

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PEDAGOGICKÁ FAKULTA



**Účinnost využití vody rostlinami hodnocená
pomocí diskriminace izotopu ^{13}C**

Diplomová práce

Ondřej Záleský

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Jiří Šantrůček, CSc.

České Budějovice 2011

Záleský O. 2011: Účinnost využití vody rostlinami hodnocená pomocí diskriminace izotopu ^{13}C . Magisterská diplomová práce. Pedagogická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. 54 s.

Anotace:

Diskriminace izotopu ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$) může být vhodným měřítkem pro stanovení účinnosti využití vody (*WUE*) rostlinami. Tato práce potvrzuje negativní korelaci $\Delta^{13}\text{C}$ a *WUE* u vybraných genotypů ječmene a pšenice. Dále se zabývá vhodností využití zjištěného vztahu pro šlechtění suchu odolnějších plodin.

Annotation:

Carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) may be an appropriate measure for determination of the water use efficiency (*WUE*) of plants. This work confirms the negative correlation of $\Delta^{13}\text{C}$ and *WUE* in selected genotypes of barley and wheat. It also deals with the suitability of using the observed relationship in breeding of drought resistant crops.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pod vedením a s využitím konzultací vedoucího diplomové práce. Veškerou použitou literaturu a prameny cituji a uvádím v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 15. prosince 2011

Ondřej Záleský

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. Ing. Jiřímu Šantrůčkovi, CSc. za trpělivost, ochotu a všechny odborné rady pro dokončení této práce. Ing. Marii Hronkové, Ph.D. děkuji za pomoc a rady týkající se pěstování rostlin a zhotovování IR snímků. Ing. Marii Šimkové a Ing. Petře Fialové za velkou ochotu a pomoc při zpracování kořenů a zhotovování otisků průduchů. Mgr. Ladislavu Markovi za odborné informace a instruktáž k izotopovému stanovení.

Děkuji všem ostatním zaměstnancům, kteří mi poskytli jakoukoli pomoc nebo radu a celé katedře Fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty za výborné přijetí, důvěru a zázemí, kterého se mi zde dostalo. Pokusy byly prováděny s finanční podporou grantu GAČR č. 206-08-0787.

Na závěr děkuji všem svým blízkým za psychickou podporu a povzbuzení.

Obsah

1 ÚVOD	7
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1 STABILNÍ IZOTOPY	8
2.1.1 <i>Historie výzkumu stabilních izotopů v rostlinách</i>	9
2.1.2 <i>Fracionace izotopů uhlíku</i>	9
2.1.2.1 Kinetický efekt	12
2.1.2.2 Termodynamický efekt.....	12
2.1.2.4 Složky izotopové fraccionace v rostlinách.....	13
2.1.2.5 Teorie celkové izotopové fraccionace u C ₃ rostlin.....	14
2.1.2.6 Rozdíly mezi C ₃ a C ₄ rostlinami.....	15
2.1.3 <i>Izotopová diskriminace</i>	16
2.2 ÚČINNOST VYUŽITÍ VODY ROSTLINAMI.....	18
2.2.1 <i>Historické aspekty studia účinnosti využití vody</i>	18
2.2.2 <i>Využití vody rostlinou a jeho vztah k rychlosti fotosyntézy</i>	18
2.2.3 <i>Metody měření WUE</i>	19
2.2.3.1 <i>Gazometrická měření na úrovni listu</i>	19
2.2.3.2 <i>Měření WUE celých rostlin vážkově</i>	20
2.2.3.3 <i>Měření WUE pomocí izotopové diskriminace uhlíku</i>	21
2.2.4 <i>Fyziologická versus agronomická účinnost využití vody</i>	22
2.2.5 <i>Vyšší účinnost může provázet nižší výnos</i>	23
2.2.6 <i>Vyšší účinnost spojená s vyšším výnosem a příklady úspěšného šlechtění</i>	23
2.2.7 <i>Dědičnost WUE</i>	24
3 CÍLE PRÁCE	25
4 METODIKA A MATERIÁL	26
4.2 ROSTLINY A PODMÍNKY PĚSTOVÁNÍ.....	26
4.3 MĚŘENÍ, SKLIZEŇ A ZPRACOVÁNÍ ROSTLINNÉHO MATERIÁLU.....	27
4.3.1 <i>Termovize listů</i>	27
4.3.2 <i>Stanovení suché hmoty prýtů, příprava vzorků pro izotopovou analýzu</i>	27

4.3.3 Stanovení hustoty prúduchů.....	28
4.3.4 Stanovení suché hmoty kořenů, příprava vzorků pro izotopovou analýzu	28
4.3.4 Izotopová analýza sušiny rostlin.....	28
4.4 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	29
5 VÝSLEDKY	30
5.1 SPOTŘEBA VODY.....	30
5.2 TERMOVIZE LISTŮ.....	30
5.3 HMOTNOST SUCHÉ HMOTY PRÝTŮ	31
5.4 HMOTNOST SUCHÉ HMOTY KOŘENŮ.....	33
5.5 ÚČINNOST VYUŽITÍ VODY	34
5.6 DÉLKA A PLOCHA KOŘENOVÉHO SYSTÉMU	36
5.6 HUSTOTA PRŮDUCHŮ.....	37
5.7 DISKRIMINACE IZOTOPU ¹³ C	38
5.7.1 Nadzemní část rostlin	39
5.7.2 Kořeny.....	41
6 DISKUZE	43
6.1 TRANSPIRACE ROSTLIN	43
6.2 BIOMASA ROSTLIN	43
6.3 HUSTOTA PRŮDUCHŮ.....	44
6.4 ÚČINNOST VYUŽITÍ VODY	45
6.5 DISKRIMINACE IZOTOPU ¹³ C	45
6.6 VZTAH IZOTOPOVÉ DISKRIMINACE A WUE.....	46
7 ZÁVĚR	48
8 CITOVANÁ LITERATURA	49
9 PRILOHY.....	53

1 Úvod

Problém nedostatku pitné vody v globálním měřítku je v poslední době velmi diskutovaným tématem. Spolu s očekávaným zvyšováním teploty ovzduší tvoří obávaný stav globálního ekosystému v blízké budoucnosti. Je předpovídán mnoha konferencemi a vědeckými studiemi (např. IPCC 2007 - Intergovernmental Panel on Climate Change). Škodlivé důsledky nedostatku vody na růst rostlin mohou být sice částečně kompenzovány zvýšeným přísunem CO₂ z ovzduší, přesto je dopad na potravinové zdroje v podstatě nevyhnutelný (Lobell *et al.* 2008).

Na mnoha místech na světě se nedostatek pitné (ale i užitkové sladké) vody stává již velmi závažným až fatálním a úzce souvisí se stále rostoucí lidskou populací. Morison *et al.* (2009) v jedné ze svých prací uvádějí, že v globálním měřítku je využito 80–90 % veškeré pitné vody v zemědělství, většinou na zavlažování rostlin. Každé procento zvýšení účinnosti vody rostlinami by mohlo výrazně zmírnit nedostatek vody.

Pěstování plodin vyšlechtěných na vysokou míru účinnosti využití vody je jedním z nadějných řešení (Condon *et al.* 2004). Výzkum v této oblasti se převážně zaměřuje na pěstování rostlin (zejména obilovin) v suchém prostředí, neboť sucho je hlavním faktorem, který ovlivňuje výnos, v případě obilovin výnos zrna. Zvýšení výnosu zrna při zachování fixní spotřeby vody, a tedy i zvýšení účinnosti využití vody, je zásadní pro posílení světové produkce plodin a tedy i dostupnosti potravin (Misra *et al.* 2010).

Pro účinné šlechtění je nezbytně nutné porozumět základním vztahům mezi příjmem vody a ukládáním uhlíku do biomasy rostlin od molekulárně-genetické úrovně až po agronomické podmínky, ve kterých dané plodiny rostou. Je dále třeba najít měřitelné vlastnosti rostliny spojené s účinností využití vody a geny, které tyto vlastnosti podmiňují. V současné době se zdá, že onou vhodnou vlastností by mohla být tzv. diskriminace stabilního izotopu uhlíku ¹³C. Identifikace a lokalizace příslušných genů je předmětem mnoha probíhajících výzkumů, nicméně objevují se již první úspěšné výsledky, jak bude uvedeno dále v příslušné kapitole.

Snahou této práce bylo ověřit dále vysvětlený vztah mezi diskriminací izotopu uhlíku ¹³C a účinností využití vody na konkrétních genotypech obilnin. Jednotlivé cíle práce jsou rozepsány v kap. 3 Cíle práce.

2 Literární přehled

2.1 Stabilní izotopy

Prvky v přírodě se často vyskytují v různých izotopech neboli nuklidech. Izotopy určitého prvku mají stejný počet elektronů i protonů, liší se však počtem neutronů v jádře. Jejich označení se tedy liší v tzv. nukleonovém čísle tj. součtem protonů a neutronů (např. pro uhlík: ^{13}C a ^{12}C). Znamená to, že chemické vlastnosti různých izotopů daného prvku jsou vesměs totožné, ale izotopy se liší svojí atomovou hmotností. Odlišné chování izotopů se tedy projevuje u všech fyzikálně-chemických jevů, které přímo souvisejí s atomovými, resp. molekulovými hmotnostmi (např. hustota, molární objem) a dále u všech jevů, kde je rozhodující rychlost částic (např. difuzní pochody, vypařování, asimilace uhlíku apod.). Některé izotopy se rozpadají za uvolňování (emise) různých částic. Ty nazýváme radioizotopy. Stabilní izotopy se naproti tomu nerozpadají, tedy neemitují žádné záření. Jejich zastoupení v daném uzavřeném systému je stálé (např. Cabicar 1983). Z **Tab. 1** je patrné, že těžší izotopy daného prvku jsou zpravidla vzácnější a vyskytují se v nepatrném množství oproti lehčím.

Tab. 1: Průměrné relativní zastoupení stabilních izotopů hlavních biogenních prvků. Upraveno podle Sulzman (2007).

Prvek	Izotop	Množství (%)
Vodík	^1H	99.985
	^2H (D)	0.016
Uhlík	^{12}C	98.892
	^{13}C	1.108
Dusík	^{14}N	99.635
	^{15}N	0.365
Kyslík	^{16}O	99.759
	^{17}O	0.037
	^{18}O	0.204
Síra	^{32}S	95.00
	^{33}S	0.75
	^{34}S	4.21
	^{36}S	0.014

2.1.1 Historie výzkumu stabilních izotopů v rostlinách

Výzkum stabilních izotopů se začal rozvíjet kolem poloviny 30. let 20. století i přesto, že důkaz existence izotopů podal již v roce 1912 J. J. Thomson (Cabicar 1983). Zkoumání izotopového složení hmoty probíhalo nejprve v oblasti geologie a až poté přešlo do biologických věd, resp. vědy o rostlinách. Milníkem v této oblasti bylo vyvinutí moderního izotopového hmotnostního spektrometru (IRMS, *isotope ratio mass spectrometer*), který umožnil přesné měření relativního množství lehkých nebo těžkých forem izotopů prvků – např. vodíku, kyslíku nebo uhlíku (Ehleringer a Vogel 1993).

Pomocí hmotnostního spektrometru Nier a Gulbransen (1939) jako první odhalili, že těžší izotop uhlíku ^{13}C je mírně ochuzen v rostlinách oproti anorganickým materiálům, jako např. vápenec. Později se ukázalo, že obsah ^{13}C je různý ve dřevěch odlišných rostlinných druhů. Další výzkumy se soustředily na objasnění otázky, proč je obsah ^{13}C v rostlinách snížen oproti substrátu (CO_2 ve vzduchu). Změna obsahu ^{13}C pomohla i k objasnění principu fotosyntézy u C_4 rostlin, které jsou obecně méně ochuzené o těžší izotop uhlíku ve srovnání s rostlinami fixujícími uhlík tzv. C_3 mechanismem (Ehleringer a Vogel 1993). Za stěžejní v této oblasti lze považovat výzkumy Grahama Farquhara, Marion O'Learyho a Joea Berryho (1982), kteří objevili souvislost mezi izotopovým zastoupením uhlíku u konkrétních rostlin a koncentrací CO_2 v mezibuněčných prostorech. Farquhar (1984) poté poukázal, že této souvislosti by bylo možné využít pro selekci genotypů s vyšší účinností využívání vody.

2.1.2 Frakcionace izotopů uhlíku

Uhlík se v přírodě vyskytuje ve formě dvou stabilních izotopů: ^{12}C a ^{13}C . Mimo to jsou u uhlíku známy ještě dva radioaktivní izotopy, ^{11}C a ^{14}C , které se rozpadají. Veškeré následující pojednání se bude týkat pouze stabilních izotopů.

Ze dvou stabilních izotopů tvoří ^{13}C přibližně 1,1 % ze všech atomů uhlíku v přírodě. Na ^{12}C připadá tedy asi 98,9 %. Přesným měřením v hmotnostním spektrometru se stanovuje obsah izotopů a vyjadřuje se jako tzv. izotopový poměr R definovaný podle O'Learyho (1993) jako:

$$R = \frac{^{13}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2} \quad (1)$$

pro obsah ^{13}C v CO_2 , nebo podle Šantrůčka (2010) jako

$$R = \frac{[^{13}\text{C}]}{[^{12}\text{C}]}, \quad (2)$$

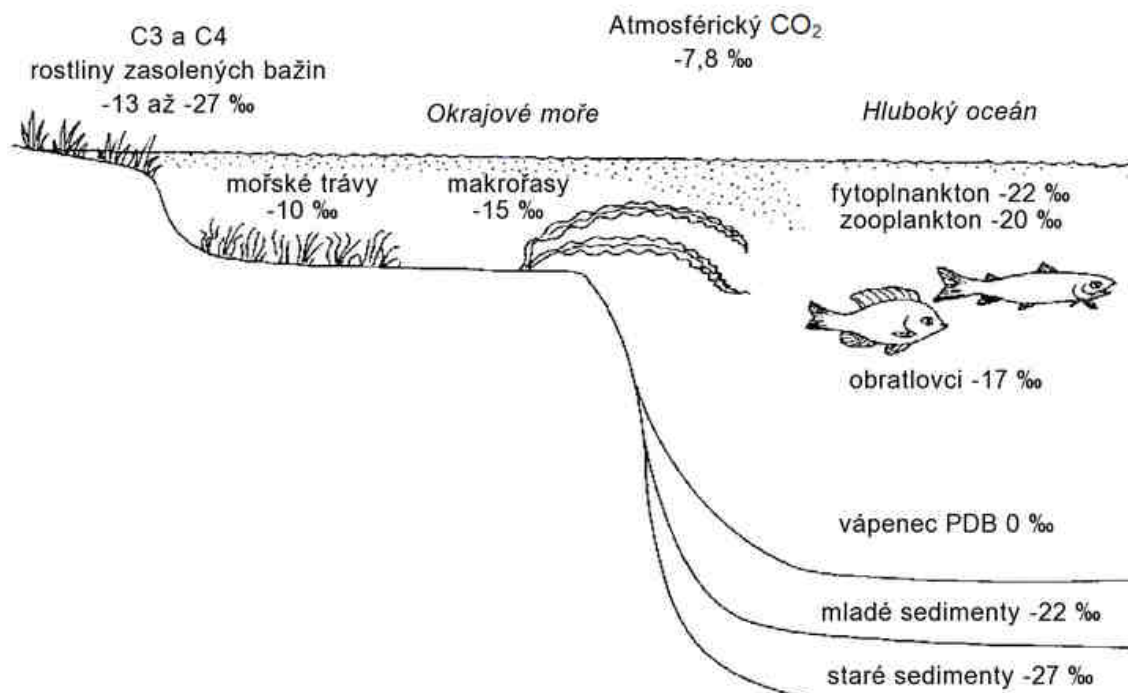
kde lomené závorky představují koncentraci příslušného izotopu v jakékoli látce. Pevné materiály (např. sušina rostlin) jsou pro IRMS analýzu převáděny na CO_2 spalováním nebo speciálními enzymatickými či chemickými metodami.

Pro zjednodušení se hodnoty R běžně převádějí na hodnoty $\delta^{13}\text{C}$:

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{R_A}{R_S} - 1, \quad (3)$$

kde R_A je izotopový poměr $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ zkoumaného vzorku a R_S poměr standardu (Farquhar a Lloyd 1993, O'Leary 1993). Běžně se násobí $\delta^{13}\text{C}$ tisícem, a je tedy bezrozměrné číslo uváděné v jednotkách promile ‰. Jako standard slouží druhohorní vápenec z tzv. Pee Dee formace v Jižní Karolíně pocházející ze schránek belemnitů (*Belemnitella americana*), v literatuře označován jako PDB. PDB má hodnotu R_S 0,01118. $\delta^{13}\text{C}$ tedy vyjadřuje relativní odchylku zkoumaného vzorku oproti tomuto standardu. Podle Farquhara a Lloyda (1993) se hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ rostlinného materiálu pohybují mezi -8,9 ‰ až -30,1 ‰ a hodnota atmosférického CO_2 dosahuje -8,0 ‰. Široké rozmezí hodnot $\delta^{13}\text{C}$ u rostlin je dáno druhem rostliny a zejména podmínkami jejich růstu. Míra ochuzení ^{13}C v atmosférickém vzduchu se každým rokem zvyšuje (hodnota je stále více záporná) v průměru o -0,028 ‰ v důsledku spalování fosilních paliv a odlesňování.

Hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ v mořích a pobřežních ekosystémech znázorňuje **Obr. 1**. Čím více je $\delta^{13}\text{C}$ záporná, tím méně obsahuje těžkého izotopu ^{13}C oproti standardu, jak ukazuje vztah (3).



Obr. 1: Orientační hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ v mořském ekosystému. Upraveno podle Šantrůčka - studijní texty kurzu Stabilní izotopy. Nepublikováno.

