



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH **ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií

Bakalářská práce

Vliv ročníku na klíčivost a vzcházivost semen máku

Autorka práce: Olga Jelínková

Vedoucí práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.

České Budějovice
2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo provést nádobový pokus s rostlinami máku kontrolními a stresovanými suchem. U získaných semen byla následně testována klíčivost semen v normálních podmínkách a v podmínkách sucha simulovaného pomocí PEG 6000. Bylo zjištěno, že stres suchem u rostlin máku určených k produkci osiva sice snižuje výnos a kvalitu osiva, ale zároveň zlepšuje energii klíčivosti a samotnou klíčivost takto získaných semen.

V rámci této práce jsem dále testovala metodu rezonance povrchového plazmonu (SPR) jako potenciálně využitelnou metodu pro analýzu akumulace dehydrinů. Podařilo se mi ověřit využitelnost metody pro izolaci termostabilních proteinů a zároveň jsem potvrdila, že metoda SPR je potenciálně využitelná i pro analýzu akumulace dehydrinů v klíčících rostlinách máku.

Klíčová slova: Mák setý, klíčivost, stres suchem, metoda rezonance povrchového plazmonu

Abstract

The aim of this thesis was to perform an experiment with opium poppy control and drought stressed plants. Gained seeds were tested for germinability in normal conditions and during simulated drought stress induced with PEG 6000. It was found plants for seed production provides less seeds with lower quality, but the vigour and germinability of these seeds are better.

In this thesis I also tested the method of surface plasmon resonance as potentially suitable method for dehydrin accumulation analysis. I managed to verify method for thermostable proteins isolation and at the same time I confirmed, the SPR method is potentially usefull method for dehydrin accumulation analysis in opium poppy seedling plants.

Keywords: Opium poppy, germinability, drought stress, surface plasmon resonance method

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucímu práce prof. Ing. V. Čurnovi, Ph.D. za možnost práce v jeho laboratořích. Dále děkuji konzultantce Ing. Ireně Hoštičkové, Ph.D. za odborné rady a bezmeznou trpělivost. Také děkuji Ing. Andree Rychlé za poskytnutí osiva máku a Mgr. Martině Vráblové, Ph.D. za provedení analýzy SPR. Velké díky také patří tatškovi za pomoc s vyhotovením přístřešku a provedením nádobového pokusu a celé mé rodině za podporu. Experimentální výsledky byly získány s využitím velké výzkumné infrastruktury ENREGAT podporované MŠMT, č. projektu LM2018098.

Obsah

Úvod.....	8
1 Mák setý.....	9
1.1 Popis druhu.....	9
1.2 Technologie pěstování máku.....	11
1.3 Šlechtění máku v ČR.....	12
1.4 Klíčivost a vzházivost.....	13
1.5 Abiotické stresy.....	14
1.6 Stres suchem.....	16
1.6.1 Obranné mechanismy proti stresu suchem.....	17
1.6.2 Průduchy.....	18
1.6.3 Dehydriny.....	20
2 Cíle práce.....	21
3 Materiál a metody.....	22
3.1 Rostlinný materiál.....	22
3.2 Podmínky pěstování.....	22
3.3 Stanovení počtu průduchů a průduchového indexu listů.....	23
3.4 Stanovení průměrné výšky rostlin a HTS semen.....	24
3.5 Zkouška klíčivosti.....	24
3.6 Měření akumulace dehydrinů.....	25
3.6.1 Izolace termostabilních proteinů.....	26
4 Výsledky.....	27
4.1 Stanovení průměrné výšky rostlin a HTS semen.....	27
4.2 Stanovení počtu průduchů a průduchového indexu listů.....	27
4.3 Zkouška klíčivosti.....	28
4.4 Měření akumulace dehydrinů.....	30

5	Diskuse.....	32
6	Závěr	34
7	Seznam použité literatury.....	35
8	Seznam obrázků	42
9	Seznam tabulek	43
10	Seznam použitých zkratek.....	44

Úvod

Česká republika je pěstitelskou makovou velmocí, pochází od nás podstatná část světové produkce. Mák se u nás pěstuje od nepaměti a ve velkém, protože je pro Čechy tradiční a oblíbenou pochutinou. Podle údajů ČSÚ průměrný Čech zkonsumuje asi 400 gramů máku za rok. Po přepočtu tohoto množství na buchty se jedná o desítky buchety na hlavu za rok. V loňském roce se na českých polích vypěstovalo přibližně 29 tisíc tun máku.

Nejvýznamnější faktor, který omezuje produktivitu zemědělských plodin ve světovém měřítku je pravděpodobně sucho. Očekávané globální oteplování by mohlo vést k dalšímu zesílení těchto vlivů prostředí. Nicméně rostliny mají obranné strategie, kterými se brání. Pro výběr vhodných genotypů pro šlechtění je zapotřebí znát obranné mechanismy vůči nepříznivým faktorům prostředí a zároveň najít účinné metody selekce.

1 Mák setý

Mák setý pochází z předoasijského genového centra a údaje o jeho pěstování pochází již z neolitu (Kulovaná, 2001). U nás jsou první doklady o pěstování máku z doby bronzové (Havel et al., 2018), máme nálezy doloženy z roku 500, v době, kdy docházelo ke stěhování národů (Kulovaná, 2001). Mák setý byl popsán botanikem Linném v roce 1753. Kolem roku 1803 objevil německý lékárník Sertuner opiový alkaloid morfin, v čistém stavu jej získal v roce 1816 (Český modrý mák, 2019).

Mák je pro nezaměnitelnou chuť užíván v potravinářství (Český modrý mák, 2019) a má také význam ve farmacii (Vašák et al., 2003). Tkáně, především z makovic, produkují alkaloidy, které se po tisíciletí užívají pro tlášení nejkřutějších bolestí. Bohužel hrozí zneužití narkomany (Český modrý mák, 2019). Z máku se připravují jedny z nejnebezpečnějších drog. Opium i heroin jsou omamné látky způsobující závislost, které dodnes stojí za mnoha zničenými lidskými životy i válečnými konflikty. V některých zemích je pěstování máku dokonce zakázáno (Národní zemědělské muzeum, s.p.o.). Proto v Evropě, a to hlavně u nás v České republice, pěstujeme pouze bezpečné, neopiové máky výhradně pro potravinářské využití (Český modrý mák, 2019). Česká republika patří k nejvýznamnějším pěstitelům máku nejen v evropském, ale i světovém měřítku (Venclová, 2020), osevňovací plocha máku se v posledních letech zvětšuje. Zatímco v roce 2018 se u nás mák pěstoval na výměře 26 608 ha, tak v roce 2019 naši pěstitelé oseli plochu 35 778 ha. Produkce máku dosáhla 24 190 tun. V loňském roce se výměra máku na našich polích opět zvýšila. Podle sdělení Ing. Václava Lohra u nás mák pěstovalo 839 pěstitelů (Honsová, 2020).

V Jihozápadní Asii, především v Turecku a Iránu jsou mladé rostliny máku konzumovány jako salát. Odrůdy máku pěstované k potravinářskému využití se podstatně liší od průmyslových odrůd pro farmaceutický průmysl. V zahradách se lze setkat s odrůdami máku vyšlechtěnými pro okrasné účely (Kuchtová et al., 2013).

1.1 Popis druhu

Mák setý *Papaver somniferum L.*, čeleď *Papaveraceae* – makovité, jedná se o jednoletou olejninu s velkou tradicí pěstování v České republice. Pěstuje se ve formě jarní (seje se na jaře, květy většinou bílé) nebo ozimé (seje se na podzim, má fialové květy). Kořenový systém se skládá z jednoho kulovitěho kořene, dosahujícího do hloub-

ky 50 až 80 cm a mnoha jemných postranních kořenů (Pelikán et al., 2015). Lodyha je přímá, nejčastěji lysá nebo jen řídce chlupatá, modře ojíňená (Pazdera, 2015), 30 až 180 cm vysoká, vyplněná dřevem. