

Středoškolská odborná činnost

Obor: 7. Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Selekce genotypů pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) odolných vůči stresu suchem pomocí zkoumání kořenového systému

Autor: Natálie Rudolfová
Škola: Slovanské gymnázium Olomouc
Kraj: Olomoucký kraj
Konzultant: Mgr. Petra Hloušková, Ph.D.

Olomouc 2019

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali s přípravou a psáním této práce. Hlavně mým konzultantům, rodičům a všem, kteří si práci přečetli a sdělili mi své výtky a připomínky.

Title: Selection of drought-resistant genotypes of common wheat (*Triticum aestivum* L.) by examining root system

Authors: Natálie Rudolfová

School: Slavonic grammar school Olomouc

Abstract: Stress is an inherent part of our and plant's lives as well. Due to their stationary nature, plants have developed diverse defense mechanisms to survive and thrive in the ever-changing environmental conditions. One of such mechanisms are the antioxidant enzymes. Using modulation of the activity of these enzymes, the plants regulate the formation of reactive oxygen species to keep homeostasis and survive in the changing conditions of the environment.

Wheat is by far one of the most important crops grown worldwide. Scientists and breeding companies are trying to develop better more resistant genotypes. Recently, the focus has been on drought-resistant plants. The drought-resistance is often linked to different root system architecture, its qualitative and quantitative characteristics. Root system has not yet been the object of breeding because of missing approach of research.

The aim of this study was to investigate the influence of the differences of root systems of various genotypes of common wheat in response to drought stress and to examine the activity of antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase) in the roots of these plants. Subsequently, we wanted to determine whether the enzymatic activity can be used as the first indicator for selection of drought-resistant plants.

Keywords: common wheat, drought stress, root system, antioxidative enzymes, oxidative stress, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase

Název práce: Selektce genotypů pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) odolných vůči stresu suchem pomocí zkoumání kořenového systému

Autoři: Natálie Rudolfová

Škola: Slovanské gymnázium Olomouc

Abstrakt: Stres je neodmyslitelnou součástí našich životů, stejně jako životů rostlin. Vzhledem k přisedlému způsobu života se u rostlin vyvinula řada obranných mechanismů, jak se vypořádat s nepříznivými životními podmínkami. Jedním z nich jsou antioxidační enzymy. Změnou aktivity antioxidačních enzymů rostlina reguluje tvorbu reaktivních forem kyslíku, a snaží se tak udržet homeostázu a přežít v nepříznivých podmínkách.

Pšenice je jedna z nejpěstovanějších plodin na světě, vědci a šlechtitelské firmy neustále hledají výnosnější odrůdy. V poslední době se pozornost zaměřuje na odrůdy odolnější k nedostatku vody. Odolnost k suchu je často spojena s odlišným utvářením kořenového systému, jeho kvantitativními i kvalitativními znaky. Kořenový systém však dosud nebyl předmětem šlechtění z důvodu chybějící metody studia.

Cílem práce bylo zhodnotit vliv odlišnosti kořenového systému různých odrůd pšenice seté na stres suchem a studovat aktivitu antioxidačních enzymů (askorbátperoxidasy a guajakol peroxidasy) v kořenech těchto rostlin s cílem zjistit, zda by se měření aktivity antioxidačních enzymů v kořeni dalo použít jako první indikátor k selekci rostlin odolných vůči stresu suchem.

Klíčová slova: pšenice setá, stres suchem, kořenový systém, antioxidační enzymy, oxidační stress, askorbátperoxidasa, guajakolperoxidasa

Obsah

1	Stres	3
1.1	Stres suchem	5
1.2	Oxidační stres	5
1.3	Asorbátperoxidasa (APX)	6
1.4	Guajakolperoxidasa (POX)	7
2	Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i> L.)	8
2.1	Kořenový systém	8
2.2	Příjem vody	9
2.3	Příjem minerálních živin	10
3	Materiál a metody zpracování	11
3.1	Materiál a metody kultivace	11
3.2	Měření velikosti kořenového systému a analýza sušiny	11
3.3	Měření a vyhodnocení relativního obsahu vody	11
3.4	Měření aktivity antioxidantních enzymů	12
3.5	Vyhodnocení aktivity enzymů	12
3.6	Statistické vyhodnocení	13
4	Výsledky	14
4.1	Celková délka kořenového systému	14
4.2	Váhy sušiny kořenového systému	14
4.3	Váhy sušiny nadzemní části rostliny	16
4.4	Relativní obsah vody v listech	17
4.5	Aktivita enzymu APX	17
4.6	Aktivita enzymu POX	17
5	Diskuse	19
6	Závěr	21
	Reference	22

Úvod

Je všeobecně známo, že žijeme v době, kterou ovládá stres. Stres ale není vynález posledních století. Není způsoben pouze rychlým životním stylem ani konzumní společností. Stres je nástroj přírody pro vybírání nejsilnějších nebo nejprizpůsobivějších druhů. Stres existoval vždy, nicméně za éry existence člověka se nejvíc změnil.

Netvrdím, že trepka velká (*Paramecium caudatum* L.) si dělá starosti s dopravní situací na silnici a slunečnici roční (*Helianthus annuus* L.) vadí termín odevzdání daňového priznání. Rostlinám způsobuje stres nedostatek vody, znečištěné ovzduší nebo sluneční radiace. Mnoho faktorů způsobil právě člověk.

Stres hraje v životě rostlin velkou roli. Je důležitým faktorem při pěstování zemědělských plodin a významně ovlivňuje výnosy při sklizni. Hledání výnosnějších plodin musí dopady různých druhů stresů zohlednit. Pokud je naším cílem najít odrůdy, které jsou odolnější vůči suchu, musíme se zaměřit na kořenový systém, neboť právě ten přijímá vodu z půdy. Nicméně zkoumání kořenového systému je pro zemědělce a šlechtitele složité. Co však má být zkoumáno v rostlině? Je důležitější celková délka kořenového systému nebo obsah vody v rostlině? Doposud neexistuje žádná ucelená metodika pro zkoumání kořenového systému a odolnosti rostliny vůči stresu, takže se na kořenový systém a odolnost k suchu zapomíná.

Cílem práce bylo zhodnotit vliv odlišnosti kořenového systému různých odrůd pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) na stres suchem a studovat aktivitu antioxidantních enzymů (askorbátperoxidasy a guajakolperoxidasy) v kořenech těchto rostlin. Cílem bylo zjistit, zda by se měření aktivity antioxidantních enzymů v kořeni dalo použít jako první indikátor k selekci rostlin odolných vůči stresu suchem.

1 Stres

Stres je neodmyslitelnou součástí života nás všech, ovlivňuje naše rozhodnutí i celkovou kvalitu života. Všichni jsme si velmi dobře vědomi jeho účinků, ale napadlo nás někdy, že i rostliny čelí stresu jako my? Rostliny žijí přisedlým způsobem života, takže se nemohou jednoduše přesunout za lepším životem jako my lidé, proto musely vyvinout mnoho obranných mechanismů. V případě rostlin se nejedná o stres ze špatně vykonané práce nebo z každodenní situace na silnici, ale může to být stres z nedostatečné kvality ovzduší nebo z nedostatku světla a vody. Společným faktorem lidského stresu a stresu rostlin je jeho negativní dopad na vývoj a existenci. V zemědělství se projevuje velmi významně a negativně ovlivňuje výnos a kvalitu sklizně.

Nicméně i tento škodlivý proces měl a stále má velmi důležitou roli v evoluci [1, 2]. Stresové podmínky vytváří extrémní tlak na rostliny [3] stejně jako na všechny živé organismy na zemi. Přežijí pouze ti, kteří se nejlépe přizpůsobí nebo vyvinou obranné mechanismy, které je ubrání. Pokud toto organismus úspěšně zvládne, zajistí si prostor pro existenci v místech, kde by žádné jiné organismy nevydržely nebo nežily tak efektivně. Teplota prostředí, složení půdy a voda jsou třemi hlavními faktory pro rozmístění rostlinných druhů po planetě [3]. Byla to právě jejich schopnost (i neschopnost) přizpůsobit se extrémním podmínkám, která vytvořila mapu výskytu rostlin.

Pokud jsou stresové podmínky všudypřítomné v historii vývoje, znamená to, že nás nemusejí vůbec znepokojovat? Rozhodně ne. V historii byly změny mnohem pomalejší než dnes, pokud nemáme na mysli extrémně vzácné případy (např. výbuch sopky nebo dopad meteoritu). Člověk mění svým působením planetu k nepoznání v časovém úseku, který v celé historii života na planetě znamená mrknutí oka. Velmi zásadní je globální oteplování. Na pólech tají ledovce, tavním suchozemským živočichům rapidně klesá plocha k životu, a zvyšuje se hladina moří. Také stoupá teplota moří a oceánů, což má negativní dopad na všechny mořské živočichy.

Významný faktor ovlivňující život rostlin je voda. Negativní dopad má její nedostatek i přebytek. Právě sucho a záplavy jsou jevy, které se objevují častěji než dříve.

Stres je definován jako nepříznivý stav organismu způsobený vlivem stresoru, který vyvolá stresovou reakci. Je způsoben nadbytkem nebo i nedostatkem běžného faktoru pro rostlinu (voda, kyslík, světlo). Stres je dočasný stav živého organismu, při němž je tento organismus vystaven mimořádným podmínkám. V důsledku nepříznivých podmínek rostlina aktivuje řadu obranných mechanismů, které mají za cíl zachování *homeostázy*¹ a zabránění poškození nebo smrti.

Stres můžeme dělit několika způsoby:

- Podle původu stresorů na vnitřní a vnější.
- Podle délky trvání na dlouhodobé a krátkodobé. Proti krátkodobému stresu se rostlina může bránit adaptací nebo obrannými mechanismy, dlouhodobý stres může způsobit její nevratné poškození.