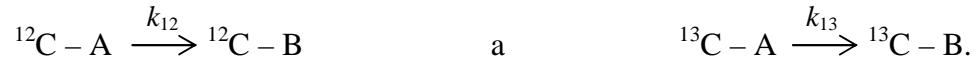
Variabilita izotopového poměru R a hodnot $\delta^{13}\text{C}$ ukázaná v **Obr. 1** vyjadřuje skutečnost, že izotopy nejsou v přírodě zastoupeny stejně – dochází k tzv. frakcionaci izotopu, tj. ke změně poměru těžkého a lehkého izotopu během syntézy nebo přeměny látky. Frakcionace se vyjadřuje tzv. izotopovým efektem α a je definována jako poměr izotopových poměrů reaktantu (R_r) a produktu (R_p) (Farquhar a Lloyd 1993):

$$\alpha = \frac{R_r}{R_p}. \quad (4)$$

Izotopový efekt (resp. izotopová frakcionace) může být dvojího typu: termodynamický a kinetický. O nich pojednávají následující kapitoly. Frakcionací při dílčích fyzikálně-chemických procesech se podrobněji zabývá až kapitola 2.1.2.4.

2.1.2.1 Kinetický efekt

Ke kinetickému efektu ($\alpha_{kinetic}$) dochází tehdy, když je rychlost chemické reakce citlivá na hmotnost atomu reagujících částic. Pro konkurenční izotopy uhlíku lze tento efekt vyjádřit jako



Vztah (4) pro izotopový efekt lze pak vyjádřit jako poměr rychlostních konstant:

$$\alpha_{kinetic} = \frac{k_{12}}{k_{13}} \quad (5)$$

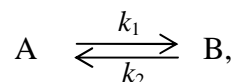
Do skupiny kinetických efektů patří frakcionace během difuze – tzv. difuzní efekt (α_{diff}). Lehké izotopy jsou obecně více pohyblivé než jejich těžké protějšky, izotopový efekt je pak poměr jejich difuzních koeficientů (D_{12}/D_{13}). Pro dva plyny v binární difuzní soustavě (jeden plyn difunduje do druhého) pak platí následující vztah:

$$\alpha_{diff} = \frac{D_{^{12}\text{CO}_2}}{D_{^{13}\text{CO}_2}} = \sqrt{\frac{m_{^{13}\text{CO}_2}}{m_{^{12}\text{CO}_2}} \cdot \left(\frac{m_{^{12}\text{CO}_2} + m_{air}}{m_{^{13}\text{CO}_2} + m_{air}} \right)}, \quad (6)$$

kde m představují molekulové hmotnosti $^{12}\text{CO}_2$ ($m = 44$), $^{13}\text{CO}_2$ ($m = 45$) a „molekuly“ vzduchu ($m_{air} = 29$). α_{diff} pro difuzi suchého vzduchu pak vychází 1,0044 (Vogel 1980), což ukazuje na to, že difuze $^{13}\text{CO}_2$ je o 4,4 ‰ pomalejší než difuze $^{12}\text{CO}_2$. Tento izotopový efekt není závislý na teplotě a je obecně nižší v kapalinách než v plynech. Difuze kapalinou totiž více závisí na objemu než na hmotnosti difundující molekuly (Farquhar a Lloyd 1993).

2.1.2.2 Termodynamický efekt

Termodynamický efekt (α_{eqbm}) se týká vratných reakcí nebo soustav o dvou fázích. Rovnovážný stav můžeme vyjádřit vztahem:



kde A a B představují odlišné chemické látky (reaktant a produkt) nebo odlišné fáze. Odvozením ze vztahu (4) dostaneme pro izotopový efekt výraz:

$$\alpha_{eqbm} = \frac{R_A}{R_B}, \quad (7)$$

Např. izotopový efekt hydratace CO₂: CO₂ + H₂O \rightleftharpoons H₂CO₃ je

$$\alpha_{eqbm} = \frac{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}(\text{CO}_2)}{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}(\text{H}_2\text{CO}_3)}. \quad (8)$$

Při 25 °C vychází hodnota α_{eqbm} na 1,011⁻¹ (Mook *et al.* 1974), z čehož se dá odvodit, že obsah ¹³C je o 11 ‰ vyšší v produktu (H₂CO₃) než v reaktantu (CO₂ rozpuštěný ve vodě). Termodynamický efekt je na rozdíl od kinetického teplotně závislý, dá se tedy očekávat teplotně závislou i frakcionace během rovnovážných katalytických reakcí (Farquhar *et al.* 1989a).

2.1.2.4 Složky izotopové frakcionace v rostlinách

Pro pochopení procesu frakcionace izotopu ¹³C v rostlinách je nutné stanovit hodnoty frakcionací v dílčích fyzikálně-chemických procesech, které přispívají k celkové hodnotě frakcionace. Procesy souvisí s fotosyntézou a jejich přehled udává **Tab. 2.** Jejich stručným vysvětlením se zabývá text dále.

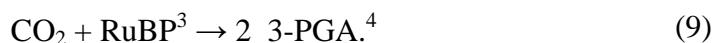
Tab. 2: Frakcionace ¹³C v procesech souvisejících s fotosyntézou. Pozitivní hodnoty frakcionace značí, že produkt je obohacen o ¹³C ve srovnání s výchozím stavem a naopak - obohacen při negativní hodnotě frakcionace. Upraveno podle O'Leary (1993).

Proces	Frakcionace (‰)
Rozpuštění CO ₂ ve vodě	1,1
Hydratace CO ₂ (na HCO ₃ ⁻)	-9,0
Difuze CO ₂ ve vzduchu (a skrz průduchy)	4,4
Difuze CO ₂ ve vodných roztocích	0,7
Samovolná hydratace CO ₂	6,9
Karboxylace enzymem PEP-karboxyláza	2,0
Karboxylace enzymem Rubisco	29,0

Podle O'Learyho (1993) vykazují difuzní procesy obecně malou izotopovou frakcionaci. Je způsobena pomalejším difuzním pohybem ¹³CO₂ oproti ¹²CO₂. Difuze CO₂ rozpuštěného ve vodě vykazuje ještě nižší frakcionaci než ve vzduchu. Nižší rozpustnost ¹³CO₂ ve vodě oproti ¹²CO₂ způsobuje frakcionaci během rozpouštění plynu a její hodnota dosahuje 1,1 ‰. Výrazné hodnoty oproti předchozím mají však

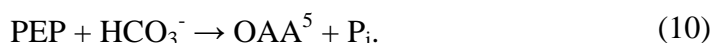
enzymatické procesy během fotosyntézy zprostředkované pomocí enzymu Rubisco¹ u C₃ rostlin a PEP-karboxylázy² u C₄ rostlin.

Studiem izotopových frakcionací spojených s enzymaticky katalyzovanými reakcemi se zabýval např. O'Leary (1989) nebo Cleland (1982, 2003). Rubisco katalyzuje první krok ve fixaci CO₂ u C₃ rostlin:



Brzy bylo zjištěno, že frakcionace způsobená tímto enzymem je zdrojem výrazné frakcionace zjištěné u C₃ rostlin. Výsledky mnoha měření ustálily hodnotu frakcionace enzymu Rubisco na 29–30 ‰.

Počáteční karboxylace u C₄ rostlin je zajišťována PEP-karboxylázou, která katalyzuje reakci:



Frakcionace při samotné enzymové karboxylaci je 2 ‰, nicméně enzym zde neváže CO₂ ale HCO₃⁻. Při hydrataci CO₂ na HCO₃⁻ dochází k frakcionaci -9 ‰, která musí být do celkové hodnoty započtena. Frakcionace při fixaci CO₂ z plynné fáze přes PEP-karboxylázu poté vychází -5,7 ‰ (O'Leary 1993). Po započtení frakcionace při difuzi CO₂ průduchy a hraniční vrstvou nad listem vychází, že C₄ rostliny jsou jen nepatrně ochuzené o ¹³C oproti substrátu (tj. CO₂ ve vzduchu).

2.1.2.5 Teorie celkové izotopové frakcionace u C₃ rostlin

Předchozí kapitoly pojednávaly o frakcionacích v dílčích procesech, které určují výslednou frakcionaci rostlin. Již Craig (1953) rozpoznal, že hlavními určujícími procesy jsou difuze (skrz průduchy) a karboxylace. Následné zjištění, že PEP-karboxyláza a Rubisco způsobují velmi odlišnou frakcionaci, dalo vznik teorii, že právě tyto rozdíly mohou být zodpovědné za rozdíly mezi C₃ a C₄ rostlinami (Whelan *et al.* 1973). Následné úpravy poté tuto myšlenku převedli do kvantitativně přijatelných forem, jak uvádí následující text.

¹ Rubisco (RuBisCO) = ribulózabisfosfátkarboxyláza/oxygenáza.

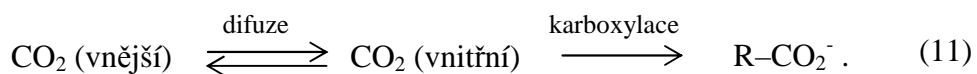
² PEP-karboxyláza (PEPc) = fosfoenolpyruvátkarboxyláza, PEP = fosfoenolpyruvát

³ RuBP = ribulózabisfosfát

⁴ 3-PGA = 3-fosfoglycerát

⁵ OAA = oxalacetát

Transport CO₂ z vnějšího prostředí až po zabudování do rostlinných sacharidů je možné znázornit pomocí následujícího schématu (O'Leary 1993):

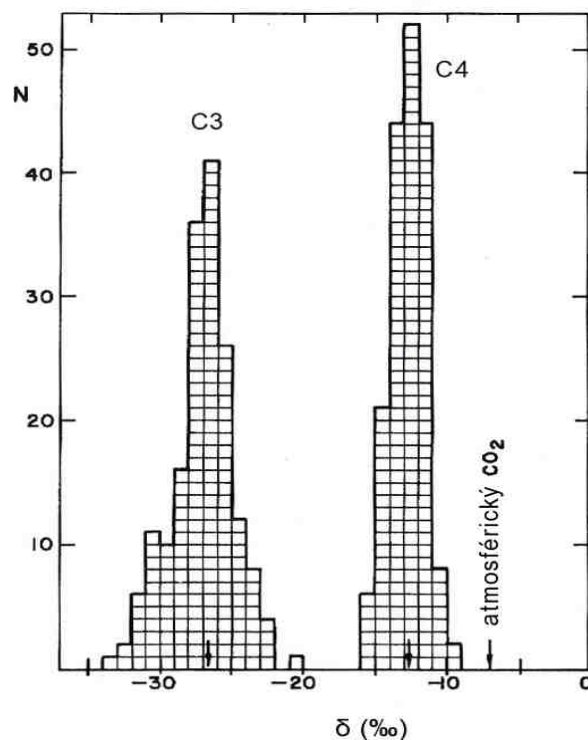


V prvním kroku CO₂ difunduje skrz průduchy do vnitřního prostoru mezofylu a buněk, ve druhém kroku je nevratně fixován v procesu karboxylace. Izotopová frakcionace spojená s difuzí je 4,4 ‰, zatímco karboxylaci u C₃ rostlin odpovídá 29 ‰, jak bylo uvedeno dříve. Berme v úvahu dva extrémní stavy. V prvním případě jsou průduchy téměř uzavřeny, celkový příjem CO₂ je limitován difuzním procesem a koncentrace CO₂ uvnitř listu je tedy nízká. Za těchto podmínek je při karboxylaci fixován veškerý dostupný uhlík a frakcionace se tedy téměř neprojeví. Její hodnota dosahuje přibližně 4,4 ‰. Celková frakcionace (ochuzení o ¹³C) vzhledem k atmosférickému CO₂ vyjádřená pomocí δ¹³C biomasy rostliny vychází pak -12 ‰ [(-8) + (-4,4)]. Na druhou stranu, pokud jsou průduchy otevřeny, dosahuje koncentrace CO₂ uvnitř listu téměř koncentrace vnější a dochází zde ke snadnému přenosu CO₂ mezi vnějším a vnitřním prostorem. V tomto případě se neprojeví difuzní frakcionace ale karboxylační. Frakcionace listu se bude blížit hodnotě -38 ‰ [(-8) + (-30)]. Podle O'Learyho (1993) se chování rostlin v praxi pohybuje někde mezi těmito dvěma extrémy.

2.1.2.6 Rozdíly mezi C₃ a C₄ rostlinami

V případě otevřených průduchů lze za využití vztahů (9) a (10) odvodit, že u C₃ a C₄ rostlin dochází k opačnému efektu frakcionace, neboť převažuje frakcionace enzymová (karboxylační), která je u obou typů rostlin odlišná. Průzkumy ukázaly, že hodnoty izotopových poměrů C₃ a C₄ rostlin spadají do dvou nepřekrývajících se kategorií (Smith a Epstein 1971).

Jeden z příkladů distribuce hodnot ukazuje **Obr. 2** na skupině trav. C₃ druhy dosahují hodnot δ¹³C mezi -22 ‰ a -34 ‰, zatímco C₄ druhy mezi -9 ‰ a -16 ‰. Tento rozdíl jasně ukazuje na odlišné metabolické dráhy. U CAM rostlin se pohybuje δ¹³C na rozmezí mezi hodnotami pro C₃ a C₄, spíše se ale v průměru blíží hodnotám C₄ (Vogel 1993).



Obr. 2: Histogram obsahu ^{13}C 351 druhů trav s čeledi *Poaceae*. Upraveno podle Vogel (1993).

2.1.3 Izotopová diskriminace

Izotopové složení vyjádřené pomocí relativního zastoupení ^{13}C vzhledem ke standardu δ , které je typické pro geologické a geochemické vědy, není pro biologické práce praktické, proto byl zaveden termín izotopová diskriminace Δ (pro ^{13}C pak $\Delta^{13}\text{C}$). Ta se definuje jako odchylka izotopového efektu od jedničky (Farquhar a Richards 1984):

$$\Delta = \alpha - 1 = \frac{R_a}{R_p} - 1 \quad (12)$$

kde R_a představuje izotopový poměr uhlíku v CO_2 vzduchu, R_p poměr v sušině rostliny. Oproti δ je Δ v případě ochuzení o ^{13}C kladná a nezávislá ani na izotopovém složení standardu ani vzduchu. Vztah mezi Δ a δ můžeme vyjádřit výrazem:

$$\Delta = \frac{\delta_a - \delta_p}{1 + \delta_p}, \quad (13)$$

kde δ_a a δ_p jsou relativní odchylky izotopového složení od standardu (viz vztah (3)) pro vzduch a sušinu rostliny. Výsledkem předchozích vztahů je malé kladné bezrozměrné

číslo, které se z praktických důvodů, stejně jako δ , násobí tisícem a vyjadřuje se jako promile ‰. Hodnoty $\Delta^{13}\text{C}$ u C_3 rostlin se běžně pohybují mezi 18 až 32 ‰ (viz dále).

Vyjadřování izotopové frakcionace pomocí Δ je výhodné i proto, že pokud chceme znát výslednou diskriminaci po sobě jdoucích procesů (v sérii), můžeme jednotlivé izotopové efekty sčítat. Pro přesný výpočet se však každý dílčí efekt musí vážit relativním rozdílem koncentrací CO_2 , který daný proces provází. Tímto způsobem se dá odhadnout výsledná diskriminace ^{13}C v C_3 rostlině (Farquhar *et al.* 1982).

Farquhar *et al.* (1982) dále provedli zjednodušení odvozené formule a publikovali prakticky použitelný vztah:

$$\Delta^{13}\text{C} = a + (b - a) \cdot \frac{c_i}{c_a}, \quad (14)$$

ve kterém je diskriminace závislá pouze na koncentraci CO_2 uvnitř listu c_i , resp. na poměru vnitřní a vnější koncentrace c_i/c_a . Konstanty a a b představují izotopové efekty difuze ($a = 4,4$ ‰) a karboxylace enzymem Rubisco ($b = 29$ ‰). Vztah byl mnohokrát ověřen a je přijímán jako platný (viz **Obr. 5A**).

Šantrůček (2010) uvádí dvě různá použití vztahu (14). Jedním může být stanovení koncentrace CO_2 uvnitř chloroplastů a odhad míry limitace vnitřních struktur listu při fixaci CO_2 . Druhé použití se týká selekce rostlin na vyšší účinnost využití vody, o kterém bude pojednávat kap. 2.2.3.3 této práce. Vztah (14) ukazuje mechanismus, jakým hodnota $\Delta^{13}\text{C}$ odráží podmínky, za kterých list roste. Za situace, kdy průduchy a další transportní dráhy v listu budou mít nekonečně velkou vodivost, bude se hodnota c_i blížit c_a . Potom se $\Delta^{13}\text{C}$ bude blížit hodnotě b (29 ‰). To může nastat v případě dostatku vody. V opačném případě, např. při chronickém stresu suchem, kdy průduchy izolují vnitřek listu od okolí, bude c_i velmi malé a $\Delta^{13}\text{C}$ se bude blížit hodnotě a (4,4 ‰). O této závislosti ale z pohledu frakcionace bylo také pojednáno v kap. 2.1.2.5.

2.2 Účinnost využití vody rostlinami

2.2.1 Historické aspekty studia účinnosti využití vody

Již od 19. stol. se objevovaly snahy porozumět vztahu mezi spotřebou vody rostlinami a jejich celkovou produkcí. Ekologové se zabývali otázkou, jak se tyto parametry liší mezi listy nebo jinými částmi rostliny. Zejména pak zkoumali, jak se ve struktuře a fyziologii rostlin odráží sezónní dostupnost vody (Ehleringer *et al.* 1993). Pionýrské práce v této oblasti publikovali např. Schimper (1908) nebo Warming (1909). Zemědělské výzkumy, jejichž hlavním cílem bylo zvýšení produkce plodin, se zaměřovaly na studium nároků širokého druhového spektra plodin na vodu. Rostliny byly pěstovány v nádobách a pečlivým měřením byly zaznamenávány jejich spotřeby vody a jejich růst (např. Briggs a Shantz 1912). Z těchto studií začínalo být jasné, že existuje značné kolísání ve vztahu mezi spotřebou vody a produkcí biomasy. Aniž by byly známy fyziologické příčiny těchto odlišností, byly rostliny rozděleny do dvou odlišných skupin (dnes označované jako C₃ a C₄ rostliny). Později bylo zjištěno, že se mohou vyskytovat význačné rozdíly ve výše uvedeném vztahu dokonce i mezi jednotlivými kultivary určitých plodin.

