguluje vývoj a růst rostlin. V nestresových podmínkách řídí fyziologické, biochemické a molekulární procesy v rostlinách. Zvýšený obsah této kyseliny reguluje senescenci, brání předčasnému klíčení, inhibuje růst do délky, a naopak stimuluje růst do šířky. Také se účastní regulací mnoha fyziologických mechanismů, vyvolaných podmínkami životního prostředí, které jsou založené na pozitivních a negativních interakcích ABA s jinými fytohormony, jako je auxin, giberelin, cytokinin, etylen, kyselina salicylová, brassinosteroidy, kyselina jasmonová. Stres vyvolaný nedostatkem vody vede ke zvýšení endogenní hladiny ABA, která spouští kaskádu signálních transdukčních drah, sestávajících se z fosfatáz, kináz, transkripčních faktorů a dalších regulačních prvků, jenž regulují řadu obranných mechanismů proti stresu včetně exprese genů a uzavření průduchů, což snižuje ztráty vody a omezuje transpiraci, která je však spojena s růstem a produktivitou, a to vede ke snížení výnosů plodin. S rostoucím vodním deficitem je biosyntéza ABA spouštěna sníženým vodním potenciálem nebo turgorem listů. Její koncentrace se zvyšuje ve všech listových pletivech. Při déle trvajícím suchu aktivuje řadu genů a specifických antistresových proteinů. Exogenní aplikace ABA může za působení vodního stresu snížit výšku růstu, celkovou biomasu a plochu listů, čistou fotosyntézu a průduchovou vodivost. Zároveň může zvýšit poměr kořene nad výhonem, specifickou listovou plochu, endogenní koncentraci ABA a efektivnější využívání vody. (Dar et al., 2017; Li et al., 2022; Ma et al., 2008; Mehrotra et al., 2014; Munemasa et al., 2015; Saradadevi et al., 2017; Parwez et al., 2022; Seidlová et al., 2008;).

Postřik ABA zmírňující stres ze sucha u rajčat

Je známo, že kyselina abscisová (ABA) a selen (Se) zmírňují účinek abiotického stresu, zejména sucha, u několika druhů rostlin. Byla publikována studie (Ramasamy et al., 2022) jejímž cílem bylo porovnat vliv postřiku roztoku ABA (0 a 100 μM) a selenu (0 a 50 μM) na listy rajčat, které byly pěstované za podmínek, které simulovaly stres ze sucha. Získané výsledky, jenž jsou založené na fyzikálně-chemickém a antioxidačním mechanismu zahrnujícím obranné enzymy, jako je kataláza, superoxidodismutáza, askorbátperoxidáza a glutathionreduktáza odhalily, že ve srovnání se selenem ABA potenciálně snížila stres ze sucha u rostlin rajčat. Ošetření sazenic ABA významně zlepšilo relativní obsah vody a hladiny chlorofylu ve srovnání s kontrolními rostlinami, což poukazuje na to, že ABA hraje zásadní roli při odstraňování stresu v podmínkách sucha. Navíc rajčata ošetřené ABA hromadily méně peroxidu vodíku ve srovnání s kontrolními rostlinami. To vypovídá o tom, že rostliny ošetřené ABA mají zesílené antioxidační mechanismy, pomocí kterých následně neutralizují peroxid vodíku. Co se týče hladiny prolinu, tak ta byla u ošetřených rostlin ve srovnání s kontrolou snížena, čímž se prokázalo snížení oxidačního stresu, který současně snižoval akumulaci prolinu. Celkově ABA chránila sazenice rajčat před oxidačním stresem vyvolaným suchem a podporovala růst a vývoj rostlin. Tato studie naznačuje, že postřik ABA na list je výhodný pro zvýšení vegetativního růstu rostlin rajčat za podmínek nedostatku vody.

Vliv kyseliny abscisové na sucho a chlad u sazenic rajčat

Vu et al. (2015) se rozhodli prozkoumat vliv kyseliny abscisové (ABA) na růst, toleranci abiotického stresu a fyziologii sazenic rajčat. Na sazenice bylo aplikováno šest koncentrací ABA (0, 10, 50, 100, 150 nebo 200 mg/l) postřikem na list jednou denně po dobu 10 dnů. Účinek počtu aplikací ABA byl studován jednou denně po dobu 1, 3, 5, 7 a 9 dnů při koncentraci 100 mg/l. Účinek ABA na fyziologii sazenic rajčat byl zkoumán při koncentraci 50 a 100 mg/l ve srovnání s kontrolou, jenž nebyla ošetřena ABA. Postřik ABA na list snížil růst sazenic rajčat v závislosti na koncentraci, nicméně nebyl pozorován žádný staticky významný rozdíl mezi ošetřeními v množství 50 a 100 mg/l. Růstové parametry postupně statisticky klesaly se zvyšujícím se počtem ošetření ABA, zároveň nebyl odhalen žádný rozdíl

mezi třetím a pátým dnem ošetření. Aplikace ABA zvýšila odolnost sazenic rajčat vůči chladu a suchu tím, že oddálila začátek bodu vadnutí v podmínkách sucha, snížila relativní únik iontů a index poškození chladem při nízké teplotě u všech ošetřených variant. Rychlost transpirace se významně snižovala, zatímco difúzní odpor průduchů se významně zvyšoval s rostoucí koncentrací ABA. Absence závlivky výrazně snížila relativní obsah vody, nicméně s rostoucí koncentrací ABA se naopak zvyšoval. ABA zlepšila toleranci sazenic rajčat vůči suchu tím, že oddálila čas začátku bodu vadnutí, přičemž u kontroly nastal třetí den a při ošetření 50 a 100 mg/l se projevil až pátý a sedmý den v daném pořadí. Výsledky naznačují, že ABA má schopnost udržovat kvalitu sazenic při nízkých teplotách a nedostatku vody.

Zvýšená tolerance vůči suchu prostřednictvím syntézy ABA a eliminací ROS u rajčat

Annexiny hrají zásadní roli v reakcích rostlin na stres a různých buněčných procesech. Ijaz et al. (2017) naklonovali gen AnnSp2 z divokého rajčete odolného vůči suchu (*Solanum pennellii*) a vložili ho do kultivovaných rajčat a funkčně ho charakterizovali. V jádře se nacházející protein AnnSp2 vykazoval vyšší expresi v listech, květech a plodech. Byl indukován několika fytohormony a některými abiotickými stresy. Rostliny nadměrně exprimující AnnSp2 měly zvýšenou toleranci vůči suchu či zasolení. AnnSp2-transgenní rostliny byly méně citlivé na ABA během klíčení semen. Vlivem působení stresu ze sucha se však obsah ABA významně zvýšil v rostlinách s nadměrnou expresí AnnSp2, to vedlo k uzavření průduchů a snížení ztráty vody, což je základem zvýšené tolerance rostlin ke stresu. V rostlinách s nadměrnou expresí AnnSp2 bylo pozorováno vychytávání ROS, byl pozorován vyšší celkový obsah chlorofylu, nižší hladiny peroxidace lipidů, zvýšená aktivita peroxidázy (včetně APX, CAT a SOD) a vyšší hladiny prolinu. Výsledky naznačují, že tyto transgenní rajčata exprimující AnnSp2 mají zvýšenou toleranci vůči suchu či zasolení prostřednictvím syntézy ABA a eliminace ROS.

Mechanismy H₂ a ABA zlepšující stres ze sucha u rajčat

Plynný vodík (H₂) a ABA regulují reakce rostlin na abiotické a biotické stresy. Mechanismy, kterými ABA a H₂ zlepšují stres rostlin suchem, jsou však nejasné, a proto se Yan et al. (2022) rozhodli zkoumat interakce mezi H₂ a ABA, přičemž byly

použity sazenice rajčat "Micro-Tom". Výsledky ukázaly, že voda bohatá na vodík (HRW) a ABA zvýšily výšku rostlin, průměr stonku a kořenovou aktivitu sazenic rajčat za působení stresu ze sucha, s optimálními koncentracemi 75 % a 150 μ M. Ošetření HRW a ABA dokázalo zvýšit toleranci vůči suchu zvýšením fotosyntézy, aktivity antioxidantních enzymů a genové exprese antioxidantních enzymů během působení stresu ze sucha. Fluridon (FLU), syntetický inhibitor ABA, významně snížil pozitivní účinky HRW, což naznačuje, že ABA může hrát klíčovou roli v H_2 posílené odolnosti sazenic rajčat vůči suchu. Ošetření polyethylenglykolem (PEG) + HRW zvýšilo oproti samotnému ošetření PEG obsah ABA o 18 %. Dále zjistili, že díky H_2 narostl endogenní obsah ABA zvýšením aktivit zeaxanthin epoxidázy (ZEP), 9-cis-epoxykarotenoid dioxygenázy (NCED) abscisic aldehydoxidázy (AAO) a expresí genů *SIZEP*, *SINCED* a *SIAAO*. Léčba PEG + HRW zvýšila aktivity ZEP a NCED, které byly o 13% a 40% vyšší než při léčbě PEG. Mezitím hladiny transkripce *SISnRK2* a *SIAREB* byly zvýšeny HRW nebo ABA během stresu způsobeného suchem, zatímco toto zvýšení bylo zvráceno FLU. Výsledky prokázaly, že H_2 je schopen zvýšit odolnost vůči suchu regulací biosyntézy ABA a expresí genů transdukce signálu ABA v sazenicích rajčat.

2.5.3. Kyselina jasmonová a její vliv na rostliny během působení stresu způsobeného nedostatkem vody

Přirozeně se vyskytující fytohormon kyselina jasmonová (JA) je považována za endogenní regulátor růstu a vývoje rostlin, jako je klíčení semen, tvorba bočních kořenů a vývoj květů ve stresových podmínkách. Patří mezi základní složky signální dráhy, které se účastní fyziologických a molekulárních reakcí během abiotického stresu. Fyziologické odpovědi často zahrnují regulaci otevírání a uzavírání průduchů aktivaci antioxidantního systému a akumulaci aminokyselin a rozpustných cukrů. Mezi molekulární reakce patří exprese genů spojených s JA, interakce s transkripčními faktory (TF) a synergické nebo antagonistické interakce s jinými rostlinnými hormony, zejména s kyselinou abscisovou (ABA), ethylenem (ET), kyselinou salicylovou (SA) anebo s kyselinou gibberelovou (GA), cytokininy a auxiny. Za aktivaci obranného mechanismu proti vodnímu deficitu je odpovědná JA. V důsledku působení sucha se rychle zvyšuje hladina endogenní JA, která se při dlouhodobém působení vodního stresu vrací na běžné koncentrace, nicméně vysoké

koncentrace mohou přispívat ke stárnutí listů. Dále reguluje ztráty vody pomocí uzavírání a otevírání stomat, exprimuje geny a TF související se suchem (Jang et al., 2020; Nazim et al., 2021; Per et al., 2018; Qiu et al., 2014; Wang et al., 2020).

Navíc exogenní aplikace JA na listy sóji vedla k výraznému zvýšení frakcionace (rozvrstvení) buněčné stěny, zvýšené hladině cukrů, fenolických sloučenin a flavonoidů (Mohamed et Latif, 2017). U rostlin rodu Brassica došlo po aplikaci JA ke zlepšení čerstvé hmotnosti, obsahu chlorofylu, relativní obsah vody v listech a zvýšení aktivity antioxidantních enzymů (Alam et al., 2014). U dvou kultivarů ječmene bylo dokázáno, že postřik JA snížil poškození membrán a zvýšil obsah ABA, zatímco hladiny prolinu a spermidinu zůstaly stejné. Zároveň nedostatek JA může hladiny ABA snížit. (Bandruska et al., 2003; De Ollas et al., 2013). Celkově tak může přispět ke zvýšené schopnosti tolerance vůči stresu z nedostatku vody u rostlin.

Interakce mezi ABA a JA za stresu z nedostatku vody

Spolupráce mezi hormony JA a ABA spouští fyziologické reakce, které mohou umožnit rostlinám zvýšit toleranci či odolnost vůči suchu. Koncentrace ABA se obvykle zvyšuje s poklesem stavu vody v pletivech, zatímco koncentrace JA kolísá a hromadí se zejména během počátečních fází stresu. ABA se účastní mnoha obraných mechanismů zlepšujících odolnost vůči suchu, které umožní růst a přežití rostlin, díky regulaci uzávěru průduchů či osmotickému přizpůsobení. Uzavřením průduchů, ale dochází k produkci cytosolických ROS. Jelikož bylo nejasné, zda JA může také přímo uzavírat průduchy, tak byl proveden pokus, při kterém se rostliny ošetřily inhibitorem ABA fluridonem. Bylo prokázáno, že exogenní aplikace methyl jasmonátu (MeJA) neměla při deficitu ABA na uzavření průduchů žádný vliv. To znamená, že JA reguluje rostlinné reakce na suchu prostřednictvím biosyntézy a akumulace ABA, cestami závislými a nezávislými na signalizaci ABA. JA je tedy charakterizována jako signální sloučenina, jejíž signalizace je závislá na interakci isoleucinové formy JA (JA-Ile) s receptorem COI1 uvolňujícím řadu molekulárních reakcí, přičemž tato interakce intereaguje s mnoha signalizačními složkami včetně proteinů JAZ a MYC₂ TF podílející se na genové expresi ABA. Nicméně se objevují i jemnější sítě biosyntézy ABA, a tedy signalizace vodního stresu / fyziologické

reakce, mezi které patří další hormony, jako je JA, ethylen, auxin, cytokinin a brassinosteroidy (De Ollas et Dodd, 2016; Hossain et al., 2011).

Účinky ABA, JA, PA a aktivity polyaminoxidázy v reakci na sucho u rajčat

Je známo, že fytohormony se v rostlinách podílejí na reakcích na stres ze sucha. Informace o regulačních účincích ABA a metabolismu volného polyaminu (PA) na akumulaci JA jsou však omezené, proto se rozhodli Zhang et Huang (2013) určit vztah mezi koncentracemi ABA, kyselinou jasmonovou (JA) a akumulací volných PA (putrescin, spermin a spermidin), jakož i s aktivitou polyaminoxidázy (PAO) v rajčatech (*Lycopersicon esculentum*M.). Sazenice byly pěstované hydroponicky pod tlakem sucha vyvolaným polyetylenglykolem. Dosáhli výsledků, které ukazují, že koncentrace endogenní ABA, JA a volných polyaminů a aktivita PAO byla v kořenech a listech ošetřených rajčat obecně vyšší než v neošetřených kontrolách. Zároveň zpozorovali významnou pozitivní korelaci $R = 0,708$ v kořenech a listech sazenic mezi koncentracemi endogenních polyaminů a aktivitou PAO. Experiment odhalil, že koncentrace ABA se zvyšuje v kořenech dříve než v listech, a proto při stresu ze sucha stimuluje vyšší koncentrace endogenního sperminu a spermidinu v kořenech a listech akumulaci endogenních ABA a JA se zvyšující se aktivitou PAO.

2.5.4. Vliv kyseliny salicylové na rostliny za účinku vodního stresu

Přírodně se vyskytující kyselina salicylová (SA) reguluje růst rostlin a podílí se na transdukci rostlinných signálů v reakci na biotické či abiotické stresy. Exogenní aplikace SA může ovlivnit mnoho fyziologických procesů, jako je klíčení semen, rychlost fotosyntézy, metabolismus ROS, osmotické přizpůsobení, růst rostlin, výnos plodů. Vysoké koncentrace SA mohou zmírnit nepříznivé účinky vodního stresu zlepšením vodního potenciálu s pozitivním dopadem na primární a sekundární metabolismus a obranné mechanismy. Zvýšení hladin endogenní SA také podporuje uzavření průduchů, které je pravděpodobně způsobeno tvorbou ROS, jenž jsou indukované právě SA. V důsledku nedostatku vody se obsah SA v rostlinách zvyšuje, navíc ošetřením SA se může zvyšovat obsah kyseliny abscisové a množství prolinu v listech. U rostlin *A. chilensis* zvyšuje aktivitu superoxid

dismutázy (SOD) a askorbát peroxidázy (APX), celkový obsah fenolů a antioxidační kapacitu současně se sníženým oxidačním stresem a zlepšuje produktivitu fotosyntézy a růst rostlin vystavených mírnému stresu způsobeného suchem. Naopak vysoké koncentrace aplikované SA vyvolávají vysoké úrovně oxidačního stresu, což vede ke snížené toleranci vůči abiotickým stresům. (Bandruska et al., 2005; Gonzalez-Villagra et al., 2022; Kang et al., 2014; Mirua et Tada, 2014; Zhang et al., 2020).

Vliv kyseliny salicylové na fyziologické a biochemické reakce v rajčatech za působení sucha

Galviz et al. (2021) zkoumali aplikaci SA za účelem zmírnění vlivu vodního deficitu během vegetativního růstu rajčete (*Solanum lycopersicum L.*). Rostliny byly pěstovány ve skleníku, kde byly zkoumány dvě varianty, a to rostliny ošetřené SA a neošetřené SA, přičemž při ošetření SA byla touto kyselinou impregnována semena, anebo zalévána roztokem SA 19 dní po vzejití semenáčků. Tyto varianty rajčat byly vystaveny působení nedostatku vody, a to při 20, 30, 40 a 100% kapacitě substrátu zadržujícího vodu, který byl aplikován 28. den po vzejití semenáčků po dobu pěti dnů. Vodní deficit inhiboval růst a fotosyntetickou aktivitu rostlin, nicméně zvýšil účinnost využití vody, aktivitu superoxid dismutázy, askorbát peroxidázy, katalázy a obsah MDA, peroxidu vodíku a osmolytů. Rajčata jejichž semena byla namočena do roztoku SA vykazovaly zvětšenou listovou plochu, suchou hmotnost kořene a poměr kořene/výhonků během působení sucha. Rostliny dobře zvlažované a ošetřené závlivkou SA měly zvýšenou rychlost asimilace CO₂ a vodivost průduchů. Experiment ukázal, že aplikace SA nezvýšila aktivitu antioxidačních enzymů, ale udržela se buněčná redoxní homeostáza, a to zvýšením obsahu prolinu a rozpustných cukrů degradovaných ze škrobu. Nicméně namáčení semen v roztoku SA může zmírnit škodlivé účinky a zachovat růst během vodního deficitu.

Kyselina salicylová poskytuje rajčatům toleranci vůči stresu ze sucha prostřednictvím selenu

Fan et al. (2022) sledovali vliv aplikace selenu (Se) na zmírnění stresu vyvolaného suchem u rajčat (*Solanum lycopersicum L.*) v závislosti na SA. Selen významně zvýšila čistou rychlost fotosyntézy, rychlost transpirace, vodivost průduchů a účinnost

využití vody při stresu způsobeného suchem. Dále významně potlačil zvýšení hladiny MDA, rozpustného cukru, prolinu v listech a akumulaci ROS. Následně byl aplikován inhibitor SA (1-aminobenzotriazol), který vyrušil účinek Se na odolnost vůči stresu ze sucha. Tyto výsledky experimentu naznačily, že aplikace Se podporuje fotosyntetickou účinnost a růst rostlin, zmírňuje oxidační stres a zvyšuje hladiny endogenního SA, čímž poskytuje rostlinám rajčat toleranci vůči stresu způsobeného suchem

Vliv kyseliny salicylové na zmírnění poškození buněk ROS a MDA v rajčatech za působení sucha

Jelikož je kyselina salicylová zajímavým poslem v metabolismu rostlin, který moduluje spoustu drah, včetně antioxidační obrany, stimulace anatomické struktury pro fixaci CO₂ během fotosyntézy. Proto byl proveden výzkum (Lobato et al., 2021), zda exogenní SA může zmírnit škodlivé účinky vodního deficitu, a to na výměnu biomasy a plynů, měření ROS, antioxidační enzymy, fotosyntetický aparát a na anatomické a morfologické znaky u rajčat. Byly použity varianty kontrola, vodní deficit, a dvě koncentrace SA (0 a 0,1 mM). Nedostatek vody negativně ovlivnil biomasu a počet plodů rostlin rajčat. Ošetření rostlin během vodního deficitu pomocí 0,1 mM SA vedlo ke zvýšení počtu plodů, hmotnosti a biomasy. Prostřednictvím SA, která stimulovala superoxid dismutázu (27,07 %), katalázu (17,81 %), askorbát peroxidázu (50,52 %) a peroxidázu (10,81 %), což vedlo ke snížení poškození buněk způsobeného MDA, únikem elektrolytu, superoxidem a peroxidem vodíku. Navíc aplikace SA zlepšila čistou rychlost fotosyntézy (84,55 %) a účinnost využití vody (65,00 %) u stresovaných rostlin v kombinaci se zlepšeným výkonem fotosystému II, prostřednictvím zlepšení anatomických výhod, jako je hustota průduchů, palisádový a houbový parenchym.