¹Homeostáza je snaha organismu udržovat stálost vnitřního prostředí, např. stále pH, konstantní teplota.

- Podle původu stresoru na *abiotický* a *biotický* stres. Abiotický stres způsobují neživé faktory např. sucho, změna teploty, salinita prostředí, změny složení půdy, chemikálie nebo nedostatek vody [3]. Biotický stres je způsoben živými organismy – mikroorganismy, hmyzem nebo jinými rostlinami [3].
- Podle vlivu stresu na rostlinu na *eustres* a *distres* [3]. Pokud mají stresové podmínky na rostlinu pozitivní vliv, jedná se o eustres, pokud mají negativní vliv, jde o distres.

Některé stresové faktory nelze odstranit (např. špatná kvalita ovzduší), nicméně můžeme vyšlechtit odrůdy, které budou k takovým stresovým situacím odolnější než jiné. Proto je důležité upravit postupy šlechtění rostlin a brát v úvahu podmínky, ve kterých bude rostlina růst.

Je velmi časté, že stresové podmínky se nevyskytují samostatně. Jeden druh stresu může být volně doprovázen druhým [4]. Stres z vysoké kyselosti půdy je spojován se stresem z vysoké koncentrace fytotoxických hlinitých iontů (Al^{3+}) [4].

Reakce rostliny na jeden druh stresu může být stejná jako reakce na jiný druh. Při stresu suchem, chladném počasí a přílišné slanosti půdy se exprimují stejné geny, protože všechny tři podmínky vedou ke ztrátě vody v rostlině [5, 6, 7].

Jedna stresová situace může vyvolávat další stresovou situaci. Slanost půdy i mráz mohou vyvolat ztrátu vody v rostlině [4, 2]. Sucho, příliš mnoho světla a vysoké i nízké teploty mohou vyvolat oxidační stres.

Pokud na rostlinu působí několik stresorů zároveň, její reakce mohou být navzájem *antagonistické* nebo *synergické* [8].

Rostlina používá speciální mechanismus obrany proti stresu (*stress sensing*) [3]. Pro každý druh stresu je mechanismus jiný, protože stresy ovlivňují jiné části rostliny. Tento mechanismus je spuštěn přímo po vystavení rostliny stresu a dále vybízí rostlinu k obranným mechanismům. Celá reakce má čtyři základní fáze:

- *Alarm phase* (alarmující fáze) [3] – v této fázi, nastávající ihned po vystavení rostliny stresovým podmínkám, aktivuje rostlina svůj obranný mechanismus. Pro rostliny, které žádný obranný mechanismus nemají (nebo je jejich obranný systém málo efektivní), může být tato fáze nebezpečná.
- *Resistance phase* (fáze obrany) [3] – rostlina se stále snaží přizpůsobit stresovým podmínkám. Každá rostlina má jinou hranici přizpůsobivosti, pokud je překročen tento limit, nastává další fáze. K překročení může dojít, pokud je rostlina vystavena stresovým podmínkám příliš dlouho nebo pokud je stres velmi intenzivní.
- *Exhaustion phase* (fáze vyčerpání) [3] – rostlina se do této fáze dostane při dlouhodobém nebo velmi intenzivním stresu. Tyto stresové podmínky způsobují vážná poškození až smrt.
- *Regeneration phase* (regenerační fáze) [3] – pokud jsou stresové podmínky odstraněny přechází rostlina do regenerační fáze. Rostlina přežije, ale její růst a reprodukivita může být značně omezena.

Stres ovlivňuje růst všech rostlin, ale především jeho dopady na zemědělské plodiny jsou pro lidstvo velmi citelné.

1.1 Stres suchem

Stres nedostatkem vody můžeme zařadit mezi nejběžnější stresy. Sucho není ojedinělý jev, ale trend, který pozorujeme několik posledních let.

Pokud použijeme dělení z předchozí kapitoly, jedná se o vnější, abiotický stres a distres.

Sucho ovlivňuje všechny aspekty růstu a vývoje rostliny a přímo souvisí s výnosem při sklizni [8, 3]. Hlavním důsledkem nedostatku vody je metabolická a osmotická nevyváženost, pokles turgoru², uzavření stomat³ a omezení výměny plynů mezi rostlinou a okolím [9]. Dalším důsledkem stresu suchem je omezení růstu rostliny (prodlužování stonku, nebo rozvoje listů) [8]. Rostlinám usychají listy, což znamená, že se zmenšuje plocha listu a tím i plocha pro fotosyntézu.

Při velmi intenzivním nedostatku vody může dojít až k zastavení procesu fotosyntézy a k uschnutí rostliny.

Rostliny se s tímto druhem stresu setkávají poměrně běžně a vyvinuly řadu obranných mechanismů, které jsou pro každý rod i druh odlišné.

Už jsem uvedla, že jeden druh stresu může být doprovázen dalším nebo může dokonce jiný stres vyvolat. Nedostatek vody v rostlině může způsobit vysoká slanost půdy, mráz nebo vysoké teploty [4]. Rostliny využívají pro vylučování vody stomata na listech a zároveň se tímto procesem zároveň chladí. Pokud rostlina nemá dostatek vody a je vystavena vysokým teplotám, nemůže vylučovat vodu stomaty, což jí způsobí velké poškození [4]. Stres suchem přímo způsobuje oxidační stres [10].

1.2 Oxidační stres

Důsledkem stresu suchem je oxidační stres, tedy hromadění reaktivních forem kyslíku (*reactive oxygen species*, dále jen ROS) v rostlině [10].

ROS vznikají jako meziproduct aerobního metabolismu [11, 12]. Pokud má rostlina nedostatek vody, jedna z jejích prvních reakcí je uzavření stomat [9]. Uzavření znemožní odpařování vody do okolí (a další ztrátu), ale také znemožní výměnu plynů. Vstřebávání CO₂ je zpomaleno, ale fotosyntetický elektronový řetězec⁴ je udržován stále v poměrně vysokém tempu. Nerovnováha mezi přenosem elektronů a vstřebáváním CO₂ způsobí větší produkci superoxidového radikálu O₂^{•-} [9, 10].

Rostlina sama záměrně produkuje ROS, například při biotickém stresu (napadení patogenem) [12] nebo pro řízení a kontrolu apoptózy⁵ buněk [11]. ROS produkují různé *oxidasy* a *peroxidasy*, jako odpověď na změny prostředí [11]. Dále je rostlina využívá jako signální molekuly pro expresi genů [11, 13]. Při vysoké koncentraci jsou ROS pro rostlinu toxické [14].

Toxicita ROS spočívá v jejich vysoké reaktivitě, čímž ohrožuje hlavně proteiny, nukleové kyseliny a lipidy [11, 15]. ROS mohou inaktivovat enzymy, oxidovat

²Trugor je tlak v buňce, rostlinám dává jejich tuhost.

³Stoma neboli průduch je struktura, která slouží ke kontrolované výměně plynů mezi rostlinou a okolím a k odevzdávání vody do ovzduší.

⁴Fotosyntetický elektronový řetězec je kaskáda molekul, přes které jsou přenášeny elektrony za postupného poklesu jejich energie.

⁵Apoptóza je jeden z hlavních typů programované buněčné smrti. Dochází k šetrnému odstranění buňky (ne k zánětu), čímž se liší od nekrózy.

proteiny a poškozovat DNA a RNA [13]. Dále mohou způsobovat *hypersensitive response-programmed cell death* (HR-PCD) [5], což znamená rozsáhlé usmrcování buněk, které má bránit šíření infekce nebo patogenů.

Díky širokému využití a také vysoké toxicitě ROS je pro rostlinu nezbytné udržovat křehkou rovnováhu mezi výrobou, spotřebou a degradací ROS. Jakékoli vychýlení rovnováhy způsobuje rostlině další oxidační stres. Narušení vyváženosti přímo souvisí se změnou vnějších podmínek, např. s příliš vysokou a nízkou teplotou, hypoxií⁶ nebo právě suchem [5, 3].

Všechny ROS jsou odvozeny od tripletového molekulárního kyslíku (*triplet molecular oxygen*) [11, 10], jehož dva valenční elektrony mají stejný spin, proto může reagovat pouze s molekulami, jejichž valenční elektrony mají stejný spin, který je zároveň opačný od spinu elektronů tripletového molekulárního kyslíku. Takových molekul není mnoho, protože většina dvojic elektronů má opačný spin, což omezuje reaktivitu molekulárního kyslíku. Tento tripletový kyslík může být převeden na mnohem reaktivnější ROS [11, 10], který je schopen reagovat s mnoha organickými sloučeninami. Pokud je jeden valenční elektron tripletového kyslíku excitován, vznikne silně reaktivní singletový kyslík [11], jeden z ROS [10]. Reakcemi, při kterých se přenáší elektrony, vzniká z tripletového kyslíku superoxidový anion radikál ($O_2^{\bullet-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) nebo hydroxylový radikál (OH^{\bullet}).

Rostliny mají několik mechanismů pro zbavování se toxických ROS. Tyto procesy jsou buď enzymatické nebo neenzymatické⁷. Mezi enzymatické antioxidanty, které degradují ROS, patří askorbátperoxidasa (POX), guajakolperoxidasa (POX), katalasa (CAT) a superoxidodismutasa (SOD) [5, 16, 17].