V dnešní době se pole fyziologických přístupů již běžně kombinuje s výsledky izotopové analýzy uhlíku, která se stala velmi vhodnou metodou ke stanovení vztahu mezi ziskem uhlíku a spotřebou vody v rostlinách (Farquhar *et al.* 1989), tedy k měření účinnosti využití vody, v literatuře zkracované obecně jako *WUE* (z anglického termínu *water-use efficiency*).

2.2.2 Využití vody rostlinou a jeho vztah k rychlosti fotosyntézy

Vztah mezi ztrátou vody a růstem suché hmoty rostliny je dán zejména společnou dráhou CO₂ a vody během fyziologických procesů. Každé otevření průduchů usnadňuje příjem nového CO₂ ale znamená také zvýšenou ztrátu vody. Naopak to platí při zavřených průduších. Zjednodušeně lze říci, že nedochází ke ztrátám vody ale ani se neasimiluje žádný nový uhlík do těla rostliny. Na úrovni listu zahrnují toky vody a uhlíku fotosyntetickou fixaci CO₂, *A*, měřenou jako množství absorbovaného CO₂, a transpiraci *E* měřenou jako množství z rostliny vypařené vody. Oba procesy můžeme kvantitativně vyjádřit v analogii s Ohmovým zákonem:

$$E = \nu \cdot g \quad (15)$$

a

$$A = (c_a - c_i) \cdot \frac{g}{1,6}, \quad (16)$$

kde ν je rozdíl tlaků vodní páry mezi listem a atmosférou dělený celkovým atmosférickým tlakem, g je difuzní vodivost pro vodní páru a konstanta 1,6 je poměr difuzní vodivosti vodní páry a CO₂ v klidném vzduchu. c_a a c_i jsou vnější atmosférická a vnitřní listová koncentrace CO₂ (Ehleringer *et al.* 1993).

Okamžitá účinnost využití vody listem WUE_i (*instantaneous water-use efficiency*) je definována jako poměr fotosyntetické fixace A a transpirace E :

$$WUE_i = \frac{A}{E} = \frac{c_a \cdot \left(1 - \frac{c_i}{c_a}\right)}{1,6 \cdot \nu}. \quad (17)$$

Ze vztahu (17) je patrné, že hlavní fyziologický parametr, na kterém WUE_i závisí, je poměr vnitřní a vnější koncentrace CO₂ c_i/c_a . Čím bude c_i menší, tím bude WUE_i vyšší.

2.2.3 Metody měření WUE

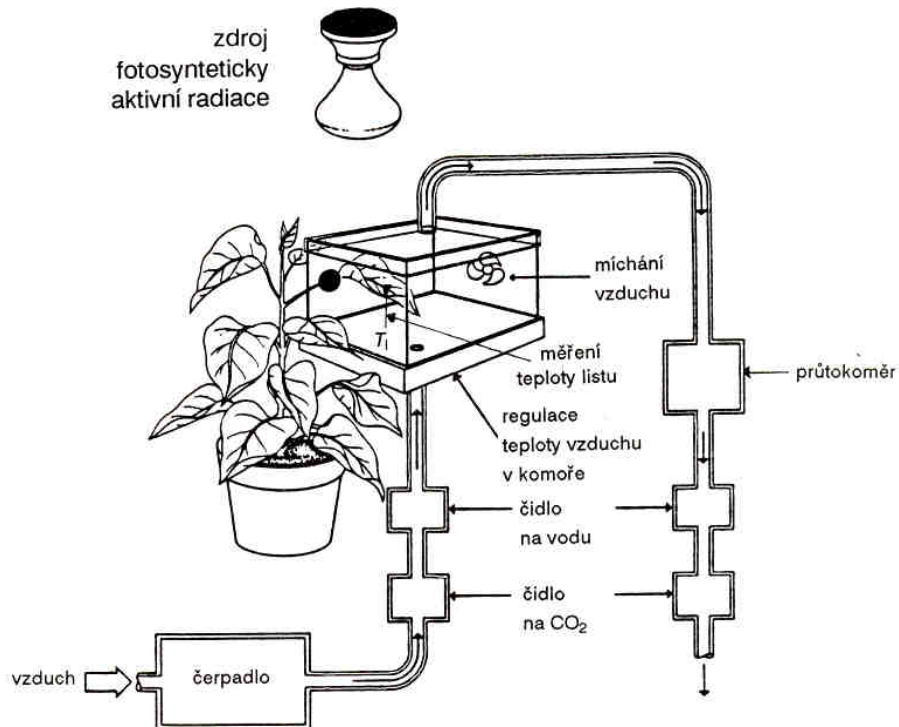
WUE lze měřit několika metodami zahrnujícími přímá i nepřímá měření. Výsledky reálné účinnosti se často liší od jednoduchého teoretického výpočtu odvozeného výše, poněvadž konkrétní hodnota WUE závisí na integraci přes čas a prostor – tj. tělo rostliny (Šantrůček 2010).

2.2.3.1 Gazometrická měření na úrovni listu

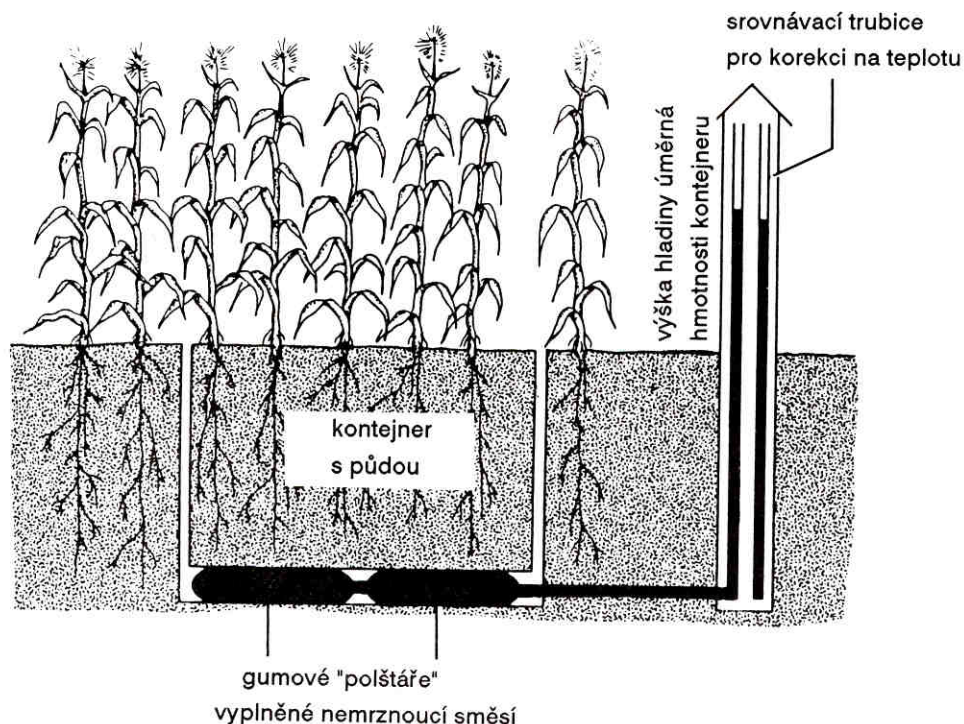
Gazometrické přístroje mohou měřit v reálném čase okamžitou účinnost využití vody WUE_i , tj. poměr fotosyntézy a transpirace A/E . Měření se dnes obvykle provádí automatizovanými přenosnými přístroji (např. Li-6400 firmy LiCor, USA). Principem jejich práce je detekce změny koncentrace CO₂ a vodní páry v proudu vzduchu kolem listu, který je hermeticky uzavřen v komoře (**Obr. 3**). Výhodou těchto přístrojů je značná automatizace, nevýhodou kromě finančních nákladů velká variabilita A i E mezi listy jedince i individuí daného druhu způsobená ontogenezí, genetickou variabilitou i proměnlivostí vnějších podmínek (Šantrůček 2010).

2.2.3.2 Měření WUE celých rostlin vážkově

Měření WUE celé rostliny se více blíží reálným podmínkám než předchozí metoda. Provádí se pomocí nádobových pokusů v polořízených (skleníky) nebo i polních podmínkách (lyzimetry). Princip měření spočívá ve zjištění celkového množství vody spotřebovaného rostlinou za celé vegetační období a celkového množství uhlíku akumulovaného v těle rostliny za stejné období. Spotřebovaná voda se obvykle zjišťuje vážením jako celkové množství záливkové vody, pokud se zamezí výparu z povrchu půdy v nádobách (např. perlitem nebo vhodným zakrytím). Nádoby se váží na vahách, kde se doplňuje záливková voda. V lyzimetrech se spotřeba vody zjišťuje jako rozdíl srážek a odtoku vody průsakem (**Obr. 4**). K výpočtu množství uhlíku fixovaného rostlinou slouží hmotnost její sušiny. Pokud se ke stanovení používá i sušina kořenů, můžou se vyskytnout komplikace s náročným vyplavováním substrátu z kořenů a nepřesnosti stanovení v důsledku ztráty jemných kořínků (Šantrůček 2010).



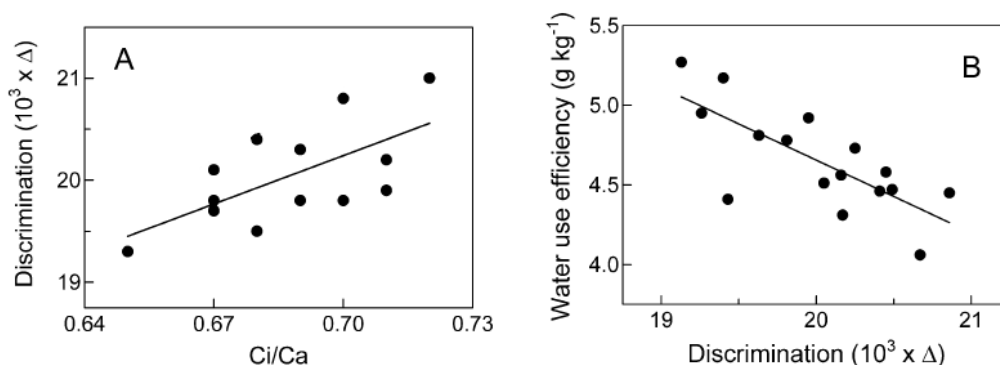
Obr. 3: Schéma otevřeného gazometrického systému pro měření rychlosti transpirace a rychlosti asimilace CO₂. Převzato z Procházka *et al.* (1998).



Obr. 4: Princip měření (evapo)transpirace lyzimetrem. Převzato z Procházka *et al.* (1998).

2.2.3.3 Měření *WUE* pomocí izotopové diskriminace uhlíku

Předchozí přímé metody měření *WUE* jsou v praxi velmi komplikované a výsledky jsou někdy značně variabilní. Farquhar a Richards (1982 a 1984) proto navrhli zástupnou veličinu, vhodnou pro stanovení *WUE* u velkého množství rostlin. Touto veličinou je diskriminace těžkého izotopu uhlíku ^{13}C při fotosyntéze rostlin (viz dříve). Na základě vztahů (14) a (17) usoudili, že $\Delta^{13}\text{C}$ v sušině rostlin by měla korelovat s okamžitou účinností využití vody WUE_i . Zásadní částí obou vztahů je totiž poměr vnitřní a vnější koncentrace CO_2 c_i/c_a . Diskriminace $\Delta^{13}\text{C}$ je přímo úměrná tomuto poměru, zatímco WUE_i je úměrná nepřímo. Z toho se dá vyvodit, že $\Delta^{13}\text{C}$ a WUE_i by měly být také nepřímo úměrné. Tato hypotéza byla ověřována množstvím experimentů a mezi výsledky převládají takové, které nepřímo úměrný vztah $\Delta^{13}\text{C}$ a WUE_i potvrzují (např. Condon *et al.* 2004, Laza *et al.* 2006, Morison *et al.* 2009). Jeden z příkladů ukazuje **Obr. 5B**. Nahrazení složitého měření *WUE* hodnotou diskriminace $\Delta^{13}\text{C}$ je lákavé i proto, že izotopový signál biomasy se integruje po celou dobu života rostliny. Odpadá tak nepříjemný efekt variability hodnot WUE_i . Vzorky sušiny je navíc možno prakticky neomezeně dlouho skladovat pro pozdější analýzy (Šantrůček 2010).



Obr. 5: (A) Vztah mezi poměrem vnitřní (Ci) a vnější (Ca) koncentrace CO₂ měřeným gazometricky na listu pšenice a izotopovou diskriminací ¹³C (‰) v sušině klasu. (B) Vztah mezi diskriminací ¹³C (‰) a účinností vody, vyjádřené v g sušiny vyprodukované na 1 kg spotřebované vody. Upraveno podle Condon *et al.* (2004).

2.2.4 Fyziologická versus agronomická účinnost využití vody

Předchozí pojednání se většinou týkalo účinnosti využití vody ve smyslu okamžité účinnosti vody WUE_i na úrovni listu. Pro agronomy je však daleko důležitější celkový výnos sklizené plodiny dosažený z vody dostupné ze srážek a/nebo zavlažování. Poměr výnosu hospodářsky užitečné části rostliny k celkovému množství dostupné vody pro rostliny se označuje jako agronomická účinnost využití vody, která je v podstatě konečným cílem šlechtitelských programů. Základním parametrem je výnos (Y):

$$Y = ET \cdot WUE_i \cdot HI \cdot \frac{T}{ET}, \quad (18)$$

kde ET značí transpiraci dohromady s výparem z půdy (evapotranspiraci), poměr T/ET značí podíl vody, která skutečně projde rostlinou (T , transpirace) k celkové vodě vypařené z porostu a HI označuje tzv. sklizňový index (*harvest index*), tj. podíl sušiny zrna na celkové suché hmotě celé rostliny (Condon *et al.* 2004).

Ze vztahu (18) lze tedy odvodit, že WUE_i je jen jednou složkou, která rozhoduje o agronomické účinnosti využití vody.

2.2.5 Vyšší účinnost může provázet nižší výnos

V pokusech se často ukazuje, že zvýšená WUE na úrovni listu nebo rostliny se neprojevuje vyšší produkcí biomasy nebo výnosu zrna na úrovni celého porostu plodiny (např. Misra *et al.* 2010, Volta *et al.* 1999). Neboli vyšší výnos často poskytují genotypy s nižší WUE_i .

Jednu z příčin této obrácené korelace u pšenice a trav popisuje Šantrůček (2010) jako určité „konzervativní“ chování rostlin. Při nízkém poměru c_i/c_a a tedy vysoké WUE indikované malou hodnotou $\Delta^{13}C$, rostliny rostou méně i tehdy (a právě tehdy), když jsou dobře zásobené vodou. To je způsobeno zachováním nízké vodivosti průduchů (a tedy nízké c_i) i přes dostatek vody.

Pozitivní korelace mezi $\Delta^{13}C$ a výnosem zrna (a negativní mezi WUE_i a výnosem) se v některých případech dá vysvětlit i fenologickými fázemi vývoje rostliny. Některé rostliny s vyšší hodnotou $\Delta^{13}C$ mají rychlý růst na začátku vegetace, což vede k rychlému zastínění povrchu půdy a tím i omezení výparu. Mění se tak poměr vody T/ET ze vztahu (18) a dochází k maskování vlivu WUE_i na výnos (Šantrůček 2010).

Projev vyšší WUE na výnos je také závislý na typu klimatu, zejm. rozdělení srážek. Ukazuje se, že např. středomořský typ klimatu činí použití metody diskriminace $\Delta^{13}C$ problematickým (Volta *et al.* 1999).

2.2.6 Vyšší účinnost spojená s vyšším výnosem a příklady úspěšného šlechtění

Ukazuje se, že metoda izotopové diskriminace nachází uplatnění hlavně u plodin suchých oblastí, v menší míře i u oblastí dobře zásobených vodou. Následují příklady vybraných experimentů.

Stiller *et al.* (2005) našli významné rozdíly v obsahu ^{13}C mezi kultivary bavlníku pěstovanými v Austrálii a Texasu. Lambrides *et al.* (2004) testovali genotypy slunečnice (*Helianthus sp.*) a našli mezi WUE_i a $\Delta^{13}C$ významnou negativní korelaci. Misra *et al.* (2010) prováděli experimenty v Indii s 20 odrůdami pšenice ve třech vodních režimech (plné zavlažování, částečné, zbytková vlhkost půdy). Výsledky ukázaly významné korelace mezi výnosem zrna a $\Delta^{13}C$ lišících se však v závislosti na vodním režimu. Poukázaly tedy na to, že korelace je velmi závislá na podmínkách

prostředí rostlin, ale že $\Delta^{13}\text{C}$ může být použita jako nepřímé výběrové kritérium pro výnos zrna.

Podařilo se mimo jiné nalézt i přímo úměrný vztah mezi $\Delta^{13}\text{C}$ a výnosem rýže (Laza *et al.* 2006). Zde dokonce výnos sklizně koreloval s izotopovou diskriminací těsněji než s WUE_i .

