

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra botaniky a fyziologie rostlin



Účinek aplikace exogenního glycin betulinu a vodního deficitu na obsah prolinu a relativního výtoku elektrolytů u juvenilních rostlin kukuřice

Diplomová práce

Autor práce: Jan Pecka

Obor studia: Rostlinná produkce (AMRR)

Vedoucí práce: doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci: "Účinek aplikace exogenního glycin betulinu a vodního deficitu na obsah prolinu a relativního výtoku elektrolytů u juvenilních rostlin kukuřice" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4. 2019

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval zejména doc. Ing. Františku Hniličkovi, Ph. D. za ochotu, nadšení, zápal a vtip, který prokázal při konzultacích a mailových korespondencích. Děkuji také všem mým spolužákům za vytvoření skvělé atmosféry při každé vyučovací hodině a za jejich vstřícného a týmového ducha. Poděkování také patří vyučujícím, které jsem měl čest poznat, a kteří mě obohatili o mnohé znalosti. Největší dík ovšem patří mé rodině, která mě neustále podporuje a uvnitř které se cítím být milován, a která mi dává sílu do všeho, co dělám. Na závěr bych chtěl ještě poděkovat Kačence, která mi pomohla vždy, když to bylo nejvíc potřeba.

Účinek aplikace exogenního glycin betulinu a vodního deficitu na obsah prolinu a relativního výtoku elektrolytů u juvenilních rostlin kukuřice

Souhrn

Kukuřice setá (*Zea mays* L.) je nejpěstovanější obilninou planety a v blízké budoucnosti se dá očekávat její další rozšíření. Jako C4 rostlina efektivněji využívá sluneční energii a přes počáteční pomalejší růst je schopna dosáhnout jednoho z nejvyšších výnosů biomasy mezi zemědělskými plodinami. Je rovněž předmětem šlechtitelského zájmu a genetických modifikací, kdy jsou upravovány především geny zodpovědné za odolnost vůči chemickým látkám či vůči biotickým stresorům.

Vodní deficit je jedním z hlavních abiotických stresorů na světě ovlivňující produktivitu přirozených i uměle vytvořených ekosystémů a snižuje produkci a kvalitu hospodářsky důležitých zemědělských komodit. Ke stabilizaci výnosů a zachování dostupnosti potravin bude potřeba komplexní přístup k pěstování a hospodaření s vodou. Jednou ze složek tohoto přístupu mohou být i aplikace osmoticky aktivních látek, které pomáhají rostlinám překonávat stres suchem. Mezi tyto látky patří i glycin betulin.

Pokus byl založen ve skleníku Katedry botaniky a fyziologie rostlin FAPPZ a jako rostlinný materiál byly použity dva vybrané hybridy kukuřice seté - RGT Indexx a RGT Lipexx. Schéma pokusu zahrnovalo čtyři varianty – KK (nestresovaná neošetřená varianta), KG (nestresovaná varianta ošetřená glycin betulinem), KS (stresovaná neošetřená varianta) a GS (stresovaná varianta ošetřená glycin betulinem) a čtyři odběry v pěti opakováních. Pro obsah prolinu byla hodnocena zvláště nadzemní část a kořeny. Odběr 1 – ve fázi BBCH 16, bez stresu vodním deficitem a bez aplikace glycin betulinu. Odběr 2 - ve fázi BBCH 16, kdy byla provedena foliární aplikace glycin betulinem o koncentraci 0,05 %. Odběr 3 – ve fázi BBCH 23, v období rulování listových čepelí vlivem vodního deficitu. Odběr 4 – ve fázi BBCH 23 po opětovné rehydrataci, tři dny po 3. odběru. Pro stanovení hodnot obsahu prolinu byl použit spektrofotometr UV - Vis Evolution 201 (Thermo Scientific) podle metodiky dle Bates (1973). Relativní výtok elektrolytů (Rel %) byl zjišťován na základě měření vodivosti přístrojem GRYF 106 L3 (GRYF HB spol. s.r.o. Česká republika) podle modifikované metodiky dle Campos et al. (2003).

Ze získaných výsledků vyplývá, že mezi genotypy kukuřice seté existují průkazné rozdíly v obsahu prolinu a relativního výtoku elektrolytů při působení vodního deficitu a aplikace exogenního glycin betulinu. Avšak rozdíl v obsahu prolinu mezi nadzemní částí a

kořeny nebyl prokázán. U hybridu RGT Indexx má převažující vliv na obsah prolinu aplikace osmoticky aktivní látky – glycin betulinu, zatímco u hybridu RGT Lipexx má převažující vliv na obsah prolinu vodní deficit a vodní deficit v kombinaci s osmoticky aktivní látkou – glycin betulinem. Nejnižší obsah prolinu byl naměřen v kořenech u varianty KK hybridu RGT Lipexx při 2. odběru $15,54 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, nejnižší průměrný obsah pak $38,67 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v kořenech varianty KK hybridu RGT Indexx. Naopak nejvyšší obsah prolinu byl naměřen v kořenech u varianty GS hybridu RGT Lipexx při 3. odběru $603,00 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, nejvyšší průměrný obsah pak $206,51 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u téže varianty hybridu RGT Lipexx. Rozdíl v obsahu prolinu mezi oběma hybridy u stresovaných variant byl přibližně trojnásobný. Vyšší obsah prolinu u hybridu RGT Indexx oproti hybridu RGT Lipexx byl zaznamenán pouze ve variantě KG. V nadzemní části $86,13 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oproti $51,46 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a v kořenech $101,34 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oproti $61,71 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Z výsledků je dále patrné, že při měření relativního výtoku elektrolytů nebyly zaznamenány průkazné rozdíly mezi sledovanými variantami, avšak rozdíl mezi sledovanými hybridy byl přibližně dvojnásobný a vyšší míra poškození membrány byla zaznamenána u hybridu RGT Lipexx (okolo 60 %). Nejnižší průměrné hodnoty relativního výtoku elektrolytu byly zjištěny ve variantě KK hybridu RGT Indexx 31,13 %, nejnižší hodnota byla naměřena při 1. odběru u téže varianty 24,17 %. Zatímco nejvyšší průměrné hodnoty relativního výtoku elektrolytu byly zjištěny ve variantě KS hybridu RGT Lipexx 61,98 % a nejvyšší hodnota byla naměřena u varianty KG hybridu RGT Lipexx při 4. odběru 64,58 %.

Dle navrhovaných hypotéz bylo potvrzeno, že genotyp hraje významnou roli v toleranci vůči vodnímu deficitu a též aplikace osmoticky aktivní látky – glycin betulinu v kombinaci s vodním deficitem průkazně ovlivňuje obsah prolinu a neprůkazně míru poškození rostlinných pletiv.

Klíčová slova: kukuřice setá; glycin betulin; vodní stres; prolin; REL %

Effect of exogenous betulinic glycine and water deficit on proline and relative electrolyte leakage in leaves of juvenile maize plants

Summary

Maize (*Zea mays* L.) is the most often grown crop in the world and its further spread in the future is highly probable. Maize uses sun energy effectively as a C4 plant and despite slower growth at the onset of its vegetation, it is capable of yielding most biomass among the agricultural crop. Maize is also a subject of interest in the fields of breeding and genetical modifications where the genes responsible for resistance against chemicals or biotics stress are mainly modified.

Water deficit is one of the most serious and prominent abiotic stressor in the world, affecting productivity of natural and human-made ecosystems and also decreases production and quality of important agricultural commodities. There is a need to introduce a complex attitude towards growing foods and water management to stabilize yields and maintain food availability. Application of osmotically active substances, which help plants overcome draught stress, can be one of contributors to creating such attitude. Betulinic glycine is one of them.

The experiment was carried out in the greenhouse of Department of Botany And Plant Physiology FAPPZ. As plant material two selected maize hybrids – RGT Indexx and RGT Lipexx were used. The experiment scheme included four varieties – KK (a variant free of stress and treatment), KG (a variant free of stress, treated with betulinic glycine), KS (a variant under stress and untreated), GS (a variant under stress and treated with betulinic glycine). There were also four samples in two repetitions. Sample 1 – stage BBCH 16, free of drought stress and without betulinic glycine treatment. The shoots along with roots were studied separately to determine the amount of proline. Sample 2 – stage BBCH 16 treated with foliar by 0,05 % betulinic glycine. Sample 3 – stage BBCH 23 - leafs were rolled due to water deficit. Sample 4 – BBCH 23 – was taken after rehydration, three days after the third sample. Spektrofotometr UV - Vis Evolution 201 (Thermo Scientific) was used to determine the content of proline through Bates method. GRYF 106 L3 (GRYF HB spol. s.r.o. Czech Republic) was used to determine relative electrolyte leakage (REL %) with the aid of the modified method of Campos et al. (2003).

The results indicate that there are significant differences between the amount of proline and relative electrolyte leakage caused by water deficit and treated by exogenous

betulinic glycine. However, there are no significant differences regarding the amount of proline in shoots and roots. In the case of hybrid RGT Indexx, the effect of treatment by osmotically active substance – betulinic glycine on content of proline – was observed and therefore in the case of hybrid RGT Lipexx it was determined that water deficit in combination with betulinic glycine affects the amount of proline. The lowest content of proline was observed in roots in variant KK of hybrid RGT Lipexx during sample 2 ($15,54 \mu\text{g.ml}^{-1}$), the lowest average content of proline in roots in variant KK of hybrid RGT Indexx ($38,67 \mu\text{g.ml}^{-1}$). By contrast, the highest content of proline was observed in roots in variant GS of hybrid RGT Lipexx during sample 3 ($603,00 \mu\text{g.ml}^{-1}$), the highest average content of proline in the same variant of the same hybrid ($206,51 \mu\text{g.ml}^{-1}$). The difference in content of proline between both hybrids in stress varieties was about three times higher. The higher content of proline in hybrid RGT Indexx compared to hybrid RGT Lipexx was observed only in KG variant. For shoots $86,13 \mu\text{g.ml}^{-1}$ compared to $51,46 \mu\text{g.ml}^{-1}$ and for roots $101,34 \mu\text{g.ml}^{-1}$ compared to $61,71 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

The results also show that there are not significant differences between the observed varieties in relative electrolyte leakage, but there are considerable discrepancies between observed maize hybrids. In hybrid RGT Lipexx about twice higher relative electrolyte leakage compared to hybrid RGT Indexx (around 60 %) was observed. The lowest average relative electrolyte leakage was observed in variant KK of hybrid RGT Indexx (31,13 %), the lowest value was observed in sample 1 in the same variant (24,17 %). Therefore the highest average relative electrolyte leakage was observed in variant KS of hybrid RGT Lipexx (61,98 %) and the highest figure of all was found in variant KG of hybrid RGT Lipexx during sample 4 (61,98 %)

In accordance with the suggested hypothesis it was confirmed that the genotype plays an important role in establishing tolerance against water deficit in combination with treatment by osmotically active substance – betulinic glycine. These two factors directly affect the amount of proline and indirectly the degree of plant cells damage.

Keywords: maize; betulinic glycine; water deficit; proline; REL %

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce a hypotézy	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Botanická charakteristika kukuřice seté (<i>Zea mays</i> L.)	3
3.2	Historie a současnost pěstování kukuřice seté	5
3.3	Obecná charakteristika stresů.....	8
3.3.1	Rozdělení stresových faktorů a interakce mezi nimi	8
3.3.2	Stresová reakce.....	9
3.4	Stres suchem	11
3.5	Prolin a jeho funkce v rostlině.....	15
3.6	Glycin betain a jeho funkce v rostlině	17
4	Metodika pokusů	21
4.1	Pokusné rostliny.....	21
4.2	Založení a schéma pokusu	21
4.3	Měření fyziologických charakteristik.....	22
4.3.1	Stanovení prolinu.....	22
4.3.2	Stanovení REL %.....	23
4.4	Použité statistické metody.....	23
5	Výsledky	24
5.1	Obsah prolinu.....	24
5.1.1	Hybrid RGT Indexx.....	24
5.1.2	Hybrid RGT Lipexx	28
5.1.3	Porovnání sledovaných hybridů	32
5.2	Relativní výtok elektrolytů (REL %)	34
5.2.1	Hybrid RGT Indexx.....	34
5.2.2	Hybrid RGT Lipexx	36
5.2.3	Porovnání sledovaných hybridů	38
6	Diskuze	39
6.1	Obsah prolinu.....	39
6.2	Relativní výtok elektrolytů (REL %)	41
7	Závěr	42
8	Seznam použité literatury.....	44

1 Úvod

Vodní deficit je jedním z hlavních abiotických stresorů na světě ovlivňující produktivitu přirozených i uměle vytvořených ekosystémů a snižuje produkci a kvalitu hospodářsky důležitých zemědělských komodit. S ohledem na stále rostoucí světovou populaci bude nutné zajistit výnosovou stabilitu plodin a nalézt efektivní řešení, jak suchu a problémům s nedostatkem vody čelit. Tato řešení budou nejspíše obsahovat celou řadu opatření, mezi které se může řadit i aplikace osmoticky aktivních látek, které pomáhají rostlinám vypořádat se s nedostatkem vody a zlepšují hospodaření s vodou. Mezi tyto látky patří i glycin betulin.

Kukuřice setá je nejpěstovanější obilninou planety a v blízké budoucnosti se dá očekávat její další rozšíření. Své místo zaujímá i v osevních postupech v České republice, kde je ceněna především jako kvalitní krmivo s vysokým podílem jádra. Jako C4 rostlina je schopna efektivněji využívat sluneční energii a přes počáteční pomalejší růst je schopna dosáhnout jednoho z nejvyšších výnosů biomasy mezi zemědělskými plodinami. Je rovněž předmětem šlechtitelského zájmu a genetických modifikací, kdy jsou upravovány především geny zodpovědné za odolnost vůči chemickým látkám, či vůči biotickým stresorům.

V diplomové práci byla pozornost věnována studiu reakcí rostlin kukuřice seté na vodní deficit a také na určení rezistence vůči němu. Rostliny vyvinuly dvě odlišné strategie na obranu proti vodnímu deficitu. První z nich je avoidance, kdy je rostlina schopna stresoru uniknout, a druhou strategií je tolerance, kdy se rostlina dokáže přizpůsobit sníženému příjmu vody. Osmotické přizpůsobení patří mezi jednu z takových reakcí. Zvýšená tvorba osmoprotektantů přispívá ke zlepšení vodního stavu v rostlině. V této diplomové práci byla zaměřena pozornost na látku glycin betulin, která byla aplikována přes list na juvenilní rostliny kukuřice seté.

I vzhledem k možným prognózám o delších obdobích bez dešťových srážek na území České republiky, lze brát osmoprotektanty jako prostředek k udržení životaschopnosti rostliny po dobu, kdy je ovlivněna vodním deficitem. Význam z hlediska praktického využití získaných poznatků by tedy mohl být prospěšný zejména samotným pěstitelům jako možné doporučení k foliární aplikaci.

2 Cíle práce a hypotézy

Vodní deficit je jedním z hlavních abiotických stresorů na světě ovlivňující produktivitu přirozených i uměle vytvořených ekosystémů a do budoucna bude zřejmě tím nejnebezpečnějším a nejvíce limitujícím stresem pěstování rostlin. Z toho důvodu byl v této diplomové práci sledován vliv vodního deficitu a aplikace osmoticky aktivní látky glycin betulinu na juvenilní rostliny kukuřice seté.

Cíle diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- Stanovit vliv vodního deficitu, aplikace osmoticky aktivní látky – glycin betulinu a jejího ovlivnění obsahu prolinu a relativního výtoku elektrolytů.
- Stanovit rozdílnou citlivost vybraných genotypů kukuřice seté vůči vodnímu deficitu a reakci na aplikaci glycin betulinu.
- Sledovat vliv aplikace glycin betulinu a vodního deficitu na obsah prolinu a výtoku elektrolytu v listech kukuřice seté.

Na základě výše zmíněných cílů je možné stanovit tyto navrhované hypotézy:

- Mezi genotypy kukuřice seté se při působení vodního deficitu a aplikace glycin betulinu v juvenilních fázích vývoje projeví rozdílné reakce v obsahu prolinu a výtoku elektrolytu.
- Kombinace působení vodního deficitu a aplikace osmoticky aktivní látky ovlivňuje obsah prolinu a míru poškození rostlinných pletiv.

Kukuřice setá je nejpěstovanější plodinou světa a i v České republice zaujímá přední místo v osévaných plochách zejména pro krmné účely anebo jako biomasa pro tvorbu energie. Z těchto důvodů byla vybrána kukuřice setá jako modelová rostlina.

3 Literární rešerše

3.1 Botanická charakteristika kukuřice seté (*Zea mays* L.)

Kukuřice patří do třídy rostlin jednoděložných, do čeledi *Poaceae*. Jak je patrné z obr. 1, kukuřice je statná rostlina, s výškou stébla 150 až 400 cm. Stéblo je vyplněné dřeví, v průměru 2 – 6 cm široké, přímé, na dolních kolínkách kořenící. Pochvy listů jsou hladké, jazýček dosahuje délky 3 – 5 mm, na konci je uťatý. Čepele listů jsou ploché, široké, čárkovitě kopinaté. Mohou být 5 – 15 cm široké, na líci slabě chlupaté a drsné. Květenství kukuřice jsou jednopohlavná a jednodomá. Samičí květenství představují válcovité palice rostoucí v úzlabích dolních listů. Jsou až do zralosti obaleny nafouklými pochvami, ze kterých nahoře vyčnívá hustý svazek niťovitých brvitých čnělek ukončených rozeklanou bliznou. Samčí květenství jsou vrcholová, tvoří přímou latu složenou z hustých, úzkých, až 20 cm dlouhých lichoklasů. Klásky jsou uspořádané ve dvojicích, z nichž dolní je přisedlý a horní stopkatý. Obilky kukuřice jsou neokoralé, nejčastěji žluté či tmavočervené až karmínové (Dostál 1989).



Obr. 1: Kukuřice setá (wikiwand.com).