2.5.5. Auxin a jeho reakce na stres způsobený suchem

Na rozdíl od zvířat, jejichž tělesné plány jsou stanoveny během vývoje embrya, si rostliny udržují schopnost iniciovat nové orgány po celý svůj životní cyklus. Auxin je klíčovým regulátorem téměř všech aspektů vývoje rostlin, včetně morfogeneze, adaptivních reakcí, fototropizmu a gravitropizmu. Koncentrace auxinu v buňce ovlivňují, zda se buňka bude dělit, růst nebo diferencovat, a tím přispívá k tvorbě

orgánů, růstu a nakonec tvaru rostliny. Auxinové gradienty jsou vytvářeny a udržovány přesně regulovanou souhrou mezi metabolismem, signalizací a transportem. Auxin se syntetizuje především ve vrcholových pletivech stonku a v mladých rostoucích listech. Do ostatních částí rostliny je transportován. Podporuje větvení a tvorbu postranních kořenů a dominanci hlavního pupene, produkujícího více auxinu, nad spodními pupeny. Další funkcí auxinu je diferenciací vodivých pletiv, která usnadňuje tok fytohormonů a dalších látek rostlinou. Hlavním zástupcem auxinů je kyselina indol-3-octová (Casanova-Saez et Voss, 2019; Seidlová et al., 2008). Kyselina indol-3-octová (IAA) spolu s kyselinou abscisovou (ABA) působí synergicky na aklimatizační procesy rostlin, které jsou vyvolané suchem. Zejména se podílí na uzavírání průduchů, inhibici větvení výhonků, syntéze zásobních molekul, hydraulické vodivosti kořenů a tvorbě postranních kořenů (Moles et al., 2018). Je naznačeno, že může také existovat interakce mezi auxinem a SA, nicméně v reakci na biotický stres (Shi et al., 2014). Zároveň Du et al. (2013), že obsah endogenního IAA se u rýže vystavené stresu ze sucha postupně snižoval a mnoho genů zapojených do signalizace a biosyntézy IAA bylo změněno v souladu se změnou endogenní hladiny IAA.

Auxin a jeho reakce na stres způsobený suchem u rostlin *Arabidopsis*

Auxin je dobře známý rostlinný fytohormon, který se účastní mnoha procesů růstu rostlin a stresových reakcí. Proto Shi et al. (2014) sledovali reakce auxinu na stres ze sucha u rostlin *Arabidopsis*. Transgenní linie (*iaaM -OX*) s vyšší hladinou endogenní kyseliny indol-3-octové (IAA) a rostliny divokého typu (WT) předem ošetřené IAA vykazovaly zvýšenou odolnost vůči stresu ze sucha, zatímco trojitě mutanty (*yuc1yuc2yuc6*) s nižší endogenní hladinou IAA vykazovaly sníženou odolnost vůči stresu ve srovnání s neošetřenými rostlinami WT. Endogenní a exogenní auxin pozitivně moduloval hladiny exprese mnoha genů souvisejících s abiotickým stresem (*RAB18*, *RD22*, *RD29A*, *RD29B*, *DREB2A* a *DREB2B*), současně pozitivně ovlivnil metabolismus ROS a základní aktivitu antioxidantních enzymů. Navíc IAA významně moduloval některé metabolity uhlíku včetně aminokyselin, organických kyselin, cukrů, cukerných alkoholů a aromatických aminů. Dále endogenní a exogenní auxin pozitivně upravoval strukturální rozmístění kořenů,

zejména počet postranních kořenů. Studie prokázala, že auxin se může alespoň částečně podílet na odolnosti vůči stresu způsobeného suchem prostřednictvím regulace kořenové architektury, exprese genů reagujících na ABA, metabolismu ROS a homeostázy metabolismu.

Kyselina indol-3-octová moduluje metabolismus fytohormonů a polyaminů během vodního stresu

Kyselina abscisová (ABA) je nejvíce studovaným hormonem, který reaguje stres způsobený nepříznivými podmínkami životního prostředí. Existuje řada důkazů, že do těchto reakcí se zapojují např. i cytokininy, brassinosteroidy a auxiny. Spolupráce mezi různými fytohormony vede k synergickým nebo antagonistickým interakcím, které hrají zásadní roli v reakci rostlin na abiotický stres (Peleg et Blumwald, 2011). Proto se Li et al. (2018) rozhodli prozkoumat, zda endogenní kyselina indol-3-octová (IAA) ovlivňuje hladiny dalších fytohormonů a metabolismus polyaminů (PA) přispívajících k regulaci tolerance k vodnímu stresu u jetele bílého. Rostliny byly ošetřeny IAA nebo kyselinou L-2-aminooxy-3-fenylpropionovou (L-AOPP, inhibitor biosyntézy IAA) a poté vystaveny vodnímu stresu. Zvýšení hladiny endogenní IAA zvýšilo anabolismus PA prostřednictvím zlepšení aktivity enzymů a úrovně transkriptů genů včetně arginin dekarboxylázy, ornitin dekarboxylázy a S-adenosylmethionin dekarboxylázy. Exogenní aplikace IAA ovlivnila katabolismus PA, což se projevilo zvýšením aktivity diaminoxidázy a snížením polyaminoxidázy a exprese genů. Nedostatek vody běžně zvyšuje koncentraci ABA, zatímco dochází ke snížení obsahu cytokininu, gibberelinu a IAA. Nicméně nedostatek IAA snížil hladiny endogenních hormonů (GA, ABA a PA) a anabolismus PA spolu s poklesem antioxidační obrany a osmotické úpravy. Vliv IAA na hladiny endogenních hormonů později opět potvrdil Zhang et al. (2020), přičemž exogenní aplikace IAA významně zlepšila obsah ABA a JA a inhibitor IAA významně snížil obsah ABA, GA3 a JA. Li et al. (2018) dále potvrdili, že exogenní aplikace IAA účinně zmírnila vodním stresem vyvolané oxidační poškození, inhibici růstu, vodní deficit a stárnutí listů prostřednictvím udržení vyššího obsahu chlorofylu, osmotické úpravy, antioxidační obrany a nižší hladiny transkriptů markerových genů stárnutí *SAG101* a *SAG102*. v listech. Tyto výsledky naznačují, že IAA-indukovaná spolupráce mezi endogenními

hormony a PA by se mohla podílet na zlepšení antioxidační obrany a osmotických úprav, což zvýší toleranci vůči vodnímu stresu.

Auxinový reakční faktor SIARF4 zvyšuje toleranci vůči suchu u rajčat

Auxinový reakční faktor (ARF) hraje klíčovou roli při regulaci exprese genů reagujících na auxin. V rajčatech se nachází 24 genů ARF, které mají vliv na růst a vývoj rostlin, včetně plodů, vývoje kořenů, morfologie listů a zrání ovoce. Proto Chen et al. (2021) zkoumali vliv SIARF4 u rajčat při stresu ze sucha. Mutantní rostliny, u kterých byl vypnutý auxinový reakční faktor SIARF4 vykazovaly nápadné svinování listů směrem nahoru a tloušťku stonku významně větší než u rostlin divokého typu (WT). Kromě toho byla rychlost ztráty vody z mladých listů *arf4* rostlin nižší než u odpovídajících listů u rostlin WT, zatímco rychlost ztráty vody ve starších listech *arf4* byla vyšší než u odpovídajících listů u rostlin WT. Rostliny WT i *arf4*, které byly vystaveny vodnímu stresu projevovaly známky vadnutí dvanáctý den po zahájení dehydratace. Nicméně po 24 hodinách od opětovné rehydratace byly listy *arf4* rostlin opět vzpřímené, zatímco rostliny WT byly stále povadlé. Z morfologického hlediska se rostliny *arf4* v podstatě zotavily. Vodní deficit a exogenní aplikace kyseliny abscisové (ABA) snížily expresi *SIARF4*, který byl exprimován v cévních svazcích a ochranných buňkách rajčatových průduchů. Obsah MDA byl během vodního deficitu významně nižší u rostlin *arf4* než u rajčat WT, zároveň rostliny *arf4* vykazovali vyšší obsah antioxidačních látek, superoxiddismutázy, skutečné fotochemické účinnosti fotosystému II (PSII) a aktivitu katalázy. Výsledky potvrzují, že SIARF4 se podílí na růstu a vývoji rostlin rajčat. V případě deficitu vody se SIARF4 podílí na signálních drahách ABA regulací exprese *ABI5/ABF* a *SCL3* a ovlivňováním morfologie stomatu a vývoje cévních svazků s cílem zlepšit odolnost rostlin vůči vodnímu deficitu.

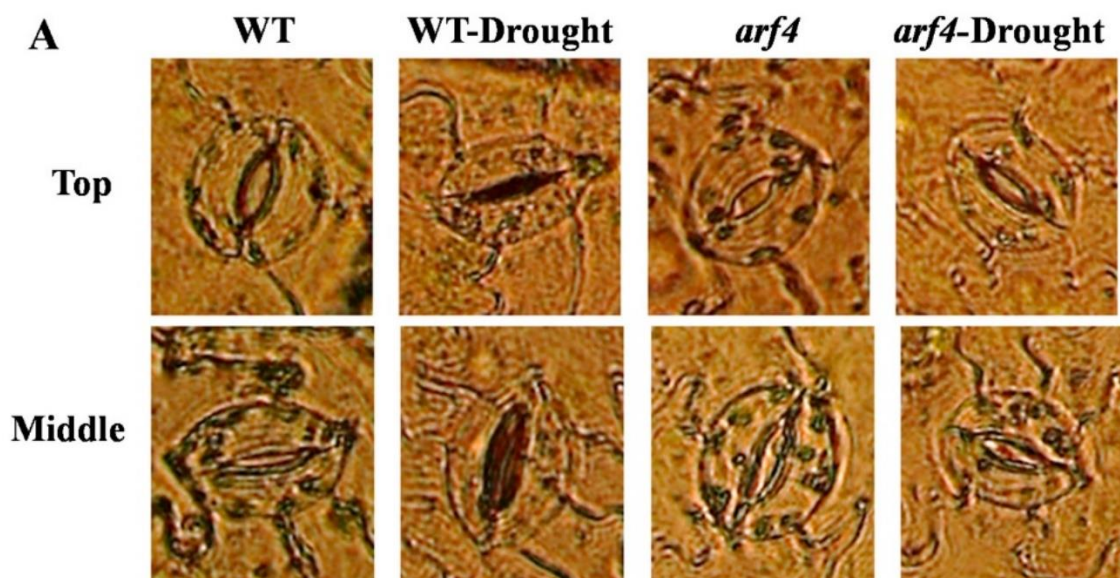
Rychlost klíčení

Chen et al. (2021) dalším testem ověřili vliv vodního deficitu na rychlost klíčení semen rajčat, a to pomocí různých koncentrací mannitolu rozpuštěného v MS médiu, které simulovaly vodní stres. Výsledky ukázaly, že čím vyšší je koncentrace mannitolu, tím nižší je rychlost klíčení semen WT, zatímco semena *arf4* si stále

udržovala vysokou rychlost klíčení i při 300 uM mannitolu, což bylo o 58 % vyšší než u semen WT. Současně rostliny *arf4* vykazovaly delší hypokotyly a kořeny. Dále byla sledována délka průduchů a ochranných buněk za podmínek vodního stresu.

Velikost průduchů

Chen et al. (2021) zjistili, že průduchy a ochranné buňky na horních listech rostlin *arf4* byly významně kratší a více zaoblené než na stejných listech u rostlin WT. Vodní stres vyvolal uzavření průduchů u rostlin WT, zatímco průduchy rostlin *arf4* se neuzavíraly normálně. Podobný vzhled vykazovaly průduchy ve středních listech rostlin *arf4*, byly širší a kulatější, zatímco průduchy rostlin WT se zdály být scvrklé vlivem vodního stresu. Absence SIARF4 změnila morfologii průduchů a zkrátila jejich délku průduchů, což vedlo k tomu, že se pod vlivem vodního deficitu neuzavíraly. Xylém dvouměsíčních rostlin rajčat WT a *arf4* vykazoval husté a kompaktní uspořádání při vodním stresu, přičemž xylém v *arf4* byl kompaktnější a rozsah xylému byl širší.



Obr. 2 Morfologie průduchů na epidermis listů rajčete (Chen et al., 2021)

Fyziologické a anatomické procesy za sucha

Hernandez-Espinoza et Barrios-Masias (2020) provedli experiment, kde hodnotili vliv nedostatku vody u rostlin rajčete v nepravidelně se opakujících cyklech sucha. Posouzena byla hydrostatická a osmotická hydraulická vodivost kořenových

systemů, průměr elementů xylému, vodní potenciál stonků, koncentrace kyseliny abscisové (ABA) v listech a vodivost průduchů. Rostliny vystavené suchu měly nižší kořenovou hydrostatickou vodivost o 36% a osmotickou hydraulickou vodivost o 65%. Oproti zavlažovaným rostlinám se zmenšily elementy xylému o 27% a celková plocha xylému o 57%. Počet cév xylému byl mezi oběma ošetřeními podobný. Nízký obsah vody v půdě zvýšil v listech koncentraci kyseliny abscisové (ABA) o více jak 65% u obou testovaných cyklů vůči suchu. Snížená vodivost průduchů se projevila u rostlin jak v prodloužených, tak v opakovaných podmínkách sucha. To mohlo ohrozit asimilaci uhlíku a snížit biomasu výhonků. V reakci na nedostatek vody vykazovaly rostliny rajčete sníženou hydraulickou vodivost kořenů a dlouhodobé anatomické změny kořenů.

Vliv dlouhodobého sucha na metabolickou odpověď u rajčat

Nedostatek vody spouští fyziologické, biochemické a molekulární změny v listech, které by mohly být důležité pro celkovou adaptační reakci rostlin a mohou ovlivnit výnos a kvalitu rajčat. Petrovic et al. (2021) se zabývali posouzením vlivu dlouhodobého mírného sucha na listy, kde byly vybrány čtyři druhy rajčat z populací MAGIC TOM, podle rozdílů ve velikosti plodů. Kontrolní rostliny a rostliny vystavené podmínkám nedostatku vody byly pěstovány ve skleníku. Vodivost průduchů byla více ovlivněna suchem u genotypů s velkými plody ve srovnání s genotypy malých plodů (třešňových rajčat), což mohlo souviset s vyšším obsahem kyseliny abscisové (ABA) v listech. Prostřednictvím důležitých adaptačních reakcí se genotypy cherry rajčat, ve srovnání s velkými plody, lépe vypořádaly s vodním stresem snížením plochy listů a zachováním fotochemické účinnosti. Akumulace rozpustných cukrů v genotypch rajčat třešňových a organických kyselin v listech genotypů větších plodů naznačila jejich roli v osmoregulaci a kontinuitu vzestupu/poklesu gradientu za stresových podmínek. Dlouhodobé mírné sucho vyvolalo zvýšenou expresi genu NCED ve všech čtyřech genotypch, která byla spojena s produkcí ABA. Zvýšená exprese genu ZEP byla zjištěna pouze u genotypu třešňových rajčat LA1420, což poukázalo na jeho možnou roli v ochraně před fotooxidačním stresem vyvolaným dlouhodobým vodním stresem. Navíc zvýšená exprese genů APX, vyšší akumulace vitamínu C a celková antioxidační kapacita v listech třešňových rajčat, zdůrazňuje

větší adaptivní reakci tohoto genotypu proti dlouhodobému stresu ze sucha ve srovnání s genotypy s většími plody.

Inhibice akumulace giberelinu umožňuje rajčatům vyhnout se působení sucha

Rostliny snižují transpiraci, aby se vyhnuly dehydrataci během období sucha uzavřením průduchů a inhibicí růstu zápoje. Dřívější studie naznačují, že nízká aktivita giberelinu (GA) podporuje tyto reakce. Shohat et al. (2021) zkoumali pomocí editace genomu, molekulárních, fyziologických a hormonálních analýz, zda sucho reguluje metabolismus GA (giberelin) v ochranných buňkách a listech rajčat (*Solanum lycopersicum*), a studoval, jak to ovlivňuje ztrátu vody. Nedostatek vody potlačoval expresi genů biosyntézy GA GA20 oxidázy1 (GA20ox1) a GA20ox2 a indukoval gen GA2ox7 deaktivující GA v ochranných buňkách a pletivech listů, což vedlo ke snížení hladiny bioaktivního GA. Toto působení bylo zprostředkováno drahami závislými a nezávislými na kyselině abscisové a transkripčním faktorem TINY1. Ztráta GA2ox7 oslabilu stomatální odpověď na nedostatek vody. Během dehydratace půdy uzavíraly rostliny rajčat ga2ox7 průduchy později, a proto vadly rychleji než divoký typ (WT) M82 cv. Mutace v GA20ox1 a GA20ox2 neměly žádný vliv na uzavření průduchů, ale vykazovaly nižší ztráty vody v důsledku menších ploch listů na vrcholech mutantních rostlin. Výsledky naznačují, že deaktivace GA vyvolaná suchem v ochranných buňkách přispívá k uzavření průduchů v ranných fázích dehydratace půdy, zatímco inhibice syntézy GA v listech potlačuje růst zápoje a omezuje oblast transpirace menších ploch listů na vrcholech rostlin.

3. Metodika experimentu

Pro tuto experimentální práci byl zvolen krátkodobý nádobový pokus v délce jednoho vegetačního období, pro který byly vybrány rostliny z čeledi *Solanaceae*, jenž byly pěstovány v růstové komoře nebo-li Fytotronu. U rostlin byl sledován vliv dehydratace a opětovné rehydratace v průběhu čtrnácti dnů. Rostliny byly rozděleny do čtyř variant, přičemž dvě varianty byly ošetřeny fytohormony. Pozornost byla věnována obraným mechanismům proti nedostatku vody, zejména pozorování dynamiky fytohormonů a vybraných markerů stresu.

3.1. Rostlinný materiál

Pro experiment byl vybrán rostlinný materiál druhu balkónových rajčat *Solanum lycopersicum* odrůdy VILMA od značky Hobby Garden. Rajčata byla vyseta 10. února roku 2021 do sadbovačů. Pro výsev byl použit výsevní substrát se supresivním účinkem od značky Agro. Přesazení mladých rostlinek do pokusných nádob proběhlo 5. března roku 2021. Kultivace probíhala v pěstební komoře Fytotron na přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Podmínky, které měly simulovat den, byly nastaveny na teplotu 25 °C, přičemž osvětlení se spouštělo od páté hodiny ráno a vypínalo se v devět hodin večer. Podmínky, které představovaly noc, byly nastaveny na teplotu 20 °C, přičemž osvětlení bylo vypnuto od deváté večerní hodiny až do páté hodiny ráno. Vlhkost vzduchu byla nastavena na 60 % a rostliny byly pravidelně obden zalévány odstátou kohoutkovou vodou.