Příkladem úspěšného šlechtění pomocí námi probírané metody může být nasazení dvou nových odrůd pšenice v oblastech severovýchodní Austrálie. V roce 2002 a 2003 byly pro komerční pěstování uvolněny odrůdy Drysdale a Rees. Výnosy odrůdy Drysdale se testovaly na několika lokalitách a srovnávaly se s výnosy dosud pěstovaných odrůd. Až na jednu výjimku převyšovala Drysdale dosavadní průměry výnosů o 7–47 % (Condon *et al.* 2004).

2.2.7 Dědičnost WUE

Pro praktickou použitelnost izotopové metody ke šlechtění rostlin na vyšší WUE je třeba znát geny zodpovědné nebo výrazně podporující tuto vlastnost. V současné době se již objevují výsledky, které dávají naději na identifikaci a lokalizaci příslušných rodin genů.

WUE a diskriminace $\Delta^{13}\text{C}$ je jev závislý na expresi mnoha genů. Přesto se zdá, že má vysokou dědivost. Masle *et al.* (2005) oznámili lokalizaci lokusu kvantitativně dědičné WUE (QTL, *quantitative trait locus*) na chromozomu 2 *Arabidopsis thaliana*, který byl zodpovědný za 21–64 % variability v hodnotách $\Delta^{13}\text{C}$. Tento lokus zahrnuje asi 37 genů, přičemž centrální je gen *ERECTA* při jehož mutaci bylo zjištěno zvýšení hodnot $\Delta^{13}\text{C}$ i WUE_i . Zatím se zdá, že jde o první objevený gen, který ovlivňuje a koordinuje rychlost fotosyntézy s rychlostí transpirace. Je nadějně, že další analýzy a manipulace s tímto genem mohou být prospěšné k zvyšování WUE (Morison *et al.* 2009, Šantrůček 2010).

3 Cíle práce

Prvním hlavním cílem mé práce bylo zjistit, zda existuje korelace mezi účinností využívání vody (*WUE*) a hodnotou diskriminace izotopu uhlíku ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$) u vybraných druhů obilnin.

Druhým cílem, který měl podklad v předchozím zjištění, bylo vybrat z daného sortimentu obilnin vhodné odrůdy, které nejúčinněji využívají vodu a doporučit je pro další šlechtitelské postupy.

Základní dílčí kroky pro řešení úkolů byly stanoveny následovně:

1. Připravit vhodné substráty a nádoby pro růst rostlin ve dvou odlišných podmínkách zavlažování.
2. Vypěstovat rostliny při kontrastním zásobení vodou (hojně zavlažované a suchem stresované) a zjistit *WUE*.
3. Odebrat rostlinný materiál zvláště nadzemní a podzemní část, vhodně jej zpracovat pro izotopová a další přidružená měření.
4. Provést jednotlivá měření a izotopovou analýzu ^{13}C .
5. Vyhodnotit zjištěná data.
6. Srovnat vlastní výsledky s výsledky jiných autorů.

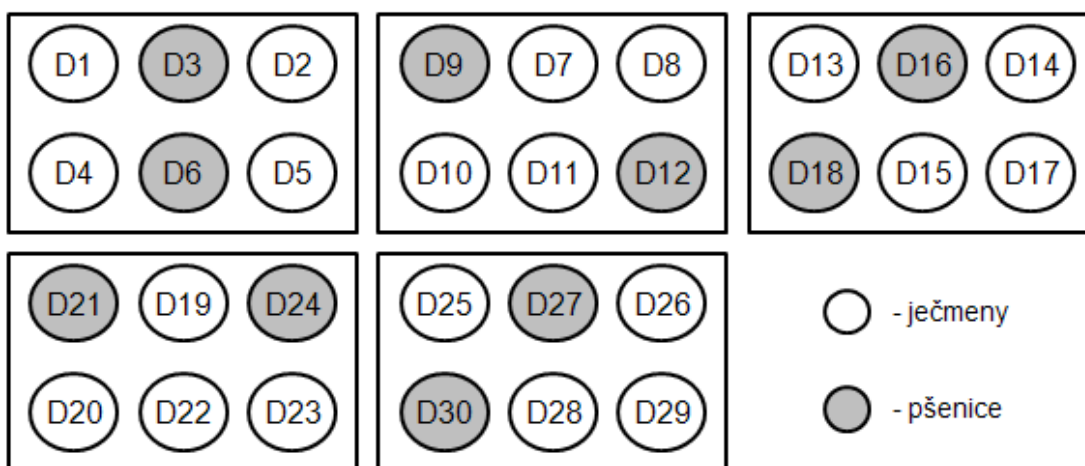
4 Metodika a materiál

4.2 Rostliny a podmínky pěstování

Pro práci byly vybrány dvě odrůdy ozimé pšenice (*Triticum aestivum* – cv. Alacris, Etela) a čtyři odrůdy dvou druhů jarního ječmene (*Hordeum vulgare* – cv. Jersey, Malz a *Hordeum spontaneum* – cv. Er, Tadmor). Osivo jsme získali ze semenné banky MZLU Brno.

Polovina jedinců zkoumaných rostlin všech druhů a odrůd byla vystavena vodnímu stresu (dále v textu jsou tyto vzorky označovány jako *D*, *dry*), druhá polovina vzorků byla hojně zavlažovaná (označení *W*, *wet*). Na základě předběžného měření maximálního nasycení substrátu vodou (plné vodní kapacity půdy, PVK) jsme připravili dvě odlišně vodou zásobené varianty zahradnického substrátu: *D* s 30 % PVK a *W* s 80 % PVK. Od začátku klíčení rostlin byla vlhkost substrátů udržována na hodnotách nasycenosti pomocí vážení jednotlivých kultivačních nádob a dolévání přesného množství vody do původních hmotností. Množství závlakové vody jsem zaznamenával. U nádob *D* jsem provedl úvodní závlaku, která dočasně zvýšila povrchovou vlhkost půdy nad určenou hodnotu 30 % pro lepší vyklíčení rostlin. Přihnojení jsem provedl jednou v polovině doby růstu u všech vzorků komplexním minerálním hnojivem (Kristalon Start, NU3 BV Vlaardingen, Netherlands).

Nádoby pro rostliny jsem zhotovil z PET lahví (objem 1,5 l), které byly vhodně zaříznuty, umyty, naplněny půdou a opatřeny pokrývkou z igelitu proti výparu vody z půdy. Všechny nádoby jsem během růstu rostlin umístil po šesti kusech do krabic pro omezení působení světla na substrát a tím zamezení výraznějšího růstu řas. V každé nádobě byly zanechány 4 zdravé rostliny jedné odrůdy, pěstování probíhalo v 5 opakováních od každé ze šesti odrůd ve variantě *D* i *W*. Celkový počet lahví byl tedy 60 (30 + 30). Výchozí uspořádání, zobrazené na **Obr. 7**, mělo náhodný charakter a během trvání pokusu se toto uspořádání měnilo. Pozice nádob v jednotlivých krabicích jsem náhodně měnil a celé krabice *D* a *W* variant jsem prohazoval, aby se eliminoval vliv případné nerovnoměrnosti v ozáření. Nádoby byly na počátku neprodyšně zakryty igelitovou fólií, která dokonale zabraňovala výparu z povrchu půdy. Jakmile fólie začínala bránit přirozenému růstu rostlin, prostříhl jsem v ní otvory minimální velikosti pro jednotlivé rostliny (viz Přílohy – **Obr. P1, P2, P3**).



Obr. 7: Schéma výchozího uspořádání nádob s rostlinami. Ovál označuje PET-lahve s půdou a rostlinami, čtverec krabice (5 opakování sad 6 zkoumaných odrůd). *D* označuje variantu s 30 % PVK, *W* varianty (80 % PVK) byly uspořádány analogicky s *D* variantami a místně na ně navazovaly.

Pěstování probíhalo po celou dobu ve skleníku (PřF JU na terase budovy B) s částečně řízenou teplotou (18–28 °C) a relativní vzdušnou vlhkostí 50–70 % od poloviny dubna do poloviny května. Pro pozdější výpočty bylo uvažováno 28 dní nadzemního růstu rostlin. Sklizeň proběhla ve stádiu zakládání klasů.

4.3 Měření, sklizeň a zpracování rostlinného materiálu

4.3.1 Termovize listů

Těsně před sklizní jsme orientačně nasníмали teploty listů v několika částech porostu variant *W* i *D* pomocí IR kamery (FLIR P660). Výsledky byly zpracovány softwarem Therma CAM Reporter 8 Professional.

4.3.2 Stanovení suché hmoty prýtů, příprava vzorků pro izotopovou analýzu

Nadzemní části rostlin (prýty) jsem oddělil těsně nad povrchem půdy. Biomasu prýtů z každé nádoby jsem odděleně vložil do označeného papírového sáčku, usušil v elektrické sušárně při teplotě 80 °C do konstantní hmotnosti, zvážil a rozemlel ji. Mletí probíhalo nejprve nahrubo v kuchyňském mixéru (Kenwood 10H22, Turecko), poté najemno v kulovém mlýnku (Retsch MM200, Německo). Namletý materiál jsem

navázil na mikrováhách (MT 5, Mettler Toledo, Switzerland), zabalil do cínových kapslí a dodal k izotopové analýze.

4.3.3 Stanovení hustoty průduchů

Na všech rostlinách odrůd Tadmor a Malz jsem zhotovil otisky spodní i svrchní listové pokožky pomocí běžného transparentního laku na nehty. Lakové otisky pokožky jsem použil pro stanovení hustoty průduchů. Počítal jsem počet průduchů na ploše listu zobrazené v zorném poli mikroskopu (Olympus BX61, Japonsko) při 500-násobném zvětšení (cca 0,127 mm²) a vyfotografované fotoaparátem (Canon EOS 1000D, Japonsko). Výsledky jsem přepočítal na 1 mm² listové plochy (viz Přílohy – **Obr. P4**).

4.3.4 Stanovení suché hmoty kořenů, příprava vzorků pro izotopovou analýzu

Kořenový systém ze všech nádob jsem zbavil půdy vyplavováním vodou. Délku a plochu kořenů jsem změřil u odrůdy Tadmor a Malz v obou variantách pomocí analyzátoru obrazu (Delta T Image Analyser, UK). Kořeny byly poté zpracovány stejným způsobem jako nadzemní části a dodány pro izotopovou analýzu.

4.3.4 Izotopová analýza sušiny rostlin

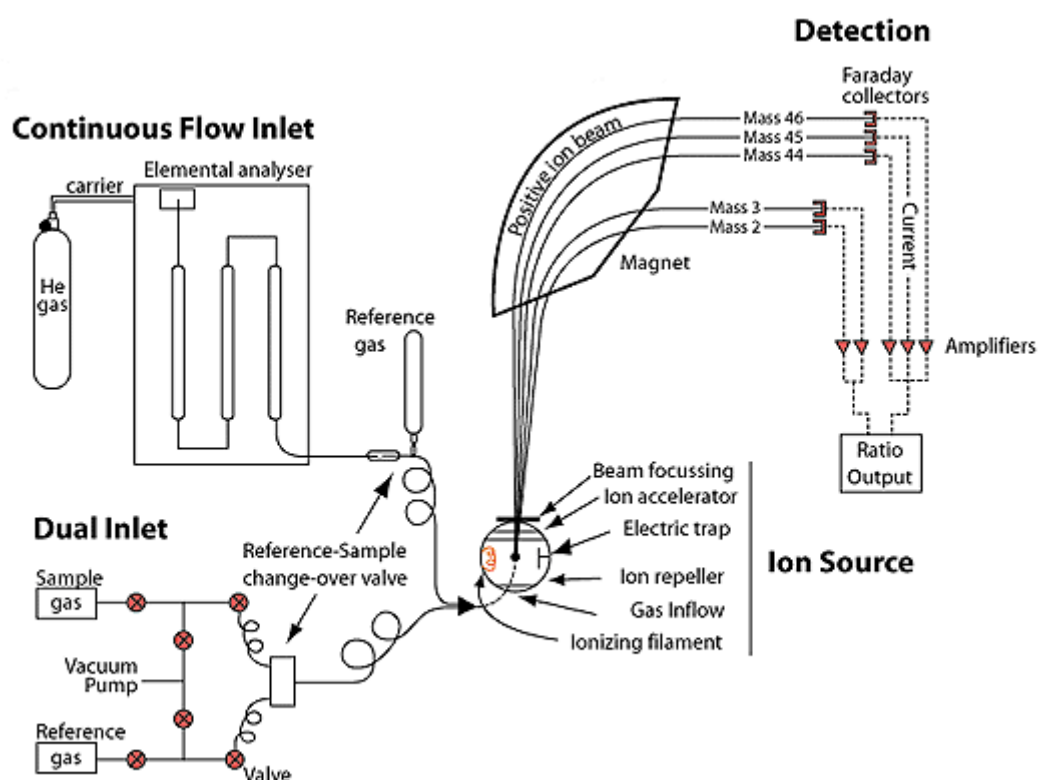
Hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ v sušině rostlin byly stanoveny izotopovým poměrovým hmotnostním spektrometrem (IRMS) Delta^{plus} XL (Thermo Finnigan, Německo), s periferiemi Conflow (Thermo Finnigan, Německo) a prvkovým analyzátozem NC 2100 (Thermo Quest, Rodano, Itálie). Schéma měření pomocí IRMS je na **Obr. 8**. Stanovení bylo provedeno u všech vzorků sušin nadzemní části i sušin kořenů, tj. celkem u 120 vzorků. Hodnoty izotopového poměru $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ měřeného vzorku (R_A) byly vztaženy ke standardu PDB (R_S), vyjádřeny jako $\delta^{13}\text{C}$ pomocí vztahu (3):

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{R_A}{R_S} - 1,$$

a přepočteny na hodnoty diskriminace $\Delta^{13}\text{C}$ podle vztahu (13):

$$\Delta = \frac{\delta_a - \delta_p}{1 + \delta_p},$$

kde δ_a δ_p jsou relativní odchylky izotopového složení od standardu (viz vztah (3)) pro vzduch a sušinu rostliny. Hodnota δ_a byla převzata z podobné práce (Kubásek 2004) a na základě téměř stejných atmosférických podmínek měření stanovena na -8,53 ‰.



Obr. 8: Schéma izotopového poměrového hmotnostního spektrometru (IRMS) navrženého v roce 1947 Alfredem Nierem. Upraveno podle Sulzman (2007).

4.4 Zpracování výsledků

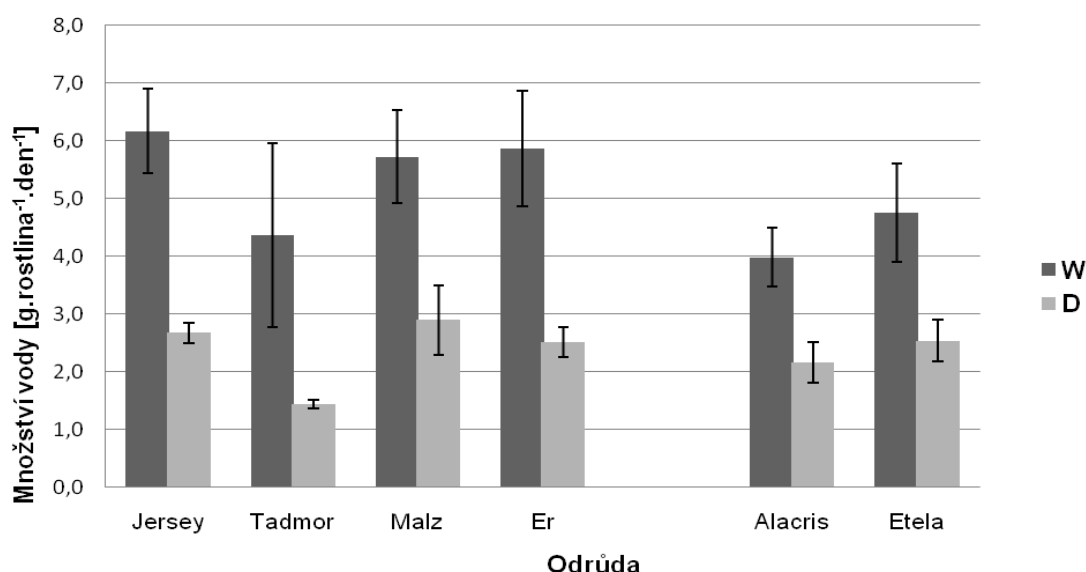
Hodnoty pro jednotlivé odrůdy byly stanoveny jako průměrné ze všech pěti opakování, a to zvláště ještě pro variantu *W* i *D*. Data pro hodnocení spotřeby vody byly přepočteny z celkové spotřeby nádoby (obsahující 4 rostliny) na 1 rostlinu.

Matematické a statistické zhodnocení dat bylo provedeno pomocí programů MS Excel 2007 a STATISTICA Cz 9.1.

5 Výsledky

5.1 Spotřeba vody

Měřil jsem spotřebu vody jednotlivými odrůdami po dobu 28 dní. Jedná se o dobu od vyklíčení prvních výhonků až po sklizeň rostliny. Hodnoty pro jednotlivé odrůdy v zavlažované (*W*) a suchem stresované (*D*) variantě znázorňuje **Obr. 8**.



Obr. 8: Porovnání množství vody spotřebované jednotlivými rostlinami daných odrůd za den u hojně zavlažovaných (*W*) a suchem stresovaných variant (*D*). Sloupce znázorňují průměrné hodnoty a úsečky \pm směrodatné odchylky (*SD*), $n = 5$.

Naměřené hodnoty ukazují výrazné rozdíly mezi rychlostí spotřeby vody (převážně transpirací) v rámci odrůd i variant *W* a *D*. Tadmor vykazuje nejnižší rychlost transpirace mezi ječmeny, v průměru $4,4 \pm 1,59$ ml vody na rostlinu a den ve variantě *W* a $1,4 \pm 0,07$ ml ve variantě *D*, a největší odpověď na suchu. Poměr *W* a *D* je více než trojnásobný (3,14). Nejmenší poměr mezi spotřebami dosahuje pšenice Alacris (1,81).

5.2 Termovize listů

Pomocí IR kamery byl nasnímán pohled ze shora na pěstované rostliny s cílem ověřit předpoklad, že existují změny v povrchových teplotách rostlin *W* a *D* variant. Ty

by měly být dány rozdílným výparem vody z povrchu listů (rychlostí transpirace) umožněným rozdíly v zavlažování a tedy i v hospodaření s vodou (**Obr. 9**).

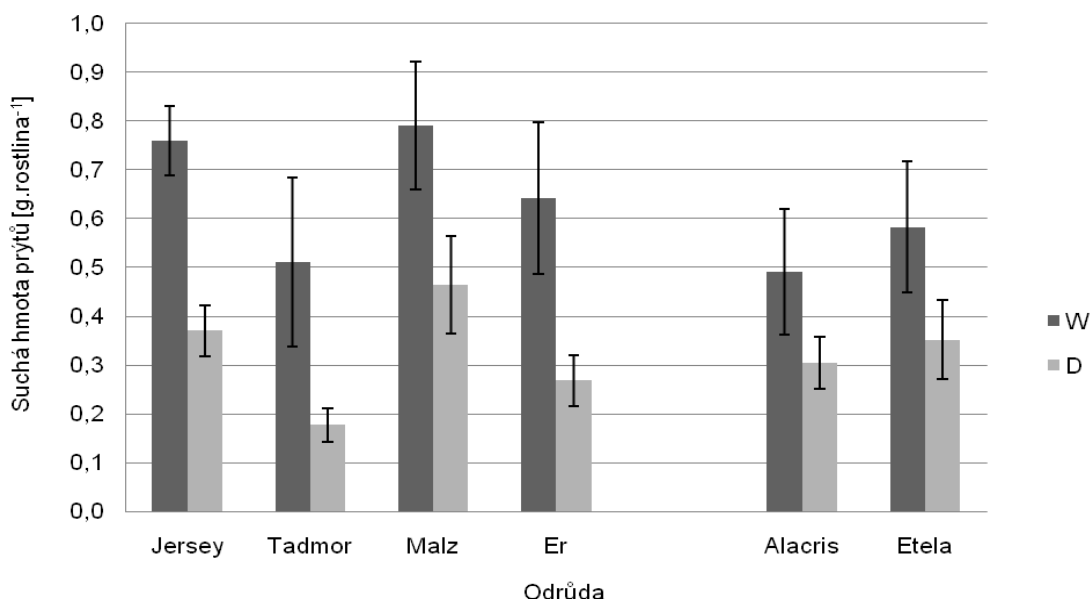


Obr. 9: Snímek pěstovaných rostlin pořízený IR kamerou. Pravá část obsahuje rostliny *W* variant, levá *D* variant. Zabarvení odpovídá povrchové teplotě listů podle stupnice v pravé části snímku.

Podle snímku z IR kamery lze jednoznačně poukázat na rozdílné teploty povrchu listů. U *W* variant se tato teplota pohybuje v rozmezí 16–17 °C, naproti tomu u *D* variant dosahuje teplota hodnot 18–19,5 °C, což je o 2–2,5 °C více. Průměrné hodnoty nelze z měření stanovit vzhledem k omezenému výřezu rostlin na fotografii.

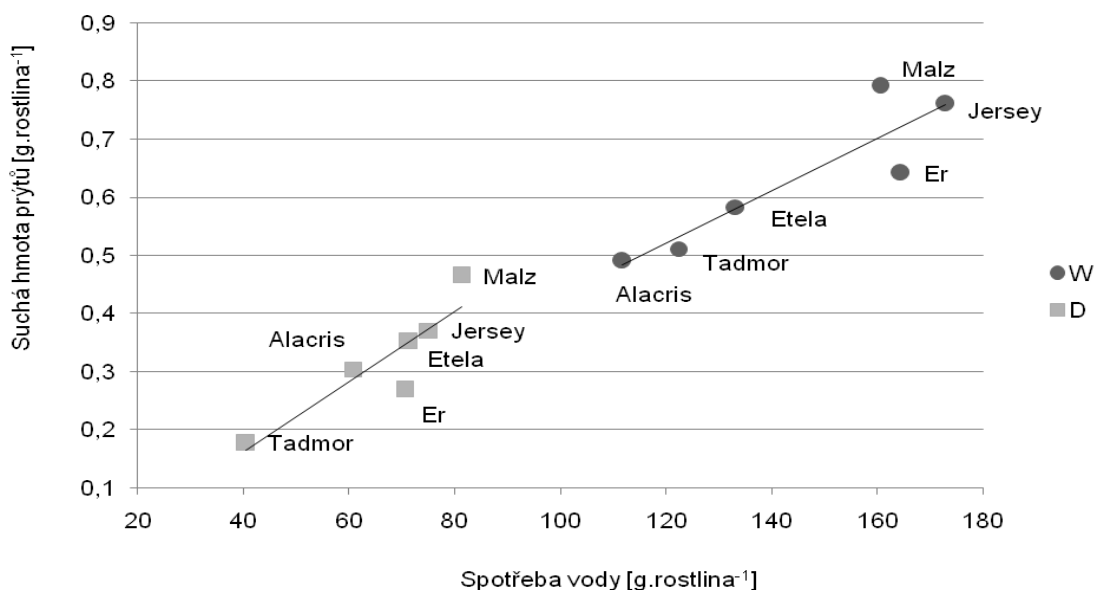
5.3 Hmotnost suché hmoty prýtů

U každé rostliny jsem stanovil hmotnost nadzemní části (prýtu) po dokonalém vysušení. Hmotnosti byly porovnány mezi odrůdami i mezi variantami (**Obr. 9**).



Obr. 9: Porovnání hmotností suché hmoty prýtů jednotlivých rostlin daných odrůd u varianty *W* a *D*. Průměry ± SD (n = 5).

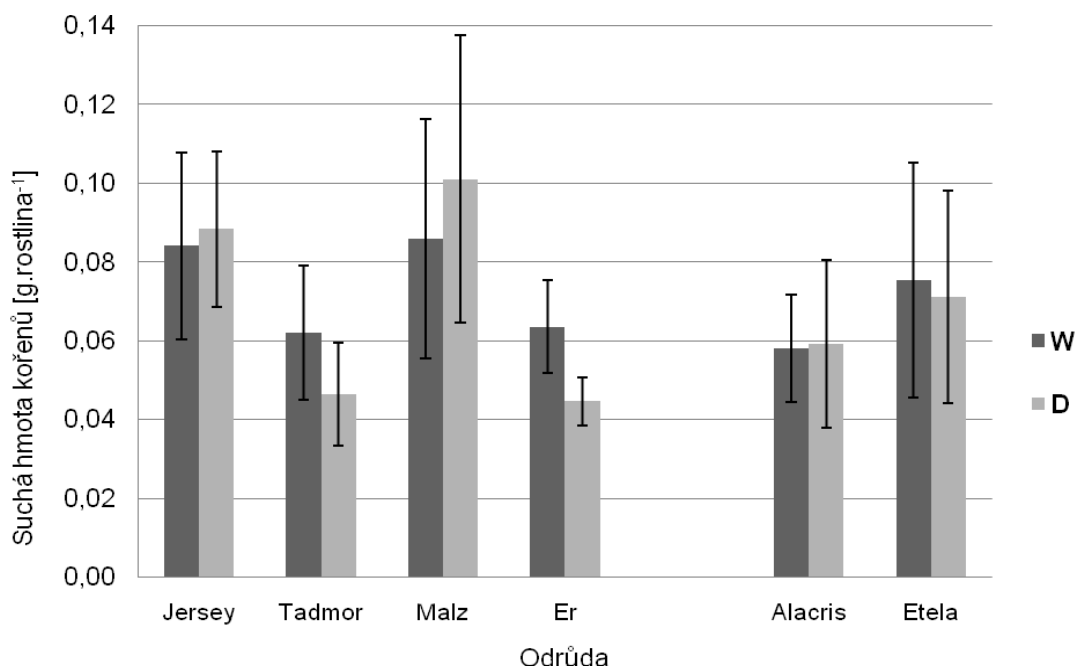
Změny v hmotnosti sušiny prýtů mezi odrůdami víceméně odpovídají změnám v rychlosti transpirace jednotlivých odrůd (**Obr. 10**). Dominuje zde ječmen *Malz* s hodnotami $0,79 \pm 0,131$ g ve variantě *W* a $0,46 \pm 0,1$ g v *D*.



Obr. 10: Korelace průměrné hmotnosti suché hmoty prýtů jedné rostliny dané odrůdy na kumulativní spotřebě vody za celé období pěstování (28 dní). Symboly znázorňují průměrné hodnoty, přímky lineární regresi.

5.4 Hmotnost suché hmoty kořenů

Obdobným způsobem jako u prýtů jsem změřil hmotnost suché hmoty kořenů všech rostlin (**Obr. 11**).



Obr. 11: Porovnání hmotností suché hmoty kořenů jednotlivých rostlin daných odrůd u varianty W a D. Průměry \pm SD (n = 5).

Tab. 3: Poměr hmotností suché hmoty kořenů ke hmotnosti suché hmoty prýtů. $M_{(prýt)}$ = průměrná hmotnost suché hmoty prýtů na jednu rostlinu v dané odrůdě (g). $M_{(kořen)}$ = průměrná hmotnost suché hmoty kořenů na jednu rostlinu v dané odrůdě (g).

Odrůda	W			D			
	$M_{(prýt)}$	$M_{(kořen)}$	$M_{(kořen)}/M_{(prýt)}$	$M_{(prýt)}$	$M_{(kořen)}$	$M_{(kořen)}/M_{(prýt)}$	
ječmen	Jersey	0,760	0,084	0,111	0,370	0,088	0,238
	Tadmor	0,511	0,062	0,121	0,177	0,046	0,261
	Malz	0,791	0,086	0,109	0,465	0,101	0,217
	Er	0,641	0,064	0,099	0,269	0,045	0,166
pšenice	Alacris	0,491	0,058	0,118	0,304	0,059	0,194
	Etela	0,583	0,075	0,129	0,352	0,071	0,202
		<i>průměr:</i>	<i>0,114</i>		<i>průměr:</i>	<i>0,213</i>	

Porovnáním hmotností suché hmoty kořenů dostáváme zajímavé zjištění, že u některých odrůd převyšuje hmotnost stresovaných nad hmotností hojně zavlažovaných variant. Tento rozdíl je výrazný u odrůdy Malz (o 17 %), menší potom u Jersey (o 4,8 %) a Alacris (o 1,7 %).

Obecně lze říci, že podíl hmotnosti suché hmoty kořenů ke hmotnosti prýtlů je větší u stresovaných variant *D* než u hojně zavlažovaných *W* (**Tab. 3**). Podíl dosahuje u *W* variant všech odrůd průměrné hodnoty 0,114; u *D* pak 0,213.

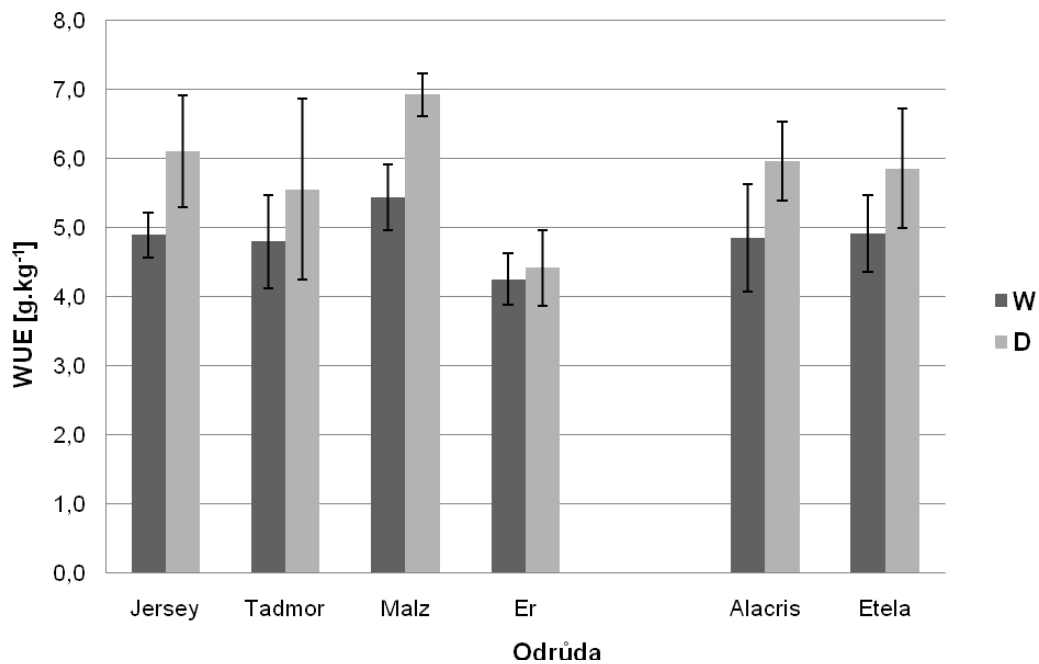
5.5 Účinnost využití vody

Účinnost využití vody (*WUE*) byla počítána jako podíl hmotnosti suché hmoty celé rostliny (součet hmoty kořenů a prýtlů) k celkové spotřebě vody rostlinou. Výsledná hodnota je průměr z individuálních hodnot *WUE* pro jednotlivá měření každé nádoby. Výsledky jsou zobrazeny v **Tab. 4** a na **Obr. 12**.

Tab. 4: Účinnost využití vody (*WUE*) jednotlivými odrůdami uvedená v g (sušiny) · kg⁻¹ (vody); n = 5. Δ_{WUE} = rozdíl *WUE* u *D* a *W* variant přepočtený na procenta vůči hodnotě *W* variant, tj. relativní zvýšení (kladné číslo) nebo snížení (záporné) *WUE* u suché varianty. SD – směrodatné odchylky průměrů.

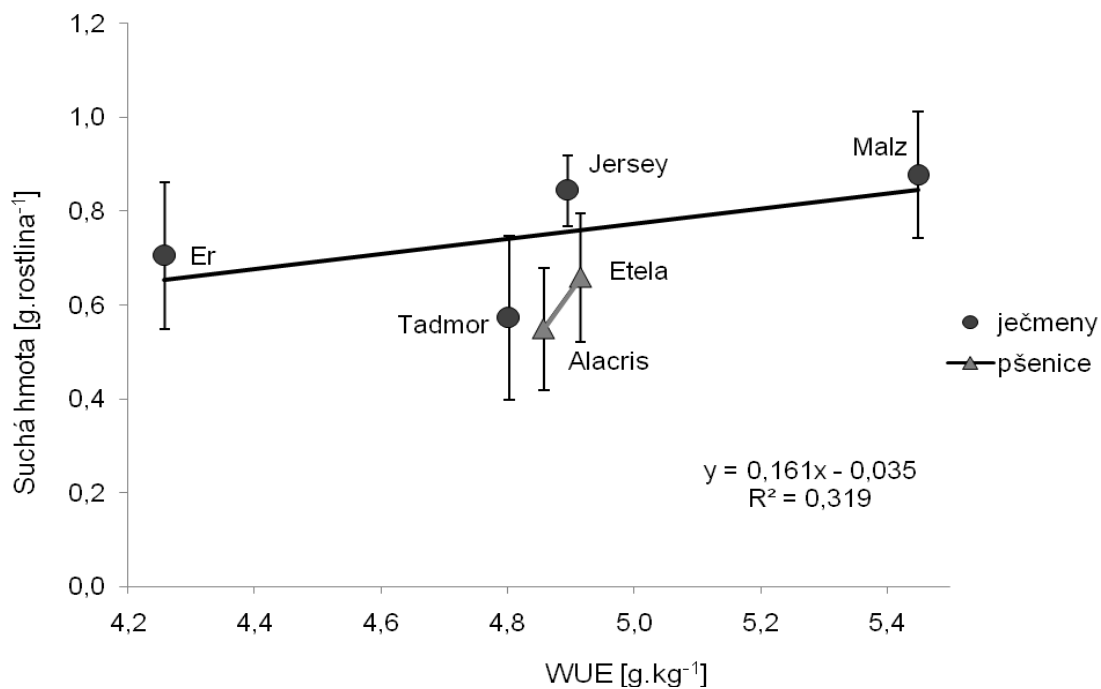
Odrůda	W		D		Δ_{WUE}	
	WUE	SD	WUE	SD		
ječmen	Jersey	4,895	0,322	6,111	0,810	24,8 %
	Tadmor	4,803	0,678	5,557	1,312	15,7 %
	Malz	5,449	0,476	6,930	0,307	27,2 %
	Er	4,259	0,376	4,419	0,550	3,8 %
pšenice	Alacris	4,858	0,776	5,970	0,574	22,9 %
	Etela	4,916	0,558	5,861	0,861	19,2 %

Rostliny stresované suchem vykazují prokazatelně ($t_{(10)} = -2.56$, $p = 0.028$) vyšší hodnoty *WUE* než rostliny hojně zavlažované. Nejvyšší účinnosti dosahuje odrůda Malz (6,930 g·kg⁻¹ ve variantě *D*), Tato odrůda také nejcitlivěji reaguje na sucho, které zvýšilo účinnost využití vody o 27,2 % (**Obr. 12**). Ve variantách *W* nejsou průkazné rozdíly mezi odrůdami ($F_{5,24} = 2.330$, $p = 0.074$), ve variantách *D* jsou rozdíly průkazné ($F_{5,24} = 5.262$, $p = 0.002$).

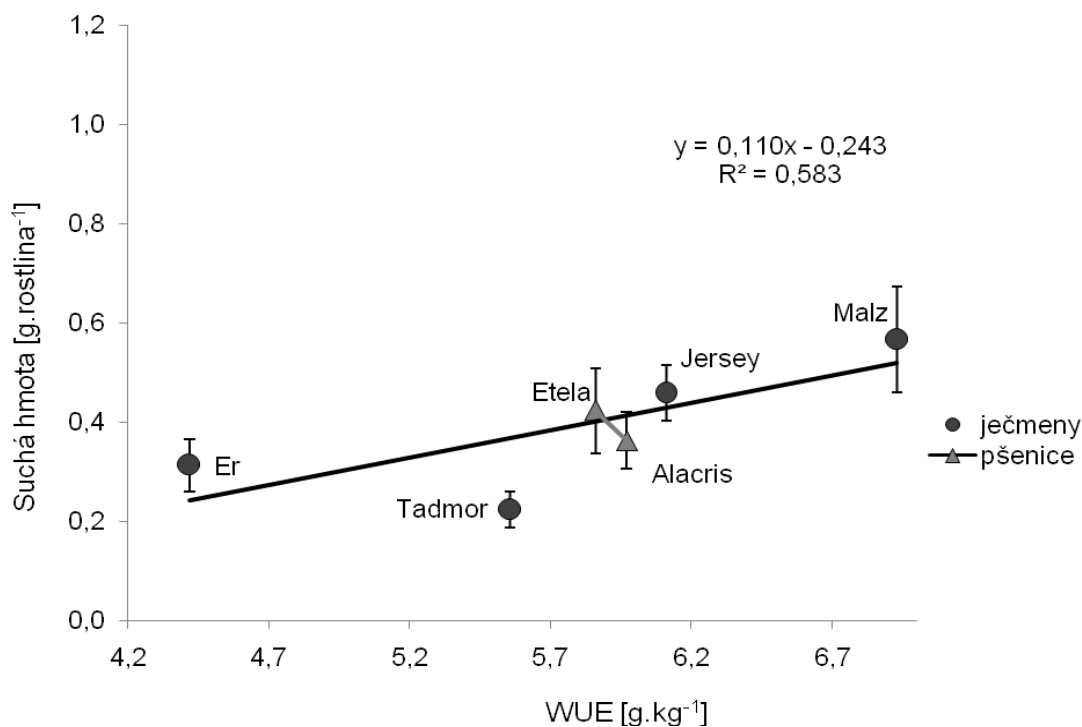


Obr. 12: Porovnání účinnosti využití vody (*WUE*) jednotlivých odrůd u varianty *W* a *D*.
Průměry ± SD (n = 5).

Dále byly porovnány korelace mezi *WUE* a celkovou suchou hmotou rostlin (**Obr. 13** a **Obr. 14**).



Obr. 13: Korelace celkové suché hmoty s účinností využití vody celou rostlinou (*WUE*) u jednotlivých odrůd *W* variant. Průměry ± SD (n = 5). Regresní přímka byla vypočtena jen pro ječmeny.



Obr. 14: Korelace celkové suché hmoty s účinností využití vody celou rostlinou (*WUE*) u jednotlivých odrůd *D* variant. Průměry ± SD (n = 5). Regresní přímka byla vypočtena jen pro ječmeny.

5.6 Délka a plocha kořenového systému

Délka a plocha kořenového systému byla změřena pouze u odrůd Tadmor a Malz protože jsem u nich očekával výrazné rozdíly v důsledku jejich odlišné adaptace k podmínkám prostředí a jejich odlišnému genotypu (Tadmor je severoafrická odrůda adaptovaná vůči suchu, Malz kulturní česká odrůda, k suchu také relativně odolná). Od každé odrůdy byla vybrána pouze jedna reprezentativní rostlina od obou variant závlahy, jedná se tedy jen o orientační stanovení. Výsledky ukazují na jednoznačně vyšší hodnoty u variant *D* u obou odrůd. Rozdíl je patrnější u odrůdy Malz, kde jsou hodnoty vyšší o 140,7 % u délky a o 76,4 % u plochy kořenového systému. Porovnání hodnot je uvedeno v **Tab. 5**.

Tab. 5: Hodnoty délky (m rostlina⁻¹) a plochy (cm² rostlina⁻¹) kořenového systému vybraných odrůd.

Odrůda		W		D	
		délka	plocha	délka	plocha
ječmen	Tadmor	34,9	188,4	61,8	221,4
	Malz	62,7	307,5	150,9	542,4

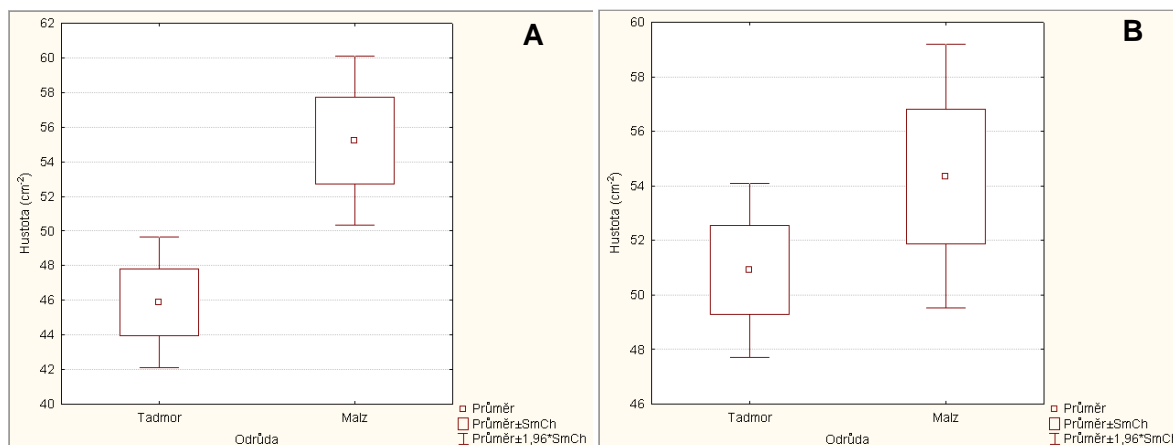
5.6 Hustota průduchů

Hustoty průduchů na listech byly stanoveny jen u odrůd Tadmor a Malz. Byly počítány jako průměrné hodnoty za všech měření všech opakování zvlášť na spodní a svrchní straně listů. Pro statistické zhodnocení byly vzaty průměrné hodnoty z obou stran listu (**Tab. 6**).

Tab. 6: Průměrné hodnoty hustot průduchů na 1 mm² listové plochy odrůdy Tadmor a Malz.

Odrůda		spodní strana		svrchní strana		obě strany	
		W	D	W	D	W	D
ječmen	Tadmor	42,7	49,8	49,1	52,0	45,9	50,9
	Malz	51,2	51,6	59,3	57,1	55,2	54,4

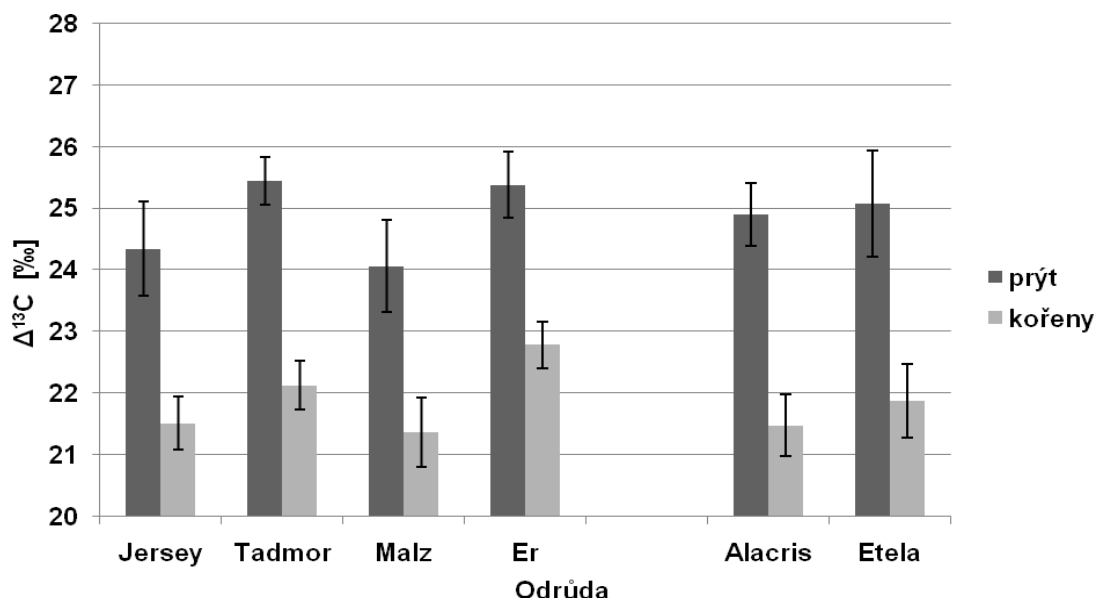
Ukázalo se, že hodnoty u *D* variant jsou variabilní do té míry, že nejsou statisticky průkazné ($t_{(18)} = -1.17$, $p = 0.258$) k odlišení jednotlivých odrůd. *W* varianty vykazují již statisticky významné rozdíly ($t_{(18)} = -2.96$, $p = 0.008$) (**Obr. 15**).



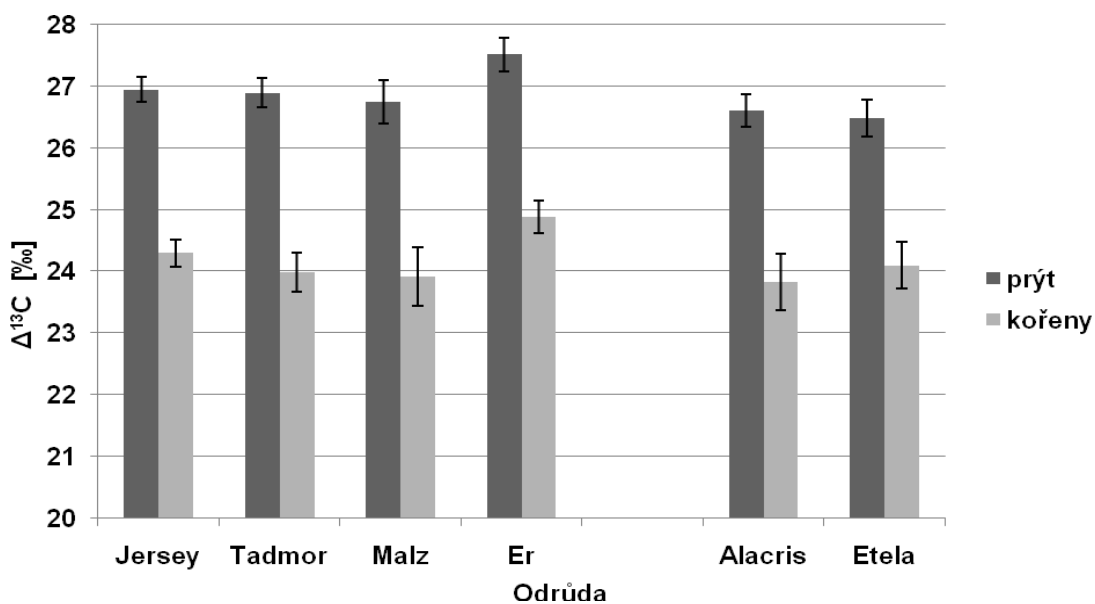
Obr. 15: Průměrné hodnoty hustot průduchů na 1 mm² z obou stran listové plochy odrůdy Tadmor a Malz *W* variant (**A**) a *D* variant (**B**), $n = 10$.

5.7 Diskriminace izotopu ^{13}C

Izotopové měření diskriminace ($\Delta^{13}\text{C}$) bylo zvlášť provedeno pro suchou hmotu nadzemních částí rostlin (prýtů) a zvlášť pro hmotu kořenů. Porovnání diskriminace mezi částmi rostlin v obou variantách je znázorněno na **Obr. 16** a **Obr. 17**.



Obr. 16: Porovnání diskriminace mezi částmi rostlin *D* variant. Průměry \pm SD (n = 5).

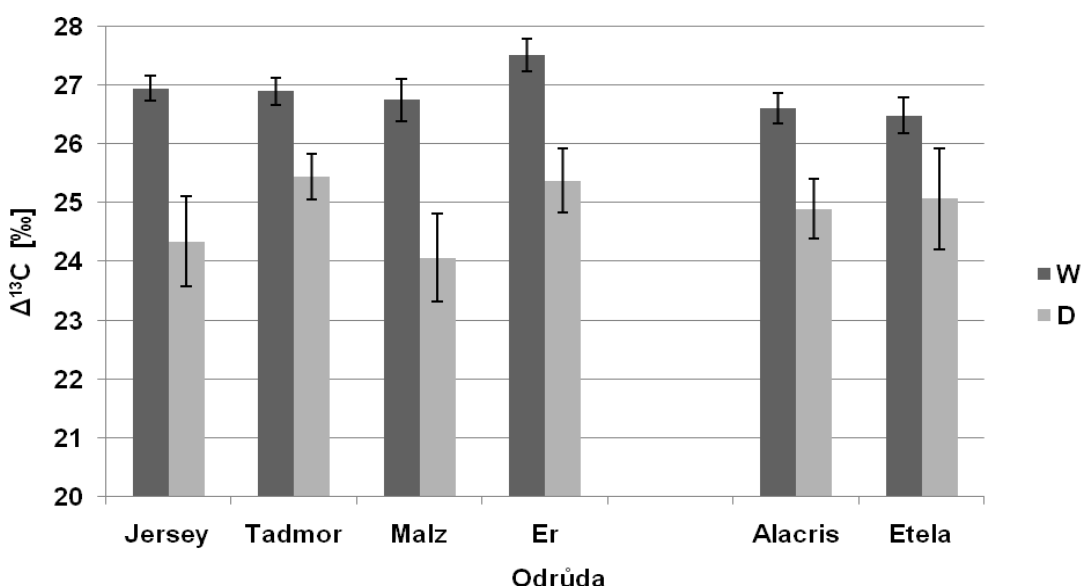


Obr. 17: Porovnání diskriminace mezi částmi rostlin *W* variant. Průměry \pm SD (n = 5).

Výsledky ukazují na prokazatelně vyšší hodnoty diskriminace prýtů oproti kořenům u *W* variant ($t_{(10)} = 12.47$, $p = 2 \cdot 10^{-7}$) i u *D* variant ($t_{(10)} = 9.53$, $p = 2 \cdot 10^{-6}$).

5.7.1 Nadzemní část rostlin

Hodnoty diskriminace nadzemních částí jednotlivých odrůd se statisticky významně liší mezi variantami zavlažování (např. Etela: $t_{(8)} = -3.46$, $p = 0.008$). Hojně zavlažované varianty jsou ochuzenější o ^{13}C (mají vyšší Δ) oproti suchem stresovaným o 5,6 % (Etela) až 11,2 % (Malz) (**Obr. 18**).

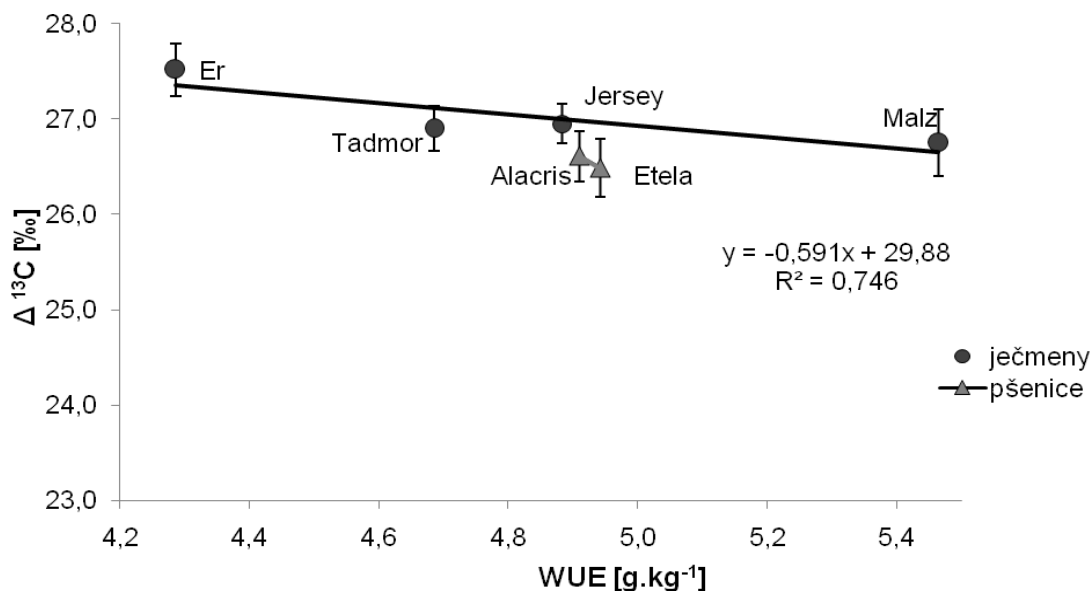


Obr. 18: Porovnání hodnot $\Delta^{13}\text{C}$ nadzemních částí rostlin mezi odrůdami obou variant.