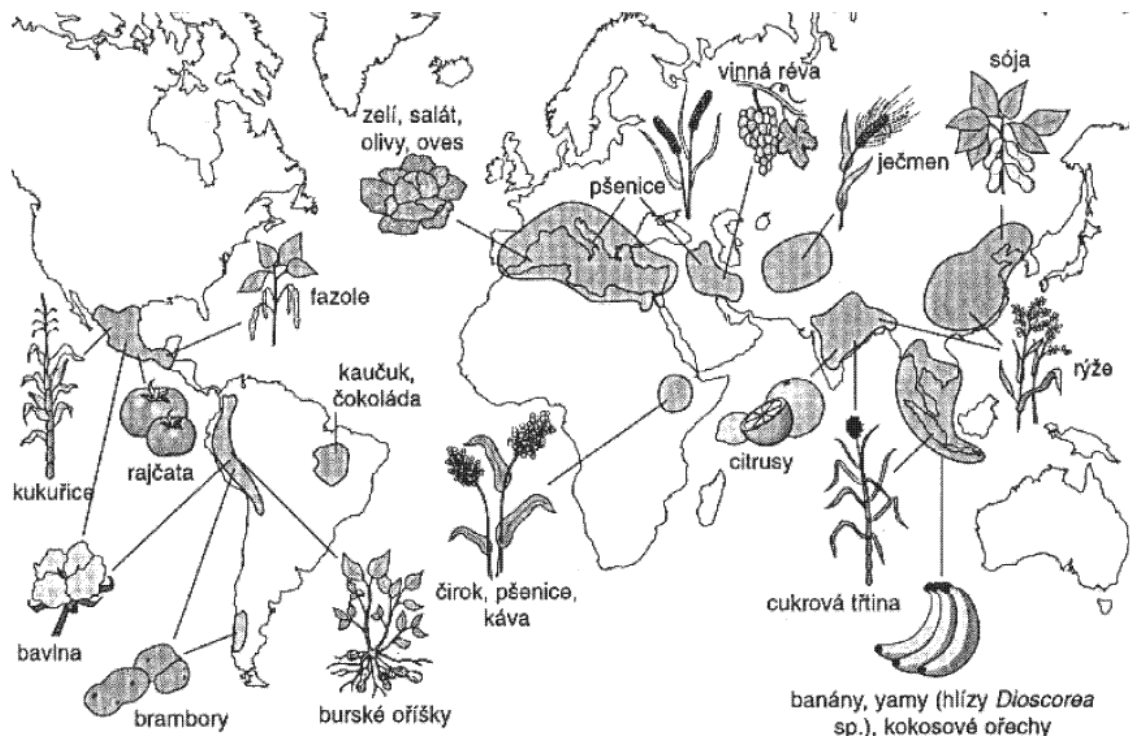
Zimolka (2008) uvádí přehled nejdůležitějších variet kukuřice, na kterých ilustruje pestrost tohoto druhu:

- Kukuřice obecná, tvrdá (*Zea mays* convar. *indurata* Sturt.). Patří k nejstarším varietám, je vysoce polymorfní. Zrno má okrouhlé, tvrdé, lesklé s moučnatým endospermem ve střední části. Zahrnuje ranější odrůdy s rychlejším vývojem. Ovšem v porovnání s kukuřicí koňský zub má nižší výnos.
- Kukuřice koňský zub (*Zea mays* convar. *indentata* Sturt.). Zrno se vyznačuje klínovitým tvarem s malou jamkou nahoře, její zrno je tvrdší než zrno kukuřice obecné. Vnitřní a horní část endospermu je měkká a moučnatá. Rostliny později dozrávají, jsou však výnosnější.
- Kukuřice polozubovitá (*Zea mas* convar. *aorista* Grebencsc.). Pochází z křížení koňského zubu a kukuřice obecné. Jedná se o přechodnou varietu.
- Kukuřice pukancová (*Zea mays* convar. *microsperma* Körn.). Vytváří drobné zrno s HTS 90 – 130 g. Existují dva typy, rýžová se zobákovitě ukončeným zrnem a perlová se zrnem zakulaceným, hladkým a lesklým. Má poměrně vysokou výživovou hodnotu a používá se na výrobu popcornu, protože pražením zrno praská, oploďí a endosperm přitom vyhřezává a několikrát zvětší svůj objem.
- Kukuřice cukrová (*Zea mays* convar. *saccharata* Sturt.). Zrno je na lomu lesklé, obsahuje málo škrobu. Charakteristickým znakem je svraštělé zrno. Tato vlastnost se ovšem projevuje až po dozrání. V mléčné zralosti má zrno okrouhlý tvar a právě v tomto stádiu se konzumuje jako zelenina.
- Kukuřice vosková (*Zea mays* convar. *ceratina* Grebencsc.). Zrno je velmi podobné zrně kukuřice obecné, liší se pouze matným povrchem. Periferní část endospermu je neprůsvitná, optickými vlastnostmi podobná vosku. Je vhodná k technickým účelům.
- Kukuřice škrobnatá (*Zea mays* convar. *amylacea* Sturt.). Zrno obsahuje málo bílkovin, zato disponuje vyšším obsahem škrobu. Vhodná je tedy k výrobě lihu. Zrno obsahuje moučný endosperm, povrch je matný.
- Kukuřice pluchatá (*Zea mays* var. *tunicata* Sturt.). Hlavní odlišností je uzavřené zrno ve zvětšených pluchách. Není hospodářsky významná, slouží především jako zdroj botanických studií a genetického materiálu.
- Kukuřice pestrolistá (*Zea mays* var. *japonica* Sturt.). Pěstuje se pouze jako okrasná rostlina. Má světležluté anebo červeně pruhované listy.

3.2 Historie a současnost pěstování kukuřice seté

Vavilov člení centra původu kulturních rostlin na osm oblastí, jak dokládá obr. 2. Za původ planých forem kukuřice a jejich následné zdomestikování považuje oblast Latinské Ameriky. Kukuřice byla hlavní plodinou pro starověké civilizace Aztéků, Mayů a Inků. Počátky jejího pěstování se tak datují do období před 6 tisíci lety (Doležal 2006).

Ovšem je potřeba vzít v potaz také výsledky Harlan (1971), které ukazují na existenci tzv. ne-center, které společně s centry původu kulturních rostlin tvoří ucelené systémy. Ne-centra původu se nacházejí v tropickém pásu, konkrétně v Africe, jihozápadní Asie a Jižní Americe. Díky větší přirozené biodiverzitě se zde mohly vyvinout druhy, které se s pozdější migrací a výměnou genetických informací, dostaly do center původu, odkud vzešly lidskou činností druhy domestikované. Za původní místo vzniku kukuřice seté je možno tedy označit systém skládající se z ne-centra v Jižní Americe, zejména v podhůří And v celé jeho délce, a centra původu v Latinské Americe.



Obr. 2: Centra původu kulturních rostlin dle Vavilova (Doležal, 2006).

Jak uvádí Primack et al. (2001) užitkové druhy rostlin vykazují v určitých oblastech světa vysokou genetickou variabilitu, a to nejčastěji tam, kde byl druh poprvé domestikován nebo je stále pěstován v tradičních zemědělských podmínkách. Variabilita druhu *Zea mays*

právě v Latinské Ameriky tak poukazuje na skutečnost, že se opravdu jedná o místa, ze kterých kukuřice setá vzešla.

Podle Doebley et al. (1995) je původ kukuřice seté pozoruhodným případem evoluce. Teosint (*Zea Luxurians* Durieu), jednoho z pravděpodobných předků dnešní kukuřice, se totiž při svém prvním objevení nepodařilo zařadit do stejného rodu kvůli odlišnému habitu rostliny. Díky křížení s jinými primitivními druhy, upřednostňování rostlin produkujících největší palice, zrna a schopné přežít v prostředí horských civilizací indiánský kmenů, se postupně zrodila podoba kukuřice seté známé v současnosti (Strnadová et al. 2012).

Kukuřice patří mezi nejvýznamnější plodinu současné doby. Během posledních desetiletí lze sledovat stoupající tendenci v množství osetých ploch nejen na americkém kontinentě, ale i ve většině zemí Evropy (Tatsumi et al. 2011).

Wang et al. (2017) uvádějí, že díky pokroku v oblasti šlechtění je možné kukuřici setou úspěšně pěstovat takřka po celém světě a v nejrůznějších výrobních oblastech. Jak odrůdy na siláž, tak zrnové odrůdy se daří pěstovat i v severských zemích, které se významně liší od původního místa vzniku této rostliny.

Hnilička & Hniličková (2012) dokumentují jednu z velikých výhod kukuřice, a to sice nízký transpirační koeficient, který se pohybuje v rozmezí od 230 do 380. Vytvoření co nejvíce sušiny při spotřebování co nejméně vody se jeví jako klíčová vlastnost úspěchu kukuřice seté jako kulturní plodiny rozšířené po celé zemi.

Zlepšená fotosyntetická výkonnost a odolnost k suchu u kukuřice je rovněž předmětem genetického inženýrství, kdy byl do rostliny kukuřice vložen gen *pepc* původem z čiroku obecného (*Sorghum bicolor*). Gen řídí produkci enzymu fosfoenolpyruvátcarboxylázy, který je u C4 rostlin významný pro fixaci a následnou utilizaci CO₂. Díky této modifikaci, která je v USA již využívána a dále rozvíjena, mají hybridy kukuřice s touto genetickou úpravou podstatně mohutnější kořenový systém, který umožňuje rostlině čerpat vodu z 2x až 3x větších hloubek oproti konvenčním odrůdám (Říha 2008).

V souvislosti s efektivnějším pěstováním kukuřice je také ověřováno souběžné vysévání fazolu a kukuřice. Luskovina v podsevu zvyšuje konkurenci vůči plevelům, eliminuje erozi, zajišťuje zlepšení půdní struktury, optimalizuje funkci mikrobních společenstev. Z hlediska výživy představuje zdroj dusíku, který je pro kukuřici přístupný zejména v druhé polovině vegetace, a též zpřístupňuje fosfor (Latati et al. 2016).

Minimální konkurenční schopnost na počátku vegetace souvisí především se systémy regulace plevelů. Vytrvalé druhy je vhodné řešit již v předplodině, případně využít možnosti setí do vymrzlé meziploidy. Sortiment herbicidů je dostatečně široký a lze je aplikovat jak preemergentně, tak až po následném vzejití rostlin. Poměrně rozšířeným systémem je rovněž kombinace herbicidní ochrany a plečkování v pozdější fázi, které je spojeno s přihnojením kapalnými dusíkatými hnojivy. Ve světě je nejrozšířenějším systémem herbicidní regulace pěstování GM kukuřice Roundup Ready, kdy se aplikuje účinná látka glyfosát nejčastěji ve dvou termínech a to až do fáze devíti listů (Kazda et al. 2010).

Mezi časté choroby kukuřice patří spála klíčnicích rostlin způsobená komplexem půdních hub, dále pak obecná sněť kukuřičná, jejímž původcem je patogen *Ustilago maydis* a napadení rostlin houbami rodu *Fusarium*. Základním ochranným opatřením vůči spále klíčnicích rostlin je prevence, kdy je důležitý výsev do dostatečně prohřáté (alespoň nad 6 °C), neutužené a nezamokřené půdy, provedení kvalitní předseťové přípravy a v neposlední řadě fungicidní moření osiva. Fuzariózy na rozdíl od sněti mohou znehodnotit produkci obsahem mykotoxinů. Je rovněž prokázán vyšší výskyt fuzarióz na rostlinách napadených obecnou snětivostí kukuřice. Taktéž přehnojení dusíkem či naopak deficit draslíku se uvádí jakožto faktory zvyšující pravděpodobnost napadení (Kazda et al. 2010).

Výše uvedení autoři uvádějí také dva nejnebezpečnější škůdce. Tím nejzávažnějším je motýl zavíječ kukuřičný (*Ostrinia nubilalis*). Housenky vyžirají stébla a prožirají se do palic. Způsobují lámání rostlin a zvyšuje se riziko infekce houbovými chorobami. Ochrana se provádí buď chemicky postřikem na čerstvě vylíhnuté larvy, anebo biologicky pomocí parazitický vosiček z rodu *Trichogramma*.

Bázlivec kukuřičný (*Diabrotica virgifera*) se jako nebezpečný škůdce vyskytuje až v posledních letech. Souvisí to s nárůstem ploch pěstované kukuřice a především s nedodržením osevních postupů, protože největší škody páchá až larva, která se líhne z přezimujícího vajíčka následný rok a může fatálně poškodit kořenový systém. Přímé škody dospělců žírem jsou závažné pouze při mimořádně hojném výskytu.

3.3 Obecná charakteristika stresů

3.3.1 Rozdělení stresových faktorů a interakce mezi nimi

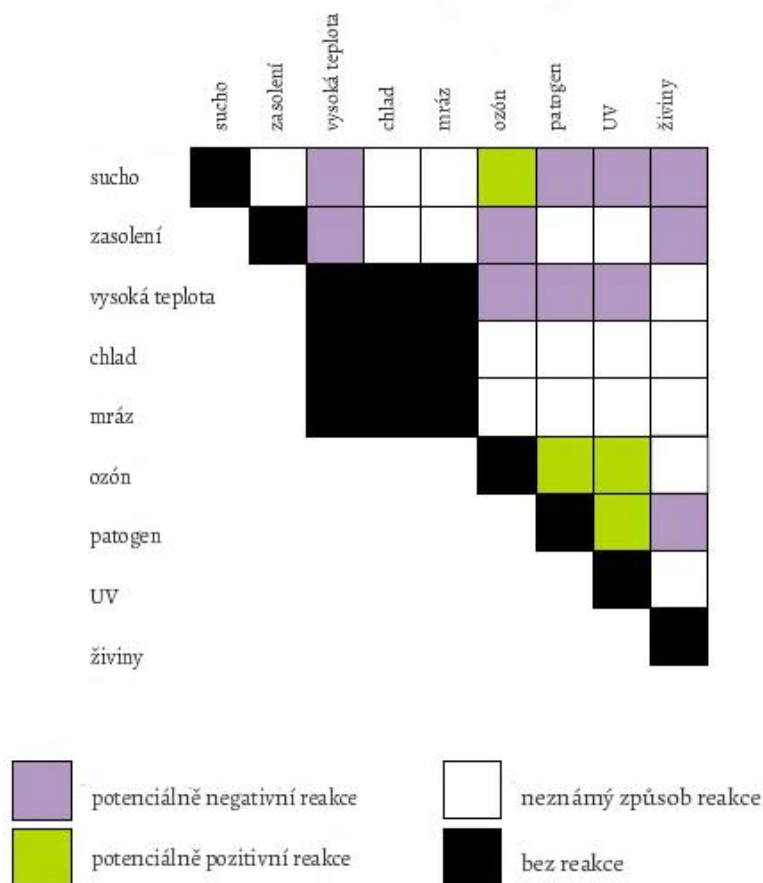
Pojmem stresor rozumíme jakýkoli vnější faktor, který vykonává vliv pro rostliny nevýhodný, negativně působí na fyziologické, biochemické a molekulární procesy v rostlině a může vést až ke smrti organismu (Ashraf & Harris 2013).

Stresové faktory lze rozdělit do dvou skupin – abiotické a biotické. Mezi abiotické patří teplota (horko, mráz, chlad), voda (její nadbytek nebo naopak nedostatek), záření, chemická zátěž (toxické kovy, nadbytek či deficit solí, pesticidy) a mechanická zátěž (vítr, částice, tlak). K biotickým faktorům se řadí tlak chorob, škůdců a negativní působení okolních organismů čili konkurence. Tyto faktory ovlivňují životní funkce rostlin, ale nepřímo jsou také zodpovědné za nepříznivou kvalitu či výnos pěstované plodiny (Hnilička & Hniličková 2016).

Stresové faktory můžeme hodnotit také v rámci jejich působení v čase. Zatímco mezi rychle působícími stresory, které se mohou projevit řádově v minutách či hodinách, lze zařadit například stres tepelný, či nepříznivé působení povětrnostních podmínek, mezi dlouhodobé, působící v dnech až měsících, patří nedostatek vody v půdě nebo nedostatek minerálních živin (Jenks & Hasegawa 2005).

Důležité je si také uvědomit, že jednotlivé stresové faktory nepůsobí odděleně, ale vždy v kombinaci, a vytváří tak interakci mezi sebou, což vede ke komplikovanosti určení reakcí rostlin. Odděleně působící stresory kupříkladu nemusí vést přímo ke smrti organismu, avšak v kombinaci s ostatními se z nich stává pro život rostliny nepřekonatelná překážka. Taktéž různé kombinace stresorů mohou ohrozit pouze některé rostlinné orgány, zatímco v jiné kombinaci a za jiných podmínek je vystavena stresoru celá rostlina (Hnilička & Hniličková 2016).

Podle Mittler (2006) ovšem existují i kombinace stresových faktorů, viz obr. 3, které mohou vyvolat potencionálně pozitivní reakci. Tyto interakce jsou bohužel oproti negativně působícím v menšinovém zastoupení, a proto je jednou z výzev moderního šlechtění rostlin a genového inženýrství vyvinout takové rostliny, které by ve své genetické výbavě nesly geny tolerance právě ke kombinaci různých stresových faktorů.



Obr. 3: Stresové matice (upraveno dle Mittler 2006).

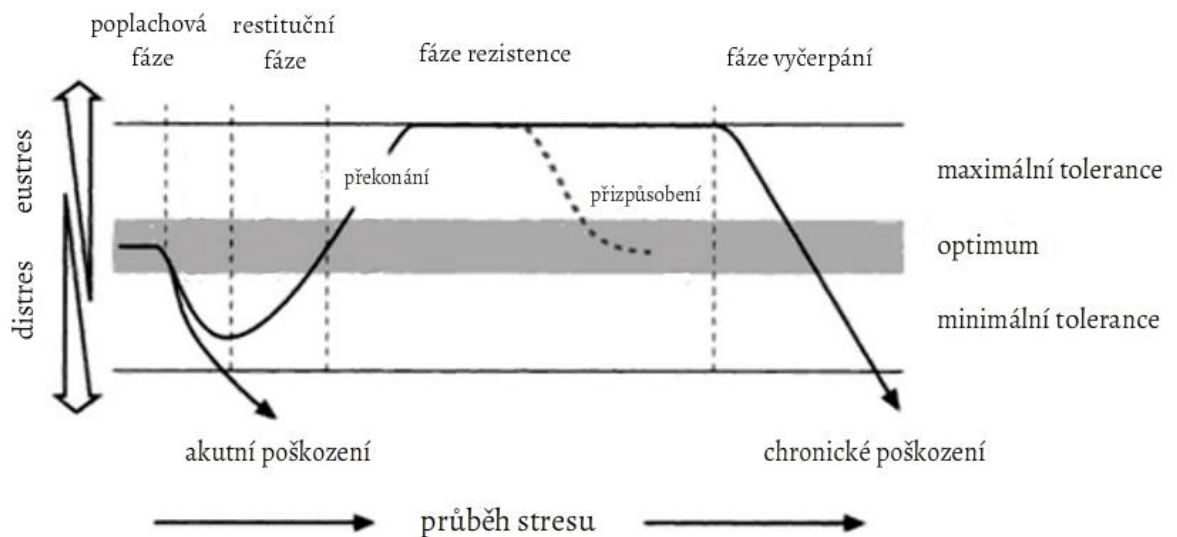
3.3.2 Stresová reakce

Rostlina reaguje na stres obrannými reakcemi, které lze obecně nazvat stresovou reakcí. Podle Levitt (1980) se jedná o tzv. strain. Stresové reakce lze dle Selye (1973) rozdělit na specifické a nespecifické. Toto rozdělení se odvíjí od modifikace základních metabolických drah. Není však vždy jasně pozorovatelné, o jakou reakci se jedná, neboť i specifická reakce může postrádat svoji specifitu. Příkladem mohou být heat shock proteiny (HSP), které se v těle rostliny vytvářejí jako obrana vůči vysoké teplotě, avšak jejich výskyt byl také prokázán v případě stresu způsobeného těžkými kovy (Schulze et al. 2005). Taktéž zvýšení koncentrace osmolytů a s tím související změna membránového potenciálu je příkladem specifické reakce, která je ovšem reakcí jak na stres suchem, tak stres mrazem (Beck et al. 2007).

Obecně lze říci, že při akutním stresu dochází častěji ke specifickým reakcím spojeným s tvorbou určitých specifických látek, zatímco při vleklém stresu je reakce rostlin méně specifická (Cerkal 2011).

Mezi nespecifické reakce patří např. tvorba a zesílení mechanických bariér, produkce sekundárních metabolitů nebo antimikrobiálních proteinů, které brání průniku patogenu do organismu, popřípadě zabraňují jeho dalšímu šíření (Hammond-Kosack et al. 1996).

Působení stresu na organismus lze rozdělit do 4 základních fází, jak demonstruje obr. 4. Z něho vyplývají čtyři základní fáze stresu: poplachová, restituční, rezistence a vyčerpání. Ve fázi poplachové rostlina reaguje na působení stresových faktorů na ni a vyhodnocuje jejich účinek. Navazuje na ni fáze restituční, kdy rostlina mobilizuje kompenzační mechanismy. Fáze rezistence se vyznačuje odpovědí organismu, kdy rostlina buď překoná stresové působení a dojde k tzv. eustresu, který má pozitivní vliv na vývoj a přežití rostliny. Pokud rostlina není schopna potlačit vliv stresu, dostane se do fáze vyčerpání, kdy není schopna odolávat stresovým podmínkám a nastává poškození organismu, dochází k tzv. distresu (Larcher 2003).



Obr. 4: Fáze stresu (upraveno dle Larchera, 2003).

Podle Lichtenthaler (1998) eustres působí jako aktivační či stimulační podnět, který pozitivně působí na rostlinu. Mírný stres tedy může být brán jako výhodný stav, který v rostlině aktivuje buněčný metabolismus a stimuluje její fyziologickou aktivitu. Pojem distres lze naopak chápat jako stres, který působí poškození a má na rostlinu negativní vliv. Stresor v takovém případě překročí prahovou hodnotu, kterou není rostlina schopna kompenzovat.