1.3 Askorbátperoxidasa (APX)

Askorbátperoxidasa (APX) a guajakolperoxidasa (POX) patří do velké skupiny peroxidas. Tyto enzymy jsou přítomné v rostlinách, houbách a obratlovcích [18]. Peroxidasy běžně obsahují prostetickou skupinu⁸ *ferriprotoporphyrin IX* [18, 19]. Ve vyšších rostlinách se může vyskytovat až 40 genů odpovídajících expresi jejich izoform [18]. Tyto izoformy mohou být jak kationické nebo anionické [19]. Činnost peroxidas je spojována s růstem rostlin, vývojem ovoce, biosyntézou ethenu a také s obranými reakcemi na různé druhy stresů [20]. Tato poslední funkce je řadí do antioxidantního systému, který zajišťuje degradaci pro rostlinu toxických ROS. Do antioxidantního systému patří také nízkomolekulární antioxidanty a enzymy regenerující redukované formy antioxidantů.

Askorbátperoxidasa je nejdůležitější oxidační enzym eliminující H_2O_2 [20, 21]. Rostliny jsou schopné vytvářet několik izoform tohoto enzymu [19], každá forma je určena pro konkrétní místo v buňce (např. cytosol, stromu, membrány plastidů a peroxizomy) [18].

APX se uplatňuje hlavně v tzv. *askorbát-glutathionového cyklu* (také nazývaný *Foyerův-Halliwellův-Asadův cyklus*) [13]. Tento cyklus přeměňuje peroxid vodíku na vodu za pomoci několika dalších enzymů. Peroxid vodíku je získán ze superoxidového anionu za pomoci dalšího antioxidantního enzymu superoxidodismutasy

⁶Hypoxie je nedostatek kyslíku pro metabolismus organismu.

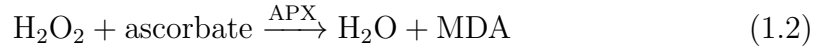
⁷Mezi neenzymatické antioxidanty můžeme zařadit askorbát, redukovaný glutathion [13].

⁸Prostetická skupina je kofaktor (nízkomolekulová neaminokyselinová složka enzymů), který je na enzym vázán kovalentní vazbou.

(SOD) [14] podle Rov. 1.1.



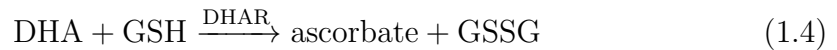
Následuje vlastní *askorbát-glutathionový cyklus*. V prvním kroku vstupuje do reakce peroxid vodíku a askorbát (ascorbate). Za přítomnosti APX askorbát oxiduje na monodehydroaskorbát (MDA) a peroxid vodíku zreaguje na vodu, podle Rov. 1.2.



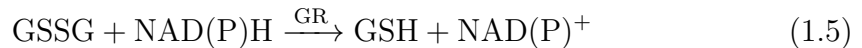
V dalším kroku monodehydroaskorbát reduktasa (MDAR) redukuje monodehydroaskorbát (MDA) na askorbát za pomoci enzymu NAD(P)H (Rov. 1.3). Pokud není MDA ihned redukován, může samovolně disproportionovat na dehydroaskorbát (DHA) a na askorbát. Dehydroaskorbát je přítomen v dalších krocích cyklu např. v Rov. 1.4.



Následně je dehydroaskorbát (DHA) redukován na askorbát a glutathion (GSH) zreaguje na svou oxidovanou formu (GSSG), podle Rov. 1.4. Tuto reakci katalyzuje dehydrogenaskorbát *reduktasa* (DHAR).

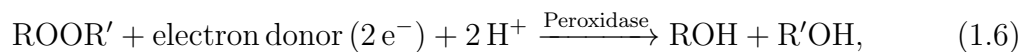


Posledním krokem je reakce oxidovaného glutathionu (GSSG) zpět na glutathion (GSH) pomocí redukčního činidla NAD(P)H za přítomnosti glutathionové reduktasy (GR). NAD(P)H zreaguje na NAD(P)⁺ (Rov. 1.5).



1.4 Guajakolperoxidasa (POX)

Dalším enzymem spojovaným s obrannou odpovědí rostlin na stres je guajakolperoxidasa (POX) [21]. Tento enzym se vyskytuje v cytosolu, vakuolách, buněčné stěně, a apoplastech a patří do skupiny peroxidas [21]. Typické reakce katalyzované peroxidasami vypadají takto:



kde R jsou uhlovodíkové zbytky a donorem elektronů je guajakol [19].

2 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

Pšenice je rod jednoděložných rostlin z čeledi lipnicovitých. Tento rod zahrnuje přibližně dvacet druhů zařazených do tří podrodů: *diploidní* se čtrnácti chromozomy, *tetraploidní* s 28 chromozomy a *hexaploidní* se 42 chromozomy.

Pšenice se pravděpodobně začala pěstovat před 10 000 lety [22, 23]. Původní druhy byly diploidní a tetraploidní [23], které mají společný původ ve východním Turecku. Hexaploidní *Triticum aestivum* vznikla asi před 8000 lety spontánním křížením volně rostoucí diploidní trávy *Aegilops tauschii* (mnohoštět Tauschův) a tetraploidní *Triticum turgidum* (pšenice naduřelá) [24, 25, 26]. Dalším primitivním šlechtěním vznikla současná hexaploidní *Tritirum aestivum*, která nemůže v přírodě volně růst [22, 23].

T. aestivum je celosvětově významná plodina, v roce 2011 se na světě vypěstovalo asi 681 milionů tun [24]. Důvodem k tak markantní oblibě této plodiny může být její velká schopnost přizpůsobit se různým prostředím. Pšenice se může pěstovat jak v Rusku, Skandinávii a Argentině, ale i ve vyvýšených oblastech tropů a subtropů [23]. Dnes tvoří zhruba 95 % veškeré světové produkce hexaploidní pšenice setá, zbylých 5 % tvoří tetraploidní *Triticum durum* [22], která se lépe přizpůsobí suchému středomořskému podnebí.

V druhé polovině dvacátého století došlo k tzv. zelené revoluci [27]. Začaly se ve velkém měřítku používat hnojiva, insekticidy a závlahové systémy. Zemědělství se intenzifikovalo a požadavky na nové vyšlechtěné odrůdy byly vysoké. Při šlechtění se zohledňoval hlavně výnos, u pšenice kvantita obilku. Toto šlechtění produkovalo velmi výnosné, ale málo odolné rostliny. Vzhledem k rostoucím environmentálním problémům už nestačí zohledňovat pouze výnosy, ale také celkové náklady na pěstování. Intenzivní zemědělství vyžaduje hodně vody nebo rostliny, které dokáží přežít i v sušších obdobích. Proto se v posledních letech produkce přeorientovala na strategii většího výnosu na kapku (*more crop per drop*) [27]. Pokud chceme spotřebovat méně vody, musíme pěstovat rostliny, které nepotřebují mnoho této životodárné tekutiny nebo si lépe dokáží poradit s jejím nedostatkem [28].

Při studiu a šlechtění rostlin se nesmíme zabývat pouze množstvím obilku nebo velikostí hlíz u rostlin, u kterých jsou hlízy bezprostředním zájmem šlechtění. Musíme zohledňovat její schopnost přizpůsobit se stresovým podmínkám, hlavně nedostatku vody. V rostlině zajišťují příjem vody kořeny. Je proto jasné, že musíme obrátit pozornost právě k nim.

2.1 Kořenový systém

Kořenový systém je zodpovědný za příjem vody a dalších nezbytných látek a za upevnění rostliny v půdě [29]. Kořeny jsou centrem dusíkatého metabolismu⁹ [30], vznikají zde aminokyseliny, alkaloidy a cytokininy¹⁰ a uchovávají se zde sacharidy a další látky [30]. Kořenový systém má další metabolické funkce: zpracování živin a jejich transport, regulace a signalizace v rámci vztahů mezi kořeny a nad-

⁹Dusík, který je nezbytnou součástí aminokyselin (tedy i proteinů a enzymů), je přijímán kořeny v podobě dusičnanových aniontů. Tyto anionty jsou redukovány na amoniak a přeneseny do plastidů, kde se resyntetizují na aminokyseliny [31].

¹⁰Cytokininy jsou fytohormony, které mimo jiné podněcují dělení buněk.

zemními částmi [29]. Některé sekundární sloučeniny jsou syntetizovány pouze v kořenech, jako např. *nikotin*¹¹. Kořeny oživují půdu a vnášejí do ní organickou hmotu [29].

U semenných rostlin je kořenový pól embrya vyvinut jako radikula, z níž se při klíčení vyvine primární kořen [30]. Nahosemenné a dvouděložné rostliny vytvářejí *allorhizii*, kořenový systém, který je složen z primárního (hlavního) kořene a z kořenů sekundárních (postranních). Větve postranních (sekundárních) kořenů se označují jako kořeny terciální. U kapradin a jednoděložných rostlin primární kořen zaniká a kořenový systém je tvořen sekundárními (adventivními) kořeny, jedná se o *homorhizii* [30].

V kořeni můžeme rozlišit tři základní pletivové celky: pokožku tvořenou krycím pletivem, primární kůru a centrální válec. Tato pletiva vznikají z iniciálních buněk vzrostlého vrcholu, chráněných kořenovou čepičkou.

Pokožka (*rhizodermis*, *rhizoderma*) je tvořena těsně na sebe nasedajícími, protáhlými, tenkostěnnými buňkami bez kutikuly. Ve vzdálenosti 0,7 – 3 mm od vrcholu kořene se z buněk rhizodermis tvoří kořenové vlásky [30].

Kořenový vlásek je absorpční, jednobuněčný, tenkostěnný trichom, jedná se o vychlípeninu pokožky. Kořenový vlásek může vznikat jak z trichoblastů¹², tak i z jakékoliv buňky rhizodermis. Vlasek má průměr asi 0,003 – 0,007 mm a délku asi 3 – 13 mm. Délka jejich života se pohybuje v řádu dnů [32].