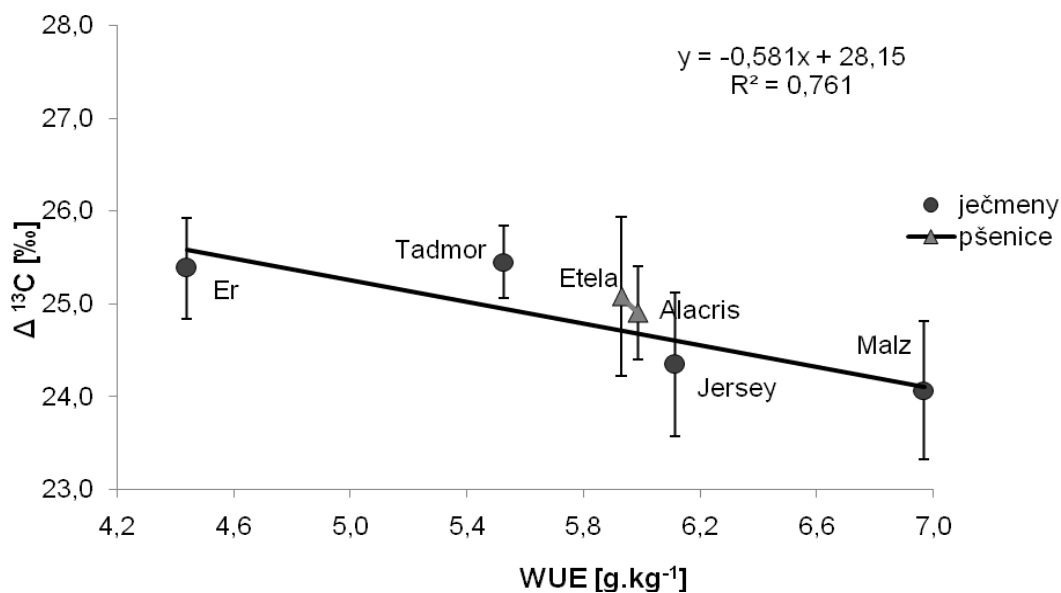
Průměry \pm SD ($n = 5$).

Nejnižších hodnot z ječmenů dosahuje odrůda Malz. V *D* variantě $24,06 \pm 0,75$ ‰, ve *W* variantě $26,75 \pm 0,35$ ‰. Ze pšenic pak v *D* variantě Alacris s hodnotou $24,90 \pm 0,51$ ‰, ve *W* variantě Etela s hodnotou $26,48 \pm 0,30$ ‰.

Naměřená izotopová diskriminace byla dále porovnána s účinností využití vody WUE celé rostliny zvlášť pro W varianty (**Obr. 19**) a zvlášť pro D varianty (**Obr. 20**).



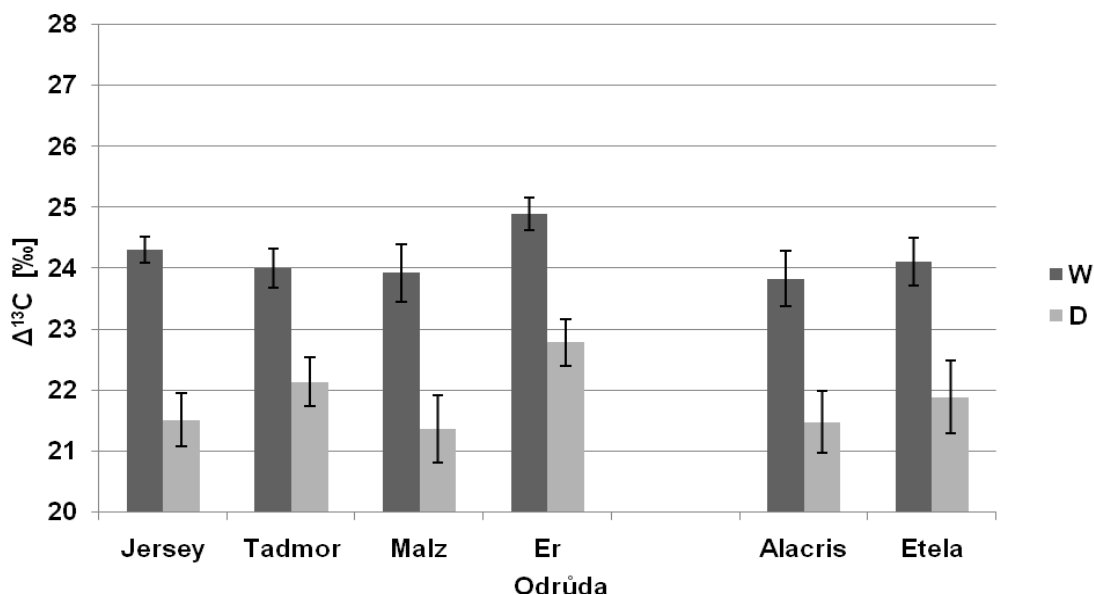
Obr. 19: Korelace izotopové diskriminace ($\Delta^{13}\text{C}$) nadzemních částí rostlin s účinností využití vody celou rostlinou (WUE) u jednotlivých odrůd W variant. Průměry \pm SD ($n = 5$). Regresní přímka byla vypočtena jen pro ječmeny.



Obr. 20: Korelace izotopové diskriminace ($\Delta^{13}\text{C}$) nadzemních částí rostlin s účinností využití vody celou rostlinou (WUE) u jednotlivých odrůd D variant. Průměry \pm SD ($n = 5$). Regresní přímka vypočtena jen pro ječmeny.

5.7.2 Kořeny

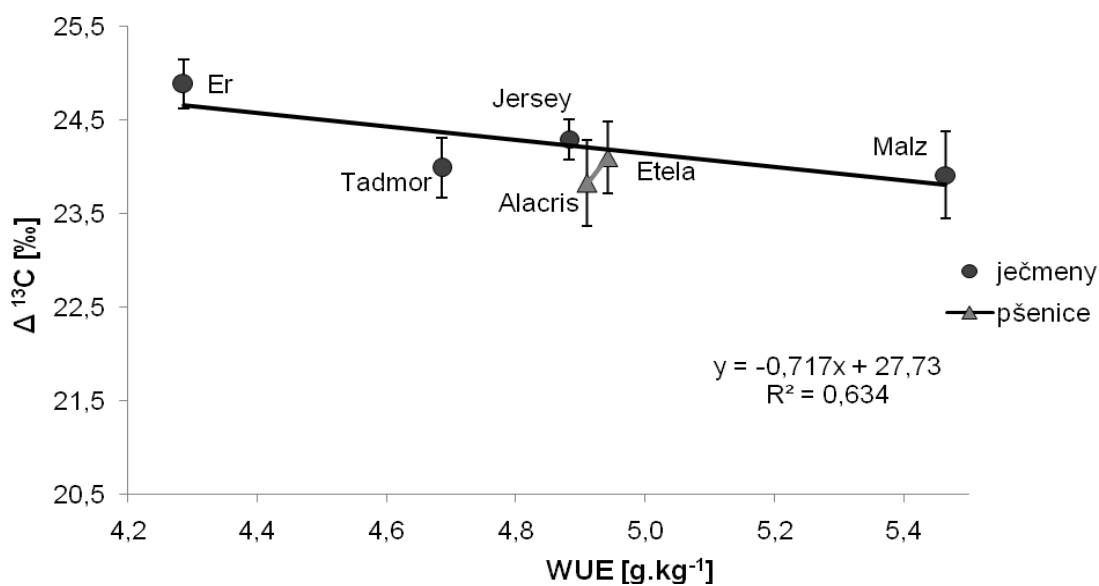
Diskriminace kořenů se mezi variantami zavlažování jednotlivých odrůd významně odlišuje. (např. Tadmor: $t_{(8)} = -8.1$, $p = 0.00004$). Rozdíly jsou zde ještě významnější než u nadzemních částí rostlin. Hojně zavlažované varianty jsou ochuzenější o ^{13}C oproti suchem stresovaným o 8,4 % (Tadmor) až 13,0 % (Jersey) (Obr. 21).



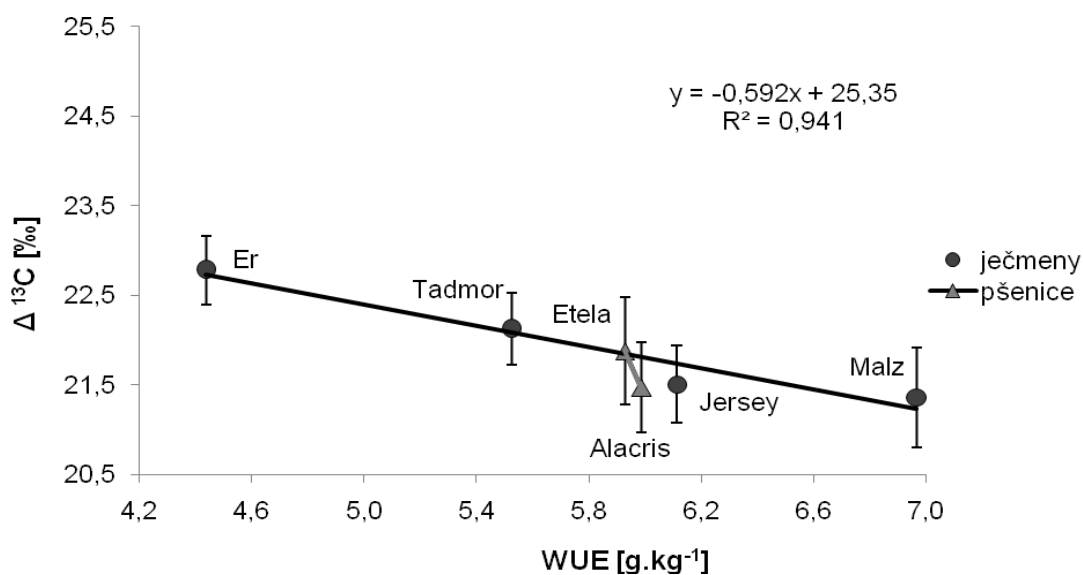
Obr. 21: Porovnání hodnot $\Delta^{13}\text{C}$ kořenů mezi odrůdami obou variant. Průměry \pm SD ($n = 5$).

Nejnižších hodnot z ječmenů dosahuje odrůda Malz. V *D* variantě $21,36 \pm 0,56$ ‰, ve *W* variantě $23,92 \pm 0,47$ ‰. Ze pšenic pak Alacris, která v *D* variantě dosahuje hodnoty $21,47 \pm 0,51$ ‰, ve *W* variantě $23,82 \pm 0,46$ ‰.

Obdobně jako u hmoty nadzemní části rostlin bylo provedeno porovnání izotopové diskriminace kořenů s účinností využití vody *WUE* celé rostliny zvlášť pro *W* varianty (Obr. 22) a zvlášť pro *D* varianty (Obr. 23).



Obr. 22: Korelace izotopové diskriminace ($\Delta^{13}\text{C}$) kořenů s účinností využití vody celou rostlinou (WUE) u jednotlivých odrůd W variant. Průměry \pm SD ($n = 5$). Regresní přímka vypočtena jen pro ječmeny.



Obr. 23: Korelace izotopové diskriminace ($\Delta^{13}\text{C}$) kořenů s účinností využití vody celou rostlinou (WUE) u jednotlivých odrůd D variant. Průměry \pm SD ($n = 5$). Regresní přímka vypočtena jen pro ječmeny.

6 Diskuze

6.1 Transpirace rostlin

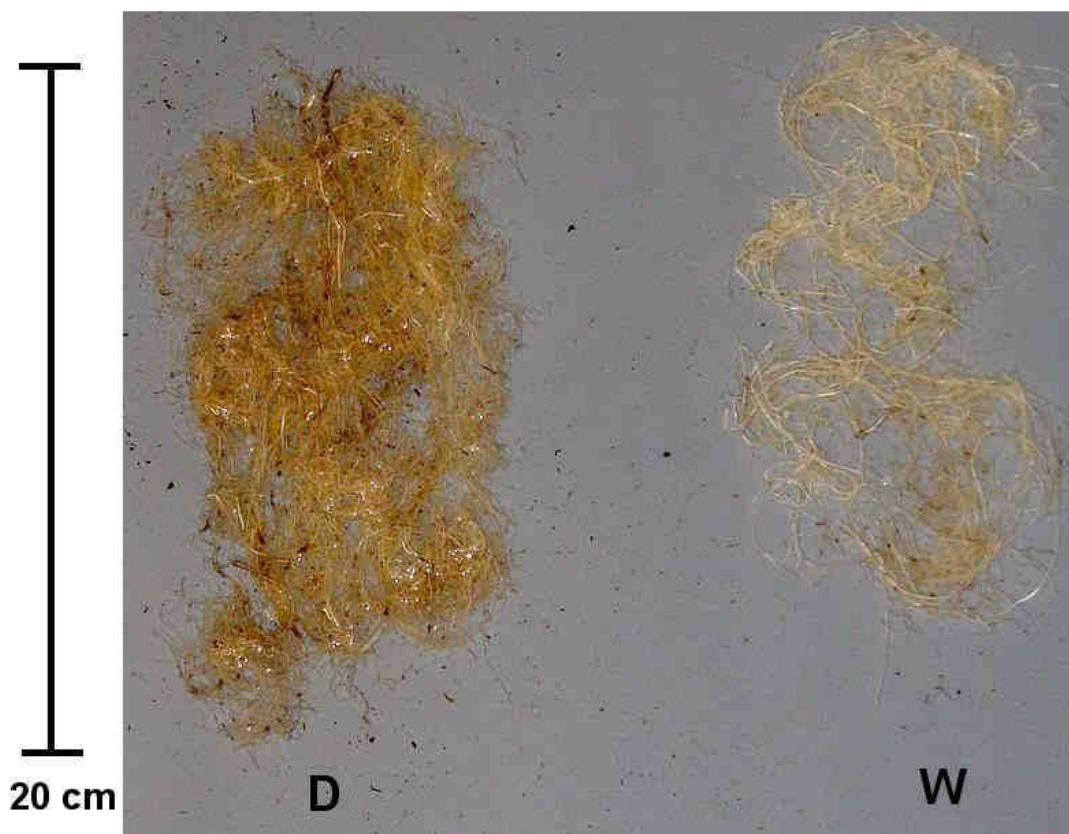
Spotřeba vody (převážně transpirací) jednotlivými odrůdami a oběma variantami zavlažování (*D* a *W*) ukazuje na velkou míru přizpůsobivosti vodního režimu rostlin. Mezi ječmeny dominuje s nejnižší rychlostí transpirace severoafrická odrůda Tadmor, jež dokázala v případě vodního stresu snížit spotřebu vody až na 3,14 násobek spotřeby v případě hojného zavlažování (**Obr. 8**). Je možné ji tedy považovat za suchu nejodolnější odrůdu ze všech testovaných. Nejnižší spotřebu při hojném zavlažování vykazuje pšenice Alacris. Její poměr spotřeb (1,81) v rámci variant zavlažování není ale zdaleka tak výrazný jako u Tadmoru.

S rychlostí transpirace úzce souvisí i povrchová teplota listů, která byla nasnímana pomocí IR kamery. Rostliny s vyšší rychlostí transpirace (varianty *W*) dosahovaly nižších teplot vlivem intenzivnějšího odpařování vody (Procházka *et al.* 1998, **Obr. 9**).

6.2 Biomasa rostlin

Celková hmotnost suché hmoty rostlin víceméně odpovídá spotřebám vody (**Obr. 10**). Zajímavý je ale poměr suché hmoty kořenů a prýtů (**Tab. 3**). Z výsledků je patrné, že tento poměr je vyšší u rostlin *D* variant než u *W*, neboli hmotnost biomasy kořenů relativně k prýtům u suchem stresovaných rostlin převyšuje hmotnost u rostlin hojně zavlažovaných. Tento fakt ještě potvrzují výsledky měření kořenové délky a plochy u odrůd Tadmor a Malz. Malz zde dosahuje znatelnějších rozdílů, hodnoty stresovaných rostlin jsou vyšší až o 140,7 % u délky a o 76,4 % u plochy kořenového systému (**Tab. 5**).

Hmotnosti suché hmoty jsou zatíženy poměrně výraznými chybami, a to zejména u kořenů. Směrodatná odchylka např. u odrůdy Malz s hmotností sušiny kořenů 0,101 g u varianty *D* činí 0,036. Tento fakt poukazuje buď na velkou morfologickou variabilitu kořenového systému, nebo na nepřesné stanovení hmotnosti. To může být dáno zejména procesem čištění kořenů, kdy nelze zcela zabránit ztrátám jemných kořínků.



Obr. 24: Srovnání morfologie kořenového systému reprezentativních rostlin odrůdy Tadmor mezi oběma variantami zavlažování (*D* a *W*).

Pro posouzení morfologických rozdílů jsem pořídil snímek vypraných kořenů obou variant (**Obr. 24**). U *D* varianty je patrná tmavší barva, jemnější větvení a tenčí průměr jednotlivých kořínků.

Malz se oproti Tadmoru vyznačuje dále i vyšší účinností využití vody (*WUE*) (**Obr. 12**), je tedy zřejmé, že podpořený růst kořenů funguje jako aklimační ale i adaptační odpověď rostliny na nedostatek vody v půdě. Tento vztah je obecně známý a je geneticky podmíněný (Sharp *et al.* 2004, Condon *et al.* 2004).

6.3 Hustota průduchů

Otisky listů pro počítání hustot průduchů jsem obdobně jako u kořenových poměrů zhotovil pouze u odrůd Tadmor a Malz vzhledem k náročnosti měření a ne příliš vypovídající hodnotě zjištěných výsledků. Výsledky ukázaly na velkou variabilitu dílčích hodnot. Nelze proto průkazně určit, zda se liší hustoty mezi variantami stejné odrůdy, ani zda se liší hustoty *D* variant mezi odrůdami. Při porovnání *W* variant můžeme však prokázat vyšší hustotu u odrůdy Malz (**Obr. 15**), což poukazuje na

pozitivní korelaci mezi hustotou průduchů a *WUE* (**Tab. 6** a **Obr. 12**). Tato korelace byla mnohokrát pozorována (Xu a Zhou 2008).