3.2. Příprava experimentu

Jakmile dosáhly rostliny vhodné velikosti, tak mohla hlavní část experimentu započít. Každá pokusná nádoba obsahovala pět vzrostlých balkónových rajčat. Nádoby byly rozděleny do čtyř variant, které byly označeny následovně. První nádoba byla pojmenována Kontrola, jednalo se o rostliny, které nebyly vystaveny působení vodního stresu a ani na ně nebyly aplikovány látky hormonální povahy. Měly sloužit jako vzor při porovnávání s ostatními variantami. Druhá nádoba byla označena ABA, kde bylo na rostliny aplikováno 150 μM kyseliny abscisové. Po aplikaci hormonů byla varianta vystavena působení sucha. Třetí varianta byla označena EBL, kde bylo na rostliny aplikováno 3 μM epibrassinolidu. Poté byla

varianta opět vystavena působení sucha. Poslední čtvrtá varianta byla pojmenována Sucho, přičemž na rostliny nebyly aplikovány žádné látky hormonální povahy a byly pouze vystaveny absenci závlivky. Za pomoci rozprašovače v pokusných nádobách 2 a 3 proběhla aplikace hormonů ve formě postřiku na list 16. dubna roku 2021. Tentýž den byly naposledy zality nádoby 2, 3 a 4. Pouze první varianta tedy Kontrola byla stále pravidelně obden zalévána 4x500 ml odstáté kohoutkové vody.



Obr. 3 Varianta Kontrola balkonových rajčat před experimentem, rostliny jsou ve velmi dobrém stavu [16.04.2021] (foto Janoušek, 2021)



Obr. 4 Varianta ABA+sucho balkónových rajčat před experimentem, rostliny jsou ve velmi dobrém stavu [16.04.2021] (foto Janoušek, 2021)



Obr. 5 Varianta EPI+sucho balkónových rajčat před experimentem, rostliny jsou ve velmi dobrém stavu [16.04.2021] (foto Janoušek, 2021)



Obr. 6 Varianta Sucho balkónových rajčat před experimentem, rostliny jsou ve velmi dobrém stavu [16.04.2021] (foto Janoušek, 2021)

3.3. Odběr vzorků a analýzy

Samotný odběr vzorků započal 18. dubna ve stavu dehydratace. Ze všech čtyř variant, z každé rostliny v pokusné nádobě, byly postupně odebírány vzorky listů. Za účelem stanovení superoxidového radikálu, malondialdehydu a prolinu bylo nutné vytvořit přesnou navážku, jenž byla pro správné stanovení jednotlivých stresových markerů nezbytná. Z každé nádoby bylo tedy získáno patnáct vzorků pro analýzy, které byly provedeny na přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Zároveň byly odebírány vzorky listů v navážce 0,1 g čerstvé hmotnosti, které byly po každém odběru ukládány do hluboce mrazícího boxu při teplotě -80 °C. Tyto vzorky byly později převezeny na analýzu fytohormonů do Ústavu experimentální botaniky – Laboratoře hormonálních regulací u rostlin v Praze. Navážky pro vlastní analýzu bylo nutné rozetřít ve vychlazené třecí misce s pomocí křemičitého písku. Ke stanovení superoxidového radikálu bylo nutné navážít 0,1 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu a napipetovat k navážce 2 ml fosfátového pufru, a poté rozetřít. Pro malondialdehyd utřít 0,2 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu s 2 ml 0,1% TCA. A na stanovení prolinu utřít navážku 0,3 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu společně s 5 ml 3% SSA. Po těchto základních

úpravách následovaly další kroky, které zahrnovaly mísení s dalšími chemikáliemi, centrifugaci, zahřívání a ochlazování vzorků, jenž jsou podrobně vysvětleny dále. Závěrečná fáze analýz zahrnovala měření absorpance jednotlivých markerů pomocí spektrofotometru, kde bylo nutné přednastavit pro specifický metabolit určitou vlnovou délku. Toto se opakovalo 20. a 22. dubna v průběhu dehydratace. Opětovná rehydratace byla provedena u všech čtyř variant 22. dubna po odběru jednotlivých vzorků. Následující dny 24., 26. a 28. dubna se pokračovalo v odběru vzorků a jejich analýze. Pokusné rostliny v nádobách 2, 3 a 4 již zalévány nebyly, ale Kontrola byla pravidelně obden zalévána 4x500 ml odstátou kohoutkovou vodou v průběhu celého experimentu.

3.4. Seznam použitých pomůcek, chemikálií a přístrojů

Pomůcky: pokusné nádoby, třecí miska s tloučkem, kádinky, zkumavky 1,5 ml a 15 ml, stojan na zkumavky, automatické pipety + špičky, skleněné tyčinky, chemická lžička, Petriho misky

Chemikálie a roztoky:

Fosfátový pufr (smícháním zásobních roztoků K_2HPO_4 a KH_2PO_4 v poměru 1:1)

10 mM hydroxylamin (0,165 ml 50% hydroxylaminu s 250 ml destilované vody)

17mM sulfanilamid (0,732 g sulfanilamidu ve 250 ml destilované vody)

7 mM α -naftylamin (0,251 g α -naftylaminu ve 250 ml destilované vody)

Dietyléteru

0,1% TCA (0,1 g kyseliny trichloroctové ve 100 ml destilované vody)

0,5% TBA v 20% TCA (20 g kyseliny trichloroctové ve 100 ml destilované vody a přidá se 0,5 g kyseliny 2-tiobarbiturové)

3% SSA (3 g kyseliny sulfosalicylové ve 100 ml destilované vody)

6 M H_3PO_4 (40,5 ml 85% H_3PO_4 s 59,5 ml destilované vody)

kyselý ninhydrin (1,25 g ninhydrinu za zvýšené teploty ve 30 ml ledové kyseliny octové a 20 ml 6 M H_3PO_4)

kyselina octová

toulen

křemičitý písek

Přístroje:

Analytické váhy

Blokový ohříváč

Centrifuga

Fytotron

Chladnička

Hlubokomrazící box

Spektrofotometr

Sušárna

Třepačka

3.5. Stanovení stresových markerů

Při přípravě vzorků a stanovení množství superoxidového radikálu, malondialdehydu a prolinu se postupovalo dle certifikované metodiky: Certifikovaná metodika odolnosti ovocných plodin k suchu v in vitro podmínkách (Jiroutková et Kovalíková, 2020).

Stanovení superoxidového radikálu

Ve vychlazené třecí misce se rozetře 0,1 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu s 2 ml fosfátového pufru. Připravený homogenát se přesune do 1,5 ml mikrozkuhavky a centrifuguje se 15 minut při 14000 rpm a teplotě 4 °C. Následně se k 250 µl fosfátového pufru přidá 30 µl hydroxylaminu a 300 µl supernatantu homogenátu. Směs se promíchá a nechá se 15 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Poté se přidá 300 µl sulfanylmidu a po promíchání se inkubuje 15 minut při laboratorní teplotě. V dalším kroku se přidá 300 µl naftylaminu a po promíchání se opět inkubuje 15 minut při laboratorní teplotě. Na závěr se přidá 300 µl dietyléteru. Výsledná reakční směs je světle- až tmavě růžové barvy v závislosti na obsahu vytvořeného dusitanu. Zároveň je připravován slepý vzorek.

Stanovení malondialdehydu

Ve třecí misce se utře 0,2 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu s 2 ml 0,1% TCA. Vzniklý homogenát se přenesse do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifuguje 15 minut při 14000 rpm a teplotě 20 °C. K 0,5 ml supernatantu se následně přidá 1,5 ml 0,5% TBA v 20% TCA. Směs se promíchá a nechá se 30 minut inkubovat v sušárně při teplotě 90 °C. Poté se zkumavky prudce ochladí ve vodě s ledovou drtí. Vzorky se opět centrifugují 15 minut při 14000 rpm a teplotě 20 °C. Ve slepém vzorku, který je připravován souběžně, se vzorek nahradí 0,1% TCA o objemu 0,5 ml. Zároveň je připravován slepý vzorek.

Stanovení prolinu

Ve třecí misce se utře 0,3 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu s 5 ml 3% SSA. Takto připravený homogenát se přenesse do 15 ml zkumavky a centrifuguje 20 minut při 4500 rpm a teplotě 20 °C. Ke 2 ml vzniklého supernatantu se přidá 2 ml ledové kyseliny octové a 2 ml kyselého ninhydrinu. Směs se promíchá a nechá se 1 hodinu inkubovat ve vodní lázni při teplotě 90-100 °C. Poté se zkumavky prudce ochladí ve vodě s ledovou drtí na teplotu cca 25 °C. Po ochlazení se přidají 3 ml toluenu a směs se důkladně 20x protřepe.

Měření absorpance

Superoxidový radikál

V slepém vzorku, který se připravuje souběžně, se vzorek nahradí fosfátovým pufrem o objemu 300 µl. Pomocí spektrofotometru se změří absorpance výsledné směsi ve skleněné kyvetě při vlnové délce 530 nm. Jako standard pro sestavení kalibrační křivky se použije NaNO₂ o různé koncentraci. Poustupuje se stejně, jako při samotné analýze, pouze se vzorek nahradí roztokem 300 µl standardu o různé koncentraci. Obsah superoxidového radikálu se vyjádří jako µg radikálu na 1 gram čerstvé hmotnosti.

Malondialdehyd

Ve spektrofotometru se ve skleněné kyvetě změří absorpance při 532 nm (komplex MDA-TBA) a 600 nm (korekce nespecifického zákalu). Ve slepém vzorku, který je připravován souběžně, se vzorek nahradí 0,1% TCA o objemu 0,5 ml. Obsah MDA

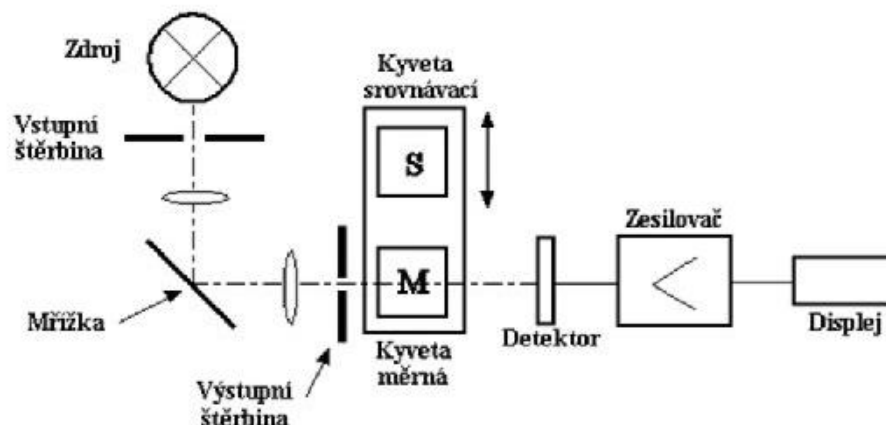
resp. TBARS se určí jako rozdíl absorbancí $A_{532} - A_{600}$ s použitím molového absorpčního koeficientu $155 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Výsledky na základě známého ředění vyjádříme jako $\mu\text{mol MDA}$ na g čerstvé hmotnosti.

Prolin

Absorbance vrchní toluenové vrstvy se změří při vlnové délce 520 nm. Jako slepý vzorek se použije čistý toluen a jako standard pro sestavení kalibrační křivky se použije prolin o různé koncentraci. Poustupuje se stejně, vzorek se nahradí roztokem standardu o různé koncentraci. Celkový obsah prolinu se na závěr vyjádří jako $\mu\text{mol prolinu}$ na g čerstvé hmotnosti.

Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je jednou z nejrozšířenějších analytických technik díky své jednoduchosti, spolehlivosti a nízké ceně instrumentace jak pro přímá měření, tak ve spojení s dalšími technikami nebo procesy, jako je chromatografie, elektroforéza a průtoková analýza (Rocha et Teixeira, 2004). Tato metoda je první volbou při analýze látek, které jsou samy barevné nebo mohou reagovat za tvorby barevného produktu. Vidíme-li 2 roztoky stejné látky o různé intenzitě zbarvení, automaticky předpokládáme, že tmavší roztok je více koncentrovaný. Tento předpoklad je vlastně podstatou spektrofotometrie. Koncentraci roztoků zjistíme na základě, kolik světla roztoky projde. Roztok absorbuje část světla, které ním projde, a proto je intenzita paprsku vstupujícího vyšší než intenzita paprsku prošlého. Množství procházejícího světla můžeme analyzovat spektrofotometrem na principu molekulové absorpční spektrofotometrie. Měření se provádí vždy v identické kyvetě, aby byly dodrženy stejné podmínky. Nejprve se změří blank, čímž se nastaví nulová absorbance roztoku blanku, přičemž se získá „baseline“ pro měření všech standardů i vzorků. Tato „baseline“ musí zůstat stejná po celou dobu měření. Blank obsahuje jen reagenční směs bez analyzovaného vzorku. Roztok blanku může být i barevný. Spektrofotometr umožňuje měřit absorbance až do 2,5, vzorky s vyšší absorbancí se musí ředit a výsledek násobit faktorem ředění (Subhanová, 2018).



Obr. 7 Schéma spektrofotometru (dostupné z WWW: < [C 6200 Biochemick metody 08 Celektronov spektra molekul \(slidetodoc.com\)](http://www.c6200.biochemickemetody08.celektronovspektramolekul.slidetodoc.com)>)

Pojmy ve spektrofotometrii

Absorbance – množství světla pohlceného měřeným roztokem

Absorpce světla – pohlcení a zeslabení záření při průchodu měřeným roztokem

Absorpční spektrum – závislost absorbance na vlnové délce

Atest – známá hodnota standardu, stanovená nezávislou metodikou

Auxochrom – skupina atomů s volným elektronovým párem, která zvyšuje absorpci chromoforu

Blank (slepý vzorek) – roztok obsahující všechny složky kromě analyzovaného vzorku

Chromofor – seskupení atomů v molekule, která způsobuje absorpci v UV-VIS oblasti

Kalibrační křivka – závislost absorbance na koncentraci

Standard – vzorek analytu o známé koncentraci dané atestem

Transmitance – propustnost - poměr intenzity záření prošlého vzorkem a záření vstupujícího do vzorku

UV-VIS – ultrafialová a viditelná část elektromagnetického spektra

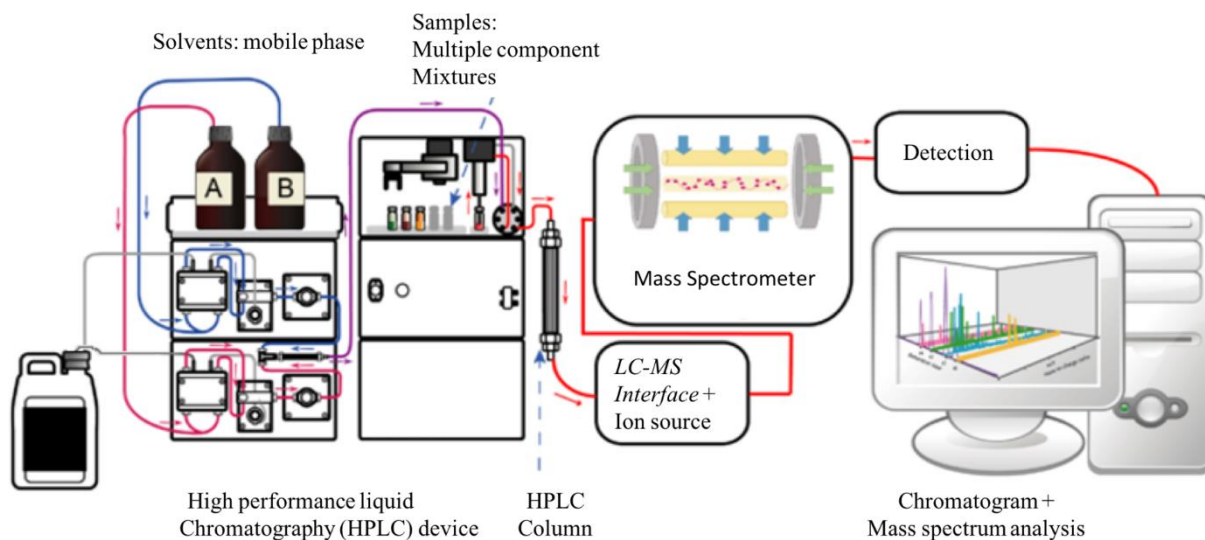
(Subhanová, 2018)

3.6. Analýza fytohormonů

Na základě spolupráce provedl analýzu fytohormonů Ústav experimentální botaniky – Laboratoř hormonálních regulací u rostlin v Praze pomocí analýzy LC/MS (Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií).

Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS)

LC-MS je analytická metoda, která využívá k oddělení složek směsi kapalinový chromatograf a k jejich následné analýze hmotnostní spektrofotometr. Kapalinový chromatograf odděluje jednotlivé složky směsi, přičemž následně hmotnostní spektrometr analyzuje jejich strukturu s vysokou specifitou a citlivostí. Aparatura LC-MS obsahuje zařízení, které přeměňuje látky oddělené pomocí LC na zdroje iontů pro MS. Pomocí tohoto rozhraní přecházejí vzorky z mobilní fáze, kterou je stlačená kapalina, do hmotnostního spektrometru, ve kterém je tlak okolo 10^{-4} Pa. Je nezbytné, aby se přenesla co nejvyšší část analytů a co možná nejméně mobilní fáze a přitom nedošlo ke změně jejich chemických vlastností. Rovněž by nemělo působit na ionizátor či vakuum uvnitř hmotnostního spektrometru. Nejčastěji používané rozhraní pro LC/MS jsou založeny na elektrosprejové ionizaci, chemické ionizaci za atmosférického tlaku nebo fotoionizaci za atmosférického tlaku. Touto metodou se analyzují biochemické, organické i anorganické látky v biologických vzorcích nebo vzorcích ze životního prostředí. Uplatnění využití má v mnoha oblastech, jako jsou biotechnologie, výroba léčiv či agrochemie (Dass, 2006; Chaimbault, 2014; Niessen, 2006; Pitt, 2009).



Obr. 8 Schéma kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (dostupné z WWW: < [Liquid Chromatography Mass Spectrometer - Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií – Wikipedie \(wikipedia.org\)](http://www.wikipedia.org/wiki/Liquid_Chromatography_Mass_Spectrometer)>)

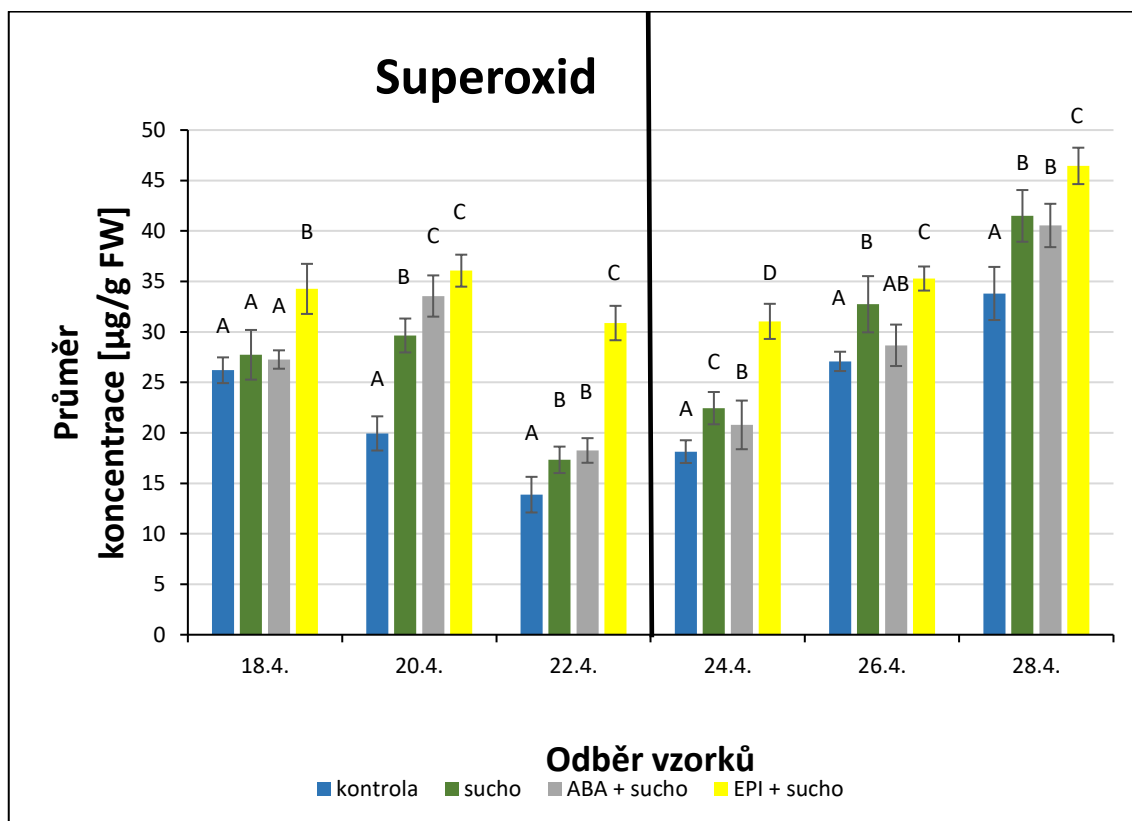
3.7. Statistické zpracování dat

Výsledky koncentrace jsou u superoxidu uvedeny v $\mu\text{g/g}$ FW (čerstvé hmotnosti), prolinu v $\mu\text{mol/g}$ FW, MDA (manlondialdehydu) v $\mu\text{mol/g}$ FW a fytohormonů v pmol/g FW. Ze získaných hodnot byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka (standardní chyba průměru). Tato data byla v programu Microsoft Excel přehledně uspořádaná do tabulek a grafů. Naměřené hodnoty byly v témže programu zpracovány pomocí Analytických nástrojů, konkrétně analýzy rozptylu (ANOVA), která je založena na hodnocení vztahů mezi rozptyly porovnávaných výběrových souborů, přičemž hladina významnosti byla stanovena na 95% ($p = 0,05$). Pokud byla hodnota p nižší než 0,05, znamenalo to, že mezi hodnotami existují průkazné rozdíly. Nejprve byly porovnávány hodnoty mezi první variantou a druhou, třetí, čtvrtou, poté mezi variantou druhou a třetí, čtvrtou a naposled mezi třetí a čtvrtou. Toto se opakovalo pro každý z šesti dnů, kdy byly odebírány vzorky. Dále byla vypočítána korelace mezi sledovanými markery, markery a fytohormony a mezi fytohormony navzájem. Korelace, které vycházely na základě kritických hodnot Pearsonova korelačního koeficientu při hladině významnosti 0,05, byly významné.

4. Výsledky

4.1. Obsah superoxidu

Změny obsahu superoxidu jsou znázorněny v grafu č. 1



Graf č. 1: **Obsah superoxidu v rostlinách u jednotlivých variant** (hodnoty označené stejným písmenem se výrazně neliší dle hodnot P, kde A, B, C, D - $P \leq 0,05$)

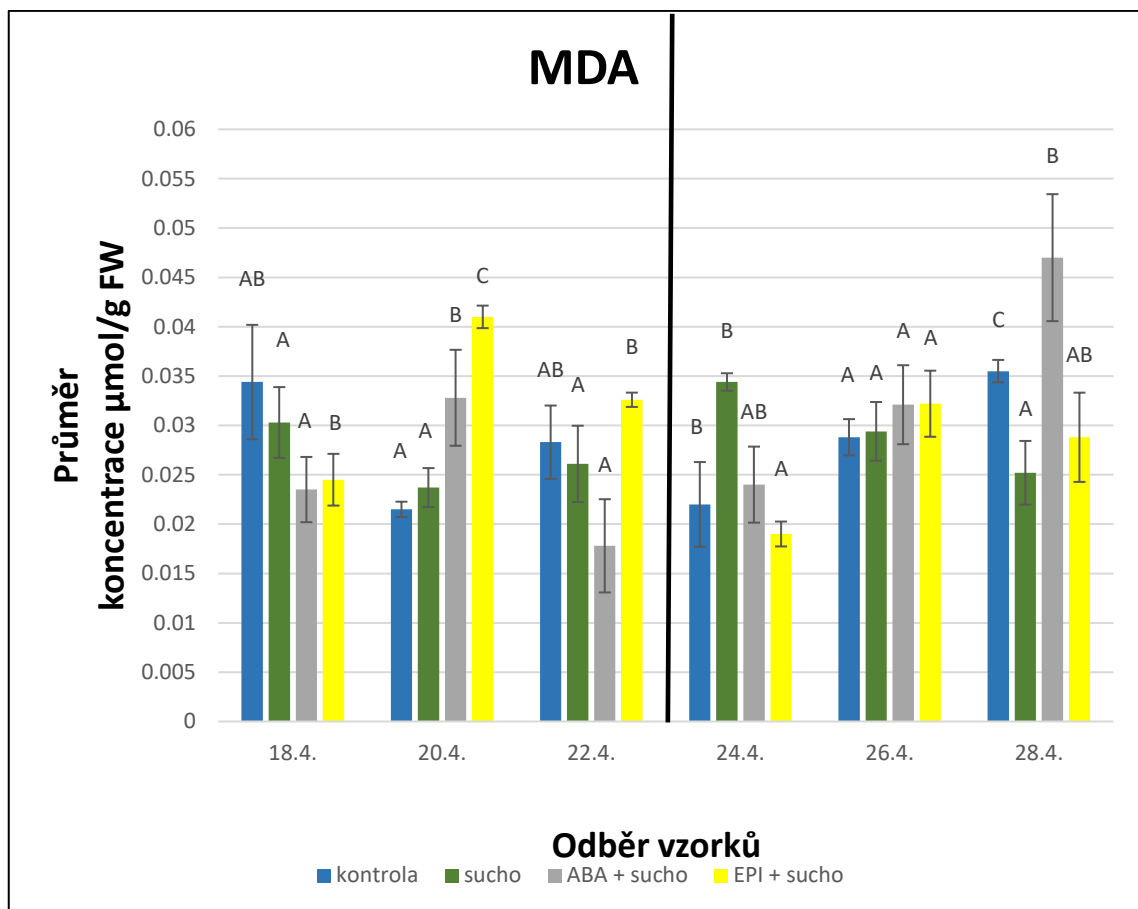
Nejvyšší průměrný obsah superoxidu ze všech 6 odběrů mají všechny sloupce s variantou EPI+sucho. Naopak nejnižší průměrný obsah superoxidu ze všech 6 odběrů vlastní všechny sloupce s kontrolními rostlinami. V období dehydratace dosáhl aritmetický průměr nejvyšší hodnoty 20. dubna u varianty EPI+sucho ($36,0693 \mu\text{g/g FW}$), a po rehydrataci ($46,4478 \mu\text{g/g FW}$) opět u varianty EPI+sucho 28. dubna. Nejnižší naměřené průměry byly u kontrolních rostlin, během dehydratace 22. dubna ($13,8769 \mu\text{g/g FW}$), a po rehydrataci 24. dubna ($18,1395 \mu\text{g/g FW}$). Průměr superoxidu se během dehydratace zvýšil, a to druhý den odběru 20. dubna u stresovaných variant, poté klesal a po rehydrataci začal vzrůstat u všech variant. Hodnoty jsou graficky znázorněny v grafu č. 1. Chybové úsečky označují

standardní chybu průměru. Konkrétní naměřené hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky jsou obsaženy v tabulce č. 2 viz přílohy.

Dále byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti 5 % (konkrétní P hodnoty lze nalézt v příloze v tabulce č. 9) mezi variantou Kontrola a variantami Sucho, ABA+sucho a EPI+sucho. Dále mezi variantou Sucho a variantami ABA+sucho a EPI+sucho a naposled mezi variantou ABA+sucho a variantou EPI+sucho. U prvního odběru 18. dubna vyšla analýza rozptylu průkazně mezi variantami Kontrola a EPI+sucho, dále mezi variantou Sucho a EPI+sucho a nakonec mezi variantami ABA+sucho a EPI+sucho. U druhého odběru 20. dubna byla prokázána statistická významnost mezi všemi variantami. U třetího odběru 22. dubna byla prokázána statistická významnost mezi všemi variantami kromě Sucha a ABA+sucho. U čtvrtého odběru 24. dubna byla opět prokázána statistická významnost mezi všemi variantami kromě Sucha a ABA+sucho. U pátého odběru byla analýza rozptylu prokázána mezi všemi variantami, kromě variant Kontrola a ABA+sucho a variant Sucho a EPI+sucho. U posledního šestého odběru byla statistická významnost prokázána mezi všemi variantami, kromě varianty Sucho a variantami ABA+sucho a EPI+sucho.

4.2. Obsah malondialdehydu

Změny obsahu malondialdehydu jsou znázorněny v grafu č. 2



Graf č. 2: **Obsah malondialdehydu v rostlinách u jednotlivých variant** (hodnoty označené stejným písmenem se výrazně neliší dle hodnot P, kde A, B, C, D - $P \leq 0,05$)

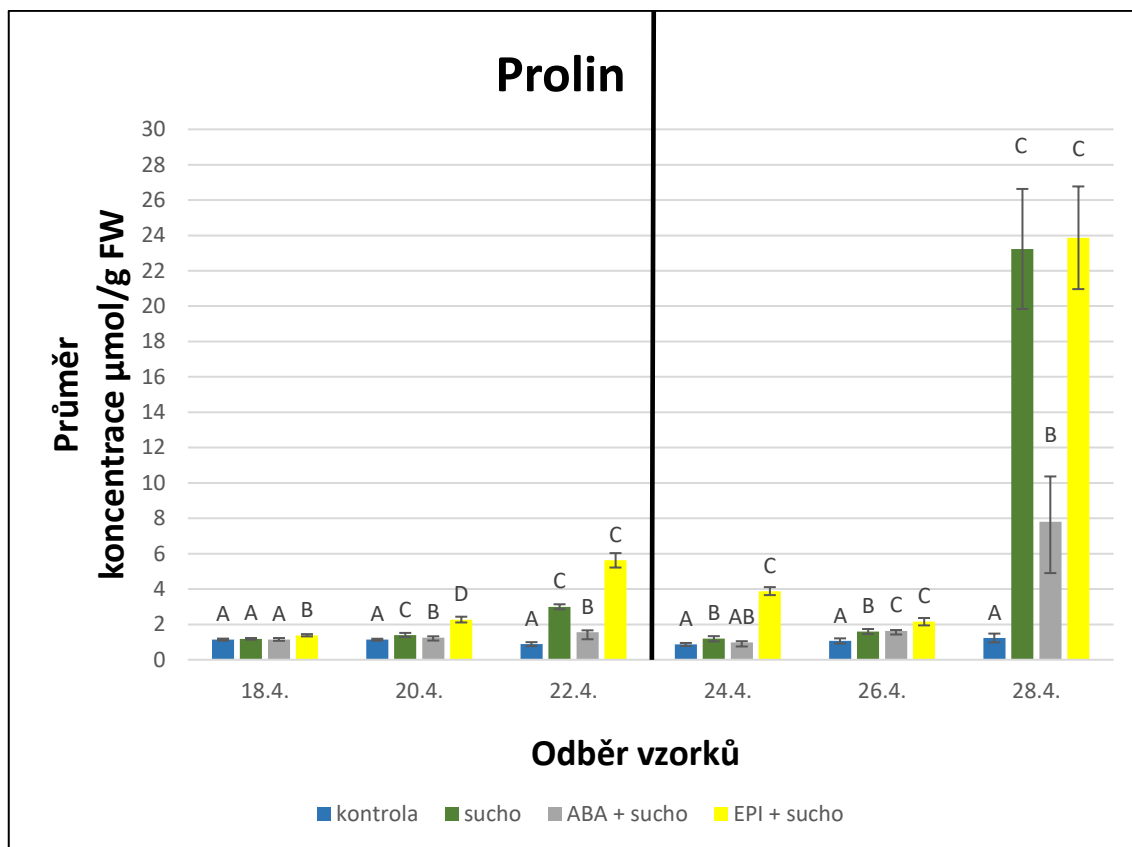
V období dehydratace dosáhl aritmetický průměr MDA nejvyšší hodnoty 20. dubna u varianty EPI+sucho (0,041 $\mu\text{mol/g FW}$). Nejnižší hodnota průměru dosahovala (0,0178 $\mu\text{mol/g FW}$) 22. dubna u varianty ABA+sucho. Aritmetický průměr MDA po rehydrataci dosahoval nejvyšší hodnoty 28. dubna u varianty ABA+sucho (0,047 $\mu\text{mol/g FW}$), naopak nejnižší hodnoty dosahoval 24. dubna u varianty EPI+sucho (0,019 $\mu\text{mol/g FW}$). Z grafu vyplývá, že průměrné hodnoty MDA značně kolísaly a výrazně se odlišovaly při každém měření. Průměry varianty Sucho mimo 18. dubna stoupaly během dehydratace až do rehydratace, přičemž po ní dosáhly maxima, následně klesaly. Průměry varianty ABA+sucho během dehydratace kolísaly, nicméně po rehydrataci postupně stoupaly. Průměry EPI+sucho mimo 18. dubna postupně klesaly, přičemž po rehydrataci klesl významně a následně opět vzrostly. Hodnoty jsou graficky znázorněny v grafu č. 2. Chybové úsečky označují standardní

chybu průměru. Konkrétní naměřené hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky jsou obsaženy v tabulce č. 3 viz přílohy.

Dále byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti 5 % (konkrétní P hodnoty lze nalézt v příloze v tabulce č. 10) mezi variantou Kontrola a variantami Sucho, ABA+sucho a EPI+sucho. Dále mezi variantou Sucho a variantami ABA+sucho a EPI+sucho a naposled mezi variantou ABA+sucho a variantou EPI+sucho. U prvního odběru 18. dubna vyšla analýza rozptylu průkazně mezi všemi variantami, kromě variant Kontrola a Sucho, a dále mezi variantou ABA+sucho a EPI+sucho. U druhého odběru 20. dubna byla statistická významnost mezi všemi variantami, kromě variant Kontrola a Sucho. U třetího odběru 22. dubna byla opět prokázána statistická významnost mezi všemi variantami, kromě variant Kontrola a Sucho. U čtvrtého odběru 24. dubna nebyla prokázána statistická významnost mezi Kontrolou a variantami ABA+sucho a EPI+sucho, u ostatních kombinací vyšla průkazně. U pátého odběru 26. dubna nebyla analýza rozptylu prokázána ani mezi jednou kombinací variant. U posledního šestého odběru 28. dubna byla statistická významnost prokázána mezi všemi variantami, kromě kombinací variant Kontrola a EPI+sucho a kombinací Sucho + EPI+sucho.

4.3. Obsah prolinu

Změny obsahu prolinu jsou znázorněny v grafu č. 3



Graf č. 3: **Obsah prolinu v rostlinách u jednotlivých variant** (hodnoty označené stejným písmenem se výrazně neliší dle hodnot P, kde A, B, C, D - $P \leq 0,05$)

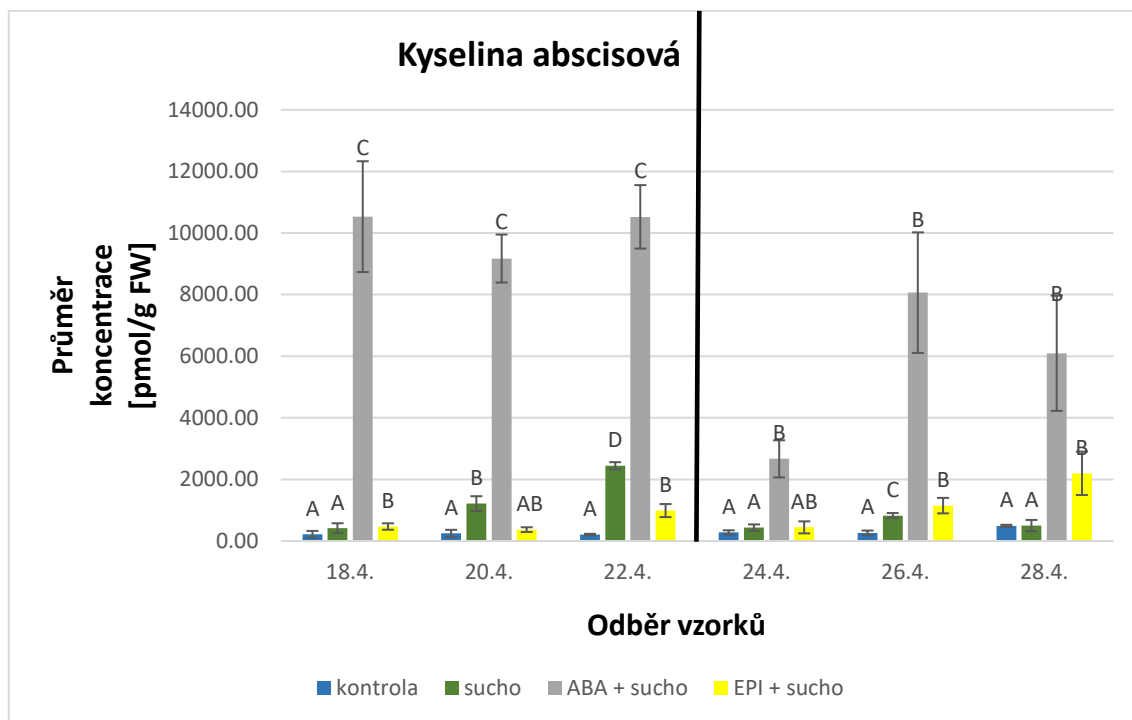
Aritmetický průměr prolinu během dehydratace dosáhl nejvyšší hodnoty 22. dubna u varianty EPI+sucho ($5,6236 \mu\text{mol/g FW}$), naopak nejnižšího průměru dosáhl u kontroly v tomtéž odběru ($0,8842 \mu\text{mol/g FW}$). V období po rehydrataci měl nejvyšší hodnotu průměru sloupec varianty EPI+sucho ($23,8676 \mu\text{mol/g FW}$) 28. dubna. Z grafu je patrné, že tentýž den odběru výrazně převyšují hodnoty průměrů variant Sucho a EPI+sucho ostatní hodnoty průměrů jednotlivých variant v předešlých odběrech. Sloupec s Kontrolou odběru 24. dubna dosahoval po rehydrataci nejnižšího průměru ($0,8661 \mu\text{mol/g FW}$). Graf naznačuje, že s rostoucí dehydratací se obsah prolinu zvyšoval u všech variant mimo kontrolu, druhý den po rehydrataci jeho hladiny klesly, nicméně poté se začaly opět zvyšovat. Enormních hodnot dosahovaly průměry poslední den odběru v porovnání s ostatními odběry. Hodnoty jsou graficky znázorněny v grafu č. 3. Chybové úsečky označují standardní

chybu průměru. Konkrétní naměřené hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky jsou obsaženy v tabulce č. 4 viz přílohy.