Primární kůra kořene je mnohovrstevná parenchymatická vrstva mezi rhizodermou a centrálním válcem. Exodermis (vnější vrstva primární kůry kořene) se histochemicky i strukturálně podobá endodermis (vnitřní vrstvě primární kůry kořene). Mezodermis je parenchymatická střední vrstva primární kůry s schizogenními intercelulárami. U jednoděložných rostlin (zvláště u trav) se často v mezodermis tvoří sklerenchym [30].

Centrální válec kořene (stélé) se skládá z vodivého systému, který je zřetelně ohraničen pericyklem, a případně z dřevě. V perycylu vznikají postranní kořeny [30].

2.2 Příjem vody

Voda je přijímána hlavně kořeny. Nejaktivnější zóna příjmu vody je 10 až 50 mm od kořenové špičky, tedy v části kořene, kde se tvoří nejvíce kořenových vlásků [30]. U starších kořenů sorpční aktivita klesá v důsledku suberinizace¹³ jejich povrchových pletiv. Nicméně i u starších kořenů je příjem vody měřitelný a vzhledem k jejich ploše i velmi významný.

Příjem vody je závislý na rozdílu vodního potenciálu půdního roztoku a vodního potenciálu v kořeni rostliny. Vodní potenciál v půdě musí být větší než potenciál v kořeni a rychlost příjmu vody závisí na velikosti rozdílu [30]. Existuje několik cest příjmu vody:

¹¹Nikotin je pyridinový alkaloid obsažený v tabáku [31].

¹²Trichoblast je speciální buňka rhizodermis, ze které vznikají kořenové vlásky. Mají hustší cytoplazmu a větší jádra, než normální buňky rhizodermis [30].

¹³Suberinizace je proces ukládání suberinu do buněčných stěn. Suberin je hydrofilní polymer tvořený mastnými kyselinami s přísádkem fenolických látek. Zvyšuje pevnost buněčných stěn a snižuje jejich propustnost.

- apoplazmatická cesta – voda nevstupuje do cytoplazmy, ale pohybuje se mezibuněčnými prostory případně buněčnými stěnami [30],
- symplazmatická cesta – voda vstupuje do cytoplazmy už v epidermis a následně se pohybuje pouze symplastem [30],
- vakuolární cesta – voda vstupuje do cytoplazmy a následně do vakuoly, tento proces se opakuje v celém řetězci sousedních buněk [30].

Hluboký rozvětvený kořenový systém přináší jisté výhody při suchých obdobích, delší kořeny dosáhnou k podzemním zásobám vody. Nicméně i rostliny s malým kořenovým systémem mohou odolávat suchu, protože jejich hospodaření s vodou je efektivnější [32].

2.3 Příjem minerálních živin

Rostliny přijímají minerální živiny téměř výhradně ve formě iontů z půdního roztoku pomocí kořenového systému. Nicméně rostlina může tyto látky přijímat i pomocí listů, toho se využívá v zemědělství při aplikaci tekutých hnojiv přímo na listy [30].

Příjem vody a minerálních látek nemůže fungovat na stejném principu. Vstřebávání iontů si musí rostlina sama regulovat, protože rostlina nepřijímá rozpuštěné ionty ve stejné koncentraci ve které se vyskytují v půdním roztoku a podíl látek v půdním roztoku neodpovídá jejich zastoupení v rostlinné biomase.

Vzhledem k nízké koncentraci většiny iontů v půdním roztoku musí být existovat způsob transportu, který jde proti koncentračnímu gradientu (z nižší koncentrace iontů v půdním roztoku do vyšší koncentrace iontů v rostlině). Kořeny musí být schopny regulovat příjem jednotlivých iontů nezávisle na sobě. Membrány se velmi významně podílejí na řízení příjmu iontů rostlinou [30].

Mezi makrobiogenní¹⁴ prvky patří uhlík, vodík, kyslík, dusík, fosfor, draslík, vápník, síra, hořčík a železo. Mezi mikrobiogenní¹⁵ prvky můžeme zařadit zinek, bor, měď, kobalt, mangan, chlor a další prvky.

¹⁴Makrobiogenní prvky jsou prvky, které jsou funkční v metabolismu rostliny a vyskytují se v rostlině v setinách procent (železo) až v desítkách procent (uhlík).

¹⁵Mikrobiogenní prvky jsou prvky, které jsou funkční v metabolismu rostliny a vyskytují se v rostlině v koncentraci menší než tisícina procenta na sušinu.

3 Materiál a metody zpracování

3.1 Materiál a metody kultivace

Pro výzkum byly použity čtyři genotypy pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), které byly poskytnuty šlechtitelskou firmou. Přesný postup šlechtění je obchodním tajemstvím. Genotypy jsou pojmenované *Ta1*, *Ta2*, *Ta3* a *Ta4*.

Rostliny byly pěstovány v 1/2 Hoaglandově roztoku, složení roztoku je uvedeno v (Tab. 1). 50 zrn každého genotypu pšenice seté bylo umístěno na vlhký filtrační papír na dva dny do lednice pro synchronizaci klíčení. Následně byla zrna přemístěna na 5 dní do kultivační komory (15 °C, 60% vlhkost). Pátý den byly semenáče vloženy do hydroponického systému, a ponechány růstu v 1/2 Hoaglandova roztoku. Ve věku 3 týdnů byly rostliny rozděleny do dvou skupin, kontrolní, která byla dále pěstována v 1/2 Hoaglandově roztoku a stresovaná, kdy do 1/2 Hoaglandova roztoku byl přidán 20% polyethylenglykol (PEG) 6000, který omezuje buňkám příjem vody a simuluje tak stres suchem. Rostliny byly pěstovány v prostředí, které simuluje prodlouženou denní dobu (světlo 16 h a zbylých 8 h tma). Každá skupina byla reprezentována 25 rostlinami.

Soli stopových prvků				Soli živin meq/l	
sůl	mg/l	prvek	ppm	sůl	1/2 roztok
H ₃ BO ₃	0,143	B	0,025	Ca(NO ₃) ₂	4
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	1,81	Mn	0,5	KNO ₃	3
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,22	Zn	0,05	MgSO ₄	2
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,08	Cu	0,02	NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5
H ₂ MoO ₄ · H ₂ O	0,02	Mo	0,01		
FeSO ₄	0,1 ppm Fe přidáno každý druhý den				

Tabulka 1: Složení 1/2 Hoaglandova roztoku

3.2 Měření velikosti kořenového systému a analýza sušiny

Kořenový systém čtyři týdny starých rostlin byl skenován pomocí STD4800 SCANNERu a analyzován programem WinRHIZO, verze Arabidopsis 2013e. Kořenový systém a nadzemní části byly vysušeny v 80 °C po dobu 12 h. Sušina nadzemních částí a kořenového systému byla zvážena.

3.3 Měření a vyhodnocení relativního obsahu vody

Relativní obsah vody (*relative water content*, *RWC*) v listech se vypočítá podle vztahu:

$$RWC = \frac{(W - DW)}{(TW - DW)} \times 100, \quad (3.1)$$

kde *W* je váha čerstvých vzorků, *DW* (*dry weight*) je váha sušeného vzorku a *TW* (*turgid weight*) je váha plně nasyceného vzorku vodou. Relativní obsah vody se udává v procentech,

Z listů byla odštíhnutá asi 5 cm dlouhá část, která byla ihned zvážena, v Rov. 3.1 tato hodnota představuje *W*. Následně byl vzorek vložen do zkuševky plné vody. Po 24 hodinách inkubace ve 4 °C ve tmě byly vzorky znovu

zváženy, v Rov. 3.1 tato hodnota představuje TW . Na závěr byly vzorky sušeny po dobu 24 h při teplotě 80 °C a zváženy, v Rov. 3.1 je tato hodnota DW .

3.4 Měření aktivity antioxidantních enzymů

Bylo odebráno 150 mg vzorku kořene a ihned zamrazeno v tekutém dusíku. Takto odebraný vzorek byl homogenizován za pomoci třecí misky a tloučku v 750 μ l extrakčního pufru (0,1 M K-fosfátový pufr pH = 7, 0,1 mM EDTA–Na⁺, 1% PVPP, 2 mM DTT, 0,5 mM Pefabloc) a centrifugován po dobu 30 min, 4 °C a 12000 rpm. Supernatant obsahující proteiny byl použit pro spektrofotometrické měření enzymatické aktivity.

Pro měření aktivity APX bylo smícháno 25 μ l extraktu s 248 μ l 50 mM roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného (KH₂PO₄) a 22 μ l 5 mM roztoku askorbové kyseliny. Následně byla změřena absorbance¹⁶ vzorků ve spektrofotometru při 290 nm. Toto měření fungovalo jako kalibrovací hodnota, *blank*. Následně bylo přidáno 5 μ l H₂O₂, který byl připraven smícháním 85 μ l 30% H₂O₂ s 10 ml vody. Vzorky byly měřeny ve spektrofotometru při 290 nm každých deset sekund po dobu dvou minut.

K měření aktivity POX bylo smícháno 1 μ l extraktu, 164 μ l reakčního pufru (150 mM roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (KH₂PO₄) o pH = 6,1) a 24 μ l roztoku guajakolu. Roztok guajakolu byl získán smícháním 40 μ l guajakolu s 40 μ l glycerolu a následným doplněním do 5 ml destilované vody. Byl změřen *blank*, následně byl přidán H₂O₂ (85 μ l 30% H₂O₂ v 10 ml vody). Přidání peroxidu započalo celou reakci. Reakce byla měřena ve spektrofotometru při 470 nm po deseti sekundách po dobu dvou minut.

3.5 Vyhodnocení aktivity enzymů

Pro stanovení aktivity byly využity spektrofotometrické metody. Při výpočtu se vychází z Lambert-Beerova zákona o vztahu koncentrace látky a její absorbanci.

Při průtoku světelného toku roztokem dochází k jeho zeslabení, protože částice látek přítomných v roztoku část elektromagnetického záření pohltí (absorbují). Záření procházející kyvetou dopadá na detektor spektrofotometru, který měří jeho intenzitu. Proto zavádíme veličinu zvanou transmitance (propustnost, označována písmenem T), která je definována podle Rov. 3.2

$$T = \frac{I}{I_0}, \quad (3.2)$$

kde je I_0 je intenzita záření vstupujícího do kyvety, a I je intenzita záření po průchodu kyvetou. Transmitance tedy nabývá hodnot $T \in \langle 0, 1 \rangle$.

Množství absorbovaného záření lze vypočítat z hodnoty transmitance, podle Rov. 3.3:

$$A = -\log(T) = \log \frac{1}{T} \Leftrightarrow T = 10^{-A}, \quad (3.3)$$

kde A je veličina zvaná absorbance a je definována jako záporný dekadický logaritmus transmitance.

¹⁶Absorbance je veličina udávající, kolik světla (o určité vlnové délce) bylo pohlceno měřeným vzorkem.

Lambert-Beerův zákon je definován jako:

$$A = cl\varepsilon \Leftrightarrow T = 10^{-cl\varepsilon}, \quad (3.4)$$

kde A je absorbance, c je molární koncentrace, l je délka kyvety, ε je molární absorpční koeficient a T je transmitance.

Pro výpočet aktivity enzymu je nutné spočítat počet molů dané látky, která vznikla nebo zreagovala v reakci katalyzované studovaným enzymem za jednotku času:

$$\text{Aktivita enzymu} = \frac{n}{t} = \frac{\Delta AV_1}{\varepsilon lt}, \quad (3.5)$$

kde $\frac{n}{t}$ je aktivita enzymu, ΔA je změna absorbance za čas, V_1 je objem reakční směsi. Aktivitu můžeme přepočítat na jeho koncentraci, výsledný vzorec bude vypadat takto:

$$\text{Aktivita enzymu} = \frac{n}{t} = \frac{\Delta AV_1}{\varepsilon l t c_e}, \quad (3.6)$$

všechny veličiny jsou totožné s Rov. 3.5 a c_e je koncentrace μg enzymu na μl vzorku.

3.6 Statistické vyhodnocení

Statistická signifikance rozdílů byla vypočítána neparametrickým Kruskal-Wallis Anova & Median testem.

4 Výsledky

Kořenový systém čtyř genotypů pšenice seté byl studován v hydroponickém systému. Rostliny rostoucí v 1/2 Hoaglandově roztoku byly týden stresovány přídatkem 20% PEG 6000, který se pro simulaci podmínek stresu suchem běžně používá (Obr. 1).

Následně byla analyzována celková délka kořenového systému, sušina nadzemní části a kořenového systému, relativní obsah vody v listech a aktivita antioxidantních enzymů askorbátperoxidasy a guajakolperoxidasy v kořenech.



Obrázek 1: Rozdíly ve vzrůstu rostlin pšenice seté u kontrolní skupiny (vlevo) a stresované (vpravo).

4.1 Celková délka kořenového systému

Kořenový systém jednotlivých rostlin byl skenován a následně byla analyzována celková délka kořenového systému. Na první pohled můžeme studované genotypy rozdělit podle architektury kořenového systému do dvou skupin. V kontrolních podmínkách měly genotypy *Ta3* a *Ta4* kořeny kratší, ale hustší a celková délka jejich kořenových systémů byla menší než u genotypů *Ta1* a *Ta2*, které měly kořenů méně, ale byly delší (Obr. 2, Obr. 3a). V kontrolních podmínkách vykazoval nejdelší kořenový systém genotyp *Ta3*, naopak nejkratší kořenový systém byl naměřen u genotypu *Ta2*.

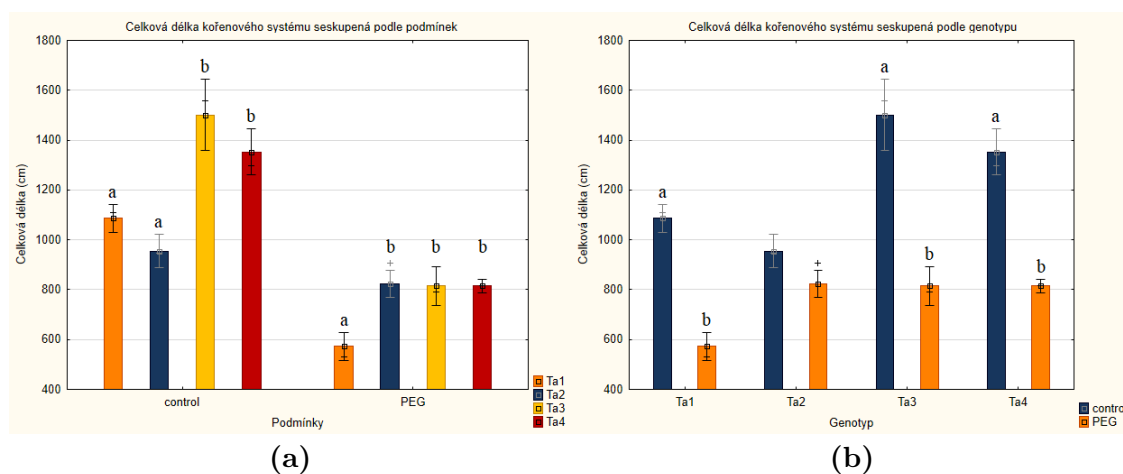
Aplikace 20% PEG 6000 měla za následek signifikantní redukci délky kořenů u všech genotypů až na genotyp *Ta2* (Obr. 3b). Nejmenší celkový kořenový systém ve stresových podmínkách měl genotyp *Ta1*, ostatní tři měly srovnatelnou délku celého kořenového systému.

4.2 Váhy sušiny kořenového systému

Rovněž byla měřena hmotnost sušiny kořenového systému. Nejvyšší hmotnost sušiny kořenového systému v kontrolních podmínkách byla naměřena u genotypu



Obrázek 2: Rozdílnost v kořenovém systému čtyř genotypů pšenice seté. Zleva kultivar *Ta1*, *Ta2*, *Ta3* a *Ta4*. Genotypy *Ta1* a *Ta2* mají menší hustotu kořenového systému, ale kořeny jsou delší. Kořenový systém genotypů *Ta3* a *Ta4* je naopak hustší a jednotlivé kořeny jsou kratší.



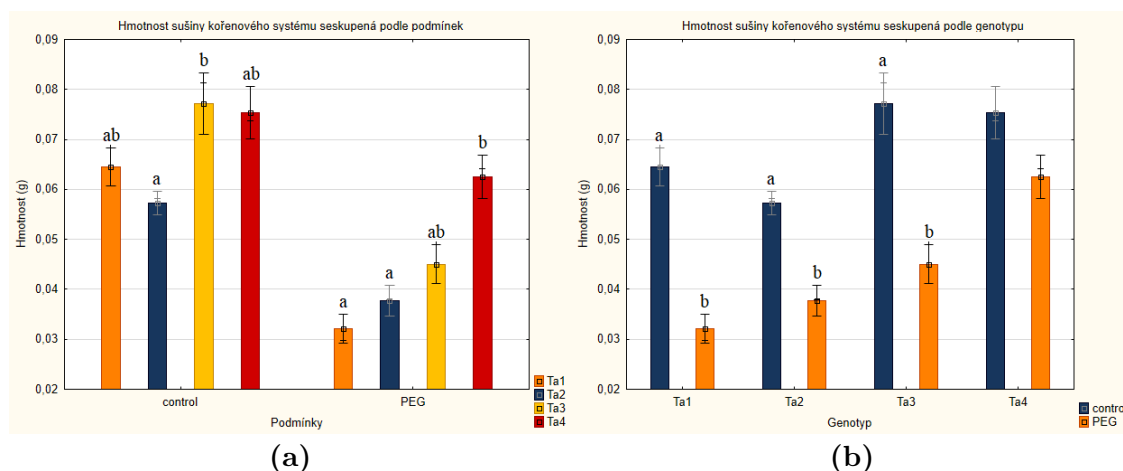
Obrázek 3: Celkové délky kořenových systémů čtyř genotypů pšenice seté v kontrolních podmínkách a ve stresu 20% PEG 6000. *a* a *b* znamená statisticky významný (signifikantní) rozdíl, p -value < 0,05. Obr. 3a graf seskupený podle podmínek, Obr. 3b graf seskupený podle genotypů.

Ta3 a nejnižší hmotnost měl kořenový systém genotypu *Ta2* (Obr. 4a).

Ve stresu měl nejvyšší hmotnost vysušeného kořenového systému genotyp *Ta4*, nejnižší genotyp *Ta1*.

Ve stresu se u všech genotypů zmenšila hmotnost vysušeného kořenového systému. Signifikantní pokles byl zaznamenán u genotypů *Ta1*, *Ta2* a *Ta3* (Obr. 3b),

u genotypu *Ta4* nebyl pokles statisticky signifikantní (viz Obr. 4b).