6.4 Účinnost využití vody

Na základě výsledků lze říci, že se *WUE* zvyšuje s vodním stresem, neboli rostliny stresované suchem vykazují vyšší *WUE*. Tento vztah koresponduje s výsledky současných výzkumů (Zhao *et al.* 2004), nebyl ale zjištěn ve všech případech (Walley *et al.* 1999). Významné meziodrůdové rozdíly jsem ale zjistil pouze u rostlin *D* variant, i když i zde v průměrných hodnotách existují poměrně velké směrodatné odchylky (**Obr. 12** a **Tab. 4**) dané zejména velkou variabilitou v hmotnostech suché biomasy.

Zjišťovaná účinnost využití vody v této práci neposkytuje žádné informace o výnosu zrna, což je pro agronomy klíčová vlastnost pro posuzování vhodnosti odrůd obilí. Porovnává pouze výnos vegetativní biomasy rostlin. Hodnoty jsou srovnatelné s jinými výzkumy (Farquhar a Richards 1984).

I přes opatření nebylo možné zcela zabránit únikům vody výparem z půdy, proto hodnoty spotřeb vody nejsou zcela absolutně přesné. Vzhledem ale ke stejným podmínkám pěstování všech rostlin lze hodnoty považovat za relativně přesné v rámci zvolené architektury výzkumu.

6.5 Diskriminace izotopu ^{13}C

Zjištěné výsledky ukazují, že míra diskriminace ^{13}C je rozdílná v odlišných částech rostliny (**Obr. 16** a **17**). Hmota kořenů je méně diskriminovaná, tj. více obohacená o izotop ^{13}C než hmota prýtlů. Rozdíly jsou prokazatelné u obou variant zavlažování. Podobné trendy byly zjištěné např. u pšenice (Farquhar a Richards 1984), řepky (Matus *et al.* 1995) a dalších rostlin. Důvody těchto rozdílů nebyly jednoznačně prokázány. Předpokládá se, že jsou způsobeny jednak frakcionací během transportu sacharidů z místa fotosyntézy do zásobních orgánů a jednak rozdílným chemickým složením různých orgánů – např. obsahem lipidů a ligninu (Zhao *et al.* 2004).

Zjištěné hodnoty diskriminace spadají do běžně očekávaného rozmezí pro C_3 rostliny – od 18 do 32 ‰ (Šantrůček 2010). Oproti výsledkům z jiných prací jsou ale výsledky mírně vyšší. Farquhar a Richards (1984) uvádějí hodnoty diskriminace ($\Delta^{13}\text{C}$) pro pšenici (*Triticum aestivum* – cv. Cleopatra, Pitic) v rozmezí 19–23 ‰. Condon

(2004) uvádí pro pšenici (odrůdy Drysdale a Rees) 19–21 ‰. Všechny hodnoty pochází z biomasy dobře zavlažovaných rostlin. Ansari *et al.* (1998), kteří zkoumali vliv salinity půdy na $\Delta^{13}\text{C}$, uvádějí u odrůd ječmene průměrnou hodnotu 19,01 ‰ pro nestresované rostliny. Mnou zjištěné hodnoty pro pšenici (*Triticum aestivum* – cv. Alacris, Etela) se pohybují v rozmezí 26–27 ‰, pro ječmen (*Hordeum vulgare* – cv. Jersey, Malz a *Hordeum spontaneum* – cv. Er, Tadmor) 26–28 ‰ (**Obr. 18**).

Rozdíly jsou jistě dány odlišnostmi jednotlivých odrůd a velmi pravděpodobně i odlišným izotopovým složením CO_2 ve vzduchu ve skleníkových kójiích, kde se rostliny pěstovaly. Zdánlivou příčinou by mohlo být i velmi hojné nasycení půdy závlahovou vodou u *W* odrůd, kterého nedosahuje půda v polních podmínkách (viz Metodika a materiál). V tomto případě by se ale již hodnoty *D* odrůd neměly odlišovat od jiných prací. I zde jsou ale hodnoty vyšší (rozmezí 24–26 ‰).

Chyba stanovení diskriminace (resp. frakcionace $\delta^{13}\text{C}$ vyjádřená jako diskriminace $\Delta^{13}\text{C}$) totožných testovacích vzorků hmotnostním spektrometrem činila 0,035 ‰. Samotné měření lze proto považovat za velmi přesné.

6.6 Vztah izotopové diskriminace a WUE

Výsledky této práce potvrzují vztah mezi $\Delta^{13}\text{C}$ a *WUE*, který byl prvně naznačen již Farquhardem a Richardsem (1982 a 1984). Závislosti jsou vyjádřeny zvláště pro nadzemní části rostlin mezi variantami *W* a *D* a zvláště pro kořeny, přičemž regresní přímka byla vždy vypočtena jen pro ječmeny. Pšenice jsou zobrazovány zvláště (**Obr. 19, 20, 22, 23**).

Ve všech případech byla prokázána negativní korelace $\Delta^{13}\text{C}$ a *WUE*. V případě nadzemní části rostlin byla korelace nepatrně výraznější u *D* variant ($R^2 = 0,761$) než u *W* ($R^2 = 0,746$). U kořenů byla zjištěna výrazná korelace u *D* variant ($R^2 = 0,941$), *W* varianty vykazovaly nejslabší korelaci ze všech měřených vztahů ($R^2 = 0,634$). Nejtěsnější vztah mezi $\Delta^{13}\text{C}$ a *WUE* u ječmenů vykazuje tedy hmota kořenů u *D* variant.

Farquhar a Richards (1984) uvádějí korelační koeficient R (tj. $\sqrt{R^2}$) mezi $\Delta^{13}\text{C}$ a *WUE* u listů pšenice od 0,86 ($R^2 = 0,74$) po 0,87 ($R^2 = 0,76$) podle doby pěstování. Výsledky této práce pro nadzemní části odpovídají uvedeným hodnotám velmi přesně.

Z rovnic regresních přímek je patrná další skutečnost, která koresponduje s teoretickými předpoklady. U prýtů rostlin s dostatkem vody by absolutní člen y (tj.

$\Delta^{13}\text{C}$) měl být pro $x = 0$ (tj. nulové WUE) roven hodnotě frakcionačního faktoru enzymu Rubisco (29–30 ‰, viz kap. 2.1.2.4), čemuž výsledky této práce skutečně odpovídají (**Obr. 19:** 29,88 ‰). Při stresu je rostlina proti této teoretické hodnotě obohacena (má nižší $\Delta^{13}\text{C}$), absolutní člen je tudíž nižší (**Obr. 20:** 28,15 ‰). Tyto rozdíly jsou ve stejném smyslu patrné i v případě kořenů (**Obr. 22 a 23**).

7 Závěr

Na základě výsledků této práce lze formulovat několik tvrzení.

- 1) Rostliny mají schopnost výrazného přizpůsobení (aklimace) vodního režimu a hospodaření s vodou (*WUE*). Projevuje se to rozdílnou rychlostí transpirace vody i asimilace uhlíku do těla rostliny při deficitu a dostatku vody; zvýšením *WUE* při půdním suchu.
- 2) Diskriminace izotopu ^{13}C může být vhodným měřítkem pro stanovení účinnosti využití vody (*WUE*) vybranými genotypy rostlin (v našem případě odrůdami pšenice a ječmene). Potvrdil jsem poměrně významnou negativní korelaci těchto veličin. K izotopovému měření postačuje malé množství sušiny nadzemní části nebo kořene dospělé rostliny. Nelze ale porovnávat hodnoty z různých částí rostlin mezi sebou, ani z výrazně odlišných podmínek vodního zásobení.
- 3) Zkoumaná metoda se ukazuje jako nadějná pro posuzování a šlechtitelský výběr rostlin ječmene rostoucích za podmínek nedostatku vody. Mohla by být také po dalších testech použita pro šlechtění pícninařských plodin, např. trav, kde je klíčovým znakem výnos nadzemní listové biomasy. Metoda neposkytuje ale žádné informace o agronomické účinnosti využití vody (viz kap. 2.2.4), tj. o výnosu zrna případných plodin.

8 Citovaná literatura

- Ansari R., Naqvi S. S. M., Khanzada A. N., Hubick K. T.** 1998: Carbon-isotope discrimination in wheat under saline conditions. *Pak. J. Bot.* **30**: 87-93.
- Briggs L. J., Shantz H. L.** 1912: The Relative Wilting Coefficients for Different Plants. *Botanical Gazette* **53**: 229-235.
- Cabicar J.** 1983: Stabilní izotopy. Academia, Praha. 300 s.
- Cleland W. W.** 1982: Use of Isotope Effects to Elucidate Enzyme Mechanisms. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **13**: 385-428.
- Cleland W. W.** 2003: The Use of Isotope Effects to Determine Enzyme Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **278**: 51975–51984.
- Condon A. G., Richards R. A., Rebetzke G. J., Farquhar G. D.** 2004: Breeding for high water-use efficiency. *J. Exp. Bot.* **55**: 2447-2460.
- Craig H.** 1953: The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* **3**: 53-92.
- Ehleringer J. R., Vogel J. C.** 1993: Historical Aspect of Stable Isotopes in Plant Carbon and Water Relations. In: Ehleringer J. R., Hall A. E., Farquhar G. D. (ed.): *Stable isotopes and plant carbon - water relations*. Pp. 9-18. Academic Press, San Diego. Pp. 553.
- Farquhar G. D., O'Leary M. H., Berry J. A.** 1982: On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant. Physiol.* **9**: 121-137.
- Farquhar G. D., Richards R. A.** 1984: Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust. J. Plant. Physiol.* **11**: 539-552.
- Farquhar G. D., Ehleringer J. R., Hubick K. T.** 1989: Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 503-537.
- Farquhar G. D., Lloyd J.** 1993: Carbon and Oxygen Isotope Effect in the Exchange of Carbon Dioxide between Terrestrial Plants and the Atmosphere. In: Ehleringer J. R., Hall A. E., Farquhar G. D. (ed.): *Stable isotopes and plant carbon - water relations*. Pp. 47-69. Academic Press, San Diego. Pp. 553.

- Kubásek J.** 2004: C₄ rostliny a stabilní izotopy uhlíku. Magisterská diplomová práce. Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. 78 s.
- Lambrides C. J., Chapman S. C., Shorter R.** 2004: Genetic variation for carbon isotope discrimination in sunflower: association with transpiration efficiency and evidence for cytoplasmic inheritance. *Crop Sci.* **44**: 1642-1653.
- Laza M. R., Kondo M., Ideta O., Barlaan E., Imbe T.** 2006: Identification of quantitative trait loci for $\delta^{13}\text{C}$ and productivity in irrigated lowland rice. *Crop Sci.* **46**: 763-773.
- Lobell D. B., Burke M. B., Tebaldi C., Mastrandera M. D., Falcon W. P., Naylor R. L.** 2008: Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. *Science* **319**: 607-610.
- Masle J., Gilmore S. R., Farquhar G. D.** 2005: The *ERECTA* gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis*. *Nature* **436**: 866-870.
- Matus A., Slinka A. E., Kessel C. V.** 1995: Carbon-13 isotope discrimination at several growth stages in lentil, spring wheat and canola. *Can. J. Plant Sci.* **75**: 577-581.
- Misra S. C., Shinde S., Geerts S., Rao V. S., Monneveux P.** 2010: Can carbon isotope discrimination and ash content predict grain yield and water use efficiency in wheat? *Agric. Water Man.* **97**: 57-65.
- Mook W. G., Bommerson J. C., Staverman W. H.** 1974: Carbon isotope fractionation between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide. *Earth and Plan. Sc. Let.* **22**: 169-176.
- Morison J. I. L., Baker N. R., Mullineaux P. M., Davies W. J.** 2009: Improving water use in crop production. *Phil. Trans. R. Soc. B* **363**: 639-658.
- Nier A. O., Gulbransen E. A.** 1939: Variations in the relative abundance of the carbon isotopes. *J. Am. Chem. Soc.* **61**: 697-698.
- O'Leary M. H.** 1993: Biochemical Basis of Carbon Isotope Fractionation. In: Ehleringer J. R., Hall A. E., Farquhar G. D. (ed.): *Stable isotopes and plant carbon - water relations*. Pp. 19-28. Academic Press, San Diego.
- O'Leary M. H.** 1989: Multiple isotope effect on enzyme-catalyzed reactions. *Annu Rev. Biochem.* **58**: 377-401.

- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol.** 1998: Fyziologie rostlin. Academia, Praha. 484 s.
- Sharp R. E., Poroyko V., Hejlek L. G., Spollen G. W., Springer G. K., Bohnert H. J., Nguyen H. T.** 2004: Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* **55**: 2343-2351.
- Schimper A. F. W.** 1908: Pflanzen- Geographie auf Physiologischer Grundlage. Fisher, Jena. 876 s.
- Smith B. N., Epstein S.** 1971: Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. *Plant Physiol.* **47**: 380-384.
- Stiller W. N., Read J. J., Constable A., Reid P. E.** 2005: Selection for water use efficiency traits in a cotton breeding program: cultivar differences. *Crop Sci.* **45**: 1107-1113.
- Sulzman E. W.** 2007: Stable isotope chemistry and measurement: a primer. In: Michener R. and Lajtha K. (ed.): *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Pp. 1-21. Blackwell, Malden.
- Šantruček J.** 2010: Nové možnosti šlechtění na účinnost využití vody. In: Bláha L., Hnilička F., Martinková J. (ed.): *Současné možnosti fyziologie a zemědělského výzkumu přispět k produkci rostlin*. Pp. 139-154, VÚRV, v.v.i. Praha. 310 s.
- Vogel J. C.** 1980: Fractionation of the carbon isotopes during photosynthesis. In: Sitzungsberichte der Heidelberger Akademie der Wissenschaften, mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse Jahrgang 1980. Pp. 111-135. Springer-Verlag, Berlin.
- Vogel J. C.** 1993: Variability of Carbon Isotope Fractionation during Photosynthesis. In: Ehleringer J. R., Hall A. E., Farquhar G. D. (ed.): *Stable isotopes and plant carbon - water relations*. Pp. 20-46. Academic Press, San Diego.
- Volta J., Romagosa I., Lafarga A., Armesto A. P., Sombrero A., Araus J. L.** 1999: Genotype by environment interaction for grain yield and carbon isotope discrimination of barley in Mediterranean Spain. *Aust. J. Agric. Res.* **50**: 1263-1271
- Walley F. L., Lafond G. P., Matus A., Kessel C.** 1999: Water-Use efficiency and carbon isotopic composition in reduced tillage systems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**: 356-361.

Warming E. 1909: *Oecology of Plants: An introduction to the study of Plant Communities*. Clarendon Press, Oxford. 422 s.

Whelan T., Sackett M. W., Benedict C. R. 1973: Enzymatic fractionation of carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ plants. *Plant Physiol.* **51**: 1051-1054.

Xu Z., Zhou G. 2008: Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J. Exp. Bot.* **59**: 3317-3325.

Zhao B., Kondo M., Maeda M., Ozaki Y., Zhang J. 2004: Water-use efficiency and carbon isotope discrimination in two cultivars of upland rice during different developmental stages under three water regimes. *Plant and Soil* **261**: 61–75.

9 Přílohy



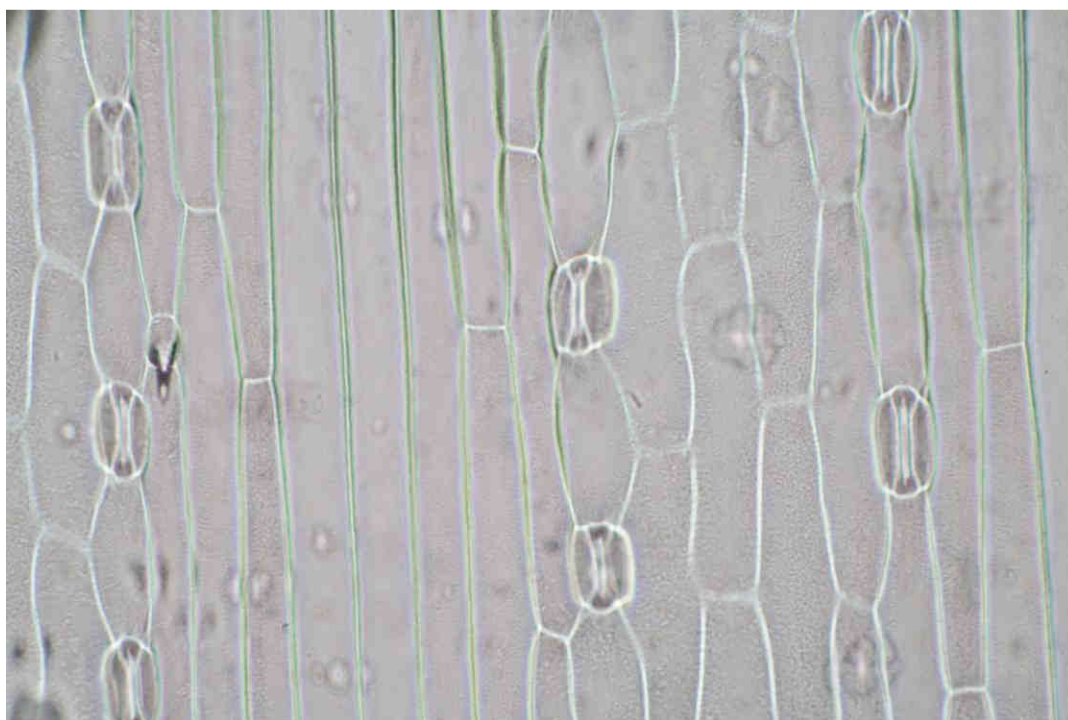
Obr. P1: Příklad rozložení nádob s pěstovanými rostlinami před rozstřížením igelitových obalů.



Obr. P2: Příklad rozložení nádob s pěstovanými rostlinami po rozstřížení igelitových obalů.



Obr. P3: Způsob vážení nádob pro zjištění množství závlivkové vody.



Obr. P4: Ukázkový snímek otisku pokožky svrchní části listu (odrůda Tadmor).