Jak uvádí Cerkal (2011), rostlina se do fáze vyčerpání mnohdy nemusí dostat ani při dlouhodobém působení stresových faktorů. Vlastnosti stresu, které ovlivňují, zda se rostlina dokáže s nepříznivými podmínkami vyrovnat, jsou – síla, doba trvání, počet expozičních a kombinace stresů. Při akutním stresu jsou reakce rostliny silnější, nápadnější a rychleji tak vzniká poškození, zatímco při vleklém stresu rostlina reaguje pomaleji a poškození nejsou tolik nápadná, či k nim dochází se zpožděním.

Mezi schopnosti rostliny, které umožňují odolávat stresovým faktorům, se řadí zejména tolerance. Tu je možno získat buď geneticky, selekcí v průběhu generací. Tento proces se nazývá adaptace. Druhou cestou je aklimatizace, kdy si rostlina při postupném vystavování stresu zvykne na jeho působení a je tak schopna mu odolat (Jenks & Hasegawa 2005).

Změny v důsledku přizpůsobování, či úplnému přizpůsobení rostlin vůči stresovým podmínkám, lze pozorovat na několika úrovních. Změny probíhají na molekulární, subcelulární, orgánové a systémové úrovni. Mezi příklady adaptace rostlin na nepříznivé podmínky patří například vytvoření trnů jako obrana před živočišnými škůdci, anebo zesílení kutikuly kvůli zabránění pronikání UV záření pokožkou (Mareček 2001).

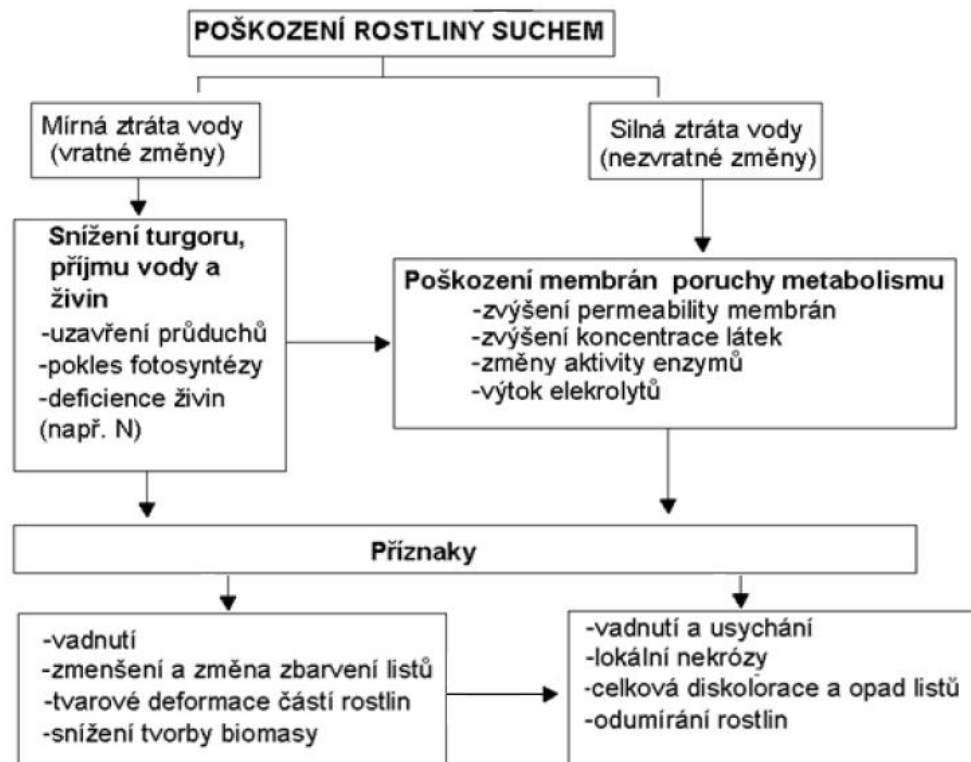
3.4 Stres suchem

Podle Blum (2005) je nastupující stres suchem období, kdy poptávka rostliny po vodě není uspokojena a rostlina se tak dostává do vodního deficitu. Vodní deficit lze definovat jako množství vody, které rostlině chybí k úplnému nasycení. Lipiec et al. (2013) popisují sucho jako výsledek nerovnovážného toku vody mezi evapotranspiračními nároky prostředí a transportem vody v systému půda – kořenový systém.

Voda prostupuje celou rostlinu (průměrný obsah vody v rostlině se pohybuje mezi 60 – 90 %) a vytváří nejen prostředí pro pohyb anorganických i organických látek, ale také hydratuje buněčnou stěnu a cytoplazmu, ovlivňuje strukturu molekul proteinů, nukleových kyselin a polysacharidů. Tvoří prostředí, ve kterém probíhá většina biochemických reakcí a do mnoha procesů vstupuje jako reakční činidlo (např. fotosyntéza, hydrolýza zásobních látek). Vnitřní pozitivní hydrostatický tlak vody pomáhá udržet tvar rostliny a vodní režim stabilizuje teplotní poměry v rostlině i jejím okolí (Taiz & Zeiger 2002).

Je tedy zřejmé, že stres z nedostatku vody patří k nejzávažnějším stresorům a významnému limitnímu faktoru v pěstování rostlin, jak je patrné z obr. 5. Z něho vyplývá, že pokud je rostlina vystavena stresu z nedostatku vody dlouhodobě, začnou se projevat

opticky viditelné změny. Listy žloutnou, hnědnou, svinují se kolem střední žilnatiny a předčasně odumírají. Postiženy jsou nejprve spodní patra, usychání probíhá od vrcholu k bázi listu. Růst všech rostlinných částí je omezen a kvalita plodů se snižuje. Nakonec může docházet až k opadu listů i plodů. Stresované rostliny si za každou cenu snaží udržet plodnost, proto často nastupuje generativní fáze rychleji, vegetační doba se zkracuje. Zvyšuje se hodnota osmotického tlaku díky vyššímu obsahu iontů a cukrů (Kůdela et al. 2013).



Obr. 5: Poškození rostlin suchem (převzato od Kůdely et al. 2013).

Za vodní deficit je považován stav, kdy je obsah vody v rostlině nižší než při maximálním nasycení. Vodní deficit vede ke ztrátě turgoru a projevuje se zastavením růstu a vadnutím. Navíc se při nedostatku vody zvyšuje citlivost k působení dalších stresorů, např. ke zvýšené teplotě, neboť stres suchem významně snižuje transpirační proud a rostlina tak není schopna se dostatečně ochlazovat (Bray 1997).

Nedostatek vody pro zásobení rostliny způsobuje především její nedostupnost, ale také zasolení půd, jež vede ke snížení vodního potenciálu půdního roztoku pod hodnotu vodního potenciálu buněk kořene, čímž zabraňuje v příjmu vody. Stres z nedostatku vody ovšem může nastat i krátkodobě např. vysokou transpirací při horkém dni. Rostlina není schopna kompenzovat zvýšenou transpiraci dostatečným přísunem vody z půdy. Vodní deficit může

být však vyvolán zcela opačnými teplotami, a to při mrazivých dnech, kdy se vytváří led v mezibuněčných prostorách a dochází k dehydrataci cytosolu (Taiz & Zeiger 2002).

Významným ukazatelem toho, zda rostliny přecházejí z optimálního stavu do stádia stresu suchem, je obsah vody v půdě. Pro většinu druhů rostlin se jako ideální nasycenost půdních pórů vodou uvádí 60 až 80 % a zbývajících 20 až 40 % vzduchem. Při větším obsahu vody v půdě nastává částečné nebo úplné zamokření, navíc chybí kyslík. Otočí-li se poměr obsažené vody ke vzduchu, rostliny naopak trpí suchem (Kůdela et al. 2013).

Při poklesu fotosyntézy začne probíhat nadměrná tvorba energie ve fotosystému II, což vede k narušení průběhu fotosyntézy a především k akumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS). Tento proces následně vede až k oxidativnímu stresu. Rostlina si tedy musí poradit nejen s nedostatkem organických a anorganických látek a postupné ztráty vody jakožto pohyblivého toku a reakčního činidla, ale také s omezením fotosyntézy, s tím spojeného nižšího energetického příjmu, a v neposlední řadě hromadícími se reaktivními formami kyslíku (Sperdouli & Monstakas 2012). Akumulace reaktivních forem kyslíku působí na rostlinu toxicky, ohrožuje buňku únikem elektronů, poškozují buněčné membrány a deaktivují některé důležité enzymy (Rai et al. 2012).

Nedostatek vody v půdě vede ke snížení vodního potenciálu v půdním roztoku, na což musí rostlina reagovat taktéž snížením svého vodního potenciálu. Přitom k měřitelnému zpomalení růstu dochází již při velmi malých ztrátách vody, kdy turgor klesne pouze o 0,1 až 0,2 MPa. Růst se zastavuje již při poklesu turgoru na -0,3 až -0,4 MPa. Vodní deficit působí na rostlinu ještě před tím, než se vůbec projeví vizuální známky vadnutí. Další pokles vodního potenciálu buněk přibližně na hodnotu -0,2 až -0,8 MPa vede k rychlým změnám aktivity enzymů. Snižuje se syntéza bílkovin a cytokininů a zpomaluje se dělení buněk. Pokud hodnota vodního potenciálu dosáhne hodnoty okolo -1,0 MPa, začne rostlina vytvářet větší množství cukrů, alkoholů a osmoprotektantů, např. prolin (Jones et al. 1989).

Rostliny vyvinuly dvě různé strategie na obranu proti vodnímu deficitu. Prvním souborem mechanismů je avoidance, neboli vyhnutí se podmínkám sucha. Druhá strategie spočívá v toleranci k sníženému obsahu vody. Mechanismy tolerance se dále dělí na ty, které se snaží udržet vysoký vodní potenciál a na ty, které vedou k poklesu vodního potenciálu a de facto k vysušení rostliny. Obě strategie se navzájem nevylučují a mohou se objevovat současně, či na sebe navazují, pokud se ukáže jedna ze strategií jako málo účinná (Larcher 2003).

Mezi mechanismy vyhnutí se podmínkám sucha patří rychlý fenologický vývoj, úsporný růst a tvorba omezeného počtu generativních orgánů, plasticita jednotlivých vývojových fází a prodloužená dormance. Některé druhy potřebují k plnému vývoji pouhých pár týdnů a využívají tak maximálně potenciál období, kdy je přístupná voda v půdě. Vývojová plasticita se může projevovat například opadem listů v období sucha a při výskytu srážek dochází k opětovnému růstu (Nilsen & Orcutt 1996).

Některé rostlinné druhy jsou schopné tolerovat kompletní vyschnutí, aniž by došlo k úmrtí organismu. Následnou rehydratací opět obnovují svůj růst. Do skupiny rostlin mající tuto schopnost patří především nižší cévnaté rostliny jako např. mechy, kaprad'orostry a některé druhy řas. V období stresu suchem se voda odpařuje z pletiv, snižuje se turgor a vodní potenciál, cytoplasma ztrácí svůj objem (Nilsen & Orcutt 1996).

Druhým způsobem tolerance je zachování si vysokého vodního potenciálu, což vyžaduje zlepšení hospodaření s vodou. Toho lze dosáhnout zlepšením efektivity využití vody zavíráním průduchů, silnější kutikulou, sníženou plochou listů, růstem podzemní biomasy a vyšší aktivitou kořenů. Rostlina na stres suchem reaguje také úpravou biochemických vlastností, tedy produkcí osmoticky aktivních látek, antioxidantů a růstových hormonů (Khan et al. 2013).

Rostliny vyskytující se v oblastech s nižším množstvím srážek vytváří obecně hlubší kořenový systém, což vede k větší absorpci vody a stabilitě výnosů. Růst kořenů podporují fytohormony cytokininy a gibbereliny. Kořeny rostoucí do větších hloubek mají zvýšenou schopnost proniknout silnou vrstvou půdy a lépe si osvojují živiny (Gao et al. 2016)

Kutikula chrání rostlinu před nekontrolovanou difúzí vody do atmosféry, ale také chrání buňky před dopady UV záření. Primární reakcí na pokles stavu vody v rostlině je uzavření stomat ve snaze zadržet vodu v těle (Jenks & Hasegawa 2005). Zavírání průduchů řídí mimo jiné kyselina abscisová, která je také zodpovědná za inhibici růstu, způsobuje opad plodů a listů a reguluje počet nasazených generativních orgánů (Fard et al. 2017). Avšak i po uzavření průduchů dochází k výparu díky tzv. kutikulární propustnosti. Proto rostliny adaptované na suché oblasti mají kutikulární membránu až 100krát méně propustnou než mezofytní rostliny (Jenks & Hasegawa 2005).

Za účelem udržení si osmotického potenciálu hromadí rostlina metabolity organického původu s nízkou molekulární hmotností nazývané kompatibilní osmolyty či osmoprotektanty. Mají neutrální náboj, nejsou pro buňku toxické a podílejí se na stabilizaci proteinů a

bunčných membrán, kdy zabraňují denaturaci v důsledku stresového působení z prostředí. Podílejí se také na odbourávání reaktivních forem kyslíku a pomáhají udržovat turgor buněk a snižovat vodní potenciál rostliny. Mají také vliv na aktivitu enzymů. Patří mezi ně například prolin a glycin betain (Yancey 1994).

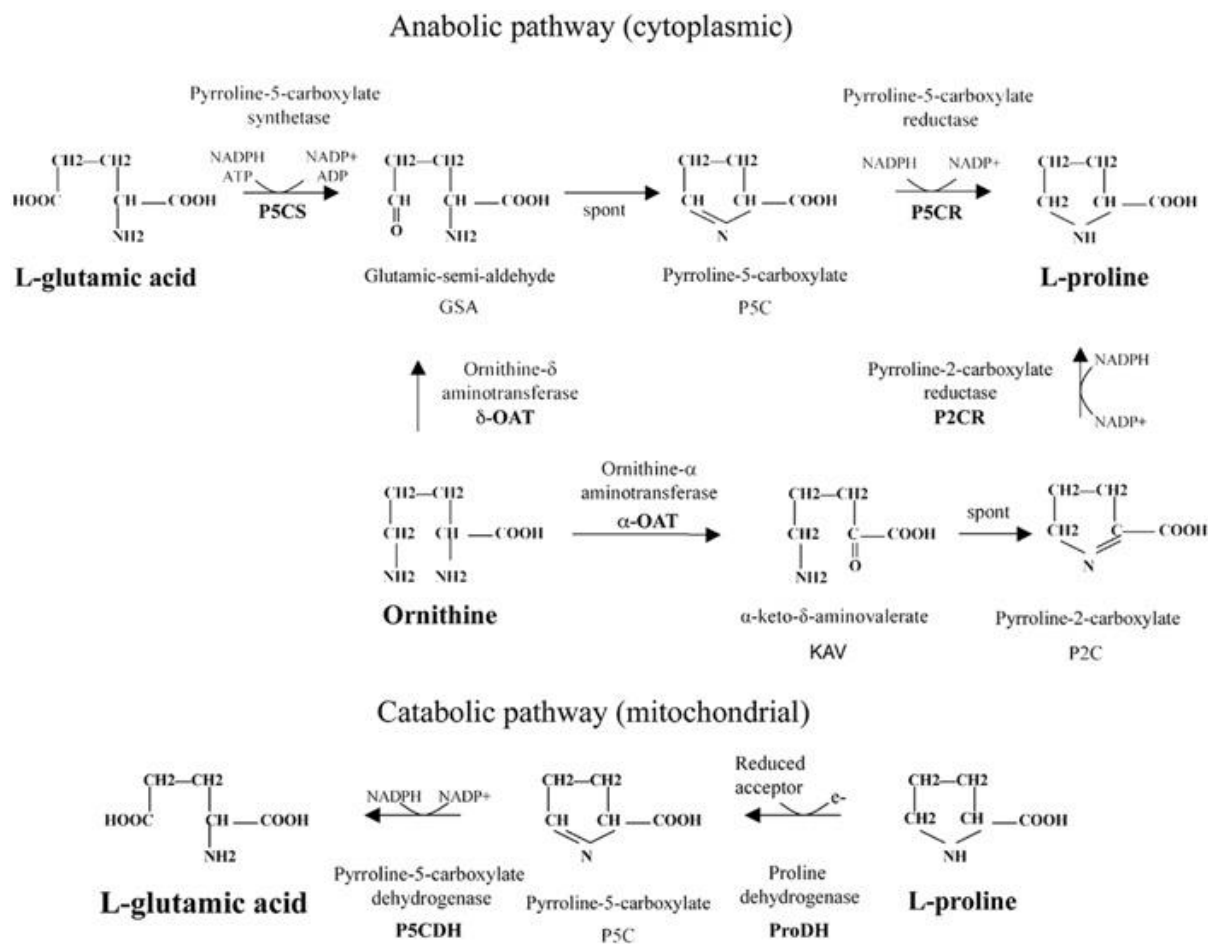
Vypořádat se s dopady vodního deficitu se jeví jako jeden z hlavních úkolů při úspěšném pěstování plodin a dosahování požadovaných výnosů. Zvláště důležitým obdobím z hlediska zásobenosti vodou je pro rostlinu fáze prodlužovací a fáze růstu a zakládání generativních orgánů. Jestliže v tomto období trpí buňky nedostatkem vody, prodlužovací fáze se předčasně ukončí a orgány již nedorostou do běžné délky, rostliny zůstanou zakrslé, sníží se výnos i kvalita (Kůdela et al. 2013).

Cílem pěstitelů by tedy mělo být napomáhat rostlinám zmírňovat projevy nedostatku vody, či vůbec předcházet jeho vzniku. Dostupnost vody v půdě lze zvýšit efektivním zavlažováním či zakrýváním povrchu půdy, čímž se zabrání neekonomickému výparu (Yi et al. 2010). Též zvyšování organické hmoty v půdě a udržování půdní struktury vede ke zlepšenému vodnímu stavu (Vaněk et al. 2016). Prokázán je rovněž pozitivní efekt foliární aplikace osmoprotektantů (Hayat et al. 2012; Cha-um et al. 2013).

3.5 Prolin a jeho funkce v rostlině

Hromadění prolinu v rostlinných buňkách je jedním z významných znaků při adaptaci rostlin na nepříznivé změny prostředí a jeho nárůst bývá zaznamenáván při poplachové fázi působení stresových faktorů. Prolin je součástí metabolismu kyseliny glutamové a glutaminu. Je výjimečný tím, jak dokládají Goring & Thien (1978), že je jedinou aminokyselinou, která je zakomponována přímo do bílkovin. Nečiní mu potíže pohyb ve vodných i v nevodných mediích, což mu umožňuje snadný přechod přes biologické membrány buněk a organel.

Syntéza prolinu v rostlinách je možná dvěma metabolickými drahami, jak dokumentuje obr. 6. Za normálních podmínek převažuje tzv. ornitinová cesta. V tomto případě je prekurzorem alfa-aminokyselina ornitin. Akumulace prolinu touto cestou je význačná především v počátečních fázích růstu a klíčení rostliny, dále při opylení (Vašáková & Hradecká 1994; Hossian et al. 2014).



Obr. 6: Syntéza prolinu (převzato od Trovata et al. 2008).

Druhou dráhou syntézy prolinu je tzv. glutamátová cesta, jak je uvedeno v obr. 6. Z něho je patrné, že výchozí surovinou je glutamát, který se přeměňuje na prolin. Tento zdroj syntézy prolinu je významný během stresových podmínek (Hossian et al. 2014).

Prolin je zapojený do mnoha fyziologických procesů. Jedná se o aminokyselinu, u které se na hlavní řetězec váže řetězec postranní za vzniku pyrrolidinového kruhu. Jedná se o osmoprotektant hromadící se v rostlinách při reakci na stresové podmínky, jakými jsou např. sucho, zasolení, vysoké či nízké teploty, přítomnost těžkých kovů nebo UV záření. Prolin ovlivňuje dělení buněk, ale i buněčnou smrt a podílí se na obnově rostlinných pletiv při negativním působení stresů z okolí (Theocharis et al. 2012; Fujisawa et al. 2018).

Prolin se účastní celé řady procesů obrany rostlinných pletiv proti působení nepříznivých podmínek. Podle Klaus & Heriber (2004) se účastní se stabilizace proteinů a membrán, čímž brání úniku elektrolytů, a působí jako hlavní organický osmolyt. Dále je induktorem osmotických genů, které úzce souvisí se stresem. Odbourává reaktivní formy kyslíku (ROS), díky čemuž napomáhá rostlině předcházet oxidativnímu stresu. ROS, jako

například peroxid vodíku, jsou produkovány rostlinami jako vedlejší produkty aerobního metabolismu.

Theocharis et al. (2012) dále uvádějí, že prolin také reguluje poměr NADP^+ a NADH . Syntéza prolinu totiž vytváří NADP^+ , zatímco jeho oxidace produkuje NADPH . Z toho důvodu je prolin významným právě při toleranci stresu díky posunu redoxního potenciálu doplněním o NADP^+ . Vlivem prolinu také dochází k zvýšení fotochemické aktivity fotosystému II v tylakoidních membránách a dochází k snížení peroxidace lipidů.

Prolin mohou organismy využívat rovněž jako zdroj uhlíku, dusíku a především zdroj energie. Podle Wood (1987) je prolin významný v bioenergetice, kdy je jako energetický substrát využíván v respiračních řetězcích ke tvorbě ATP. Takto vytvořená energie, vzhledem ke kumulaci prolinu při stresových podmínkách, je organismem využita k překonání stresu a regeneraci buněk.

Dle Vašákové & Hradecké (1994) odpovídá za akumulaci prolinu zvýšená aktivita enzymu glutamátkinázy, klíčového enzymu biosyntetické cesty vzniku prolinu z kyseliny glutamové. Biosyntéza prolinu tak může probíhat podle potřeby rostliny. Za normálních podmínek je hladina prolinu udržována na stejné úrovni díky samoregulační inhibiční vazbě k enzymu glutamátkinázy. Lze tak konstatovat, že hladina prolinu v rostlině je indikátorem stresu. Podle autorek zvýšená biosyntéza prolinu nastává při nízkých teplotách ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), za sucha anebo při vyšší koncentraci solí v substrátu.

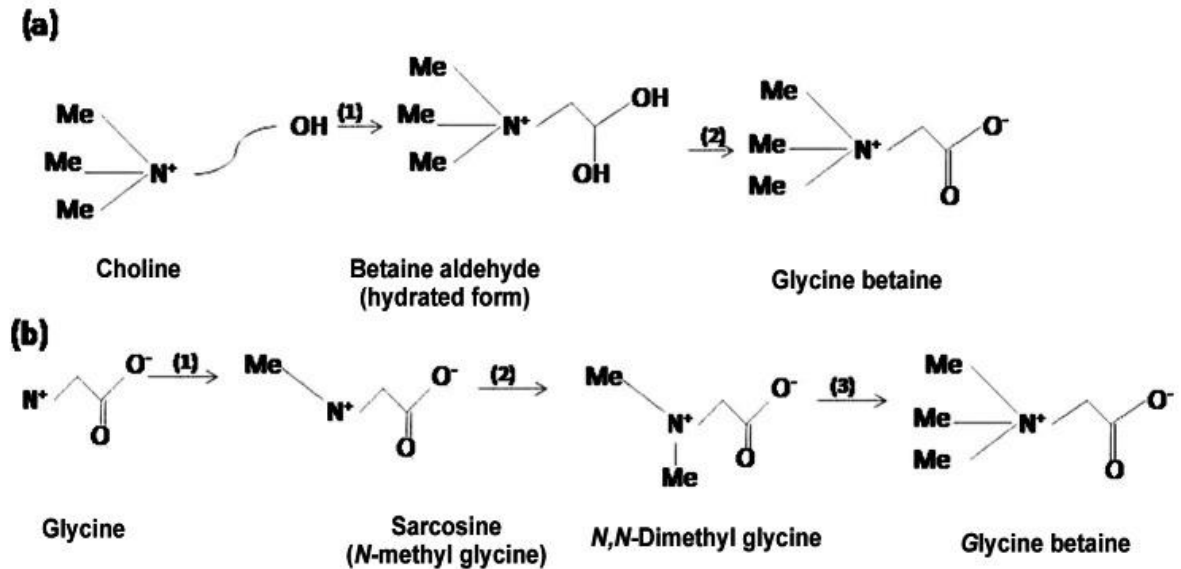
Rostlině lze prolin dodávat rovněž foliární aplikací, jak uvádějí Hayat et al. (2012). Zároveň ovšem varují před nepříznivým efektem dodání prolinu v příliš velké koncentraci, která způsobuje toxicitu. Dodaný prolin totiž nepomáhá pouze odolávat stresovým podmínkám, ale rovněž nastartuje biosyntézu této látky uvnitř rostliny.

3.6 Glycin betain a jeho funkce v rostlině

Glycinbetain (N,N,N -trimetyl glycin) se hojně vyskytuje v různých druzích rostlin, ale i u živočichů a mikroorganismů. Molekula má neutrální pH, vykazuje dipolaritu, avšak s neutrálním elektrickým nábojem. Je rozpustný ve vodě a nezpůsobuje toxicitu ani při vysokých koncentracích. Jako osmoprotektant napomáhá chránit organismus před stresem ze sucha, zasolení a při extrémních teplotách (Chen & Murata 2008).

Biosyntéza glycin betainu se uskutečňuje dvojí cestou, jak dokazuje obr. 7. Z něho je patrné, že u většiny organismů převažuje tzv. cholinová cesta. Přeměna cholinu na glycin

betain je ovlivněna buď jedním, anebo dvěma enzymy v závislosti na stupni oxidace cholinu. Rozšířenější variantou je dvojnásobná oxidace cholinu přes betain aldehyd až na glycin betain. Oxidace probíhá za pomoci enzymů cholin monooxygenázy a betain aldehyd dehydrogenázy. Oba enzymy se u rostlin nacházejí ve stromatu chloroplastů (Sakomo & Murata 2002).



Obr. 7: Syntéza glycin betainu (převzato od Sakamoto & Muraty 2002).

Méně častým způsobem syntézy glycin betainu je dle Nyysölä et al. (2000) tzv. glycinová cesta, při které je prekurzorem glycin. Tento způsob byl zjištěn pouze u dvou halofytních mikroorganismů *Ectothiorhodospira halochloris* a *Actinopolyspora halophila*. Syntéza glycin betainu u těchto mikroorganismů probíhá postupnou trojnásobnou N-metylací. Vše probíhá za pomoci katalyzátoru S-adenosylmethionin methyl transferázy.

Rostliny syntetizují glycin betain jak v kořenech, tak listech. Při působení stresu ze sucha nebo zasolení, se koncentrace glycin betainu podle Hajlaoui et al. (2010) zvyšuje jak v mladých tak starších listech, jenž jsou schopné fotosyntézy. Ve stárnoucích listech dochází jen k minimálnímu nárůstu koncentrace této látky. V kořenech se koncentrace glycin betainu zvyšuje směrem ke kořenovým špičkám a kořenovému vlášení. Stejně jako ostatní kompatibilní osmolyty není glycin betain rostlinou dále metabolicky využíván. Interaguje s proteiny, což má za následek udržení jejich hydratace.

Zhang et al. (2011) uvádějí, že kromě funkce osmoticky aktivní látky může glycin betain chránit také buňky před vlivy okolního prostředí nepřímo. Jedná se o působení na jednotlivé enzymy a stabilizaci membránovou integrity tím, že udržuje strukturu proteinů.

Dále chrání cytoplasmu a chloroplasty, fotosyntetický aparát a slouží jako lapač kyslíkových radikálů. Nicméně u mnoha druhů kulturních rostlin je akumulace glycin betainu nízká, a tudíž je jeho pomoc vůči stresovým faktorům podstatně snížena.

Podle těchto autorů se glycin betain v rostlinách za běžných podmínek nerozkládá, takže může být snadno získáván jako vedlejší produkt při pěstování velkoobjemových plodin, jako je například cukrová řepa. Vnější aplikace glycin betainu by mohla být řešením u plodin, jež si ho nejsou schopny v dostatečném množství produkovat samy.

Mnoho druhů rostlin, jako například cukrová řepa, dokáže syntetizovat glycin betain a při optimálních podmínkách k růstu udržují jeho hladinu na nízké úrovni. V případě abiotického stresu jsou schopny toto množství navýšit až stonásobně, uvádí se hodnoty od 40 do 400 μmol . U některých druhů však bylo prokázáno, že nejsou schopny syntetizovat glycin betain vůbec. Podle McCue & Hansona (1990) se jedná o rýži setou, rajče jedlé či lilek brambor. Jak uvádějí Khan et al. (2009) gen biosyntézy glycin betainu je předmětem šlechtění k odolnosti vůči abiotickým stresům.

Ve své studii Wang et al. (2010) dokazují pozitivní vliv glycin betainu na ochranu fotosyntetického aparátu při stresovém působení z nedostatku vody. Glycin betain funguje zejména jako stabilizátor lipidů v tylakoidní membráně, čímž umožňuje rostlině fotosyntetizovat i při stresových podmínkách. Glycin betain také pomáhá při stresu z nadměrného ozáření, kdy se aktivně účastní xantofylového cyklu a zvyšuje jeho aktivitu.

Podobné účinky jako glycin betain vykazuje glycin betulin, derivát kyseliny betulinové. Název je odvozen od břízy bělokoré (*Betula alba* L.), ze které byl poprvé syntetizován. Glycin betulin působí v rostlině jako osmoprotektant, má antioxidační a antibakteriální účinky (Yogeeswari & Sriram 2005).

Foliární aplikace glycin betainu se musí uskutečnit buď jako preventivní opatření, nebo co nejdříve na počátku působení stresu z nedostatku vody, jak dokládá ve své práci Reddy et al. (2013). Aplikace v pozdější fázi, kdy už se efekt nedostatku vody začne projevovat vizuálně, není příliš účinná. Pokud je ovšem aplikace správně načasována, umožní glycin betain rostlině překonat krátkodobý stres suchem takřka bez ztráty biomasy, čímž získává výhodu pro další vegetaci oproti neošetřeným rostlinám.

Cha-um et al. (2013) ve své studii uvádějí, že redukce biomasy, konkrétně u rýže seté, je u ošetření glycin betainem oproti kontrolní variantě až o 65 %. Zajímavé je také zjištění, že

aplikace glycin betainu vede i u nestresovaných rostlin k výraznému navýšení biomasy vůči rostlinám neošetřeným, a to až o 40 %.

Dodání glycin betainu lze uplatnit i u stresu ze zasolení. Pomáhá stimulovat biosyntézu prolinu, čímž zvyšuje osmotický tlak, což vede ke zlepšenému příjmu vody a živin v zasoleném prostředí. Při dávce 50 mM na rostlinu zvyšuje také klíčivost a hmotnost semen. Ovšem při dávkách vyšších (100 a 200 mM) se pozitivní efekt na klíčivost a hmotnost semen snižuje (Chaum & Kirdmanee 2010).

Druhou možností je podle Hussain et al. (2013) zvýšení obsahu glycin betainu a zlepšení tak tolerance rostlin k různým abiotickým stresům, jsou genové mutace. Jedná se o přenos genů zodpovědných za tvorbu a funkci enzymů cholin monooxygenázy, respektive betain aldehyd dehydrogenázy. Zdrojovým organismem pro gen tvorby cholin monooxygenázy je půdní bakterie *Arthrobacter globiformis*, zatímco gen tvorby betain aldehyd dehydrogenázy je získáván z bakterie *Escherichia coli*. Zmíněné mutace za účelem především zvýšení tolerance vůči suchu a zasolení byly provedeny například u vojtěšky seté, rajčete jedlého či rýže seté.

4 Metodika pokusů

V diplomové práci byl sledován vliv aplikace exogenního glycin betulinu a vodního deficitu na obsah prolinu a relativního výtoku elektrolytů u juvenilních rostlin kukuřice. Na 2 vybraných hybridech kukuřice seté byly měřeny výše uvedené fyziologické charakteristiky v růstových fázích BBCH 16 - 23. Pokus byl založen ve skleníku Katedry botaniky a fyziologie rostlin FAPPZ.

4.1 Pokusné rostliny

Pro studium byly použity 2 vybrané hybridy kukuřice seté. Osivo poskytla osivářská firma VP AGRO, spol. s.r.o.

1. RGT Indexx – dvouliniový (Sc), středně raný hybrid (číslo ranosti cca 280 S). Rostliny vysoké, palice nasazeny vysoko, počet řad zrn vysoký až velmi vysoký, typ zrna tvrdý až mezityp. Výnos celkové suché hmoty vysoký, výnos celkové zelené hmoty vysoký, obsah škrobu středně vysoký až vysoký, stravitelnost středně vysoká. Určen pro pěstování na siláž v zemědělských výrobních oblastech kukuřičné a řepařské (eagri.cz).
2. RGT Lipexx - dvouliniový (Sc), raný hybrid (číslo ranosti 280 Z). Rostliny vysoké, palice nasazeny středně vysoko až vysoko, počet řad zrn vysoký, typ zrna mezityp až koňský zub. Výnos zrna vysoký. Určen pro pěstování na zrno v zemědělských výrobních oblastech kukuřičné a řepařské (eagri.cz).

4.2 Založení a schéma pokusu

V pokusu byl sledován vliv aplikace exogenního glycin betulinu a vodního deficitu na fyziologické odezvy kukuřice seté. Glycin betulin (Solagran Limited) zde byl použit jako protistresová látka, jež by měla zmírňovat uměle navozený stres suchem.

Pokus se uskutečnil v částečně řízených podmínkách skleníku FAPPZ. Ve skleníku byly rostliny pěstovány za přirozených světelných podmínek. Teplota vzduchu dosahovala ve dne 23 °C a v noci 18 °C. Relativní vlhkost vzduchu se pohybovala mezi 65 % a 85 %. Rostliny byly pěstovány v nádobách o objemu 11 l v inertním skleněném foukaném písku - balotinė. K zavlažování rostlin byl použit Hoaglandův živný roztok.

Schéma pokusu zahrnovalo čtyři varianty – KK (neošetřená nestresovaná varianta), KG (stresovaná varianta neošetřená glycin betulinem), KS (neošetřená stresovaná varianta) a GS

(stresovaná varianta ošetřená glycin betulinem) a čtyři odběry v pěti opakováních. Odběr 1 – ve fázi BBCH 16, kdy rostliny nebyly stresované vodním deficitem, ani nebyla provedena aplikace glycin betulinem. Odběr 2 - ve fázi BBCH 16, kdy byla provedena foliární aplikace glycin betulinem o koncentraci 0,05 %. Měřeno bylo po dvoudenní asimilaci účinné látky. Poté byl zahájen stres postupným vysycháním substrátu. Odběr 3 – ve fázi BBCH 23, v období rulování listových čepelí vlivem vodního deficitu. Poté se uskutečnila rehydratace. Odběr 4 – ve fázi BBCH 23 po opětovné rehydrataci, tři dny po 3. odběru.

4.3 Měření fyziologických charakteristik

U vybraného rostlinného materiálu kukuřice seté, stresované vodním deficitem a po aplikaci antistresové látky glycin betulinu, byl sledován obsah prolinu (zvláště nadzemní část a kořeny) a relativní výtok elektrolytů.

4.3.1 Stanovení prolinu

Metodika stanovení prolinu vychází z práce Bates (1973). Bylo odebráno 0,25 g listového pletiva bez středního žebra od každé jednotlivé zkoumané odrůdy a z každé varianty dle schématu pokusu. Vzorek byl rozmělněn v třecí misce spolu s 1 ml 3% kyseliny sulfosalicylové. Po důkladném rozmělnění byl vzorek doplněn o další 4 ml kyseliny a směs byla řádně promíchána. Poté byla vzniklá směs přefiltrována přes filtrační papír určený pro kvalitativní analýzu. Z filtrátu byl odebrán 1ml vzorku a smíchán s 1 ml koncentrované kyseliny octové a 1ml ninhydrinu. Tato reakční směs byla následně umístěna do vortexu k promíchání. Po 15minutách třepání byla směs umístěna do vodní lázně o teplotě 80-90°C na dobu 30 minut k inkubaci. Po inkubaci ve vodní lázni byla směs prudce zchlazena. Do již zchladlé a vytemperované směsi byly přidány 3 ml toluenu. Tato směs byla opět po dobu 15 minut umístěna do vortexu. Po opětovném důkladném protřepání se počkalo na ustálení dvou separovaných vrstev, ze kterých se odebral vzorek z “toluenové“ horní části zkumavky který byl následně měřen na spektrofotometru UV- Vis Evolution 201 (Thermo Scientific). Měření na spektrofotometru probíhalo měřením absorbance horní vrstvy při 520 nm. Jako slepý vzorek nám posloužil čistý toluen. Naměřené hodnoty byly přes kalibrační křivku přepočteny na $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Počet opakování byl 3.

4.3.2 Stanovení REL %

Stanovení relativního výtoku elektrolytů vychází z mírně modifikované metodiky pokusů Campos et al. (2003). Z různých částí listů byly odebrány listové terčíky o průměru 1cm. Terčíky byly nejprve promývány destilovanou vodou po dobu dvou minut a následně byly umístěny do 5ml destilované vody po dobu 24 hodin. Po uplynutí 24 hodin byly vzorky podrobeny měření elektrické vodivosti roztoku. Po naměření byly vzorky umístěny do vodní lázně o teplotě 90°C po dobu 20 minut, tak aby bylo dosaženo maximální poškození na buněčné úrovni. Po vychladnutí vzorků se uskutečnilo druhé měření vodivosti roztoku. Míra poškození (Rel %) byla na základě změny vodivosti roztoku vyjádřena jako poměr Rel 1 / Rel 2. Pro všechna měření a všechny odběry byl použit konduktometr GRYF 106 L3 (GRYF HB spol. s.r.o., Česká republika). Z každé rostliny byl použit k odběru terčíku jeden intaktní nejvíce rozvinutý list. Výpočet Rel % byl proveden na základě změn vodivosti roztoku ze vzorce:

$$\text{CMS} = [1 - (T1 - T2)] / [1 - (C1 - C2)] \times 100$$

$$\text{Rel}\% = 100 - \text{CMS}$$

4.4 Použité statistické metody

K vyhodnocení statistických výsledků byly použity programy STATISTICA 13 a Statgraphics Centurion 18 (64 - bit). Jako metoda byla zvolena multifaktoriální analýza rozptylu - vícefaktorová ANOVA a Tuckeyho test. Stanovená hladina významnosti byla $\alpha = 0,05$.

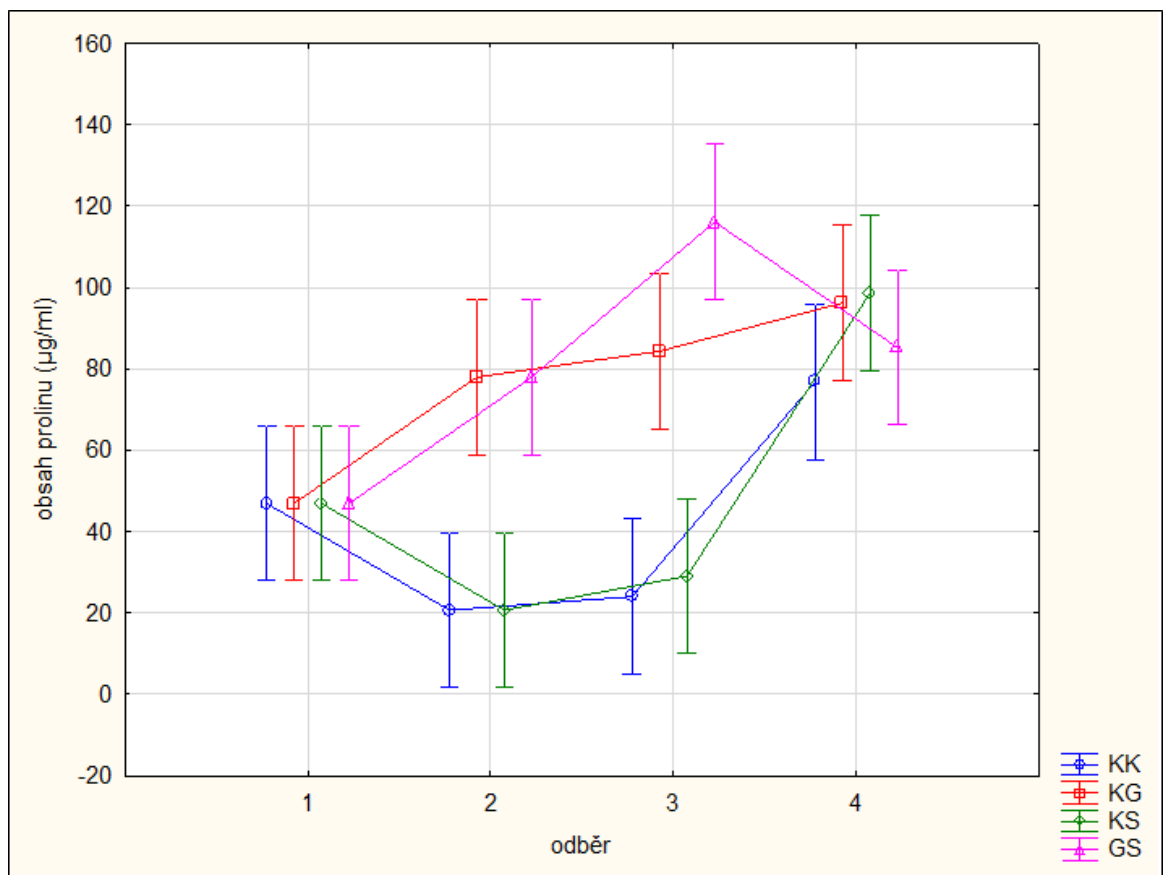
5 Výsledky

V diplomové práci byla věnována pozornost vlivu aplikace exogenního glycin betulinu a vodního deficitu na obsah prolinu a relativního výtoku elektrolytů u juvenilních rostlin kukuřice. Na 2 vybraných hybridech byly měřeny výše uvedené fyziologické charakteristiky v růstových fázích BBCH 16 – 23. Hodnocen byl vliv termínu a vliv odrůdy (genotypu).

5.1 Obsah prolinu

5.1.1 Hybrid RGT Indexx

Z grafu 1 je patrné, že aplikace glycin betulinu zvyšuje obsah prolinu v rostlinách kukuřice seté hybridu RGT Indexx. Tři dny po aplikaci byl naměřen obsah prolinu $77,95 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oproti $20,67 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v kontrolní variantě. Po postupném vysušení substrátu se obsah prolinu ještě navýšil, zejména v ošetřené variantě (GS) a to na $116,06 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Mírně vyšší obsah prolinu oproti neošetřené kontrole byl zaznamenán i u varianty KS, kdy se obsah prolinu průkazně zvýšil na $30,08 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Graf 1: Změny obsahu prolinu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v nadzemní části hybridu RGT Indexx v závislosti na variantě pokusu a termínu odběru.

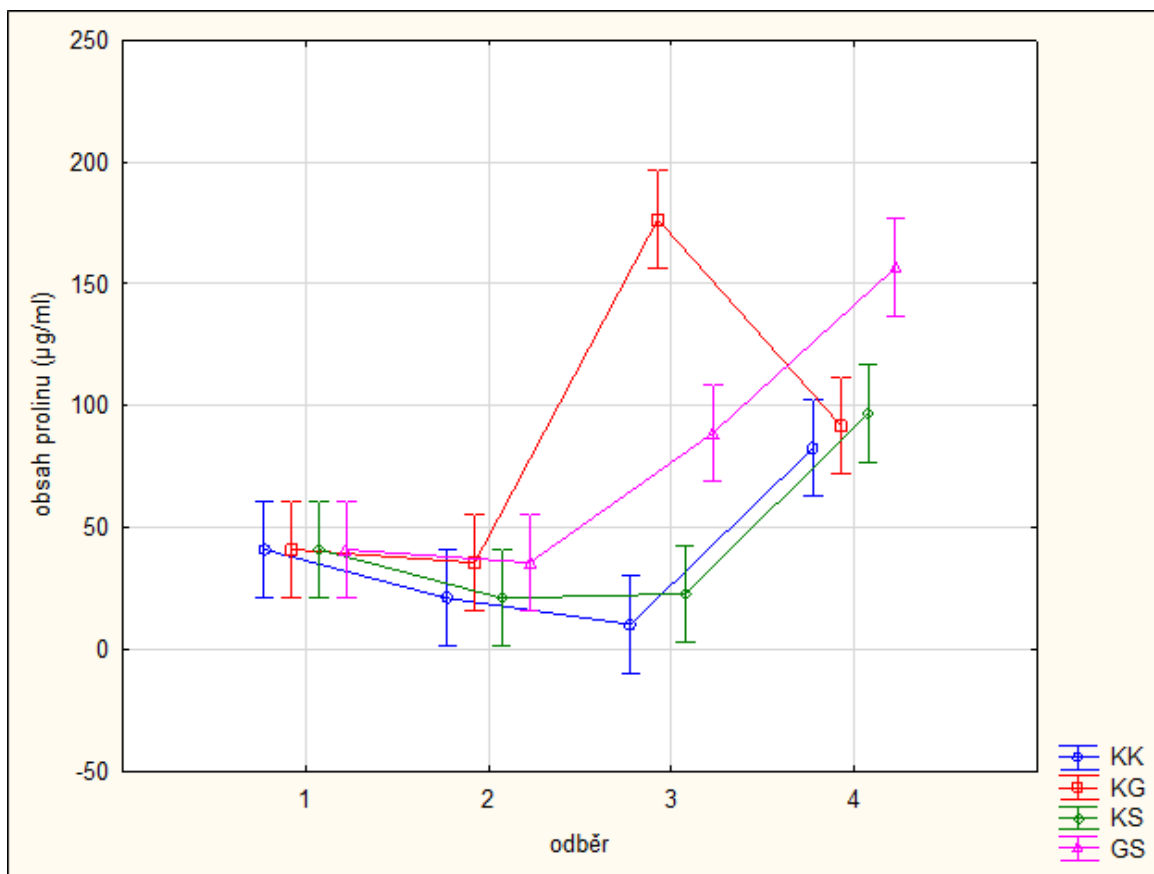
Po následné rehydrataci se obsah prolinu u varianty KS průkazně navýšil na hodnotu 98,55 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, navýšení bylo pozorováno i u kontrolní varianty: 76,78 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u ošetřené varianty nestresované suchem: 96,16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Naopak u stresované ošetřené varianty došlo k poklesu na 85,18 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

		KK 42,087	KG 76,327	KS 48,798	GS 81,522
1	KK		0,000169	0,752544	0,000154
2	KG	0,000169		0,000830	0,867399
3	KS	0,752544	0,000830		0,000193
4	GS	0,000154	0,867399	0,000193	

Tab. 1: Tuckeyho test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pro obsah prolinu v nadzemní části kukuřice seté hybridu RGT Indexx.

Z tabulky 1 je patrné, že existují statisticky významné rozdíly v obsahu prolinu v nadzemní části kukuřice seté hybridu RGT Indexx. Konkrétně mezi variantami KK (nestresovaná neošetřená varianta) a KG (nestresovaná varianta ošetřená glycin betulinem), KK a GS (stresovaná varianta ošetřená glycin betulinem), KS (stresovaná neošetřená varianta) a KG, KS a GS. Naopak mezi variantami KK a KS, KG a GS neexistuje statisticky významný rozdíl v obsahu prolinu v nadzemní části. Lze tedy konstatovat, že vliv aplikace glycin betulinu na obsah prolinu v nadzemní části kukuřice seté hybridu RGT Indexx je statisticky průkazný, stejně jako vliv aplikace glycin betulinu společně s vlivem vodního deficitu, zatímco pouze vliv vodního deficitu na obsah prolinu nelze prokázat.

Z grafu 2 vyplývá, že po aplikaci glycin betulinu došlo k mírnému nárůstu obsahu prolinu v kořenech hybridu RGT Indexx na hodnotu 35,54 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oproti neošetřené kontrole, která při odběru 2 dosáhla hodnoty 20,92 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při odběru 3 došlo ke znatelnému nárůstu u varianty KG na maximální měřenou hodnotu 176,60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Taktéž u varianty GS se obsah prolinu zvýšil na hodnotu 88,71 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Naopak u variant neošetřených glycin betulinem byla zaznamenána stagnace, či mírný pokles, jedná se o varianty – KK: 10,16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, KS: 22,80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při odběru 4 ve fázi BBCH 23 po rehydrataci stresovaných variant, se obsah prolinu navýšil u všech variant kromě KG, u které byl zaznamenán pokles na hodnotu 91,88 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Varianta GS po rehydrataci dosáhla na hodnotu 156,77 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, u varianty KK byl naměřen obsah prolinu 82,70 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u varianty KS 96,73 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



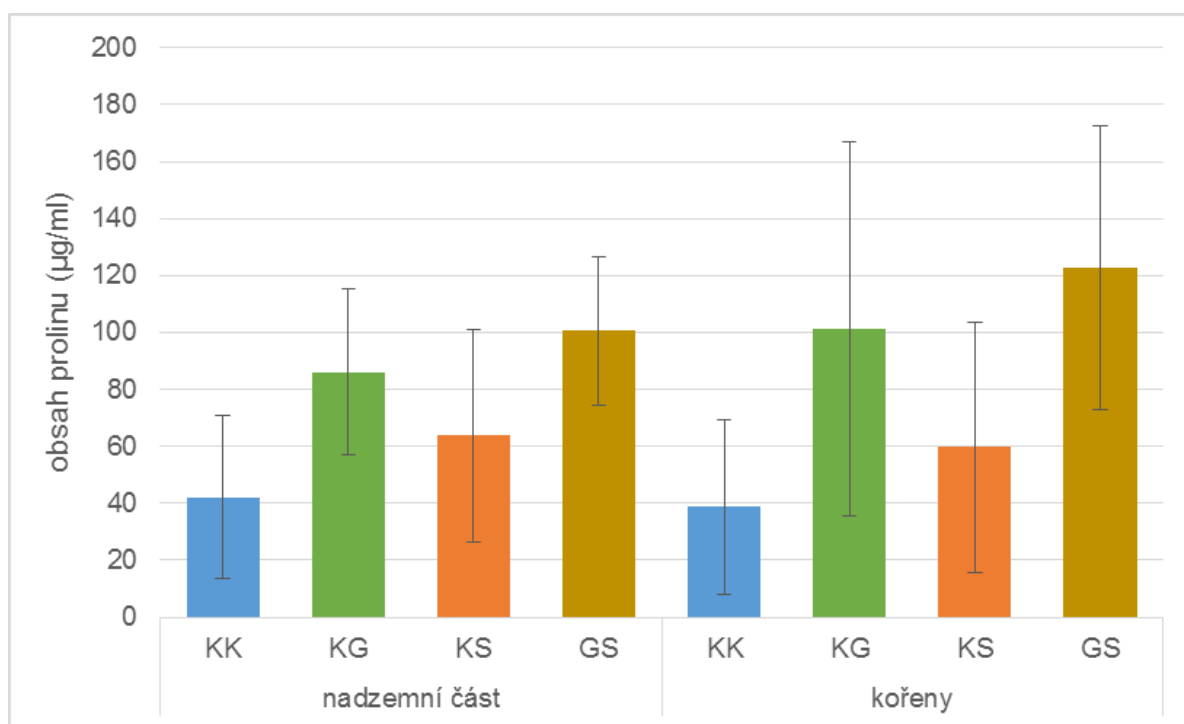
Graf 2: Změny obsahu prolinu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v kořenech hybridu RGT Indexx v závislosti na variantě pokusu a termínu odběru.

Tabulka 2 ukazuje zhodnocení statisticky významných rozdílů mezi sledovanými variantami, které koresponduje se statistickým zhodnocením obsahu prolinu v nadzemní části. Lze tedy konstatovat, že statisticky významný rozdíl existuje mezi variantami KK a KG, KK a GS, KS a KG, KS a GS. Naopak mezi variantami KK a KS, KG a GS neexistuje statisticky významný rozdíl v obsahu prolinu v kořenech.

		KK 38,674	KG 86,236	KS 45,340	GS 80,485
1	KK		0,000153	0,780070	0,000154
2	KG	0,000153		0,000154	0,846534
3	KS	0,780070	0,000154		0,000176
4	GS	0,000154	0,846534	0,000176	

Tab. 2: Tuckeyho test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pro obsah prolinu v kořenech kukuřice seté hybridu RGT Indexx.

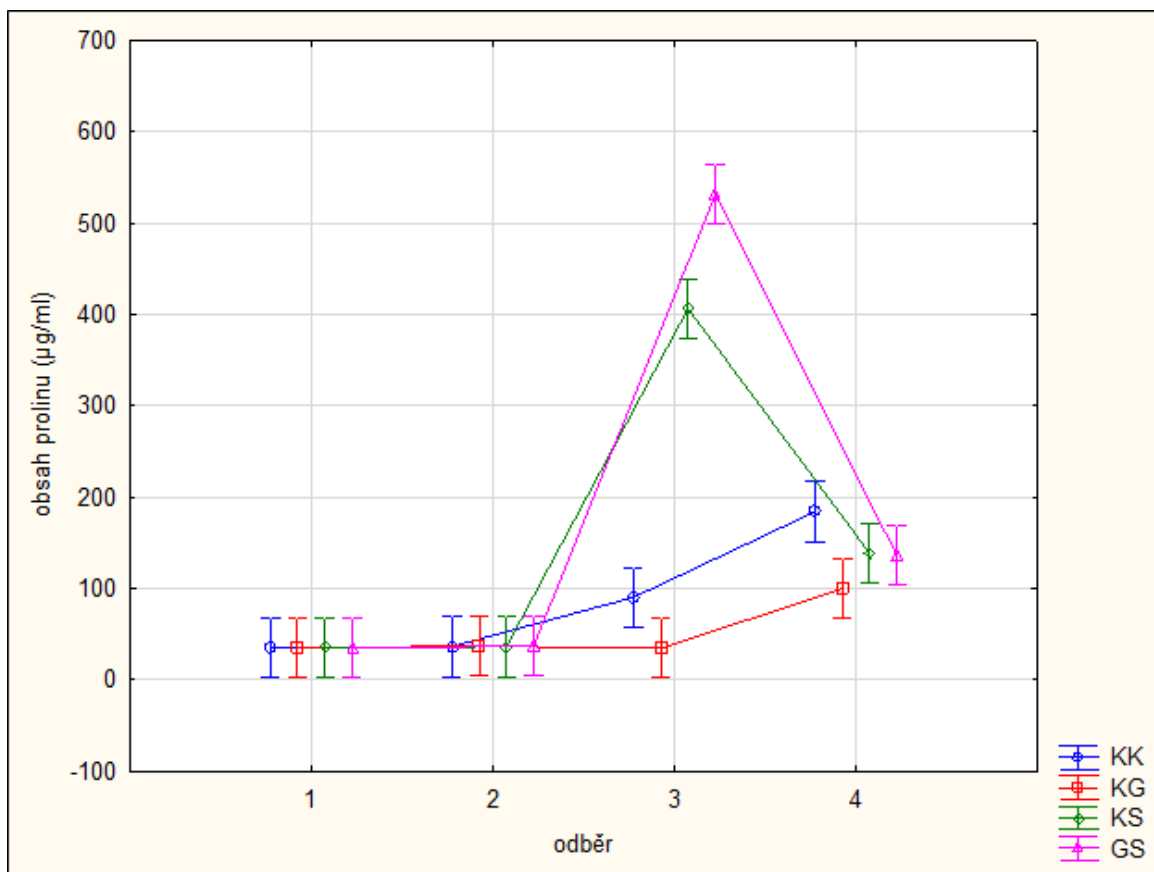
V grafu 3 jsou uvedeny průměrné hodnoty obsahu prolinu v rámci jednotlivých variant pokusu zvlášť pro nadzemní část a kořeny hybridu RGT Indexx. Z uvedeného grafu jsou patrné statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami pokusu, avšak rozdíl mezi nadzemní částí a kořeny není statisticky významný. Průměrný obsah prolinu v kontrolní variantě KK byl $42,09 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u nadzemní části, respektive $38,67 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u kořenů. U rostlin, kde byl aplikován glycin betulín (KG), se obsah prolinu v porovnání s kontrolou zvýšil na hodnotu $86,14 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u nadzemní části a $101,34 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u kořenů. V případě rostlin stresovaných suchem, ale bez aplikace glycin betulínu (KS) se obsah prolinu blížil hodnotám kontrolní varianty, konkrétně $63,81 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respektive $59,76 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Stresovaná varianta s aplikací osmoticky aktivní látky (GS) dosahovala podobných hodnot jako varianta KG. Naměřeny byly tyto hodnoty pro nadzemní část: $100,62 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro kořeny: $122,74 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Graf 3: Změny obsahu prolinu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v nadzemní části a kořenech hybridu RGT Indexx v závislosti na variantě pokusu.

5.1.2 Hybrid RGT Lipexx

U hybridu RGT Lipexx bylo zaznamenáno navýšení obsahu prolinu v nadzemní části až po zahájení stresu vodním deficitem. Po aplikaci glycin betulinu byl obsah prolinu ve variantě KG naměřen v hodnotě $36,69 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oproti $36,35 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ve variantě bez ošetření (KK). V následném odběru 3 byly naměřeny několikanásobně vyšší hodnoty ve variantách stresovaných oproti variantám kontrolním. U varianty KS se obsah prolinu navýšil na $406,32 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u stresované ošetřené varianty (GS) dosáhlo navýšení až na $531,46 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U kontrolní varianty byl zaznamenán nárůst na $90,19 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u varianty kontrolní ošetřené glycin betulinem (KG) se obsah prolinu nepatrně snížil na $34,50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po opětovné rehydrataci nastal prudký pokles obsahu prolinu u stresovaných variant, konkrétně na hodnotu $138,45 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u KS, respektive $135,92 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u GS. U variant kontrolních se obsah prolinu zvýšil na hodnotu $184,10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (KK) a $99,58 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (KG).



Graf 4: Změny obsahu prolinu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v nadzemní části hybridu RGT Lipexx v závislosti na variantě pokusu a termínu odběru.