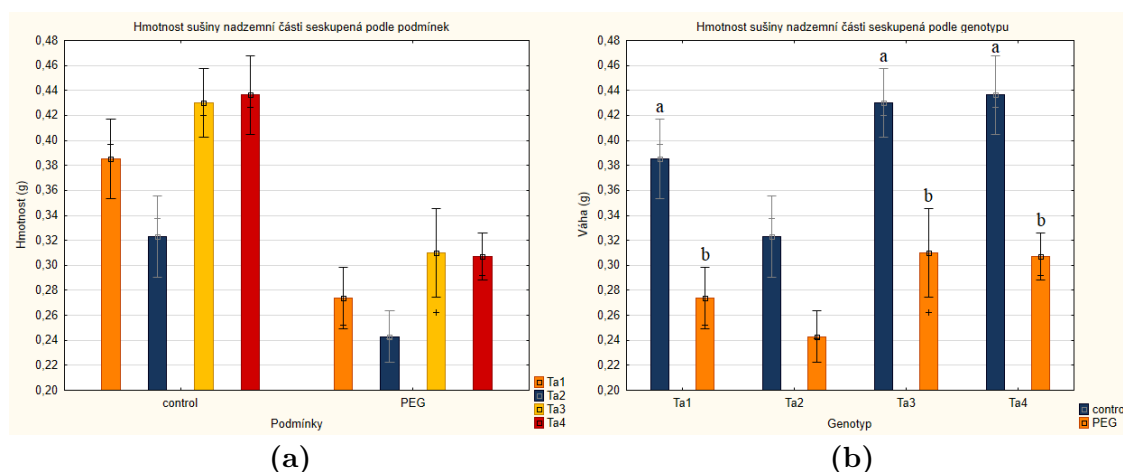


Obrázek 4: Hmotnost vysušeného kořenového systému čtyř genotypů pšenice seté v kontrolních podmínkách a ve stresu 20% *PEG 6000*. *a* a *b* znamená statisticky významný (signifikantní) rozdíl, $p\text{-value} < 0,05$. Obr. 4a graf seskupený podle podmínek, Obr. 4b graf seskupený podle genotypů.

4.3 Váhy sušiny nadzemní části rostliny

Dále byla analyzována sušina nadzemní části rostlin. Jak v kontrolních, tak ve stresových podmínkách nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi studovanými genotypy pšenice (Obr. 5a).

Pokud se zaměříme na změny hodnot u jednotlivých genotypů, zjistíme, že u všech genotypů došlo ve stresu k snížení hmotnosti nadzemní části, pouze u genotypu *Ta2* byla tato změna nesignifikantní vzhledem ke kontrolním podmínkám. (Obr. 5b).

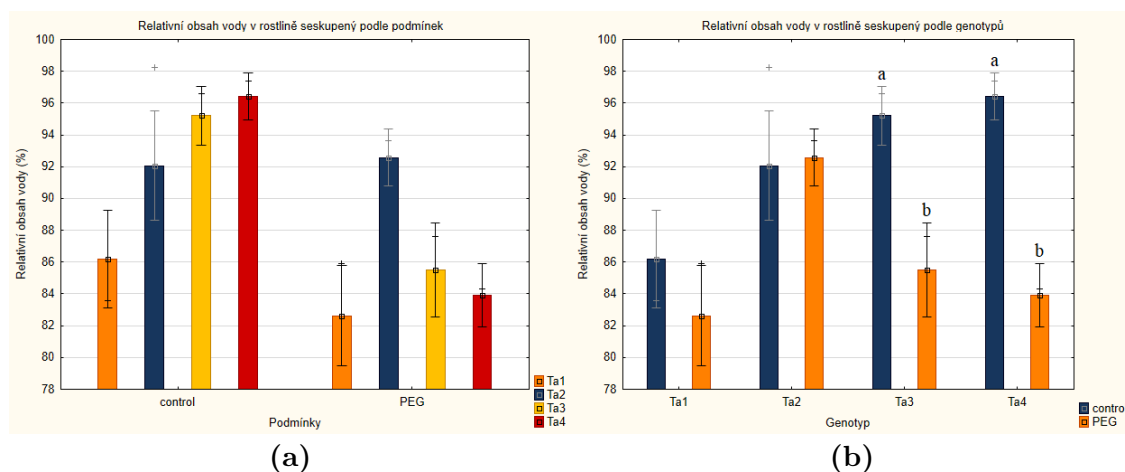


Obrázek 5: Váha vysušené nadzemní části rostlin genotypů pšenice seté v kontrolních podmínkách a ve stresu 20% *PEG 6000*. *a* a *b* znamená statisticky významný (signifikantní) rozdíl, $p\text{-value} < 0,05$. Obr. 5a graf seskupený podle podmínek, Obr. 5b graf seskupený podle genotypů.

4.4 Relativní obsah vody v listech

Dále byla stanovena hodnota relativního obsahu vody v listech. Mezi genotypy v obou podmínkách nebyl pozorován rozdíl v relativním obsahu vody (Obr. 6a).

U genotypů *Ta3* a *Ta4* se hodnota relativního obsahu vody v listech signifikantně snížila ve stresu suchem. Zatímco u genotypů *Ta1* a *Ta2* se relativní obsah vody v listech nezměnil (Obr. 6b). Největší pokles hodnot byl naměřen u genotypu *Ta4*.



Obrázek 6: Hodnoty relativního obsahu vody (*RWC*) v rostlinách genotypů pšenice seté v kontrolních podmínkách a ve stresu 20% *PEG 6000*. *a* a *b* znamená statisticky významný (signifikantní) rozdíl, $p\text{-value} < 0,05$. Obr. 6a graf seskupený podle podmínek, Obr. 6b graf seskupený podle genotypů.

4.5 Aktivita enzymu APX

Byla stanovena aktivita enzymu askorbátperoxidasy. Nejvyšší aktivita APX byla zaznamenána v rostlinách genotypu *Ta2*, naopak nejmenší aktivita v kontrolních podmínkách byla naměřena u genotypu *Ta1* (Obr. 7a).

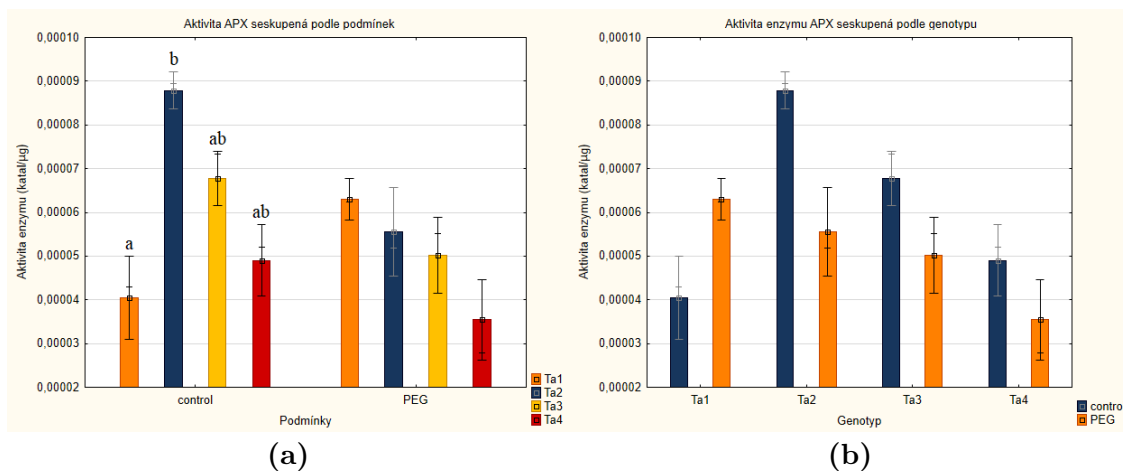
U genotypu *Ta1* se aktivita enzymu APX ve stresových podmínkách zvýšila, u ostatních genotypů se aktivita snížila.

4.6 Aktivita enzymu POX

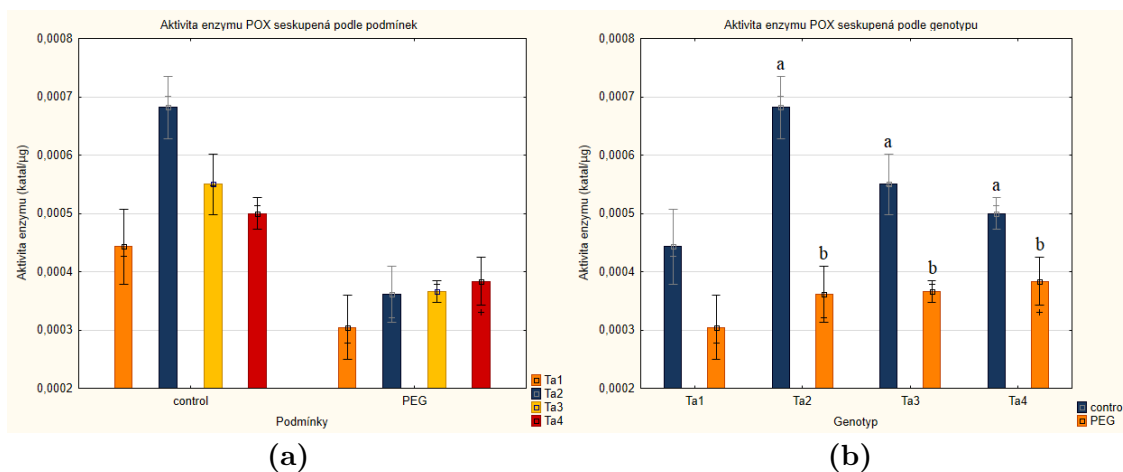
Byla stanovena hodnota aktivity enzymu guajakolperoxidasy. V kontrolních podmínkách byl nejaktivnější enzym POX u genotypu *Ta2*, nejnižší aktivita byla naměřena u genotypu *Ta1*.

Ve stresových podmínkách měly genotypy *Ta2*, *Ta3* a *Ta4* velmi podobné hodnoty aktivity enzymu POX (viz Obr. 8a). U genotypu *Ta1* byla aktivita i ve stresových podmínkách nejmenší.

U genotypů *Ta2*, *Ta3* a *Ta4* došlo k signifikantnímu poklesu ve stresových podmínkách, u genotypu *Ta1* nebyl naměřen signifikantní pokles v aktivitě POX (viz Obr. 8b).



Obrázek 7: Hodnoty aktivity enzymu *APX* v rostlinách genotypů pšenice seté v kontrolních podmínkách a ve stresu 20% *PEG 6000*. *a* a *b* znamená statisticky významný (signifikantní) rozdíl, $p\text{-value} < 0,05$. Obr. 7a graf seskupený podle podmínek, Obr. 7b graf seskupený podle genotypů.



Obrázek 8: Hodnoty aktivity enzymu *POX* v rostlinách genotypů pšenice seté v kontrolních podmínkách a ve stresu 20% *PEG 6000*. *a* a *b* znamená statisticky významný (signifikantní) rozdíl, $p\text{-value} < 0,05$. Obr. 8a graf seskupený podle podmínek, Obr. 8b graf seskupený podle genotypů.

5 Diskuse

Stres je velmi významným faktorem v životě lidí, zvířat i rostlin. Rostliny jsou náchylnější na změny prostředí, které jim způsobují nejrůznější stresy.

Jedním z nejvýznamnějších a nejběžnějších stresorů je nedostatek vody. Sucho se velmi výrazně projevuje ve výnosnosti zemědělských plodin. Jeho dopady vnímáme i my, obyvatelé střední Evropy, kteří se zatím běžně nepotýkáme s nedostatkem vody.

Pro zemědělství je nutné vyšlechtit odrůdy, které budou vůči suchu rezistentní. Při šlechtění suchu rezistentních odrůd bychom neměli zapomínat na kořenový systém, který přijímá vodu a živiny. Šlechtitelé se doposud nezabývali při studiu nebo šlechtění nových odrůd pšenice kořenovým systémem. Avšak odolnost rostlin vůči stresu je spjata s odlišným utvářením kořenového systému. Kořenový systém také souvisí se způsobem, jakým rostlina hospodaří s vodou. Kořenová soustava přímo ovlivňuje přizpůsobivost celé rostliny, zejména dosažení dobrého výnosu i za nepříznivých podmínek prostředí.

Bohužel zatím neexistuje ucelená metodika pro zkoumání kořenového systému, která by se dala použít pro všechny prostředí. Náročné na technické vybavení je využití tzv. minirhizotronů (speciálních prosklených boxů s kamerami) [33]. Na poli se nejčastěji využívá metoda tzv. *soil core*, kdy se odebere vzorek o známém objemu, kořeny se vyplaví vodou a určuje se jejich hmotnost, délka, průměr a počet [34]. Jedná se ale o metodu destruktivní.

Relativně přesné metody studia architektury kořenového systému jsou magnetická rezonance a rentgen, ale ty se nedají použít v polních podmínkách [35]. Velikost kořenového systému lze nyní v polních podmínkách hodnotit za pomoci měření elektrické kapacity, která předpokládá, že všechny biologické membrány mají specifickou elektrickou kapacitu na jednotku plochy [36]. Platí tedy, že čím je kořenový systém větší, tím je elektrická kapacita větší.

Genotyp, který je nejodolnější vůči stresu suchem, by neměl vykazovat velké změny ve své stavbě v kontrolních podmínkách a ve stresu. Celková délka kořenového systému, hmotnosti sušiny kořenového systému a nadzemní části rostliny by se neměly výrazně lišit. Velká změna v hodnotách signalizuje, že rostlina je stresem výrazně zasažena.

Naším cílem bylo zjistit, zda by se jednoduché a levné měření aktivity anti-oxidačních enzymů, které vyžaduje jen 150 mg vzorku, dalo využít jako selekční marker při výběru odrůd odolných stresu suchem. Rostliny zkoumaných genotypů pšenice seté byly pěstovány v hydroponických podmínkách 1/2 Hoaglandova roztoku a ve stresových podmínkách 20% PEG 6000 po dobu 1 týdne. Byla sledována celková délka kořenového systému, hmotnost sušiny kořenového systému a nadzemní části, relativní obsah vody v rostlině a aktivita APX a POX.

Podle kořenového systému můžeme rozlišit genotypy *Ta1* a *Ta2*, které měly delší a řidší kořeny, od genotypů *Ta3* a *Ta4*, které měly kořenový systém hustší, ale s kratšími jednotlivými kořeny. Nejmenší změna v celkové délce kořenového systému byla naměřena u genotypu *Ta2*, z čehož vyplývá, že tento genotyp byl stresem zasažen nejméně.

Rovněž u hmotnosti kořenového systému můžeme v kontrolních podmínkách pozorovat rozdělení genotypů do dvou skupin (*Ta1* a *Ta2*, *Ta3* a *Ta4*). Hmotnost kořenového systému se ve stresových podmínkách nelišila pouze u genotypu *Ta4*.

Hmotnost sušiny nadzemní části je parametr, který je velmi důležitý pro zemědělce při výběru nejvhodnějšího genotypu a v současnosti je hlavním ukazatelem pro selekci vyšlechtěných rostlin. Genotyp *Ta2* měl ze všech genotypů nejmenší váhu sušiny nadzemní části, ale zároveň se váha sušiny ve stresových podmínkách proti kontrolním podmínkám nejméně změnila. Pokud bychom vybírali ze studovaných genotypů ten, který je nejodolnější vůči suchu, museli bychom vybrat genotyp *Ta2*.

Relativní obsah vody ukazuje, jak rostlina hospodaří s vodou. Naměřené hodnoty (Obr. 6) ukazují, že u genotypu *Ta2* se relativní obsah vody v rostlině ve stresu proti kontrolním podmínkám nezměnil. To může znamenat, že rostlina záměrně zadržuje vodu a následně není postižena stresem tak významně jako ostatní genotypy, u kterých došlo k výraznému poklesu relativního obsahu vody. Z výsledků je dále patrné, že genotypy s delšími kořeny mají vyšší relativní obsah vody ve srovnání s genotypy s bohatým, ale kratším kořenovým systémem.

Předchozí studie ukázaly, že aktivita antioxidantních enzymů v kořenech odrůd pšenice seté, které byly odolné stresu suchem, se po působení tohoto stresu suchem snížila [37, 38].

V porovnání kontrolních a stresových podmínek genotyp *Ta2* nevykazoval změnu v celkové délce kořenového systému ani v relativním obsahu vody. Aktivita antioxidantních enzymů askorát peroxidasy a guaajakol peroxidasy byla v kontrolních podmínkách největší a ve stresu poklesla, proto můžeme odvodit, že genotyp *Ta2* je nejodolnějším vůči stresu suchem ze zkoumaných genotypů. Dále můžeme uzavřít, že kořenový systém, který má delší jednotlivé kořeny, ale je řídký, je výhodnější pro rostliny rezistentní na stres suchem.

Šlechtitelé doposud nevyužívají metody zkoumání kořenového systému a aktivity antioxidantních enzymů při výběru vhodných odrůd. Měřením několika parametrů jsme určili, že odrůda *Ta2* je nejodolnější vůči stresu suchem. Aktivita antioxidantních enzymů byla u tohoto genotypu nejvyšší v kontrolních podmínkách a se stresem se výrazně snížila. Mohli bychom říci, že rostlina je předpřipravena na budoucí možné stresové podmínky, které kořen zachytí jako první. Obdobné výsledky enzymatické aktivity byly pozorovány při studiu stresu rezistentní odrůdy pšenice *Plainsman* a stresu citlivé *Cappelle Desprez* [37, 38].

Můžeme říci, že by se měření aktivity antioxidantních enzymů dalo použít pro selekci odolnějších odrůd, ale je nutné měření provést na rostlinách pěstovaných na poli. Rostliny rostoucí v běžných podmínkách na poli, se budou vyvíjet jinak, než rostliny pěstované v laboratoři. V běžných podmínkách se nevyskytuje pouze jeden druh stresu, ale často na rostlinu působí více stresů zároveň.

Do dalšího výzkumu by bylo vhodné zahrnout měření více parametrů, jako fotosyntetické a gazometrické parametry (měření fluorescence chlorofylu, stanovení vodního potenciálu, měření otevřenosti průduchů) a zaměřit se na celkový stav rostliny jako potvrzení vhodnosti naší metodiky selekce odolnějších odrůd.

6 Závěr

Stres suchem je významným faktorem v životě rostlin. Velmi výrazně se podepisuje na výnosu zemědělských plodin, proto je nutné šlechtit odrůdy, které jsou vůči suchu odolné. Při šlechtění a selekci odrůd odolných vůči suchu nesmíme opomenout zohlednit roli kořenového systému. Kořeny jsou zodpovědné za příjem vody a živin rostlinou, a tudíž hrají významnou roli v odolnosti rostliny vůči stresu suchem. Dále jsou důležité antioxidantní enzymy, které zmírňují dopady stresu suchem.

Genotypy odolné vůči stresu suchem výrazně nemění svou stavbu ve stresových podmínkách a hodnoty relativního obsahu vody v rostlině se v kontrolních podmínkách a ve stresu nemění. Aktivita antioxidantních enzymů v kořenech odolných genotypů ve stresu suchem poklesne. Tyto předpoklady splňuje genotyp *Ta2*, jehož kořenový systém je řidší a jednotlivé kořeny jsou delší.

Měření celkové délky kořenového systému, měření sušiny kořenového systému a nadzemní části, stanovení relativního obsahu vody v listech a měření aktivity antioxidantních enzymů potvrdilo, že měření aktivity antioxidantních enzymů v kořeni by mohlo být vhodnou metodikou k rychlé selekci odolnějších genotypů. Pro zavedení do praxe jsou ale nutná další měření parametrů, které se nyní používají k selekci takových odrůd (fotosyntetické a gasometrické parametry). Je žádoucí, aby byl experiment zopakován v polních podmínkách, kde nebudou rostliny vystaveny pouze stresu suchem, ale i jiným druhům stresu (vysoké teploty, nedostatek živin).