Dále byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti 5 % (konkrétní P hodnoty lze nalézt v příloze v tabulce č. 11) mezi variantou Kontrola a variantami Sucho, ABA+sucho a EPI+sucho. Dále mezi variantou Sucho a variantami ABA+sucho a EPI+sucho a naposled mezi variantou ABA+sucho a variantou EPI+sucho. U prvního odběru 18. dubna vyšla analýza rozptylu průkazně mezi kombinacemi Kontrola a EPI+sucho, Sucho a EPI+sucho a nakonec mezi ABA+sucho a EPI+sucho. U druhého odběru 20. dubna byla prokázána statistická významnost mezi všemi variantami. U třetího odběru 22. dubna byla opět prokázána statistická významnost mezi všemi variantami. U čtvrtého odběru 24. dubna nebyla prokázána statistická významnost mezi Kontrolou a ABA+sucho, u ostatních kombinací vyšla průkazně. U pátého odběru 26. dubna nebyla analýza rozptylu prokázána mezi kombinací Sucho a ABA+sucho, u všech ostatních vyšla průkazně. U posledního šestého odběru 28. dubna byla statistická významnost prokázána mezi všemi variantami, kromě kombinace variant Sucho + EPI+sucho.

4.4. Obsah kyseliny abscisové

Změny obsahu kyseliny abscisové jsou znázorněny v grafu č. 4



Graf č. 2: **Obsah kyseliny abscisové v rostlinách u jednotlivých variant** (hodnoty označené stejným písmenem se výrazně neliší dle hodnot P, kde A, B, C, D - $P \leq 0,05$)

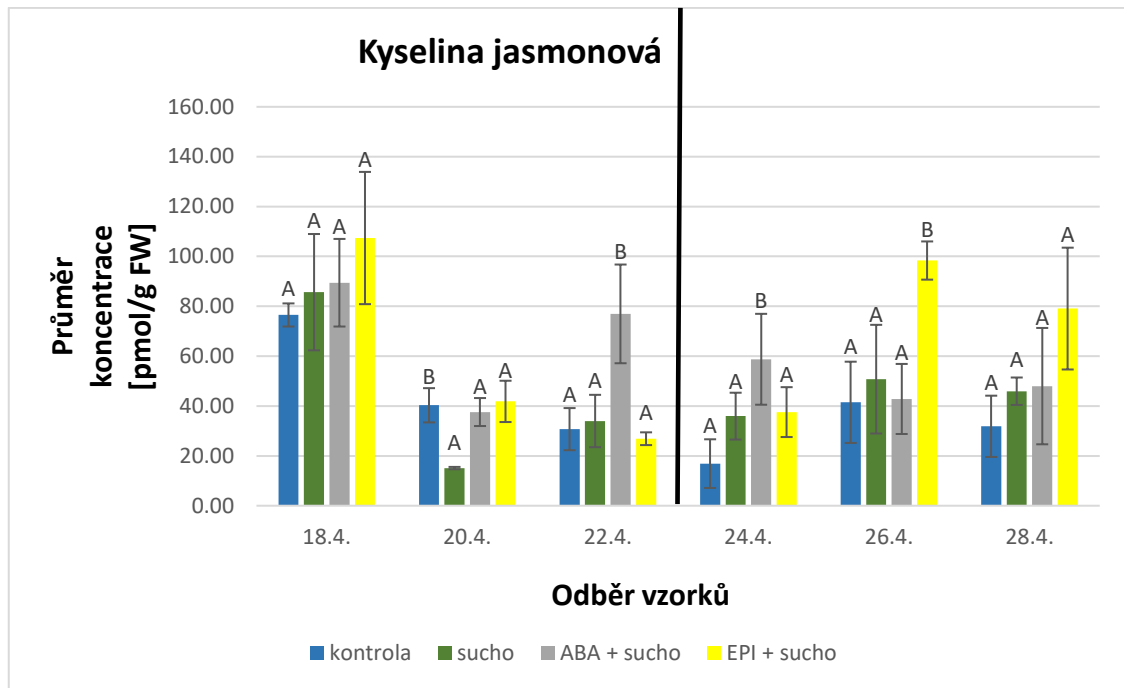
Aritmetický průměr obsahu kyseliny abscisové (ABA) dosahoval nejvyšší hodnoty během dehydratace 18. dubna u varianty ABA+sucho (10531,15 pmol/g FW), nejnižší hodnota průměru během dehydratace byla zjištěna u varianty Kontrola 22. dubna (210,74 pmol/g FW). Nejvyšší hodnota aritmetického průměru po rehydrataci dosahovala 26. dubna varianta ABA+sucho (8064,25 pmol/g FW), u téhož odběru byla zjištěna nejnižší hodnota průměru po rehydrataci u varianty Kontrola (264,93 pmol/g FW). Z grafu jednoznačně vyplývá, že nejvyšší obsah kyseliny abscisové obsahovala varianta ABA+sucho. Zároveň k nejvyššímu nárůstu ABA došlo během dehydratace, druhý den po rehydrataci se její průměrný obsah razantně snížil, nicméně v následujících odběrech opět stoupal. U varianty Sucho průměrný obsah ABA postupně vzrůstal s prohlubující se dehydratací, druhý den po rehydrataci se snížil, a poté se již nijak významně nezvyšoval. U Varianty EPI+sucho dosahoval průměrný obsah ABA během dehydratace menších hodnot oproti jmenovaným variantám, významnější vzrůst byl zaznamenán až po rehydrataci při pátém a šestém odběru. Hodnoty jsou graficky znázorněny v grafu č. 5. Chybové

úsečky označují standardní chybu průměru. Konkrétní naměřené hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky jsou obsaženy v tabulce č. 4 viz přílohy.

Dále byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti 5 % (konkrétní P hodnoty lze nalézt v příloze v tabulce č. 12) mezi variantou Kontrola a variantami Sucho, ABA+sucho a EPI+sucho. Dále mezi variantou Sucho a variantami ABA+sucho a EPI+sucho a naposled mezi variantou ABA+sucho a variantou EPI+sucho. U prvního odběru 18. dubna vyšla analýza rozptylu průkazně mezi všemi variantami, kromě kombinace Kontrola a Sucho a kombinace Sucho a EPI+sucho. U druhého odběru 20. dubna byla prokázána statistická významnost mezi všemi variantami, kromě kombinace variant Kontrola a EPI+sucho. U třetího odběru 22. dubna byla prokázána statistická významnost mezi všemi variantami. U čtvrtého odběru 24. dubna byla prokázána statistická významnost mezi Kontrolou a ABA+sucho, dále mezi variantami Sucho a ABA+sucho a nakonec mezi ABA+sucho a EPI+sucho. U pátého odběru 26. dubna nebyla analýza rozptylu prokázána mezi kombinací ABA+sucho a EPI+sucho, u všech ostatních vyšla průkazně. U posledního šestého odběru 28. dubna byla statistická významnost prokázána mezi všemi variantami, kromě kombinace variant Kontrola a Sucho.

4.5. Obsah kyseliny jasmonové

Změny obsahu kyseliny jasmonové jsou znázorněny v grafu č. 5



Graf č. 2: **Obsah kyseliny jasmonové v rostlinách u jednotlivých variant** (hodnoty označené stejným písmenem se výrazně neliší dle hodnot P, kde A, B, C, D - $P \leq 0,05$)

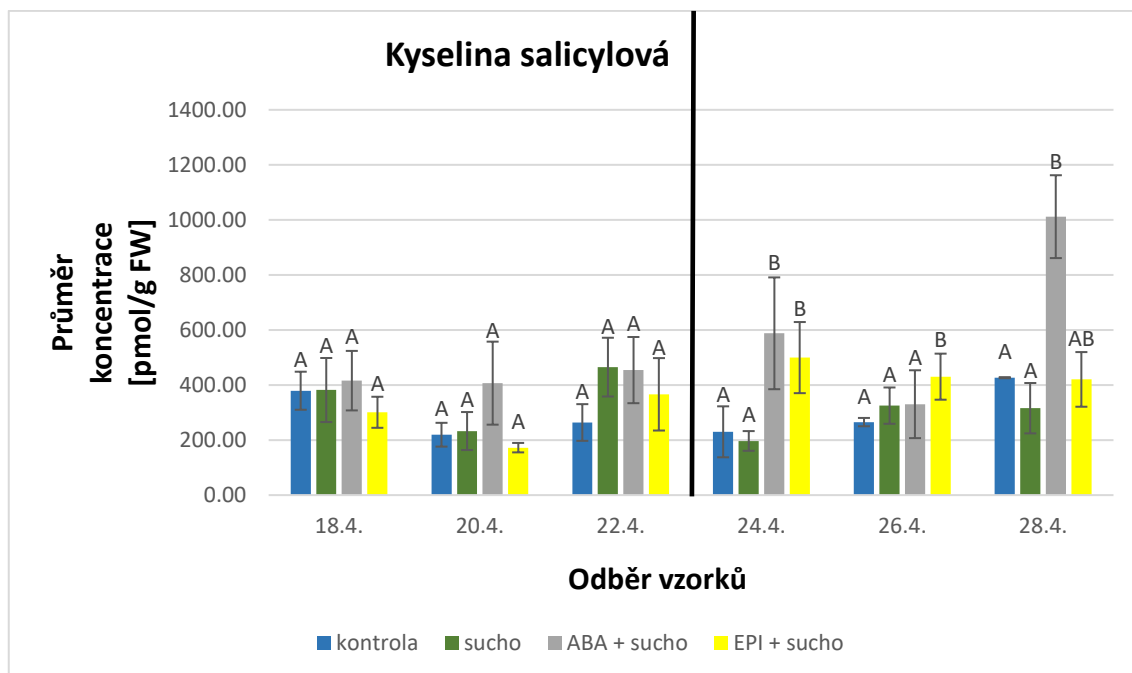
Nejvyšší aritmetický průměr obsahu kyseliny jasmonové (JA) během dehydratace byl zjištěn při prvním odběru 18. dubna u varianty EPI+sucho (107,37 pmol/g FW), naopak nejnižší průměrný obsah JA během dehydratace byl zjištěn při druhém odběru 20. dubna u varianty Sucho, který dosahoval hodnoty (15,10 pmol/g FW). Nejvyšší průměr obsahu JA po rehydrataci byl objeven u varianty EPI+sucho při pátém odběru 26. dubna, který dosahoval hodnoty (98,35 pmol/g FW). Nejnižší průměr vykazovala Kontrola druhý den po rehydrataci 24. dubna, zde dosahoval hodnoty (16,89 pmol/g FW). Nejvyšší průměry obsahu JA vykazovaly všechny varianty během prvního odběru 18. dubna, poté výrazně klesly, přičemž před rehydratací 22. dubna výrazně převažoval průměr u varianty ABA+sucho nad ostatními, následně po rehydrataci se postupně snižoval. U varianty Sucho dosahoval průměr obsahu JA první den odběru 18. dubna nejvyšší hodnoty, poté razantně klesl a kromě hodnot z 20. dubna dosahoval během experimentu podobných hodnot, které se nijak významně nelišily. Varianta EPI+sucho dosahovala nejvyššího průměru JA první den odběru, a poté klesal až do

rehydratace, po které se průměr JA začal opět zvyšovat, přičemž svým průměrem významně převyšoval ostatní varianty, a to 26. dubna a 28. dubna. Hodnoty jsou graficky znázorněny v grafu č. 5. Chybové úsečky označují standardní chybu průměru. Konkrétní naměřené hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky jsou obsaženy v tabulce č. 6 viz přílohy.

Dále byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti 5 % (konkrétní P hodnoty lze nalézt v příloze v tabulce č. 13) mezi variantou Kontrola a variantami Sucho, ABA+sucho a EPI+sucho. Dále mezi variantou Sucho a variantami ABA+sucho a EPI+sucho a naposled mezi variantou ABA+sucho a variantou EPI+sucho. U prvního odběru 18. dubna nebyla analýza rozptylu prokázána mezi žádnou kombinací variant. U druhého odběru 20. dubna byla prokázána statistická významnost mezi variantami Kontrola a Sucho, dále Sucho a ABA+sucho a nakonec Sucho a EPI+sucho. U třetího odběru 22. dubna byla prokázána statistická významnost mezi variantami Kontrola a ABA+sucho, dále Sucho a ABA+sucho a nakonec ABA+sucho a EPI+sucho. U čtvrtého odběru 24. dubna byla prokázána statistická významnost pouze mezi kombinací variant Kontrola a ABA+sucho. U pátého odběru 26. dubna byla analýza rozptylu prokázána mezi kombinací variant Kontrola a EPI+sucho, dále Sucho a EPI+sucho a nakonec ABA+sucho a EPI+sucho. U posledního šestého odběru 28. dubna nebyla statistická významnost prokázána ani mezi jednou z uvedených variant.

4.6. Obsah kyseliny salicylové

Změny obsahu kyseliny salicylové jsou znázorněny v grafu č. 4



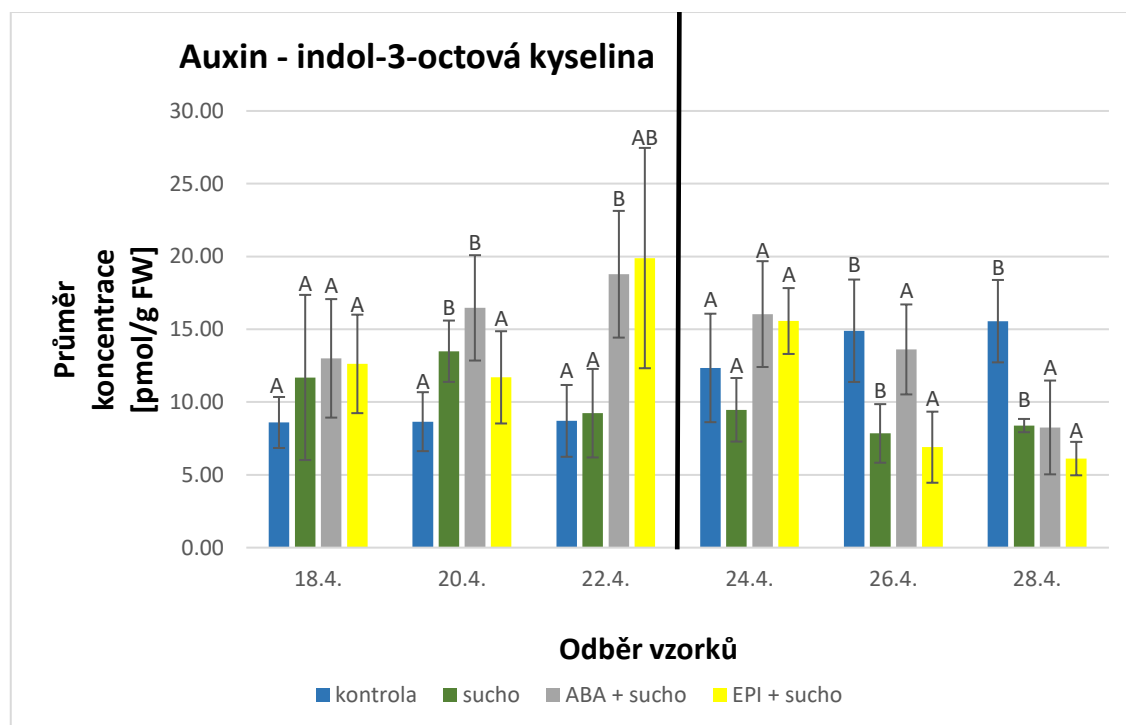
Graf č. 2: **Obsah kyseliny salicylové v rostlinách u jednotlivých variant** (hodnoty označené stejným písmenem se výrazně neliší dle hodnot P, kde A, B, C, D - $P \leq 0,05$)

Nejvyšší aritmetický průměr kyseliny salicylové (SA) během dehydratace byl zjištěn u odběru z 22. dubna, a to u varianty Sucho, kde dosahoval hodnoty (465,09 pmol/g FW), naopak nejnižší průměr během dehydratace byl zaznamenán 20. dubna u varianty EPI+sucho (172,44 pmol/g FW). Nejvyšší průměr po rehydrataci z 28. dubna dosahoval u varianty ABA+sucho hodnot (1011,77 pmol/g FW). Nejnižší průměr po rehydrataci vykazovala varianta Sucho z 24. dubna, kde dosáhl hodnoty (196,87 pmol/g FW). Průměry obsahu SA u varianty Sucho se pravidelně během měření zvyšovaly a snižovaly, přičemž výrazné snížení přišlo po rehydrataci. Průměry obsahu SA u varianty ABA+sucho se během dehydratace příliš nelišily, nicméně rehydratace zapříčinila jejich zvýšení. U varianty EPI+sucho se průměry obsahu SA během dehydratace mimo 20. dubna zvyšovaly, přičemž maxima dosáhly druhý den po rehydrataci 24. dubna, poté se průměry postupně snižovaly. Hodnoty jsou graficky znázorněny v grafu č. 6. Chybové úsečky označují standardní chybu průměru. Konkrétní naměřené hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky jsou obsaženy v tabulce č. 7 viz přílohy.

Dále byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti 5 % (konkrétní P hodnoty lze nalézt v příloze v tabulce č. 14) mezi variantou Kontrola a variantami Sucho, ABA+sucho a EPI+sucho. Dále mezi variantou Sucho a variantami ABA+sucho a EPI+sucho a naposled mezi variantou ABA+sucho a variantou EPI+sucho. U prvního odběru 18. dubna nebyla analýza rozptylu prokázána mezi žádnou kombinací variant. U druhého odběru 20. dubna nebyla prokázána statistická významnost ani mezi jednou z variant. U třetího odběru 22. dubna nebyla prokázána statistická významnost ani mezi jednou z variant. U čtvrtého odběru 24. dubna nebyla prokázána statistická významnost mezi kombinací variant Kontrola a Sucho a kombinací ABA+sucho a EPI+sucho, u všech ostatních variant prokázána byla. U pátého odběru 26. dubna byla analýza rozptylu prokázána pouze mezi kombinací variant Kontrola a EPI+sucho. U posledního šestého odběru 28. dubna byla prokázána statistická významnost mezi variantami Kontrola a ABA+sucho, dále Sucho a ABA+sucho a nakonec ABA+sucho a EPI+sucho.

4.7. Obsah auxinu

Změny obsahu kyseliny indol-3-octové jsou znázorněny v grafu č. 4



Graf č. 2: **Obsah auxinu v rostlinách u jednotlivých variant** (hodnoty označené stejným písmenem se výrazně neliší dle hodnot P, kde A, B, C, D - $P \leq 0,05$)

Nejvyšší hodnota aritmetického průměru auxinu během dehydratace byla zjištěna 22. dubna u varianty EPI+sucho, kde dosahovala hodnoty (19,89 pmol/g FW), naopak nejnižší byla zjištěna první den měření 18. dubna u varianty Kontrola s hodnotu (8,60 pmol/g FW). Nejvyšší hodnota průměru auxinu po rehydrataci byla zaznamenána 24. dubna u varianty ABA+sucho (16,04 pmol/g FW). Nejnižší hodnota průměru auxinu se vyskytuje u varianty EPI+sucho v poslední den odběru 28. dubna, kde hodnota dosáhla (6,12 pmol/g FW). U druhé varianty Sucho se průměry obsahů auxinu během dehydratace snížily, přičemž rehydratace přinesla zanedbatelné zvýšení, které bylo následováno snižováním průměrů. U varianty ABA+sucho se průměry zvyšovaly od prvního dne odběru 18. dubna, přičemž maxima dosáhl 22. dubna, a i přes rehydrataci se průměry začaly snižovat až do posledního dne odběru. Průměry auxinu u varianty EPI+sucho první dva odběry kolísaly, přičemž od dosažení maxima v období dehydratace 22. dubna se průměry i přes vliv rehydratace snižovaly. Hodnoty jsou graficky znázorněny v grafu č. 7. Chybové úsečky označují standardní chybu průměru. Konkrétní naměřené hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky jsou obsaženy v tabulce č. 8 viz přílohy.

Dále byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti 5 % (konkrétní P hodnoty lze nalézt v příloze v tabulce č. 15) mezi variantou Kontrola a variantami Sucho, ABA+sucho a EPI+sucho. Dále mezi variantou Sucho a variantami ABA+sucho a EPI+sucho a naposled mezi variantou ABA+sucho a variantou EPI+sucho. U prvního odběru 18. dubna nebyla analýza rozptylu prokázána mezi žádnou kombinací variant. U druhého odběru 20. dubna byla prokázána statistická významnost mezi variantami Kontrola a Sucho, dále Sucho a ABA+sucho. U třetího odběru 22. dubna byla prokázána statistická významnost mezi variantami Kontrola a ABA+sucho, dále Sucho a ABA+sucho. U čtvrtého odběru 24. dubna byla prokázána statistická významnost pouze mezi kombinací variant Sucho a EPI+sucho. U pátého odběru 26. dubna byla analýza rozptylu prokázána mezi kombinací variant Kontrola a Sucho, dále Kontrola a EPI+sucho a nakonec ABA+sucho a EPI+sucho. U posledního šestého odběru 28. dubna byla statistická významnost prokázána mezi variantou Kontrola a Sucho, dále Kontrola a EPI+sucho a nakonec mezi kombinací variant Sucho a EPI+sucho.

4.8. Korelační analýza

Následovala korelační analýza. Nejprve byla spočítána korelace mezi stresovými markery a fytohormony, poté mezi fytohormony. Korelace vyšla pozitivně mezi superoxidem a SA, dále pozitivně mezi MDA a SA a záporně mezi MDA a IAA, poté záporně mezi prolinem a IAA. Co se týče hormonů, tak pozitivně vyšla korelace mezi ABA a SA, dále pozitivně mezi ABA a IAA. Nicméně u významných korelací se nepodařilo prokázat regresí.

Tabulka č.1: Korelace mezi stresovými markery a fytohormony a fytohormony navzájem

	superoxid	MDA	prolin	ABA	JA	SA	IAA
superoxid		X	X	X	X	0.233644	X
MDA	X		X	X	X	0.276103	-0.24325
Prolin	X	X		X	X	X	-0.32765
ABA	X	X	X		X	0.342522	0.276967
JA	X	X	X	X		X	X
SA	0.233644	0.276103	X	0.342522	X		X
IAA	X	-0.24325	-0.32765	0.276967	X	X	

5. Diskuze

Tato experimentální práce se zaměřila na stresové markery a fytohormony v rostlinách rajčat produkované vlivem dehydratace a následné rehydratace. Rostlinný materiál byl analyzován na obsah superoxidu, malondialdehydu, prolinu, kyseliny abscisové, kyseliny jasmonové, kyseliny salicylové a auxinu kyseliny indol-3-octové.

5.1. Změny v hodnotách superoxidu a malondialdehydu vyvolané dehydratací a následnou rehydratací

Superoxid, řadící se mezi ROS, je považován za vedlejší produkty fotosyntézy a dýchání, jenž vzniká v buněčných kompartmentech, jak popisuje Das et al. (2015). K tomuto hromadění ROS dochází během nepříznivých podmínek, mezi které se řadí i sucho, což uvádí Schneider (2019). Zároveň s rostoucím obsahem ROS dochází k nárůstu MDA, přičemž tento metabolit naznačuje, že došlo k poškození rostlin (Zhang et al., 2021). Oproti kontrole došlo u varianty Sucho k nárůstu superoxidového radikálu stejně jako uvádí Zhou et al. (2019), avšak u obsahu MDA se naše výsledky rozcházejí, neboť v případě našeho experimentu byly hodnoty MDA nižší, než u Kontroly, kromě výrazného nárůstu druhý den po rehydrataci. Proto se naše výsledky neshodují ani s experimentem u cherry rajčat provedeným Hassan et al. (2015). U varianty ABA+sucho byly hodnoty superoxidu vyšší než u kontroly a převážně vyšší než u varianty Sucho. Naopak Ijaz et al. (2017) uvádí, že se v rajčatech zvýšil obsah ABA, který napomohl eliminaci ROS zvýšením aktivity antioxidantních enzymů. Tento mechanismus obrany zřejmě mohl být posílen vneseným genem AnnSp2, který v tomto experimentu nebyl využit. Nicméně po následné rehydrataci došlo ke snížení hladin superoxidu vůči variantě Sucho, což může vypovídat o tom, že zvýšené hodnoty ABA zvýšily aktivitu antioxidantních mechanismů v porovnání s experimenty Ramasamy et al. (2022). Avšak toto tvrzení nelze prokázat, neboť nebyl sledován antioxidantní obranný mechanismus. Vliv ABA na hodnotu MDA u varianty ABA+sucho nelze porovnat s žádnou z uvedených studií. Navíc chybové úsečky označují velký rozptyl a hodnoty značně kolísaly oproti ostatním variantám, a to jak během dehydratace, tak rehydratace. Co se týče varianty EPI+sucho, tak zvýšené hodnoty byly naměřeny ve všech dnech odběru vzorků vůči ostatním

variantám. V porovnání s tvrzením vlivu epibrassinolidu u ječmene Gill et al. (2017) naznačují, že aplikace epibrassinolidu snižuje obsah ROS, ale lze souhlasit pouze s jejich tvrzením, že epibrassinolid snižuje obsah MDA, ale v tomto případě pouze po rehydrataci a u rajčat. Na druhou stranu snížení obsahu MDA pomocí epibrassinolidu u rajčat potvrzuje experiment Yuan et al. (2010), přičemž toto ošetření také vedlo ke zvýšení aktivity antioxidantních enzymů.

5.2. Změny v hodnotách prolinu vyvolané dehydratací a následnou rehydratací

Prolin se hromadí v rostlinách s omezeným množstvím vody, přičemž zlepšuje osmotické přizpůsobení buněk při nedostatku vody (Verslues et Sharma, 2010). Oproti variantě Kontrola obsah prolinu vzrůstal u varianty Sucho během dehydratace, což lze pozitivně porovnat s experimentem provedeným Knipp et Honermeier (2006) u brambor, patřící do stejné čeledi rostlin jako rajčata *Solanaceae*. Prokázaný nárůst prolinu demonstrovali i Pereira et al. (2014) při experimentech na cherry rajčatech, stejně jako Montesinos-Pereira et al. (2014), Hassan et al. (2015) a Rai et al. (2013) u transformovaných rajčat. Hodnoty prolinu zároveň vzrůstaly i u varianty EPI+sucho. Po rehydrataci došlo ke snížení obsahu osmolytů, přičemž k jeho extrémnímu navýšení došlo poslední den odběru vzorků. Z průměrných hodnot vyplývá, že aplikace ABA u varianty ABA+sucho významně reguluje hladiny prolinu, stejně jako to uvádí Verslues et Sharma (2010) ve své studii. Navíc Ramasamy et al. (2022) uvádí, že postřik ABA na list snížil akumulaci prolinu u rostlin rajčat.

5.3. Změny v hodnotách kyseliny abscisové (ABA) vyvolané dehydratací a následnou rehydratací

S rostoucím vodním deficitem je biosyntéza ABA spouštěna sníženým vodním potenciálem nebo turgorem listů (Munemasa et al., 2015). Ijaz et al. (2017) uvádí, že vlivem působení stresu ze sucha došlo ke zvýšení obsahu ABA v rostlinách rajčat. V tomto ohledu se naše výsledky shodují, neboť byl zaznamenán nárůst hodnoty ABA u varianty Sucho během dehydratace, po rehydrataci došlo ke snížení, ale následně průměrný obsah ABA opět vzrůstal. Exogenní aplikace ABA rapidně zvýšila

endogenní obsah ABA v listech rajčat u varianty ABA+sucho během dehydratace, druhý den po rehydrataci došlo k poklesu hodnoty ABA, nicméně její obsah se v dalších odběrech opět zvyšoval. Zvýšení endogenní hladiny ABA v závislosti na exogenní aplikaci ABA již dříve potvrdili Ma et al. (2008). U varianty EPI+sucho došlo k nárůstu hodnoty ABA během dehydratace. Po rehydrataci k došlo poklesu, který byl následován opětovným vzrůstem, přičemž hodnoty varianty EPI+sucho převyšovaly hodnoty varianty Sucho. Ošetřením rostlin rajčat pomocí epibrassinolidů za působení sucha se zabývali Yuan et al. (2010), přičemž zjistili, že EBR může zvyšovat obsah endogenní ABA, což tento experiment potvrzuje.

5.4. Změny v hodnotách kyseliny jasmonové (JA) vyvolané dehydratací a následnou rehydratací

Wang et al. (2020) uvádí, že JA aktivuje obranný mechanismus proti vodnímu deficitu, přičemž v důsledku působení sucha se rychle zvyšuje hladina endogenní JA, která se při dlouhodobém působení vodního stresu vrací na běžné koncentrace. Zde bylo dosaženo podobných výsledků, kdy nejvyšší hodnoty JA byly naměřeny první den odběru, poté se až na výjimky již snižovaly u všech variant. Kolísající koncentrace JA stejně tak interpretují De Ollas et al. (2016). Zároveň Hossain et al. (2011) uvádí, že existuje vztah mezi JA a ABA, přičemž JA reguluje reakce rostlin na sucho prostřednictvím biosyntézy a akumulace ABA. U varianty Sucho, kromě prvního odběru lze tuto závislost v grafech pozorovat. U varianty ABA+sucho, kromě prvního a předposledního odběru může existovat nějaká závislost mezi JA a ABA. Hodnoty ABA mezi JA u varianty EPI+sucho značně kolísají. Navíc lze obecně říci, že hodnoty JA u varianty ABA+sucho jsou oproti Kontrolě v ošetřených rostlinách ABA vyšší, což potvrzuje studie o rajčatech za sucha provedená Zhang a Huang (2013).

5.5. Změny v hodnotách kyseliny salicylové (SA) vyvolané dehydratací a následnou rehydratací

Mirua a Tada (2014) uvádí, že v důsledku nedostatku vody se obsah SA v rostlinách zvyšuje, dále se zvyšuje obsah ABA a prolinu, navíc zvýšené endogenní hladiny SA podporuje uzavření průduchů, které je pravděpodobně způsobeno tvorbou ROS.

Galviz et al. (2021) naopak při svém experimentu u rajčat vystavených suchu prokázali prostřednictvím SA zvýšenou vodivost průduchů, nicméně shodovali se ve zvýšeném obsahu prolinu. Dalším experimentem se zabývali Lobato et al. (2021), kde u rajčat vystavených suchu zkoumali vliv SA a došli k závěru, že SA se podílí na snížení MDA a ROS. Zde se průběh experimentu od výše citovaných autorů značně odlišoval, zřejmě proto, že většina studií byla založena na exogenní aplikaci, přičemž na naší straně byly sledovány pouze endogenní hladiny SA. Naše výsledky se shodují pouze ve významné pozitivní korelaci mezi hodnotami SA a ABA. I přes to byla na naší straně prokázána významná pozitivní korelace mezi SA a superoxidem a mezi SA a MDA, ale bohužel nebyla prokázána mezi hodnotami SA a prolinu.

5.6. Změny v hodnotách auxinu kyseliny indol-3-octové (IAA) vyvolané dehydratací a následnou rehydratací

Jednou z několika mnoha funkcí auxinu je diferenciace vodivých pletiv, která usnadňuje tok fytohormonů a dalších látek rostlinou. Hlavním zástupcem auxinů je kyselina indol-3-octová (Casanova-Saez et Voss, 2019; Seidlová et al., 2008). Moles et al. (2018) popisují, že IAA spolu s kyselinou abscisovou ABA působí synergicky na aklimatizační procesy rostlin, které jsou vyvolané suchem. S tímto tvrzením se shoduje naše významná pozitivní korelace mezi ABA a IAA. Graf č. 7 naznačuje, že experiment potvrzuje závislost mezi aplikací ABA a obsahem IAA. Konkrétně u varianty ABA+sucho lze pozorovat, že s prohlubující se dehydratací hodnoty IAA postupně vzrůstaly a po následné rehydrataci se postupně snižovaly. To samé bychom mohli říct o variantě EPI+sucho, ale pokud bychom zanedbali první den odběru. Je možné, že existuje nějaká závislost mezi epibrassinolidem a IAA, nicméně nelze ji porovnat s žádnou ze studií, neboť není obsažena v teoretické části. Li et al. (2018) píší o zvyšující se koncentraci ABA při nedostatku vody, zatímco dochází ke snížení IAA. Hodnoty v grafu obecně naznačují, že tomu tak je. Li et al. (2018) dále uvádí, že exogenní aplikace IAA snižuje oxidační poškození prostřednictvím antioxidační obrany či osmotické úpravy. V našem případě se lze shodovat, že IAA má pozitivní vliv na poškození buněk, neboť byla prokázána významná negativní korelace mezi IAA a MDA. Zároveň se ale neshodujeme v osmotické úpravě, neboť tomu oponuje opět významná negativní korelace mezi IAA a prolinem.

6. Závěr

Rajčata jsou jednou z hojně využívaných potravin člověkem, a proto jsou pěstovány na celém světě, ale zároveň jsou mnohdy vystaveny nepříznivým podmínkám prostředí, přičemž mezi nejvýznamnější patří právě sucho. Prohlubující se globální oteplování tento negativní vliv neustále zesiluje. Navíc s rostoucím počtem obyvatel na Zemi bude potřeba zvyšovat výnosy těchto plodin, čemu může v budoucnu zabránit právě sucho ještě více než dnes. Proto jsme se rozhodli v této diplomové práci prozkoumat, zda by aplikace látek hormonální povahy mohla snížit nežádoucí stres, a tak posílit výnosy této plodiny v oblastech, kde je sucho hlavním limitujícím faktorem. Stručné shrnutí výsledků našeho bádání uvádíme v tomto závěru.

Koncentrace superoxidového radikálu byla prokazatelně zvýšena v pletivech u rostlin rajčat vystavených suchu. U rostlin ošetřených kyselinou abscisovou došlo ke snížení obsahu superoxidu po rehydrataci vůči rostlinám vystavených suchu bez aplikace látek hormonální povahy. Vliv epibrassinolidu na snížení hladiny superoxidu nebyl prokázán.

Malondialdehyd slouží jako marker pro stanovení stupně poškození stresované rostliny. Avšak jeho koncentrace vůči kontrole kolísala u všech variant, přičemž jeho hodnoty byly kolikrát menší u stresovaných rostlin než u kontrolních.

Prolin zvyšuje osmotickou rovnováhu u rostlin s vodním deficitem. Ke snížení jeho hladiny u stresovaných rostlin přispěla kyselina abscisová, což je nežádoucí. Naopak k pozitivnímu navýšení jeho koncentrace došlo u rostlin vystavených suchu a rostlin ošetřených epibrassinolidem opět vystavených suchu, což vypovídá o tom, že epibrassinolid se může podílet na zvyšování obsahu prolinu u rostlin vystavených stresu způsobeného nedostatkem vody.

Kyselina abscisová se hromadí v listových pletivech při nedostatku vody, přičemž se podílí na obranné reakci rostlin. Její akumulace v listech byla prokázána u rostlin vystavených suchu. Exogenní aplikace kyseliny abscisové na rostliny vystavené stresu ze sucha výrazně zvýšila obsah endogenní kyseliny abscisové, který dosáhl nejvyšších hodnot ze všech variant. To potvrzuje vliv této kyseliny na biosyntézu

kyseliny abscisové. Dále bylo zjištěno, že epibrassinolid se také podílí na zvýšení endogenní hladiny kyseliny abscisové u rostlin vystavených suchu.

Kyselina jasmonová aktivuje obranný mechanismus rostlin, přičemž její hladiny jsou v počátečních fázích stresu vysoké a následně klesají, což získané hodnoty potvrzují. Dále existuje závislost mezi touto kyselinou a kyselinou abscisovou, a to můžeme vyčíst z grafů u varianty Sucho. Navíc se její obsah zvyšuje po aplikaci kyseliny abscisové u rostlin s omezeným množstvím vody.

V důsledku nedostatku vody se obsah kyseliny salicylové v rostlinách zvyšuje. To nemůžeme v našem případě kvůli kolísajícím hodnotám jednoznačně potvrdit. Nicméně po aplikaci kyseliny abscisové došlo ke zvýšení koncentrace kyseliny salicylové, což dokazuje pozitivní korelace. Ošetření epibrassinolidem zvýšilo hladinu kyseliny salicylové vůči variantě Sucho po rehydrataci.

Kyselina indol-3-octová spolu s kyselinou abscisovou působí synergicky na aklimatizační procesy rostlin, které jsou vyvolané suchem. Toto tvrzení bylo prokázáno pozitivní korelací a hodnotami v grafu u rostlin ošetřených kyselinou abscisovou pod stresem způsobeného suchem. Bylo potvrzeno, že tato kyselina zmírňuje oxidační poškození.

Je důležité zmínit, že některé zkoumané látky spolu významně pozitivně i negativně korelovaly. Z toho lze usoudit, že tyto látky spolu souvisí, a když se mění koncentrace jedné z nich, tak to ovlivní koncentraci látky jiné, popřípadě i mnoha dalších.

Hodnoty chybových úseček byly u většiny zkoumaných látek vysoké, a proto by bylo vhodné pro úplné potvrzení nebo vyvrácení našich předpokladů a zjištěných výsledků provést další experimenty, které by potvrdily nebo vyvrátily námi získaná data.

Seznam použité literatury

- Ahammed GJ., Li X., Liu A., Chen S. 2020: Brassinosteroidy in plant tolerance to abiotic stress, *Journal of plant growth regulation*, 39, 1451-1464. DOI: 10.1007/s00344-020-10098-0
- Al Hassan M., Fuertes M., Ramos Sanchez FJ., Vicente O., Boscaiu M. 2015: Effects of Salt and Water Stress on Plant Growth and on Accumulation of Osmolytes and Antioxidant Compounds in Cherry Tomato, *Notulae botanicae horti agrobotanici cluj-napoca*, 43 (1), 1-11. DOI: 10.15835/nbha4319793
- Alam MM., Nahar K., Hasanuzzaman M., Fujita M. 2014: Exogenous jasmonic acid modulates the physiology, antioxidant defense and glyoxalase systems in imparting drought stress tolerance in different Brassica species, *Plant biotechnology reports*, 8 (3), 279-293. DOI: 10.1007/s11816-014-0321-8
- Bandruska H. et Stroiński A. 2005. The effect of salicylic acid on barely response to water deficit, *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 379-386. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-005-0015-5>
- Bandruska H., Stroinski A., Kubis J. 2003: The effect of jasmonic acid on the accumulation of ABA, proline and spermidine and its influence on membrane injury under water deficit in two barley genotypes, *Acta physiologiae plantarum*, 25 (3), 279-285. DOI: 10.1007/s11738-003-0009-0
- Bláha L., Bocková R., Hnilička F. et al. (2003) Rostlina a stres. Praha: VÚRV. ISBN: 80-86555-32-1
- Casanova-Sáez R. et Vos U. 2019: Auxin Metabolism Controls Developmental Decisions in Land Plants, *Trends plant Science*, 24 (8), 741-745. DOI: 10.1016/j.tplants.2019.05.006
- Dar NA., Amin I., Wani W., Wani SA., Shikari AB., Wani SH., Masoodi KZ. 2017: Abscisic acid: A key regulator of abiotic stress tolerance in plants, *Plant gene*, 11, 106-111. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.003>
- Das P., Nutan KK., Singla-Pareek SL., Pareek A. 2015: Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles, *Frontiers in environmental science*, 2, 70. DOI: 10.3389/fenvs.2014.00070
- Dass Ch. 2006: Hyphenated separation techniques, Wiley Online Library, chapetr 5. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470118498.ch5>

- Davey MW., Van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie IJJ., Strain JJ., Favell D., Fletcher J. 2000: Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing, *Journal of the science of food and agriculture*, 80 (7) 825-860. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825::AID-JSFA598>3.3.CO;2-Y
- De Ollas C., Hernando B., Arbona V., Gomez-Cadenas A. 2013: Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions, *Physiologia plantarum*, 147 (3), 296-306. DOI:10.1111/j.1399-3054.2012.01659.x
- De Ollas, C. et Dodd, IC. 2016: Physiological impacts of ABA-JA interactions under water-limitation, *Plant molecular biology*, 91 (6), 641-650. DOI: 10.1007/s11103-016-0503-6
- Demidchik V. 2015: Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology, *Environmental and experimental botany*, 109, 212-228. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021
- Derevyanchuk M., Litvinovskaya R., Khripach V., Kravets V. 2016: Brassinosteroid-induced de novo protein synthesis in *Zea mays* under salinity and bioinformatic approach for identification of heat shock proteins, *Plant growth regulation*, 78, 297-305. DOI: 10.1007/s10725-015-0093-3
- Du H., Liu H., Xiong L. 2013: Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice, *Frontiers in plant science*, 397. DOI: 10.3389/fpls.2013.00397
- Emenecker R., Strader L. C. 2020: Auxin-Abscisic Acid Interactions in Plant Growth and Development, *BIOMOLECULES*, 10 (2), 281. DOI: 10.3390/biom10020281
- Fan S., Wu H., Gong H., Guo J. 2022: The salicylic acid mediates selenium-induced tolerance to drought stress in tomato plants, *Scientia horticulturae*, 300, 111092. DOI: 10.1016/j.scienta.2022.111092
- Foyer CH. Et Noctor G. 2003: Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, *Physiologia plantarum*, 119 (3), 355-364. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2003.00223.x
- Foyer, CH a Noctor, G. 2005: Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, *Plant cell*, 17, 1866–1875. DOI: 10.1105/tpc.105.033589
- Galviz YC., Bortolin GS., Guidorizi KA., Deuner S., Reolon F., de Moraes DM. 2021: Effectiveness of Seed Priming and Soil Drench with Salicylic Acid on Tomato Growth, Physiological and Biochemical Responses to Severe Water Deficit, *Journal of soil science and plant nutrition*, 21 (3), 2364-2377. DOI: 10.1007/s42729-021-00528-7

Gill MB., Cai KF., Zhang GP., Zeng FR. 2017. Brassinolide alleviates the drought-induced adverse effects in barely by modulation of enzymatic antioxidants and ultrastructure, *Plant Growth Regulation*, 82 (3), 447-455. DOI: 10.1007 / s10725-017-0271-6

Gill SS., Tuteja N. 2010: Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant physiology and biochemistry*, 48 (12), 909-930. DOI:10.1016/j.plaphy.2010.08.016

Gonzalez CM., Garcia LA.,Llorca E., Hernando I., Atienzar P., Bermejo A., Moraga G., Quiles A. 2021: Carotenoids in dehydrated persimmon: Antioxidant activity, structure, and photoluminescence, *LWT-Food science and technology*, 142, 111007. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111007

Gonzalez-Villagra J., Reyes-Diaz, MM., Tighe-Neira R., Inostroza-Blancheteau C., Escobar AL., Bravo LA. 2022: Salicylic acid Improves Antioxidant Defense system and Photosynthetic Performance in *Aristotelia chilensis* Plants Subjected to moderate drought stress, *Plants-Basel*, 11 (5), 639. DOI: 10.3390/plants11050639

Hernandez-Espinoza LH., Barrios-Masias 2020: Physiological and anatomical changes in tomato roots in response to low water stress, *Scientia Horticulturae*, 265, 109208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109208>

Horemans N., Foyer CH., Asard H. 2000: Transport and action of ascorbate at the plants plasma membrane, *Trends in plant science*, 5 (6), 263-267. DOI: 10.1016/S1360-1385(00)01649-6

Hossain, MA., Munemasa S., Uraji M., Nakamura Y., Mori IC., Murata Y. 2011: Involvement of Endogenous Abscisic Acid in Methyl Jasmonate-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis*, *Plant physiology*, 156 (1), 430-438. DOI: 10.1104/pp.111.172254

Huang S., Van Aken O., Schwarzländer M., Belt K., Millar H. 2016: The Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cellular Signaling and Stress Response in Plants, *Plant physiology*, 171 (3), 1551-1559. DOI: 10.1104/pp.16.00166

Chen M., Zhu X., Liu X., Wu C. Yu C., Hu G., Chen L. Chen R. Bouzayen M., Zouine M., Hao Y. 2021: Knockout of Auxin Response Factor SIARF4 Improves Tomato Resistance to Water Deficit, *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 22 (7), 3347. DOI: 10.3390/ijms22073347

Chiu J. et Dawes I. W. 2012: Redox control of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 22, 592–601. DOI: 10.1016/j.tcb.2012.08.002

- Ijaz R., Ejaz J., Gao S., Liu T., Imtiaz M., Ye Z., Wang T., 2017: Overexpression of annexin gene AnnSp2, enhances drought and salt tolerance through modulation of ABA synthesis and scavenging ROS in tomato, *Scientific reports*, 7, 12087. DOI: 10.1038/s41598-017-11168-2
- Ismail A., Takeda S., Nick P. 2014: Life and death under salt stress: same players, different timing?, *Journal of Experimental Botany*, 65 (12), 2963–2979. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eru159>
- Jang G., Yoon, Y., Choi YD. 2020: Crosstalk with Jasmonic Acid Integrates Multiple Responses in Plant Development, *International journal of molecular sciences*, 21 (1), 305. DOI: 10.3390/ijms21010305
- Jiroutová P. et Kovalíková Z. 2021: Certifikovaná metodika odolnosti ovocných plodin k suchu v in vitro podmínkách. Hradec Králové.
- Kang G., Li G., Guo T. 2014: Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants, *Acta physiologiae plantarum*, 36 (9), 2287-2297. DOI: 10.1007/s11738-014-1603-z
- Kerchev P., Waszczak C., Lewandowska A., Willems P., Shapiguzov A., Li Z., Alseekh S., Mühlednbock P., Hoeberichts FA., Huang J., Van Der Kelen K., Kangasjärvi J., Fernie AR., De Smet R., Van de Peer Y., Messens J., Van Breusegem F. 2016: Lack of GLYCOLATE OXIDASE1, but Not GLYCOLATE OXIDASE2, Attenuates the Photorespiratory Phenotype of CATALASE2-Deficient Arabidopsis, *Plant physiology*, 171 (3), 1704-1719. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.16.00359>
- Kincl et al., (2000) Základy fyziologie rostlin. Ostrava: MONTANEX. ISBN: 80-7225-041-8
- Knipp G. et Honermeier B. 2006: Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans, *Journal of plant physiology*, 163 (4), 392-397. DOI: 10.1016/j.jplph.2005.03.014
- Larcher W. (1995): *Physiological Plant Ecology*. New York: Springer-Verlag.
- Lee J., Shim S., Moon S., Kim H., Bae W., Kim K., Kim YH., Rhee SK., Hong CP., Lee YJ., Sung J., Ryu H. 2018: Genome-wide transcriptomic analysis of BR-deficient Micro-Tom reveals correlations between drought stress tolerance and brassinosteroid signaling in tomato, *Plant physiology and biochemistry*, 127, 553-560. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.04.031
- Li JM. et Jin H. 2007: Regulation of brassinosteroid signalling, *Trends plant science*, 12 (1), 37-41. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.11.002
- Li Q., Tian Q., Zhang Y., Niu M., Yu X., Lian C., Liu C., Wang HL., Yin W., Xia X. 2022: Increased abscisic acid sensitivity and drought tolerance of Arabidopsis by

- overexpression of poplar abscisic acid receptors, *Plant cell tissue and organ culture*, 148 (2), 231-245. DOI: 10.1007/s11240-021-02178-0
- Li Z., Li Y., Zhang Y., Cheng B., Peng Y., Zhang X., Ma X., Huang L., Yan Y. 2018: Indole-3-acetic acid modulates phytohormones and polyamines metabolism associated with the tolerance to water stress in white clover, *Plant physiology and biochemistry*, 129, 251-263. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.009>
- Lobato AKD., Barbosa MAM., Alsahli AA., Lima EJA., Silva BRS. 2021: Exogenous salicylic acid alleviates the negative impacts on production components, biomass and gas exchange in tomato plants under water deficit improving redox status and anatomical responses, *Physiologia plantarum*, 172 (2), 869-884. DOI: 10.1111/ppl.13329
- Ma X., Ma F., Mi Y., Ma Y., Shu H. 2008: Morphological and physiological responses of two contrasting Malus species to exogenous abscisic acid application, *Plant growth regulation*, 56 (1), 77-87. DOI: 10.1007/s10725-008-9287-2
- Mehrotra R., Bhalothia P., Bansal P., Basantani MK., Bharti V., Mehrotra S. 2014: Abscisic acid and abiotic stress tolerance – Different tiers of regulation, *Journal of plant physiology*, 171 (7), 486-496. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.12.007>
- Mignolet-Spruyt L., Xu E., Idanheimo N., Hoerberichts FA., Muhlenbock P., Brosche M., Van Breusegem F., Kangasjarvi J. 2016: Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling, *Journal of experimental botany*, 67 (13), 3831-3844. DOI: 10.1093/jxb/erw080
- Miller AF. 2012: Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights, *Febs letters*, 586 (5), 585-595. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.10.048
- Mirua K. et Tada Y. 2014: Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid, *Frontiers in plant science*, 5, 4. DOI: 10.3389/fpls.2014.00004
- Mittler R. 2017: ROS are good, *Trends in plant science*, 22 (1), 11-19. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.08.002
- Mohamed HI. et Latif HH. 2017: Improvement of drought tolerance of soybean plants by using methyl jasmonate. *Physiology and molecular biology of plants*, 23, 545-556. DOI: 10.1007/s12298-017-0451-x
- Moles TM., Mariotti L., De Pedro LF., Guglielminetti L., Picciarelli P., Scartazza A., 2018: Drought induced changes of leaf-to-root relationships in two tomato genotypes, *Plant physiology and biochemistry*, 128, 24-31. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.05.008

- Montesinos-Pereira D., Barrameda-Medina Y., Romero L., Ruiz JM., Sanchez-Rodriguez E. 2014: Genotype differences in the metabolism of proline and polyamines under moderate drought in tomato plants, *Plant Biology*, 16 (6), 1050-1057. DOI: <https://doi.org/10.1111/plb.12178>
- Munemasa, S Munemasa S., Hauser F., Park J., Waadt R., Brandt B., Schroeder JI. 2015: Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomata! Aperture, *Current opinion in plant biology*, 28, 154-162. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.10.010
- Nazim M., Ali M., Shahzad K., Ahmad F., Nawaz F., Amin M., Anjum S., Nasif O., Nasif, Alharbi SA., Fahad S., Danish S., Datta R. 2021: Kaolin and Jasmonic acid improved cotton productivity under water stress conditions, *Saudi journal of biological sciences*, 28 (11), 6606-6614. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.07.043
- Niessen W. M. A. 2006: Liquid chromatography-mass spectrometry,. S. 50-90. ISBN 9780824740825
- Nolan TM., Vukašinović, N., Liu D., Russinova E. 2020: Brassinosteroids: Multidimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses, *The plant cell*, 32 (2), 295-318. DOI: 10.1105/tpc.19.00335
- O'Brien JA., Daudi A., Butt VS., Bolwell GP. 2012: Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism, *Planta*, 236 (3), 765-779. DOI: 10.1007/s00425-012-1696-9
- Oda T., Hashimoto H., Kuwabara N., Akashi S., Hayashi K., Kojima C., Wong HL Kawasaki T., Shimamoto K., Sato M., Shimizu T. 2010: Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications, *Journal of biological chemistry*, 285 (2), 1435-1445. DOI: 10.1074/jbc.M109.058909
- Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Kadota Y., Hishinuma H., Senzaki E., Yamagoe S., Nagata K., Suzuki K., Tanokura M., Kuchitsu K. 2008: Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation, *Journal of biological chemistry*, 283 (14), 8885-8892. DOI: 10.1074/jbc.M708106200
- Parwez R., Aftab T., Gill SS., Naeem M. 2022: Abscisic acid signaling and crosstalk with phytohormones in regulation of environmental stress responses, *Environmental and experimental botany*, 199, 104885. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104885>
- Patrick Chaimbault P. 2014: *The modern art of natural substances in whole plants*, SpringerLink, 1106 (3). DOI: 10.1007/978-94-017-8953-0_3
- Peleg Z. et Blumwald E. 2011: Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants, *Current opinion in plant biology*, 14 (3), 290-295. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.02.001>

- Per TS., Khan MIR., Anjum NA., Masood A., Hussain SJ., Khan NA. 2018: Jasmonates in plants under abiotic stresses: Crosstalk with other phytohormones matters, *Environmental and experimental botany*, 145, 104-120. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2017.11.004
- Petrovic I., Savic S., Gricourt J., Causse M., Jovanovic Z., Stikic R. 2021: Effect of long-term drought on tomato leaves: the impact on metabolic and antioxidative response, *Physiology and molecular biology of plants*, 27 (12), 2805-2817. DOI: 10.1007/s12298-021-01102-2
- Procházka S., Gloser J., Šantrůček J. et al. (1998) Fyziologie rostlin. Praha: Academia. ISBN: 80-200-0586-2
- Qiu Z., Guo J., Zhu A. Zhang L., Zhang M. 2014: Exogenous jasmonic acid can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress, *Ecotoxicology and Environmental safety*, 104, 202-208. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.014
- Rai AC., Singh M., Shah K. 2013: 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. DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.09.010
- Ramasamy S., Nandagopal JGT., Balasubramanian M., Girija S. 2022: Effect of Abscisic acid and Selenium foliar sprays on drought mitigation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.), *Materials today-proceedings*, 48, 191-195. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.06.465
- Reddy, AR., Chaitanya KV., Vivekanandan M. 2004: Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants, *Journal of plant physiology*, 161 (11), 1189-1202. DOI: 10.1016/j.jplph.2004.01.013
- Reumann S., Chowdhary G., Lingner, T. 2016: Characterization, prediction and evolution of plant peroxisomal targeting signals type 1 (PTS1s), *Biochimica et biophysica acta-molecular cell research*, 1863 (5), 790-803. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.01.001
- Rhoads DM., Umbach AL., Subbaiah CC., Siedow JN. 2006: Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling, *Plant physiology*, 141 (2), 357-366. DOI: 10.1104/pp.106.079129
- Riemann M., Dhakarey R, Hazman M., Miro B., Kohli., Nick P. 2015: Exploring Jasmonates in the Hormonal Network of Drought and Salinity Responses. *Frontiers in plant science*, 1077 (6), 281. DOI: 10.3390/biom10020281
- Rocha FRP. Et Teixeira LSG. 2004: Strategies to increase sensitivity in UV-VIS spectrophotometry, *QUIMICA NOVA*, 27 (5), 807-812. DOI: 10.1590/S0100-40422004000500021

- Saradadevi R., Palta JA., Siddique KHM. 2017: ABA-Mediated Stomatal Response in Regulating Water Use during the Development of Terminal Drought in Wheat, *Frontiers in plant science*, 8, 1251. DOI: 10.3389/fpls.2017.01251
- Seleiman MF., Al-Suhaibani N., Ali N., Akmal M., Alotaibi M., Refay Y., Dindaroglu T., Abdul-Wajid HH., Battaglia ML. 2021: Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects, *Plants-Basel*, 10 (2), 259. DOI: 10.3390/plants10020259
- Shi H., Chen L., Ye T., Liu X., Ding K., Chan Z. 2014: Modulation of auxin content in Arabidopsis confers improved drought stress resistance, *Plant physiology and biochemistry*, 82, 209-217. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.008>
- Shohat H., Cheriker H., Kilambi HV., Eliaz NI., Blum S., Amsellem Z., Tarkowska D., Aharoni A., Eshed Y., Weiss D. 2021: Inhibition of gibberellin accumulation by water deficiency promotes fast and long-term 'drought avoidance' responses in tomato, *New phytologist*, 232 (5), 1985-1998. DOI: 10.1111/nph.17709
- Schieber M. et Chandel NS. 2014: ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress, *Current biology*, 24 (10), R453-R462. DOI: 10.1016/j.cub.2014.03.034
- Schneider HS. (2011) Encyclopedia of Climate and Weather. 2. vydání, New York: Oxford University Press. ISBN: 978-0-19-976532-4.
- Schneider JR., Caverzan A., Chavarria G. 2019: Water deficit stress, ROS involvement, and plant performance, *Archives of agronomy and soil science*, 65 (8), 1160-1181. DOI: 10.1080/03650340.2018.1556789
- Steffens B. 2014: The role of ethylene and ROS in salinity, heavy metal, and flooding responses in rice, *Frontiers in plant science*, 5, 685. DOI: 10.3389/fpls.2014.00685
- Sumimoto H. 2008: Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species, *Febs journal*, 275 (13), 3249-3277. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06488.x
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres MA., Mittler R. 2011: Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling, *Current opinion in plant biology*, 14 (6), 691-699. DOI: 10.1016/j.pbi.2011.07.014
- Suzuki N., Rivero RM., Shulaev V., Blumwald E., Mittler R. 2014: Abiotic and biotic stress combinations, *New phytologist*, 203 (1), 32-43. DOI: 10.1111/nph.12797
- Szepesi Á. et Szöllősi R. 2018: Mechanism of Proline Biosynthesis and Role of Proline Metabolism Enzymes Under Environmental Stress in Plants, *Plant metabolites and regulation under environmental stress*, 337-353. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00017-0>

- Tanveer M., Shahzad B., Sharma A., Biju S., Bhardwaj R. 2018: 24-Epibrassinolide; an active brassinolide and its role in salt stress tolerance in plants: A review, *Plant physiology and biochemistry*, 130, 69-79. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.06.035
- Tarchevsky IA. et Egorova AM. 2022: Participation of Proline in Plant Adaptation to Stress Factors and Its Application in Agrobiotechnology, *Applied biochemistry and microbiology*, 58 (4), 347-360. DOI: 10.1134/S0003683822040160
- Ullah A., Manghwar H., Shaban M., Khan A. H., Akbar A., Ali U., Ali E., Fahad S. 2018: Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy, 25 (33), 33103-33118. DOI: 10.1007/s11356-018-3364-5
- Vaňková R. (2010): 8. Plant Hormone Functions in Abiotic and Biotic Stress Responses. In: Handbook of Plant and Crop Stress. CRC Press. DOI: 10.1201/b10329-11
- Verslues PE. Et Sharma S. 2010: Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction, *The Arabidopsis Book*, 8. DOI: 10.1199/tab.0140
- Voothuluru P. et Sharp RE. 2013: Apoplastic hydrogen peroxide in the growth zone of the maize primary root under water stress. I. Increased levels are specific to the apical region of growth maintenance, *Journal of experimental botany*, 64 (5), 1223-1233. DOI: 10.1093/jxb/ers277
- Vu NT., Kang HM., Kim YS., Choi KY., Kim IS. 2015: Growth, physiology, and abiotic stress response to abscisic acid in tomato seedlings, *Horticulture environment and biotechnology*, 56 (3), 294-304. DOI: 10.1007/s13580-015-0106-1
- Wang J., Song Li., Gong X., Xu J., Li M. 2020: Functions of Jasmonic Acid in Plant Regulation and Response to Abiotic Stress, *International journal of molecular sciences*, 21 (4), 1446. DOI: 10.3390/ijms21041446
- Wang M., Zhao X., Xiao Z., Yin X., Xing T., Xia G. 2016: A wheat superoxide dismutase gene TaSOD2 enhances salt resistance through modulating redox homeostasis by promoting NADPH oxidase activity, *Plant molecular biology*, 91 (1-2), 115-130. DOI: 10.1007/s11103-016-0446-y
- Weisz R., Kaminski J., Smilowitz Z. 1994: Water deficit effects on potato leaf growth and transpiration: Utilizing fraction extractable soil water for comparison with other crops, *American potato journal*, 71 (12), 829-840. DOI: 10.1007/BF02849378
- Xia X., Hunag L., Zhou Y., Mao W., Shi K., Wu J., Asami T., Chen Z., Yu J. 2009: Brassinosteroids promote photosynthesis and growth by enhancing activation of Rubisco and expression of photosynthetic genes in *Cucumis sativus*, *Planta*, 230 (6), 1185-96. DOI: 10.1007/s00425-009-1016-1
- Yan M., Yao Y., Mou K., Dan Y., Li W., Wang Ch., Liao W. 2022: The involvement of abscisic acid in hydrogen gas-enhanced drought resistance in

tomato seedlings, *Scientia horticulturae*, 292, 110631. DOI: 10.1016/j.scienta.2021.110631

Yaqoob U., Jan N., Raman PV., Siddique KHM., John R. 2022: Crosstalk between brassinosteroid signaling, ROS signaling and phenylpropanoid pathway during abiotic stress in plants: Does it exist?, *Plant stress*, 100075. DOI: 10.1016/j.stress.2022.100075

Yuan GF., Jia ChG., Li Z., Sun B., Zhang LP., Liu N., Wang QM. 2010: Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress, *Scientia horticulturae*, 126 (2), 103-108. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.06.014

Zhang D., Xie L., Xu X. 2020: cDNA-AFLP analysis of salicylic acid- and calcium chloride-induced transcript derived fragments under drought in tomato (*Solanum lycopersicum*), *Biotechnology & Biotechnological equipment*, 34 (1), 587-594. DOI: 10.1080/13102818.2020.1789505

Zhang Ch. et Huang Z. 2013: Effects of endogenous abscisic acid, jasmonic acid, polyamines, and polyamine oxidase activity in tomato seedlings under drought stress, *Scientia horticulturae*, 159, 172-177. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.05.013

Zhang Y., Li Y., Hassan MJ., Li Z., Peng Y. 2020: Indole -3-acetic acid improves drought tolerance of white clover associated with activating auxin-related genes, abscisic acid and jasmonic acid-induced stress responsive transcription factors, and inhibiting senescence genes, *Research Square*. DOI: 10.21203/rs.2.16687/v3

Zhang Y., Luan Q., Jiang J., Li Y. 2021: Prediction and Utilization of Malondialdehyde in Exotic Pine Under Drought Stress Using Near-Infrared Spectroscopy, *Frontiers in plant science*, 12, 735275. DOI: 10.3389/fpls.2021.735275

Zhou R., Kong L., Yu X., Ottosen C., Zhao T., Jiang F., Wu Z. 2019: Oxidative damage and antioxidant mechanism in tomatoes responding to drought and heat stress, *Acta physiologiae plantarum*, 41 (2), 20. DOI: 10.1007/s11738-019-2805-1

Internetové zdroje

Hála M. 2021: I rostliny bojují se stresem [online]. [cit. 20. 05. 2022]. Dostupné z WWW: < I rostliny bojují se stresem - Časopis Vesmír (vesmir.cz)>.

Hrudová 2011: Abinozologie pro rostlináře [online]. [cit. 15. 07. 2022] Dostupné z WWW < Home (mendelu.cz)>.

Pitt J. 2009: Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry [online]. [cit. 14. 07. 2022]. Dostupné z WWW: < Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry - PMC (nih.gov)>.

Richterová L. 2008: Reaktivní sloučeniny kyslíku [online]. [cit. 29.05.2022]. Dostupné z WWW: <Microsoft Word - Dokument2 (muni.cz)>.

Rokyta R., Holeček V., Stopka P., 2006: Volné radikály [online]. [cit. 20. 07. 2022]. Dostupné z WWW: < Volné radikály - Časopis Vesmír (vesmir.cz)>.

Seidlová F., Pavlová L., Zažímalová E. 2008: Jak s rostlinami cvičí hormony [online]. [cit. 15. 07. 2022]. Dostupné z WWW: < 200808_V532-533_Seidlova.pdf (cas.cz)>.

Shao HB., Chu LY., Zhao CX., Guo QJ., Liu XA., Ribaut JM. 2006: Plant gene regulatory network system under abiotic stress [online]. [20. 05. 2022]. Dostupné z WWW: <Plant gene regulatory network system under abiotic stress | Acta Biologica Szegediensis (u-szeged.hu)>.

Subhanová I. 2018: Spektrofotometrie [online]. [cit. 12. 07. 2022]. Dostupné z WWW: < spektrofotometrie-teorie-201819.pdf (cuni.cz) >.

Yu SW. et Tang KX. 2004: MAP kinase cascades responding to environmental stress in plants [online]. [cit. 22. 05. 2022]. Dostupné z WWW: < C:\Documents and Settings\zws\? (researchgate.net)>.

Přílohy

Stav rostlin šestý den od zahájení dehydratace



Obr. 9 Varianta 1 (Kontrola) listy jsou tmavě zelené, některé spodní žloutnou, ale celkový stav rostlin je dobrý [22. 04. 2021] (foto Janoušek, 2021)



Obr. 10 Varianta 2 (rostliny ošetřeny kyselinou abscisovou a vystaveny suchu), oproti kontrole jsou některé listy mírně povadlé, začínají blednout až žloutnout, zároveň jsou rostliny v horší kondici oproti variantě 3 [22. 04. 2021] (foto Janoušek, 2021)



Obr. 11 Varianta 3 (rostliny ošetřeny epibrassinolidem a vystaveny suchu), oproti Kontrole jsou některé listy mírně povadlé, spodní začínají blednout až žloutnout, vrchní jsou tmavě zelené, zároveň jsou rostliny méně povadlé oproti variantě 2 [22. 04. 2021] (foto Janoušek, 2021)



Obr. 12 Varianta 4 (rostliny ošetřeny suchem) oproti předchozím variantám jsou rostliny silně povadlé a listy jsou více svěšené, bledé a žluté, některé listy dokonce odumírají [22. 04. 2021] (foto Janoušek, 2021)

Stav rostlin druhý den po rehydrataci



Obr. 13 Varianta 1 (Kontrola) celkový stav rostlin je obdobný z 22. dubna [24. 04. 2021] (foto Janoušek, 2021)



Obr. 14 Varianta 2 (rostliny ošetřeny kyselinou abscisovou a vystaveny suchu) vrchní listy jsou tmavě zelené, oproti 22. dubnu přibylo více bledých a žlutých spodních listů [24. 04. 2021] (foto Janoušek, 2021)



Obr. 15 Varianta 3 (rostliny ošetřeny epibrassinolidem a vystaveny suchu) spodní listy více zežloutly, vrchní listy jsou stále tmavě zelené [24. 04. 2021] (foto Janoušek, 2021)



Obr. 16 Varianta 4 (rostliny ošetřeny suchem) celkový stav rostlin se nezhoršil v porovnání v 22. dubnem, některé suché listy byly odstraněny [24. 04. 2021] (foto Janoušek, 2021)

Stav rostlin šestý den po rehydrataci



Obr. 17 Varianta 1 (Kontrola) některé bledé listy zežloutly, suché byly odstraněné, celkový stav rostlin je dobrý [28. 04. 2021]



Obr. 18 Varianta 2 (rostliny ošetřeny kyselinou abscisovou a vystaveny suchu) rostliny na první pohled vykazují příznaky silného vodního deficitu, oproti Kontrolě jsou rostliny silně povadlé, listy jsou svěšené, svinuté, některé suché [28. 04. 2021]



Obr. 19 Varianta 3 (rostliny ošetřeny epibrassinolidem a vystaveny suchu) vůči kontrole rostliny vykazují příznaky silného vodního deficitu, listy ztrácí tmavě zelenou barvu a více žloutnou, jsou svinuté a svěšené [28. 04. 2021]



Obr. 20 Varianta 4 (rostliny ošetřeny suchem) rostliny se nachází v podobném stavu jako varianty 2 a 3, vykazují příznaky silné dehydratace, většina listů je bledých až žlutých, jsou svinuté a svěšené [28. 04. 2021]

Tabulky s hodnotami

Tabulka č. 2 Superoxid – Aritmetický průměr ($\mu\text{g/g FW}$) a standardní chyba průměru všech variant

superoxid	18.04.2021		20.04.2021		22.04.2021		24.04.2021		26.04.2021		28.04.2021	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Kontrola	26.2025	1.275814	19.9425	1.693060	13.8769	1.766206	18.1395	1.126952	27.0807	0.956253	33.8085	2.631159
Sucho	27.7346	2.46036	29.6471	1.67991	17.3269	1.30980	22.4487	1.59909	32.7442	2.78399	41.4979	2.56123
ABA+sucho	27.2640	0.910972	33.5568	2.042500	18.2544	1.220297	20.7880	2.410935	28.6731	2.052554	40.5472	2.147438
EPI+sucho	34.2636	2.48004	36.0693	1.58370	30.8801	1.70458	31.0442	1.74065	35.2896	1.19261	46.4478	1.80369

Tabulka č. 3 Malondialdehyd– Aritmetický průměr ($\mu\text{mol/g FW}$) a standardní chyba průměru všech variant

MDA	18.04.2021		20.04.2021		22.04.2021		24.04.2021		26.04.2021		28.04.2021	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Kontrola	0.0344	0.00579198	0.0215	0.00077028	0.0283	0.0037149	0.0220	0.00428737	0.0288	0.00183747	0.0355	0.00113793
Sucho	0.0303	0.00358412	0.0237	0.00197713	0.0261	0.0038687	0.0344	0.00088548	0.0294	0.00297163	0.0252	0.00322811
ABA+sucho	0.0235	0.00330742	0.0328	0.00486132	0.0178	0.00472467	0.0240	0.00385228	0.0321	0.0040008	0.0470	0.00643354
EPI+sucho	0.0245	0.00262037	0.0410	0.00113987	0.0326	0.00072433	0.0190	0.00126082	0.0322	0.00334951	0.0288	0.00452286

Tabulka č. 4 Prolin – Aritmetický průměr ($\mu\text{mol/g FW}$) a standardní chyba průměru všech variant

prolin	18.04.2021		20.04.2021		22.04.2021		24.04.2021		26.04.2021		28.04.2021	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Kontrola	1.1385	0.057128	1.1351	0.053485	0.8842	0.110972	0.8661	0.083545	1.0632	0.145380	1.2315	0.247773
Sucho	1.1811	0.047732	1.4020	0.116768	2.9961	0.142098	1.1872	0.146974	1.5977	0.139579	23.2338	3.396028
ABA+sucho	1.1358	0.093527	1.2494	0.076238	1.5666	0.097397	0.9752	0.073882	1.6364	0.044815	7.8052	2.562733
EPI+sucho	1.3852	0.064518	2.2717	0.163180	5.6236	0.407858	3.8823	0.225383	2.1528	0.209036	23.8676	2.903322

Tabulka č. 5 Kyselina abscisová (pmol/g FW)– Aritmetický průměr a standardní chyba průměru všech variant

ABA	18.04.2021		20.04.2021		22.04.2021		24.04.2021		26.04.2021		28.04.2021	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Kontrola	219.78	107.74	249.00	114.64	210.74	22.22	281.56	66.77	264.93	75.08	492.38	33.55
Sucho	416.93	159.17	1214.47	240.51	2445.72	114.00	433.69	105.43	826.91	80.74	501.90	181.99
ABA+sucho	10531.15	1799.15	9171.48	778.72	10524.35	1030.10	2667.67	602.48	8064.25	1957.71	6096.38	1871.64
EPI+sucho	470.29	104.67	370.16	76.62	988.65	211.25	443.29	195.45	1148.54	251.08	2199.27	704.78

Tabulka č. 6 Kyselina jasmonová (pmol/g FW) – Aritmetický průměr a standardní chyba průměru všech variant

JA	18.04.2021		20.04.2021		22.04.2021		24.04.2021		26.04.2021		28.04.2021	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Kontrola	76.52	4.63	40.29	6.87	30.71	8.45	16.89	9.76	41.49	16.29	31.85	12.29
Sucho	85.66	23.33	15.10	0.47	33.98	10.50	35.93	9.39	50.76	21.80	45.93	5.50
ABA+sucho	89.44	17.57	37.57	5.61	76.95	19.80	58.74	18.23	42.82	14.05	47.98	23.33
EPI+sucho	107.37	26.52	41.85	8.29	26.88	2.56	37.55	10.00	98.35	7.66	79.07	24.43

Tabulka č. 7 Kyselina salicylová (pmol/g FW) – Aritmetický průměr a standardní chyba průměru všech variant

SA	18.04.2021		20.04.2021		22.04.2021		24.04.2021		26.04.2021		28.04.2021	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Kontrola	379.29	69.12	219.49	43.22	263.92	66.62	230.07	92.59	265.34	15.16	426.74	1.96
Sucho	381.87	116.34	232.87	69.02	465.09	106.74	196.87	35.83	325.19	66.00	315.87	91.50
ABA+sucho	415.91	108.12	406.85	150.81	454.30	120.28	587.99	203.12	330.35	123.28	1011.77	150.55
EPI+sucho	300.99	56.40	172.44	17.16	366.28	131.58	499.68	129.22	430.41	83.68	420.49	99.30

Tabulka č. 8 Kyselina indol-3-octová (pmol/g FW) – Aritmetický průměr a standardní chyba průměru všech variant

IAA	18.04.2021		20.04.2021		22.04.2021		24.04.2021		26.04.2021		28.04.2021	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Kontrola	8.60	1.75	8.65	2.03	8.71	2.47	12.35	3.73	14.90	3.52	15.56	2.83
Sucho	11.69	5.67	13.49	2.11	9.24	3.04	9.47	2.18	7.85	2.01	8.39	0.46
ABA+sucho	13.00	4.07	16.47	3.62	18.78	4.35	16.04	3.64	13.62	3.09	8.26	3.22
EPI+sucho	12.62	3.38	11.70	3.17	19.89	7.57	15.57	2.26	6.90	2.44	6.12	1.15

Tabulka č. 9 Superoxid – Hodnoty P mezi jednotlivými variantami

Superoxid		18.04.2021	20.04.2021	22.04.2021	24.04.2021	26.04.2021	28.04.2021
		Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P
Kontrola	Sucho	0.251461	1.71E-05	0.00798	0.001156	0.002608	0.003133
	ABA+sucho	0.168443	3.01E-06	0.001851	0.056717	0.154494	0.004435
	EPI+sucho	9.56E-05	2.55E-06	1.28E-07	3.68E-07	0.00000	0.000293
Sucho	ABA+sucho	0.698861	0.010766	0.280063	0.235209	0.030089	0.590062
	EPI+sucho	0.002875	0.000657	2.01E-07	1.85E-05	0.18132	0.050932
ABA+sucho	EPI+sucho	0.00016	0.028334	2.68E-07	3.15E-05	0.000449	0.024573

Tabulka č. 10 Malondialdehyd – Hodnoty P mezi jednotlivými variantami

Malondialdehyd		18.04.2021	20.04.2021	22.04.2021	24.04.2021	26.04.2021	28.04.2021
		Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P
Kontrola	Sucho	0.272271	0.075361	0.453614	0.008079	0.748783	0.003586
	ABA+sucho	0.01717	0.003782	0.012802	0.547187	0.148272	0.037895
	EPI+sucho	0.021298	1.23E-06	0.036092	0.233692	0.108463	0.068985
Sucho	ABA+sucho	0.032193	0.006375	0.033615	0.006533	0.32071	0.00189
	EPI+sucho	0.042056	9.79E-06	0.007407	1.01E-05	0.28879	0.269282
ABA+sucho	EPI+sucho	0.635918	0.037006	0.000203	0.049712	0.963571	0.016112

Tabulka č. 11 Prolin – Hodnoty P mezi jednotlivými variantami

Prolin		18.04.2021	20.04.2021	22.04.2021	24.04.2021	26.04.2021	28.04.2021
		Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P
Kontrola	Sucho	0.236498	0.00165	4.85E-09	0.002809	0.000349	4.95E-06
	ABA+sucho	0.95645	0.025301	6.64E-06	0.060081	3E-05	0.000942
	EPI+sucho	0.000209	4.28E-07	6.85E-09	2.81E-09	3.56E-05	1.68E-06
Sucho	ABA+sucho	0.362285	0.04006	7.34E-08	0.020466	0.571667	0.003281
	EPI+sucho	0.000462	1.07E-05	8.2E-07	1.67E-08	0.001992	0.817997
ABA+sucho	EPI+sucho	0.00118	1.4E-06	2.2E-08	3.39E-09	0.000945	0.001989

Tabulka č. 12 Kyselina abscisová – Hodnoty P mezi jednotlivými variantami

ABA		18.04.2021	20.04.2021	22.04.2021	24.04.2021	26.04.2021	28.04.2021
		Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P
Kontrola	Sucho	0.150272	0.00329	4.83E-06	0.102323	0.000909	0.94887
	ABA+sucho	0.0002	3.97E-05	6.5E-05	0.002419	0.002319	0.016238
	EPI+sucho	0.026947	0.202692	0.00621	0.24652	0.004286	0.047582
Sucho	ABA+sucho	0.000221	7.17E-05	0.000174	0.003195	0.003065	0.003978
	EPI+sucho	0.612076	0.004413	0.001895	0.943903	0.102241	0.015618
ABA+sucho	EPI+sucho	3.08E-05	4.09E-05	0.00116	0.003692	0.003723	0.020018

Tabulka č. 13 Kyselina jasmonová – Hodnoty P mezi jednotlivými variantami

JA		18.04.2021	20.04.2021	22.04.2021	24.04.2021	26.04.2021	28.04.2021
		Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P
Kontrola	Sucho	0.542144	0.003176	0.696131	0.071569	0.586604	0.163592
	ABA+sucho	0.278504	0.623494	0.020477	0.024771	0.919432	0.427889
	EPI+sucho	0.109133	0.814488	0.59416	0.062581	0.00543	0.092206
Sucho	ABA+sucho	0.814773	0.002303	0.029356	0.126351	0.624006	0.890072
	EPI+sucho	0.311999	0.00505	0.437302	0.848201	0.02344	0.083604
ABA+sucho	EPI+sucho	0.302739	0.500258	0.043136	0.152312	0.003861	0.147478

Tabulka č. 14 Kyselina salicylová – Hodnoty P mezi jednotlivými variantami

SA		18.04.2021	20.04.2021	22.04.2021	24.04.2021	26.04.2021	28.04.2021
		Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P
Kontrola	Sucho	0.975188	0.790056	0.050367	0.593536	0.200594	0.202532
	ABA+sucho	0.633396	0.107407	0.074508	0.049967	0.415923	0.006601
	EPI+sucho	0.158078	0.154576	0.316246	0.042493	0.028248	0.937966
Sucho	ABA+sucho	0.705878	0.14339	0.913016	0.030375	0.952073	0.000917
	EPI+sucho	0.270841	0.215063	0.418208	0.017376	0.162407	0.250738
ABA+sucho	EPI+sucho	0.108457	0.055525	0.494038	0.559747	0.309402	0.002075

Tabulka č. 15 Kyselina indol-3-octová – Hodnoty P mezi jednotlivými variantami

IAA		18.04.2021	20.04.2021	22.04.2021	24.04.2021	26.04.2021	28.04.2021
		Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P	Hodnota P
Kontrola	Sucho	0.417753	0.045553	0.826706	0.31288	0.039325	0.018336
	ABA+sucho	0.144886	0.030939	0.025165	0.285936	0.659518	0.054347
	EPI+sucho	0.123199	0.233453	0.084163	0.26965	0.03178	0.011897
Sucho	ABA+sucho	0.733765	0.285545	0.035741	0.054919	0.053534	0.948773
	EPI+sucho	0.794681	0.459596	0.102812	0.028294	0.631849	0.033606
ABA+sucho	EPI+sucho	0.890353	0.160748	0.842759	0.856568	0.04184	0.3304