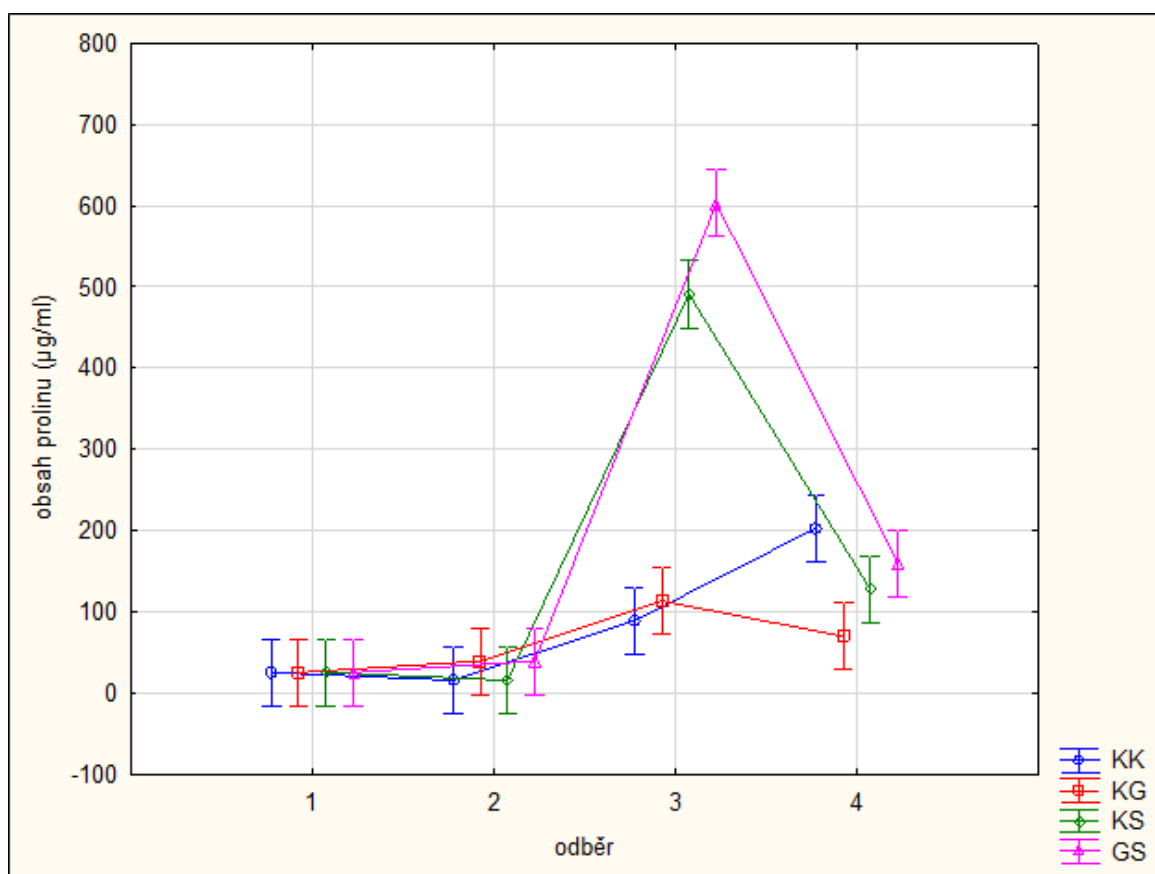
Z tabulky 3 je patrné, že existují statisticky významné rozdíly v obsahu prolinu v nadzemní části kukuřice seté hybridu RGT Lipexx mezi všemi variantami. Lze tedy

konstatovat, že vliv aplikace glycin betulinu, vodního deficitu a vliv jak aplikace glycinu betulinu, tak vodního deficitu na obsah prolinu v nadzemní části kukuřice seté hybridu RGT Lipexx je statisticky průkazný.

		KK 86,366	KG 51,464	KS 153,98	GS 184,79
1	KK		0,019406	0,000154	0,000153
2	KG	0,019406		0,000153	0,000153
3	KS	0,000154	0,000153		0,048293
4	GS	0,000153	0,000153	0,048293	

Tab. 3: Tuckeyho test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pro obsah prolinu v nadzemní části kukuřice seté hybridu RGT Lipexx.

Jak demonstruje graf 5, opět byl zaznamenán vysoký nárůst obsahu prolinu v kořenech hybridu RGT Lipexx vlivem vodního deficitu. U kontrolní varianty byla naměřena hodnota $25,00 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u varianty ošetřené glycin betulinem $39,03 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Graf 5: Změny obsahu prolinu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v kořenech hybridu RGT Lipexx v závislosti na variantě pokusu a termínu odběru.

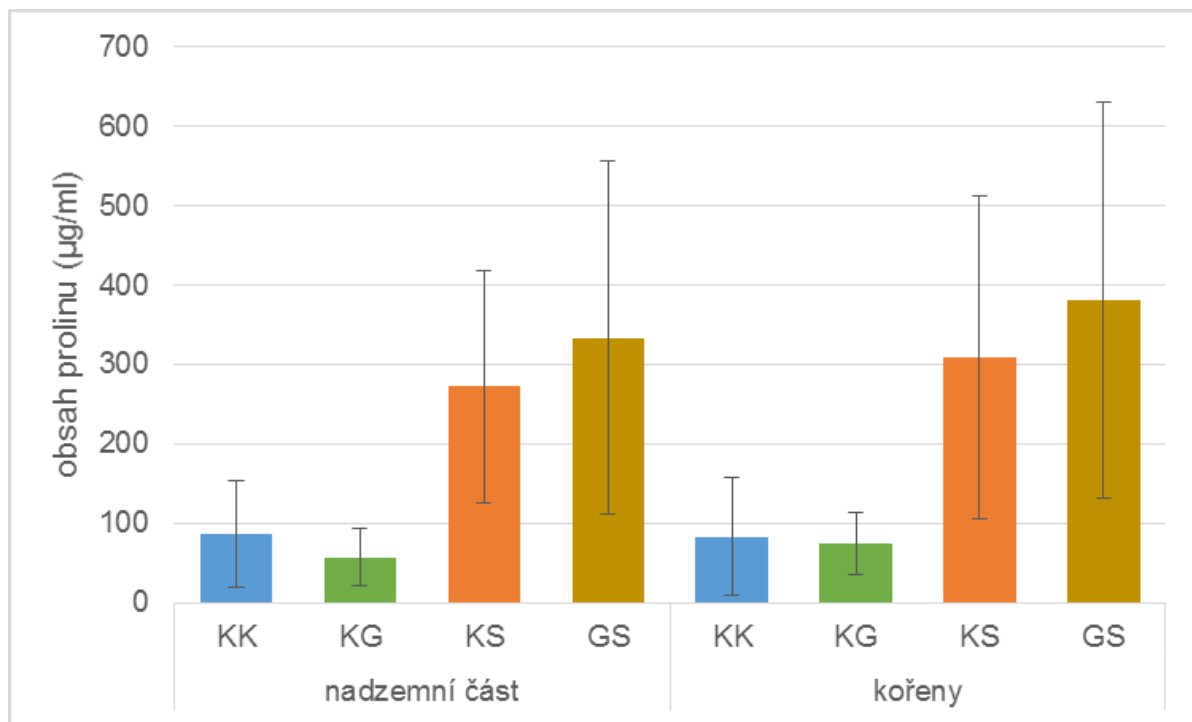
U rostlin stresovaných suchem se obsah prolinu navýšil na 491,07 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ u varianty KS, respektive až na hodnotu 603,00 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ u varianty stresované a ošetřené glycin betulinem (GS). Při odběru 4, po rehydrataci, průkazně poklesl obsah prolinu u stresovaných variant. U stresované neošetřené varianty (KS) byl zaznamenán pokles na hodnotu 126,95 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a u varianty GS na 158,98 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. U kontrolní varianty, nestresované a neošetřené glycin betulinem se při posledním odběru obsah prolinu navýšil na 203,12 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a na variantě nestresované ale ošetřené byla naměřena hodnota 69,69 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Dle tabulky 4 má obsahu prolinu v kořenech hybridu RGT Lipexx statisticky průkazné rozdíly mezi variantami KK a KS, KK a GS, KG a KS, KG a GS, KS a GS. Statisticky neprůkazný rozdíl byl zaznamenán mezi variantami KK a KG. Vliv aplikace glycin betulinu na obsah prolinu v kořenech hybridu RGT Lipexx tudíž není statisticky průkazný.

		KK 83,134	KG 61,713	KS 164,65	GS 206,51
1	KK		0,464257	0,000155	0,000153
2	KG	0,464257		0,000153	0,000153
3	KS	0,000155	0,000153		0,028319
4	GS	0,000153	0,000153	0,028319	

Tab. 4: Tuckeyho test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pro obsah prolinu v kořenech kukuřice seté hybridu RGT Lipexx.

Graf 6 znázorňuje průměrné hodnoty obsahu prolinu v rámci jednotlivých variant pokusu zvlášť pro nadzemní část a kořeny hybridu RGT Lipexx. Z uvedeného grafu jsou patrné statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami pokusu, avšak rozdíl mezi nadzemní částí a kořeny není statisticky významný.

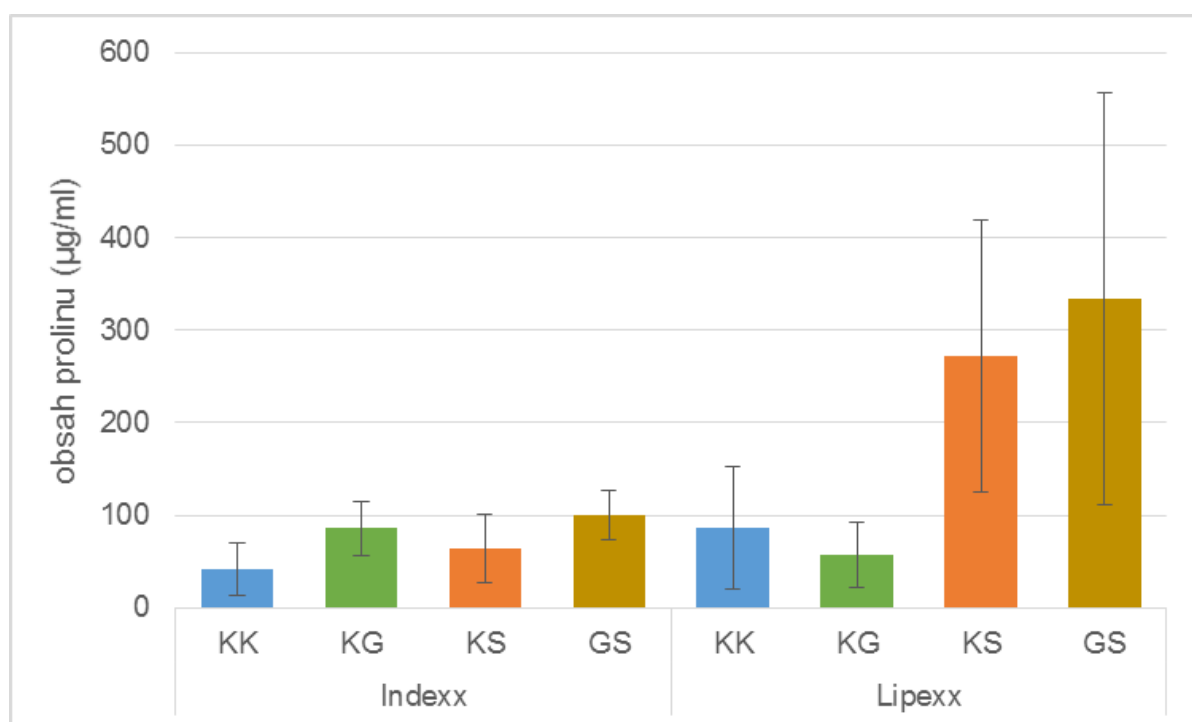


Graf 6: Změny obsahu prolinu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v nadzemní části a kořenech hybridu RGT Lipexx v závislosti na variantě pokusu.

Průměrný obsah prolinu v kontrolní variantě KK byl $86,36 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u nadzemní části, respektive $83,13 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u kořenů. U rostlin, kde byl aplikován glycin betulín (KG), se obsah prolinu v porovnání s neošetřenou kontrolou snížil na hodnotu $57,01 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u nadzemní části a $73,95 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u kořenů. V případě rostlin stresovaných suchem, ale bez aplikace glycin betulínu (KS) byl průměrný obsah prolinu oproti kontrolní variantě (KK) přibližně trojnásobný $272,38 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respektive $309,02 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Stresovaná varianta s aplikací osmoticky aktivní látky (GS) dosahovala ještě vyšších hodnot. Naměřeny byly tyto hodnoty pro nadzemní část: $333,69 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro kořeny: $380,99 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

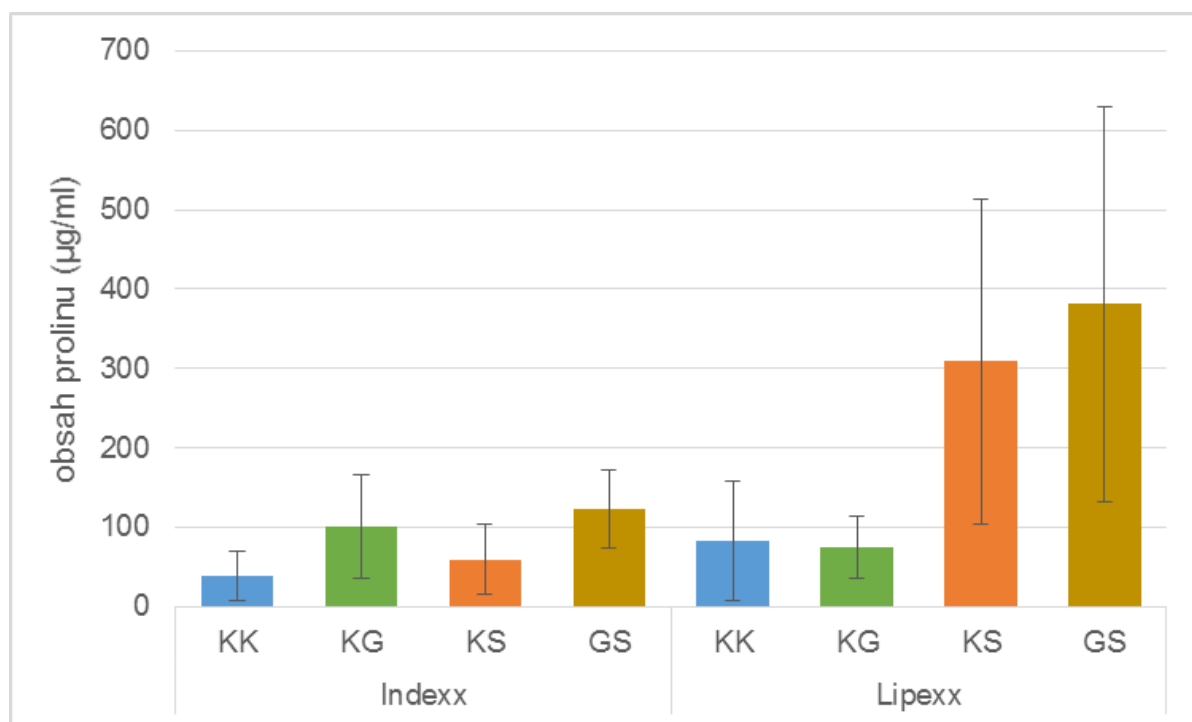
5.1.3 Porovnání sledovaných hybridů

V grafu 7 jsou uvedeny průměrné obsahy prolinu v nadzemních částech obou sledovaných hybridů. Z grafu je zřejmé, že rozdílná reakce obou hybridů spočívá především v koncentraci prolinu při stresu vodním deficitem. U varianty stresované vodním deficitem a neošetřené glycin betulinem (KS) byla u hybridu Indexx naměřena hodnota $63,81 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, zatímco u hybridu Lipexx $272,38 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Podobný rozdíl lze nalézt i v případě stresované ošetřené varianty (GS), kdy byl obsah prolinu u hybridu Indexx $100,62 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, avšak u hybridu Lipexx byla zaznamenána hodnota $333,69 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Graf 7: Porovnání ve změnách obsahu prolinu v nadzemní části u sledovaných hybridů.

V grafu 8 jsou uvedeny rozdíly v obsahu prolinu mezi sledovanými hybridy v kořenech rostlin. Stejně jako u nadzemní části i v kořenech byl zaznamenán nejvyšší rozdíl v obsahu prolinu mezi variantami stresovanými vodním deficitem. Z grafu je zřejmé, že rozdílná reakce obou hybridů spočívá především v koncentraci prolinu při stresu vodním deficitem. U varianty stresované vodním deficitem a neošetřené glycin betulinem (KS) byl u hybridu Indexx zaznamenán obsah prolinu $59,76 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, zatímco u hybridu Lipexx $309,02 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U stresované ošetřené varianty (GS) byla u hybridu Indexx naměřena hodnota $122,74 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u hybridu Lipexx hodnota $380,99 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

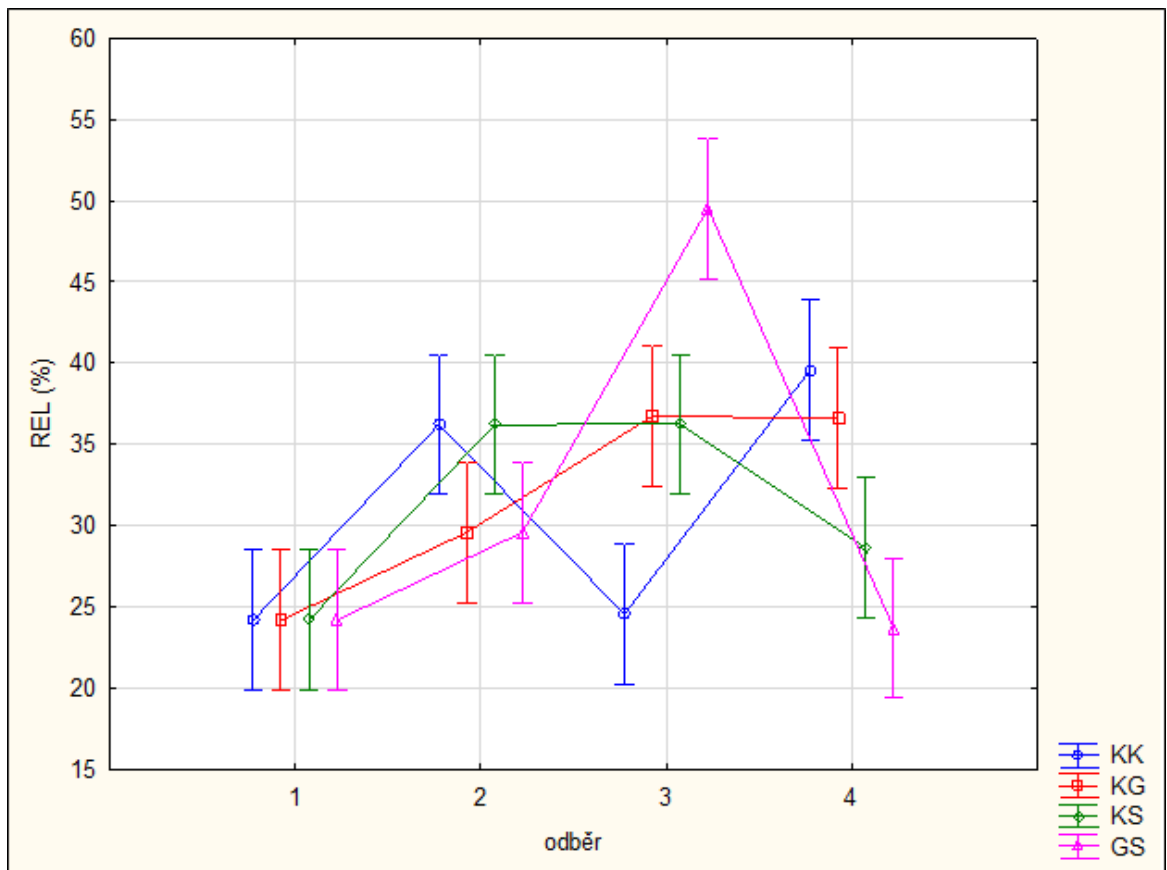


Graf 8: Porovnání ve změnách obsahu prolinu v kořenech u sledovaných hybridů.

5.2 Relativní výtok elektrolytů (REL %)

5.2.1 Hybrid RGT Indexx

Z grafu 9 je patrné, že k nejvyššímu poškození buněčné membrány došlo u stresované varianty ošetřené glycin betulinem (GS), kdy bylo zaznamenáno poškození buněk 49,53 %. Po následné rehydrataci ovšem došlo k poklesu poškození na hodnotu 23,67 %. Kontrolní varianta (KK) oscilovala mezi 24,17 % z odběru 1 a 39,58 % indexu poškození membrány naměřené při odběru 4. U varianty ošetřené glycin betulinem, avšak nevystavené stresu vodním deficitem (KG), se hodnota Rel % zvýšila z 29,58 % na 36,73 %, kde se prakticky ustálila. V případě stresované varianty neošetřené glycin betulinem (KS) byla naměřena hodnota 36,24 % při odběru 3 a po následné rehydrataci pokleslo poškození membrány na hodnotu 28,61 %.



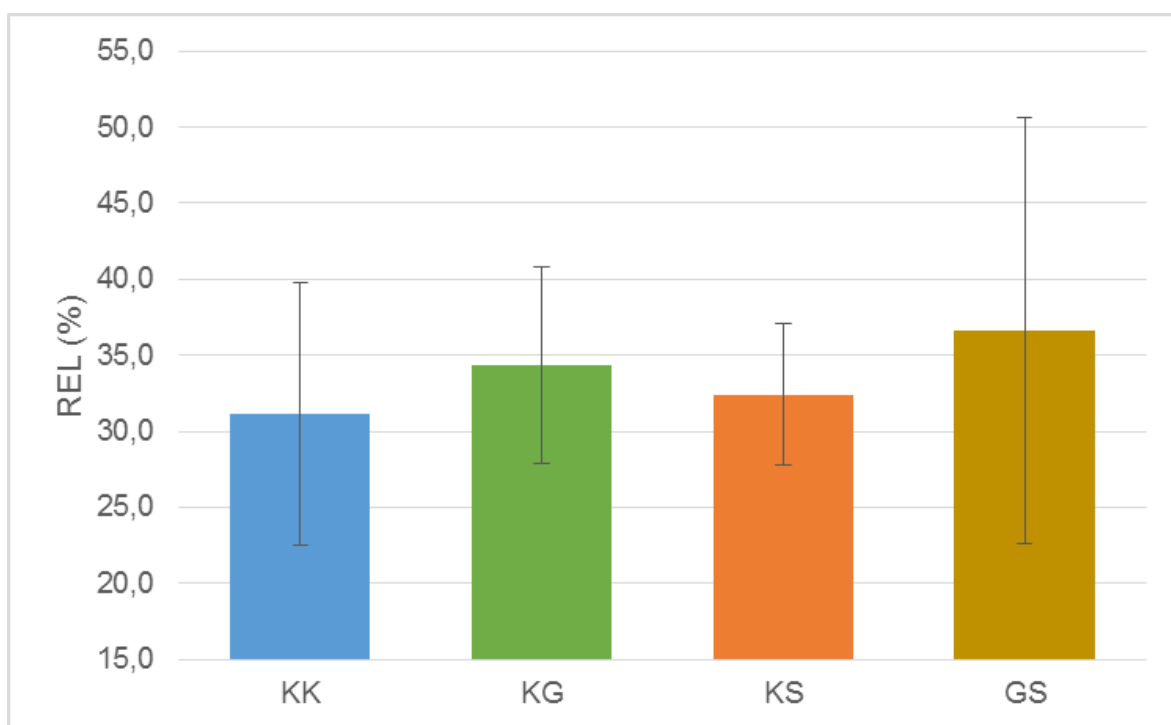
Graf 9: Změny poškození buněčné membrány hybridu RGT Indexx v závislosti na variantě pokusu a termínu odběru.

Z tabulky 5 lze vyčíst, že mezi jednotlivými variantami v míře poškození buněk není statisticky průkazný rozdíl.

		KK 31,128	KG 31,774	KS 31,309	GS 31,739
1	KK		0,974401	0,999473	0,978264
2	KG	0,974401		0,990190	0,999996
3	KS	0,999473	0,990190		0,992247
4	GS	0,978264	0,999996	0,992247	

Tab. 5: Tuckeyho test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pro index poškození buněčné membrány kukuřice seté hybridu RGT Indexx.

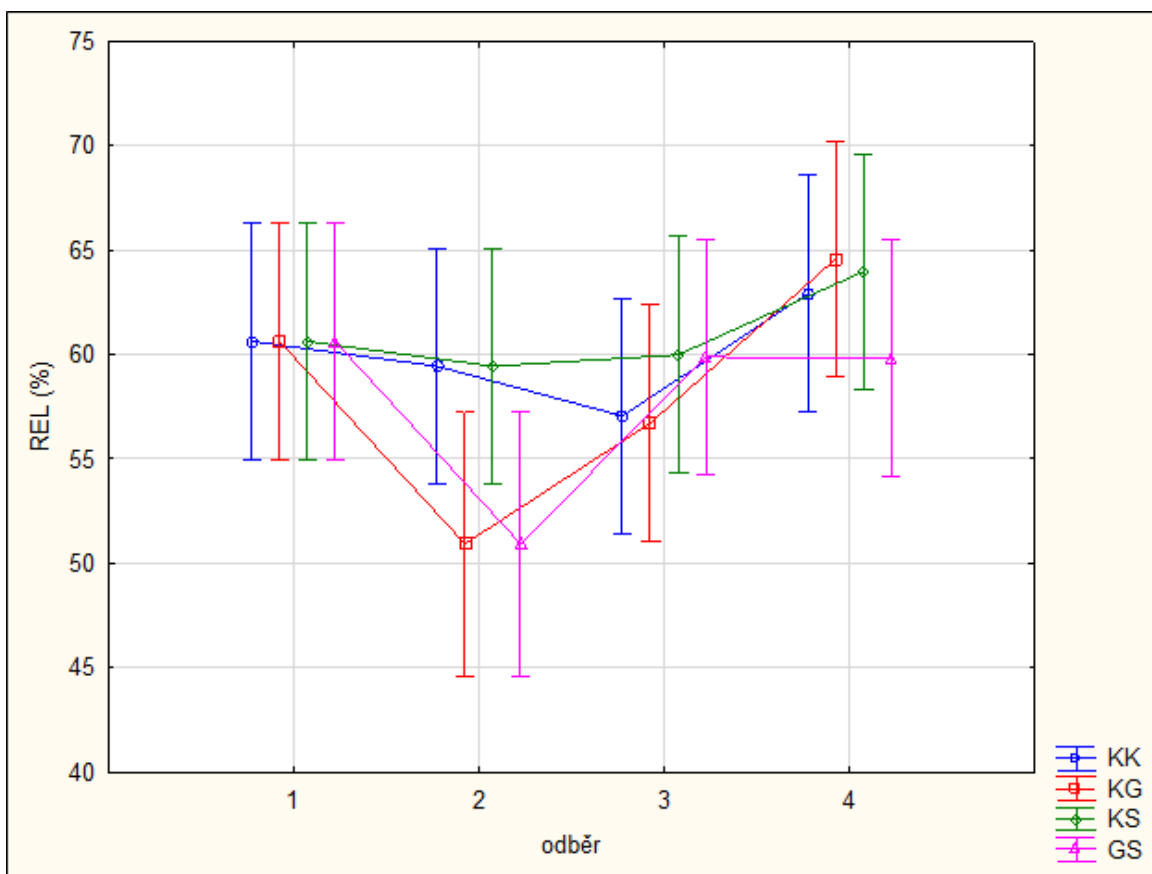
Graf 10 dokumentuje průměrné poškození membrány v závislosti na variantě pokusu. I přes statisticky neprůkazné rozdíly mezi variantami je patrné, že nejnižší poškození buněk bylo zaznamenáno u varianty KK 31,13 %. Stres suchem (KS) zvýšil relativní výtok elektrolytů na hodnotu 32,43 %. Varianty ošetřené glycin betulinem (KG) a stresované vodním deficitem (GS) zaznamenaly vyšší poškození membrán, konkrétně 34,31 % u varianty KG a 36,60 % u varianty GS.



Graf 10: Změny poškození buněčné membrány hybridu RGT Indexx v závislosti na variantě pokusu.

5.2.2 Hybrid RGT Lipexx

V grafu 11 je uvedena míra poškození buněk hybridu RGT Lipexx. Po aplikaci glycin betulinu nastalo u varianty KG snížení poškození membrány na hodnotu 50,94 % oproti kontrolní variantě (KK), u které byla zaznamenána hodnota 59,44 %. U varianty stresované suchem (KS) byla při odběru 3 naměřena hodnota 59,99 %, což odpovídalo hodnotě relativního výtoku elektrolytů i u varianty GS, která dosáhla 59,87 %. Po následné rehydrataci nastal u varianty KS nárůst poškození buněk na 63,98 %, zatímco stresovaná varianta ošetřená glycin betulinem zůstala na téměř stejné hodnotě 59,84 %. U variant nestresovaných suchem KK a KG došlo mezi dvěma posledními odběry k růstu z hodnoty 57,05 % u varianty KK na 62,93% při posledním odběru, respektive z hodnoty 56,71 % u varianty KG na 64,58 %.



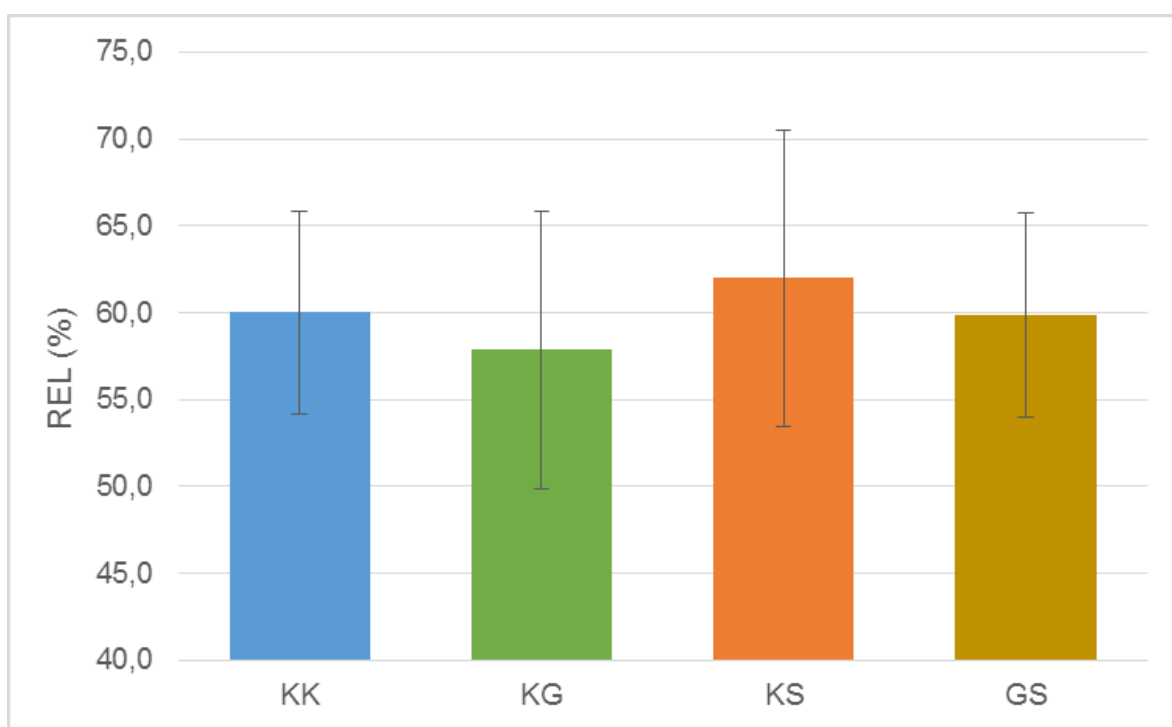
Graf 11: Změny poškození buněčné membrány hybridu RGT Lipexx v závislosti na variantě pokusu a termínu odběru.

Dle tabulky 6 neexistuje statisticky významný rozdíl v relativním výtoku elektrolytů mezi jednotlivými variantami hybridu RGT Lipexx.

	Var2	KK 60,014	KG 58,597	KS 61,010	GS 58,185
1	KK		0,896906	0,959299	0,803230
2	KG	0,896906		0,634709	0,997164
3	KS	0,959299	0,634709		0,507440
4	GS	0,803230	0,997164	0,507440	

Tab. 6: Tuckeyho test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pro index poškození buněčné membrány kukuřice seté hybridu RGT Lipexx.

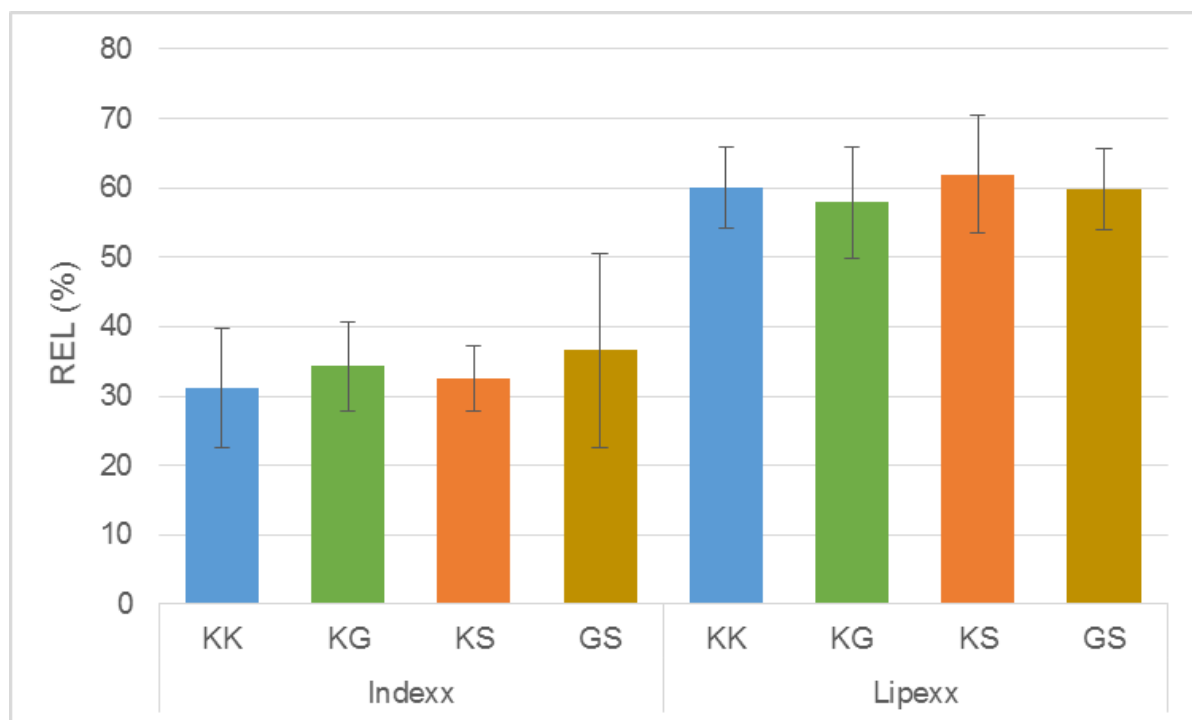
Z grafu 12 je patrné, že varianty, u kterých byl aplikován glycin betulin, zaznamenaly neprůkazně nižší míru poškození buněčné membrány. U varianty KG byl naměřen průměrný relativní výtok elektrolytů 57,87 % a u varianty GS 59,86 %. Nejvyšší průměrné poškození membrány bylo zaznamenáno u varianty KS v hodnotě 61,98 %. U kontrolní varianty byla naměřena hodnota 60,01 %.



Graf 12: Změny poškození buněčné membrány hybridu RGT Lipexx v závislosti na variantě pokusu.

5.2.3 Porovnání sledovaných hybridů

V grafu 13 jsou uvedeny průměrné obsahy relativního výtoku elektrolytů obou sledovaných hybridů. Z grafu je zřejmé, že vliv genotypu je rozhodujícím faktorem při hodnocení indexu poškození buněčné membrány. Rozdíl mezi oběma genotypy je patrný ve všech variantách a pohybuje se okolo 30 %. Například u kontrolní varianty (KK) hybridu Indexx byl naměřen relativní výtok elektrolytů 31,13 %, zatímco u hybridu Lipexx byl index poškození buněk roven 61,01 %.



Graf 13: Porovnání v poškození buněčné membrány u sledovaných hybridů.

6 Diskuze

6.1 Obsah prolinu

Prolin je zapojený do mnoha fyziologických procesů. Jedná se o osmoprotektant hromadící se v rostlinách při reakci na stresové podmínky, jakými jsou např. sucho, zasolení, vysoké či nízké teploty, přítomnost těžkých kovů nebo UV záření (Theocharis et al. 2012; Fujisawa et al. 2018). Podle Klaus & Heriber (2004) se účastní stabilizace proteinů a membrán, čímž brání úniku elektrolytů, a působí jako hlavní organický osmolyt.

Prolin mohou organismy využívat rovněž jako zdroj uhlíku, dusíku a především zdroj energie, který pomáhá rostlině překonávat stres (Wood 1987). Biosyntéza prolinu může probíhat podle potřeby rostliny. Za normálních podmínek je hladina prolinu udržována na stejné úrovni díky samoregulační inhibiční vazbě k enzymu glutamátkinázy, který je zodpovědný za syntézu prolinu. Lze tak konstatovat, že hladina prolinu v rostlině je indikátorem stresu (Vašáková & Hradecká 1994).

Vliv glycin betulinu v rostlinách nebyl zatím příliš zkoumán. Dle Yogeewari & Sriram (2005) má antioxidační a antibakteriální účinky a působí v rostlině jako osmoprotektant. Podobnou látkou je ovšem glycin betain, poprvé syntetizován z řepy cukrové, který je rovněž osmoticky aktivní látkou napomáhající chránit organismus před stresem ze sucha, zasolení a při extrémních teplotách (Chen & Murata 2008). Působí pozitivně na ochranu fotosyntetického aparátu, stabilizuje lipidy v tylakoidní membráně a umožňuje rostlině zachovat fotosyntetickou aktivitu (Wang et al 2010). Pozitivní vliv exogenní aplikace glycin betainu při vystavení rostliny stresu z nedostatku vody uvádí více autorů (Anjum et al. 2012; Ma et al. 2007; Zhao et al., 2007)

V diplomové práci byly zkoumány dva odlišné hybridy kukuřice seté a v obsahu prolinu byl zaznamenán průkazný rozdíl mezi oběma hybridy i mezi sledovanými variantami. Konstatování Vašákové & Hradecké (1994) o prolinu jako indikátoru stresu, se potvrdilo u hybridu RGT Lipexx, kdy jak v nadzemní části, tak v kořenech došlo při odběru 3 k prudkému nárůstu u stresovaných variant. Konkrétně v nadzemní části 36,55 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u kontrolní varianty a nárůst na hodnotu 406,32 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u varianty stresované suchem (KS) a 531,46 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u varianty navíc ošetřené glycin betulinem (GS). U kořenů byly naměřeny podobné výsledky: KK 25,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, KS 491,07 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, GS 603,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Zároveň byl zaznamenán výrazný pokles u stresovaných variant po následné rehydrataci. V nadzemní části

u stresované varianty neošetřené glycin betulinem (KS) na hodnotu 138,45 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 135,92 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u varianty stresované ošetřené glycin betulinem (GS). Obsah prolinu v kořenech byl následující: KS 126,95 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a GS 158,98 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Zvyšování obsahu prolinu u rostlin stresovaných suchem potvrdili ve svých pracích Mafakheri et al. (2010) u rostlin cizrny beraní, De Ronde et al. (2000) u rostlin bavlníku, Anjum et al. (2017) u různých hybridů kukuřice seté. Obdobné závěry ve své práci uvádí též Cha-um et al. (2013), kdy sleduje nejen vliv vodního deficitu, ale také aplikaci osmoticky aktivní látky glycin betainu na fyziologické odezvy u rýže seté. Obsah prolinu u stresovaných variant dosáhl pětinasobné hodnoty, respektive osminásobné hodnoty u varianty ošetřené glycin betainem oproti kontrolní variantě. Po rehydrataci nastal stejně jako ve výše uvedených výsledcích pokles na hodnotu naměřenou před navozením stresu. Podobně tak i další autoři uvádějí závislost ve zvýšeném obsahu prolinu po exogenní aplikaci glycin betainu, jak u rýže seté (Farooq et al. 2010), tak u kukuřice seté (Xin et al. 2009).