Reference

- [1] AMTMANN, A. Abiotic Stress and Plant Genome Evolution. Search for New Models. *PLANT PHYSIOLOGY* [online]. 2005, **138**(1), 127-130 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1104/pp.105.059972. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.105.059972>.
- [2] ZHU, Jian-Kang. SALT AND DROUGHT STRESS SIGNAL TRANSDUCTION IN PLANTS. *Annual Review of Plant Biology* [online]. 2002, **53**(1), 247-273 [cit. 2019-02-03]. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329. ISSN 1543-5008. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>.
- [3] MOSA, Kareem A. *Plant stress tolerance - an integrated omics approach*. New York, NY: Springer Science Business Media, 2017. ISBN 978-3-319-59377-7.
- [4] RHODES, David a NADOLSKA-ORCZYK, Anna. Plant stress physiology. *Encyclopaedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, <http://www.els.net>, 2001.
- [5] KARIM, Sazzad. *Exploring plant tolerance to biotic and abiotic stresses*. Uppsala, 2007. Disertace. Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences.
- [6] SHINOZAKI, Kazuo a Kazuko YAMAGUCHI-SHINOZAKI. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. 2000, **3**(3), 217-223 [cit. 2019-02-01]. DOI: 10.1016/S1369-5266(00)80068-0. ISSN 13695266. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526600800680>.
- [7] ZHU, Jian-Kang. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. 2001, **4**(5), 401-406 [cit. 2019-02-01]. DOI: 10.1016/S1369-5266(00)00192-8. ISSN 13695266. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526600001928>.
- [8] ALEXIEVA, V., I. SERGIEV, S. MAPELLI a E. KARANOV. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* [online]. 2001, **24**(12), 1337-1344 [cit. 2018-10-31]. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x. ISSN 0140-7791. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>.
- [9] BAISAK, Ranjita, Dharanidhar RANA, Patel B.B. ACHARYA a Manoranjan KAR. Alterations in the Activities of Active Oxygen Scavenging Enzymes of Wheat Leaves Subjected to Water Stress. *Plant and Cell Physiology* [online]. 1994, **35**(3), 489-495 [cit. 2018-10-31]. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078620. ISSN 1471-9053. Dostupné z: <https://academic.oup.com/pcp/article/35/3/489/1910377/Alterations-in-the-Activities-of-Active-Oxygen>.

- [10] TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* [online]. 2003, **552**(2), 335-344 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.049478. ISSN 0022-3751. Dostupné z: <http://www.jphysiol.org/cgi/doi/10.1113/jphysiol.2003.049478>.
- [11] APEL, Klaus a Heribert HIRT. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* [online]. 2004, **55**(1), 373-399 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701. ISSN 1543-5008. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>.
- [12] WINTERBOURN, Christine C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology* [online]. 2008, **4**(5), 278-286 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1038/nchembio.85. ISSN 1552-4450. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nchembio.85>.
- [13] PITERKOVÁ, Jana, et al. Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chem. Listy* [online]. 2005, **99**(5), 455-466 [cit. 2019-01-27]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2005_07_455-466.pdf.
- [14] CIRCU, Magdalena L. a Tak Yee AW. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2010, **48**(6), 749-762 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089158490900793X>.
- [15] BERG, Jeremy M, John L TYMOCZKO a Lubert STRYER. *Biochemistry*. 6th ed. New York: W. H. Freeman, 2006. ISBN 978-071-6767-664.
- [16] KELEŞ, Yüksel a Işıl ÖNCEL. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Science* [online]. 2002, **163**(4), 783-790 [cit. 2018-10-31]. DOI: 10.1016/S0168-9452(02)00213-3. ISSN 01689452. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945202002133>.
- [17] SAIRAM, Raj Kumar, K.Veerabhadra RAO a G.C SRIVASTAVA. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* [online]. 2002, **163**(5), 1037-1046 [cit. 2018-10-31]. DOI: 10.1016/S0168-9452(02)00278-9. ISSN 01689452. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945202002789>.
- [18] MIKA, A. Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. *PLANT PHYSIOLOGY* [online]. 2003, **132**(3), 1489-1498 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1104/pp.103.020396. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.103.020396>.
- [19] VIANELLO, Angelo, Marco ZANCANI, Gabriella NAGY a Francesco MACRÌ. Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranes oxidizes ascorbate. *Journal of Plant Physiology* [online]. 1997,

- 150**(5), 573-577 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1016/S0176-1617(97)80321-5. ISSN 01761617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161797803215>.
- [20] JEBARA, Salwa, Moez JEBARA, Férid LIMAM a Mohamed Elarbi AOUANI. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology* [online]. 2005, **162**(8), 929-936 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1016/j.jplph.2004.10.005. ISSN 01761617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.10.005>.
- [21] UARROTA, Virgílio Gavicho, Rodolfo MORESCO, Eder Carlos SCHMIDT, et al. The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. *Food Chemistry* [online]. 2016, **197**, 737-746 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.11.025. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615301709>.
- [22] DUBCOVSKY, J. a J. DVORAK. Genome Plasticity a Key Factor in the Success of Polyploid Wheat Under Domestication. *Science* [online]. 2007, **316**(5833), 1862-1866 [cit. 2019-01-27]. DOI: 10.1126/science.1143986. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1143986>.
- [23] SHEWRY, P. R. Wheat. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2009, **60**(6), 1537-1553 [cit. 2019-01-27]. DOI: 10.1093/jxb/erp058. ISSN 0022-0957. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erp058>.
- [24] BRENCHLEY, Rachel, Manuel SPANNAGL, Matthias PFEIFER, et al. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* [online]. 2012, **491**(7426), 705-710 [cit. 2019-01-27]. DOI: 10.1038/nature11650. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nature11650>.
- [25] DVORAK, J., K. R. DEAL, M.-C. LUO, F. M. YOU, K. VON BORSTEL a H. DEHGhani. The Origin of Spelt and Free-Threshing Hexaploid Wheat. *Journal of Heredity* [online]. 2012, **103**(3), 426-441 [cit. 2019-01-27]. DOI: 10.1093/jhered/esr152. ISSN 0022-1503. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jhered/article-lookup/doi/10.1093/jhered/esr152>.
- [26] JIA, Jizeng, Shancen ZHAO, Xiuying KONG, et al. Aegilops tauschii draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature* [online]. 2013, **496**(7443), 91-95 [cit. 2019-01-27]. DOI: 10.1038/nature12028. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nature12028>.
- [27] STŘEDA, Tomáš a Anna HEŘMANSKÁ. Šlechtění na větší kořenový systém přináší efektivnější využití vody a živin. *Živa. Academia*, 2015, **2015**(3), 48-50.

- [28] GREGORY, P. J., M. MCGOWAN, P. V. BISCOE a B. HUNTER. Water relations of winter wheat: 1. Growth of the root system. *The Journal of Agricultural Science* [online]. 1978, **91**(01), 91-102 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1017/S0021859600056653. ISSN 0021-8596. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0021859600056653.
- [29] HABERLE, Jan, Tomáš STŘEDA, Pavel SVOBODA, Barbora HENZLOVÁ a Gabriela KUREŠOVÁ. Kořenový systém plodin pro 21. století — efektivní příjem vody a živin. In: *Monitoring přírodního prostředí*. MENDELU, VÚMOP, 2018. ISBN 978-80-7509-570-1.
- [30] PROCHÁZKA, Stanislav. *Botanika: morfologie a fyziologie rostlin*. Vyd. 3., nezměn. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-125-8.
- [31] KERK, Nancy M a Ian M SUSSEX. Roots and Root Systems. *ELS* [online]. Chichester, UK, 2001, 2001-04-19 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1038/npg.els.0002058. ISBN 0470016175. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0002058>.
- [32] AKMAN, Hayati. Wheat Root System, Genetics and Methodology for Evaluation of Root Characteristics: A Review. *Selcuk Agriculture and Food Science*. 2011, **25**(07), 109-117.
- [33] AMATO, M., F. LUPO, G. BITELLA a R. BOCHICCHIO. A high quality low-cost digital microscope minirhizotron system. *Computers and Electronics in Agriculture* [online]. 2012, **80**, 50-53 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.compag.2011.10.014. ISSN 01681699. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2011.10.014>.
- [34] PRIKNER, P., F. LACHNIT a F. DVOŘÁK. A new soil core sampler for determination bulk density in soil profile. *Plant, Soil and Environment* [online]. 2011, **50**(No. 6), 250-256 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.17221/4029-PSE. ISSN 12141178. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/242718249_A_new_soil_core_sampler_for_determination_bulk_density_in_soil_profile.
- [35] PFLUGFELDER, Daniel, Ralf METZNER, Dagmar VAN DUSSCHOTEN a Rüdiger REICHEL. Non-invasive imaging of plant roots in different soils using magnetic resonance imaging (MRI). *Plant Methods* [online]. 2017, **13**(1) [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1186/s13007-017-0252-9. ISSN 1746-4811. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0252-9>.
- [36] CSERESNYÉS, Imre, Katalin SZITÁR, Kálmán RAJKAI, Anna FÜZY, Péter MIK-, Ramóna KOVÁCS a Tünde TAKÁCS. Application of Electrical Capacitance Method for Prediction of Plant Root Mass and Activity in Field-Grown Crops. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2018, **9** [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.3389/fpls.2018.00093. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.00093/full>.

- [37] CSISZÁR, Jolán, Ágnes GALLÉ, Edit HORVÁTH, et al. Different peroxidase activities and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* [online]. 2012, **52**(3), 119-129 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/j.plaphy.2011.12.006. ISSN 09819428. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942811003664>.
- [38] CSISZÁR, Jolán. Peroxidase activities in root segments of wheat genotypes under osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis*. 2008, **52**(1), 155 - 156.