Nárůst obsahu prolinu byl pozorován i u hybridu RGT Indexx. Na rozdíl od hybridu RGT Lipexx rostl obsah prolinu pouze u variant ošetřených glycin betulinem a to jak v kontrolní variantě (KG), tak ve variantě ošetřené a stresované vodním deficitem (GS). Vodní deficit nebyl rozhodujícím faktorem pro obsah prolinu, tudíž zde tvrzení, že prolin funguje jako indikátor stresu, není platné. Při odběru 3, kdy byly na rostlinách patrné vizuální projevy stresu suchem, byla naměřena v nadzemní části u varianty KG hodnota 84,29 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u varianty GS hodnota 116,06 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U neošetřené stresované varianty (KS) byla zaznamenána hodnota pouze 30,08 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Obsah prolinu v kořenech vykazoval podobný trend: KG 176,60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, GS 88,71 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, KS 22,80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Lze tedy konstatovat, že mezi genotypy kukuřice seté existují statisticky významné rozdíly při tvorbě prolinu v době, kdy jsou rostliny vystaveny stresu z nedostatku vody. Mohammadkhani & Heidari (2008) dospěli ve své práci k podobným závěrům, když zkoumali obsah prolinu u dvou hybridů kukuřice seté. Rozdílný genotyp vede k ovlivnění enzymů produkujících či redukujících tvorbu prolinu, což má za následek rozdíly v jeho obsahu. Obdobné závěry uvádějí i Bandurska et al. (2017), kdy byly zaznamenány rozdílné obsahy prolinu v závislosti na odlišných odrůdách ječmene, kdy byly ke studiu použity syrské a německé kultivary.

Aplikace osmoticky aktivní látky glycin betulinu tedy pozitivně ovlivňuje obsah prolinu v rostlinách kukuřice seté u obou sledovaných genotypů. Dle Reddy et al. (2013) by právě exogenní aplikace osmoticky aktivních látek mohla být do budoucna více uplatňována.

Durhou možností je využití genových mutací k vylepšení genotypů kulturních plodin tak, aby dokázaly tyto osmoticky aktivní látky samy a ve větší míře syntetizovat (Hussain et al. 2013).

6.2 Relativní výtok elektrolytů (REL %)

Index poškození buněčné membrány je založen na měření vodivosti roztoku (vody) s rostlinným materiálem. Porušení buněčné membrány vede k úniku elektrolytů, jako například K^+ iontů, které následně zvyšují vodivost roztoku (Hatsugai & Katagiri 2017). Podle Kosmala et al. (2012) se hodnota relativního výtoku elektrolytů jeví jako dobrý indikátor tolerance vůči stresu vodním deficitem a schopnosti jej překonat.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že vliv genotypu na míru poškození membrány je rozhodujícím faktorem, zatímco vodní deficit ani aplikace glycin betulinu nemá průkazný vliv na relativní výtok elektrolytů. U hybridu RGT Indexx byly naměřeny průměrné hodnoty u všech variant okolo 35 %, kdežto u hybridu RGT Lipexx okolo 60 %. Lze tedy pozorovat závislost mezi mírou poškození membrány a obsahem prolinu. Hybrid s vyšší syntézou prolinu u variant stresovaných suchem (RGT Lipexx) zaznamenal vyšší hodnotu relativního výtoku elektrolytů. Je tedy možné, že hybrid RGT Indexx je lépe vybaven na stres suchem, a proto nedocházelo během měření k vysokému poškození membrány a k nižšímu obsahu prolinu.

Míra poškození membrány mezi jednotlivými variantami oscilovala kolem podobné hodnoty a vliv varianty na relativní výtok elektrolytů nebyl prokázán. U hybridu RGT Indexx byly zaznamenány vyšší rozdíly mezi jednotlivými odběry a variantami, například u varianty GS, kdy se relativní výtok elektrolytů navýšil na 49,53 % oproti 36,73 % u varianty KG, anebo u kontrolní varianty, kdy se míra poškození membrány pohybovala mezi 24,17 % z odběru 1 a 39,58 % z odběru 4.

Výše uvedené výsledky jsou v kontrastu s prací Anjum et al. (2012), ve které se míra poškození membrány u dvou vybraných hybridů kukuřice zvyšuje s délkou působení stresu suchem a zároveň je hodnota relativního výtoku elektrolytů nižší u varianty ošetřené osmoticky aktivní látkou glycin betainem. Rozdíl se pohybuje kolem 15 % ve prospěch varianty ošetřené glycin betainem. Podobné závěry lze nalézt i v práci Ullah et al. (2016), kde je míra poškození membrány prokazatelně vyšší u stresované varianty, anebo ve výsledcích Valentovic et al. (2006) při studiu kukuřice seté.

7 Závěr

V diplomové práci byl sledován a hodnocen vliv exogenní aplikace glycin betulinu a vodního deficitu na obsah prolinu a relativního výtoku elektrolytů u juvenilních rostlin kukuřice seté. K pokusu byly vybrány dva hybridy – RGT Indexx a RGT Lipexx, na nichž byly měřeny výše uvedené fyziologické charakteristiky v růstových fázích BBCH 16 – 23. Pokus byl založen ve skleníku Katedry botaniky a fyziologie rostlin FAPPZ. Ze získaných výsledků vyplývají tyto závěry:

- Mezi genotypy kukuřice seté existují průkazné rozdíly v obsahu prolinu a relativního výtoku elektrolytů při působení vodního deficitu a aplikace exogenního glycin betulinu.
- Mezi nadzemní částí a kořeny nebyly zaznamenány průkazné rozdíly v obsahu prolinu ani u jednoho ze sledovaných hybridů v žádné z variant.
- U hybridu RGT Indexx má převažující vliv na obsah prolinu aplikace osmoticky aktivní látky – glycin betulinu.
- U hybridu RGT Lipexx má převažující vliv na obsah prolinu vodní deficit a vodní deficit v kombinaci s osmoticky aktivní látkou – glycin betulinem.
- Nejnižší obsah prolinu byl naměřen v kořenech u varianty KK hybridu RGT Lipexx při 2. odběru $15,54 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, nejnižší průměrný obsah pak $38,67 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v kořenech varianty KK hybridu RGT Indexx.
- Nejvyšší obsah prolinu byl naměřen v kořenech u varianty GS hybridu RGT Lipexx při 3. odběru $603,00 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, nejvyšší průměrný obsah pak $206,51 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u téže varianty hybridu RGT Lipexx.
- U stresovaných variant byl rozdíl v obsahu prolinu mezi hybridy přibližně trojnásobný.
- Vyšší obsah prolinu u hybridu Indexx oproti hybridu Lipexx byl zaznamenán pouze ve variantě KG. V nadzemní části $86,13 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oproti $51,46 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a v kořenech $101,34 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oproti $61,71 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.
- Při měření relativního výtoku elektrolytů nebyly zaznamenány průkazné rozdíly mezi sledovanými variantami.
- Rozdíl mezi sledovanými hybridy v míře poškození buněčné membrány je přibližně dvojnásobný a je vyšší u hybridu RGT Lipexx (okolo 60 %), což koreluje s vyšším obsahem prolinu právě u tohoto hybridu.

- Nejnižší průměrné hodnoty relativního výtoku elektrolytu byly zjištěny ve variantě KK hybridu RGT Indexx 31,13 %, nejnižší hodnota byla naměřena při 1. odběru u téže varianty 24,17 %.
- Nejvyšší průměrné hodnoty relativního výtoku elektrolytu byly zjištěny ve variantě KS hybridu RGT Lipexx 61,98 %, nejvyšší hodnota byla naměřena u varianty KG hybridu RGT Lipexx při 4. odběru 64,58 %.
- Ze získaných výsledků vyplývá, že navrhované hypotézy byly potvrzeny. Genotyp hraje významnou roli v toleranci vůči vodnímu deficitu a též aplikace osmoticky aktivní látky – glycin betulinu v kombinaci s vodním deficitem průkazně ovlivňuje obsah prolinu a neprůkazně míru poškození rostlinných pletiv.

8 Seznam použité literatury

- Anjum SA, Ashraf U, Tanveer M, Khan I, Hussain S, Shahzad B, Wang LC. 2017. Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Anjum SA, Saleem MF, Wang LC, Bilal MF, Saeed A. 2012. Protective role of glycinebetaine in maize against drought-induced lipid peroxidation by enhancing capacity of antioxidative system. *Australian Journal of Crop Science* **6**:576.
- Ashraf M, Harris PJC. 2013. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica* **51**:163-190.
- Bandurska H, Niedziela J, Pietrowska-Borek M, Nuc K, Chadzinikolau T, Radzikowska D. 2017. Regulation of proline biosynthesis and resistance to drought stress in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes of different origin. *Plant Physiology and Biochemistry*,) **118**:427-437.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* **39**:205-207.
- Beck EH, Fettig S, Knake C, Hartig K, Bhattarai T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences* **32**:501-510.
- Blum A, 2005. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential – are they compatible, dissonant, or mutually exclusive?. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**:1159–1168.
- Bray EA. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**:48-54.
- Campos PS, Quartin V, Ramalho J, Nunes MA. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology* **160**:283-292.
- Cerkal R. 2011. Stresy a produkční výkonnost polních plodin. Mendelova univerzita v Brně, Brno. Available from http://web2mendelu.cz/af_291_sklad/habilitacni_prednasky/habilitacni_prednasky/habilitacni_prednaska_cerkal.pdf (accessed January 2019).

- De Ronde JA, Van Der Mescht A, Steyn HSF. 2000. Proline accumulation in response to drought and heat stress in cotton. *African Crop Science Journal* **8**:85-92.
- Doebley J, Stec A, Gustus C. 1995. Teosinte branched1 and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics* **141**:333-346.
- Doležal K. 2006. Genová centra vzniku kulturních rostlin. upol.cz. Available from <http://old.botany.upol.cz/prezentace/dolezal/centra.pdf> (accessed January 2019).
- Dostál J. 1989. Nová květena ČSSR 2. díl. Academia, Praha.
- eagri.cz, Databáze odrůd. Available from <http://eagri.cz/public/app/sok/odrudyNouQF.do> (accessed January 2019).
- Fard EM, Bakhshi B, Keshavarznia R, Nikpay N, Shahbazi M, Salekdeh GH. 2017. Drought responsive microRNAs in two barley cultivars differing in their level of sensitivity to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **118**:121-129.
- Farooq M, Wahid A, Lee DJ, Cheema SA, Aziz T. 2010. Drought stress: comparative time course action of the foliar applied glycinebetaine, salicylic acid, nitrous oxide, brassinosteroids and spermine in improving drought resistance of rice. *Journal of Agronomy and Crop Science* **196**:336-345.
- Fujisawa I, Kitamura Y, Kato R, Aoki K. 2018. Crystal structures of resorcin [4] arene and pyrogallol [4] arene complexes with proline: A model for proline recognition through CH $\cdots\pi$ interaction. *Journal of Molecular Structure* **1163**:336-344.
- Gao H, Zhang Z, Lv X, Cheng N, Peng B, Cao W. 2016. Effect of 24-epibrassinolide on chilling injury of peach fruit in relation to phenolic and proline metabolisms. *Postharvest Biology and Technology* **111**:390-397.
- Goring H, Thien BH. 1978. Dependence of proline accumulation by roots and shoots of corn seedlings on water stress. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **172**:311-314.
- Hajlaoui H, El Ayeb N, Garrec JP, Denden M. 2010. Differential effects of salt stress on osmotic adjustment and solutes allocation on the basis of root and leaf tissue senescence of two silage maize (*Zea mays* L.) varieties. *Industrial Crops and Products* **31**:122-130.
- Hammond-Kosack KE, Jones JD. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**:1773-1791.

- Harlan JR. 1971. Agricultural origins: centers and noncenters. *Science* **174**:68-474.
- Hatsugai N, Katagiri F. 2017. Quantification of Plant Cell Death by Electrolyte Leakage Assay. *Bio-protocol* **8**:(e2758) DOI: 10.21769/BioProtoc.2758.
- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A. 2012. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior* **7**:1456-1466.
- Hnilička F, Hniličková H. 2016. Obecná koncepce stresu. Pages 2-27 in Hnilička F, Středa T, editors. *Rostliny v podmínkách stresu – abiotické stresory*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Hnilička F, Hniličková H. 2012. Vodní režim polních plodin. *Úroda* **60**:36-37.
- Hossain MA, Hoque MA, Burritt DJ, Fujita M. 2014. Proline protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress. Pages 477-522 in Parvaiz A, editor. *Oxidative damage to plants*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts.
- Hussain Wani S, Brajendra Singh N, Haribhushan A, Iqbal Mir J. 2013. Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance-role of glycine betaine. *Current Genomics* **14**:157-165.
- Cha-um S, Kirdmanee C. 2010. Effect of glycinebetaine on proline, water use, and photosynthetic efficiencies, and growth of rice seedlings under salt stress. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **34**:517-527.
- Cha-um S, Samphumphuang T, Kirdmanee C. 2013. Glycinebetaine alleviates water deficit stress in indica rice using proline accumulation, photosynthetic efficiencies, growth performances and yield attributes. *Australian Journal of Crop Science* **7**:213-218.
- Chen TH, Murata N. 2008. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science* **13**:499-505.
- Jenks MA, Hasegawa PM. 2005. *Plant abiotic stress*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Jones HG, Flowes TJ, Jones MB. 1989. *Plants under stress*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kazda J, Mikulka J, Prokinová E. 2010. *Encyklopedie ochrany rostlin*. Profi Press, Praha.

- Khan MS, Yu X, Kikuchi A, Asahina M, Watanabe KN. 2009. Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis to enhance abiotic stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology* **26**:125-134.
- Khan MA, Muhammad I, Muhammad A, Maqshoof A, Hassan MW, Moazzam J. 2013. Recent advances in molecular tool development for drought tolerance breeding in cereal crops: a review. *Žemdirbystė (Agriculture)* **100**:325-334.
- Klaus A, Heriber H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**:373-399.
- Kosmala A, Perlikowski D, Pawłowicz I, Rapacz M. 2012. Changes in the chloroplast proteome following water deficit and subsequent watering in a high and a low drought tolerant genotype of *Festuca arundinacea*. *Journal of Experimental Botany* **63**:6161-6172.
- Kůdela V, Ackermann P, Prášil IT, Rod J, Veverka K. 2013. Abiotikózy rostlin: poruchy, poškození a poranění. Academia, Praha.
- Larcher W. 2003. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media, Berlin.
- Latati M, Bargaz A, Belarbi B, Lazali M, Benlahrech S, Tellah S, Ounane SM. 2016. The intercropping common bean with maize improves the rhizobial efficiency, resource use and grain yield under low phosphorus availability. *European Journal of Agronomy* **72**:80-90.
- Levitt J. 1980. *Responses of plants to environmental stresses: water, radiation, salt and other stresses*. Academic Press, New York.
- Lichtenhaler HK. 1998. The Stress Concept in Plants. An Introduction. *Annals of the New York Academy of the Sciences* **851**:187–198.
- Lipiec J, Doussan S, Nosalewicz A, Kondracka K. 2013. Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. *International Agrophysics* **27**:463–477.
- Ma XL, Wang YJ, Xie SL, Wang C, Wang W. 2007. Glycinebetaine application ameliorates negative effects of drought stress in tobacco. *Russian Journal of Plant Physiology* **54**:472.

- Mafakheri A, Siosemardeh AF, Bahramnejad B, Struik PC, Sohrabi Y. 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science* **4**:580.
- Mareček J. 2001. *Zahradnický slovník naučný 5. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha.*
- McCue KF, Hanson AD. 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnology* **8**:358-362.
- Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* **11**:15-19.
- Mohammadkhani N, Heidari R. 2008. Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Science Journal* **3**:448-453.
- Nilsen ET, Orcutt DM. 1996. *The physiology of plants under stress.* Wiley, New York.
- Nyysölä A, Kerovuo J, Kaukinen P, von Weymarn N, Reinikainen T. 2000. Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *Journal of Biological Chemistry* **275**:22196-22201.
- Primack RB, Kindlmann P, Jersáková J. 2001. *Biologické principy ochrany přírody.* Portál, Praha.
- Rai AC, Singh M, Shah K. 2012. Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in ZAT12-transformed transgenic tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **61**:108-114.
- Reddy KR, Henry WB, Seepaul R, Lokhande S, Gajanayake B, Brand D. 2013. Exogenous application of glycinebetaine facilitates maize (*Zea mays* L.) growth under water deficit conditions. *American Journal of Experimental Agriculture* **3**:1-13.
- Říha K. 2008. Geneticky modifikovaná kukuřice. Pages 41-47 in Zimolka J, editor. *Kukuřice – hlavní a alternativní užitkové směry.* Profi Press, Praha.
- Sakamoto A, Murata N. 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant, Cell & Environment* **25**:163-171.

- Selye H. 1973. The Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones. *American Scientist* **61**:692–699.
- Schulze E, Beck E, Müller–Hohenstein K. 2005. *Plant Ecology*. Springer, Berlin/Heidelberg.
- Sperdouli I, Moustakas M. 2012. Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *Journal of Plant Physiology* **169**:577–585.
- Strnadová D, Urban J, Steinová Š, Slaba M, Růžičková V, Novák P, Kubásková L, Janusová L, Ivanega J. 2012. *Z historie zemědělství*. Národní zemědělské muzeum, Praha.
- Taiz L, Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*, 3 edition. Sinauer Associates, Cary, North Carolina.
- Tatsumi K, Yamashiki Y, Da Silva RV, Takara K, Matsuoka Y, Takahashi K, Maruyama K, Kawahara N. 2011. Estimation of potential changes in cereals production under climate change scenarios. *Hydrological Processes* **25**:2715–2725.
- Theocharis A, Clément C, Barka EA. 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta* **235**:1091–1105.
- Trovato M, Mattioli R, Costantino P. 2008. Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rendiconti Lincei* **19**:325–346.
- Ullah U, Ashraf M, Shahzad SM, Siddiqui AR, Piracha MA, Suleman M. 2016. Growth behavior of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under drought stress in the presence of silicon and plant growth promoting rhizobacteria. *Soil & Environment* **35**.
- Valentovic P, Luxova M, Kolarovic L, Gasparikova O. 2006. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil and Environment* **52**:184.
- Vaněk V, Balík J, Pavlík M, Pavlíková D, Tlustoš P. 2016. *Výživa a hnojení polních plodin*. Profi Press, Praha.
- Vašáková L, Hradecká D. 1994. Vliv vybraných biologicky aktivních látek na aktivitu enzymu glutamátkinázy v listech jarní pšenice. *agris.cz*. Available from http://www.agris.cz/Content/files/main_files/64/141799/vasakova.pdf (accessed February 2019).

- Wang L, Beissinger TM, Lorant A, Ross-Ibarra C, Ross-Ibarra J, Hufford MB. 2017. The interplay of demography and selection during maize domestication and expansion. *Genome Biology* **18**:215.
- Wang GP, Li F, Zhang J, Zhao MR, Hui Z, Wang W. 2010. Overaccumulation of glycine betaine enhances tolerance of the photosynthetic apparatus to drought and heat stress in wheat. *Photosynthetica* **48**:30-41.
- Wood JM. 1987. Membrane association of proline dehydrogenase in *Escherichia coli* is redox dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**:373-377.
- Xin ZL, Mei G, Shiqing L, Shengxiu L, Zongsuo LIANG. 2011. Modulation of plant growth, water status and antioxidative system of two maize (*Zea mays* L.) cultivars induced by exogenous glycinebetaine under long term mild drought stress. *Pakistan Journal of Botany* **43**:1587-1594.
- Yancey PH. 1994. Compatible and counteracting solutes. Pages 81-109 in Strange K, editor. *Cellular and molecular physiology of cell Volume Regulation*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Yi L, Shenjiao Y, Shiqing L, Xinping C, Fang C. 2010. Growth and development of maize (*Zea mays* L.) in response to different field water management practices: Resource capture and use efficiency. *Agricultural and Forest Meteorology* **150**:606-613.
- Yogeeswari P, Sriram D. 2005. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Current Medicinal Chemistry* **12**:657-666.
- Zhang LX, Gao M, Li S, Liang Z. 2011. Modulation of plant growth, water status and antioxidative systems of two maize cultivars induced by exogenous glycinebetaine under long term mild drought stress. *Pakistan Journal of Botany* **43**:1587-1594.
- Zhao XX, Liang C, Fang Y, Wang YQ, Wang W. 2007. Effect of glycinebetaine on function of thylakoid membranes in wheat flag leaves under drought stress. *Biologia Plantarum* **51**:584-588.
- Zimolka J. 2008. Botanická charakteristika. Pages 15-28 in Zimolka J, editor. *Kukuřice – hlavní a alternativní užitkové směry*. Profí Press, Praha.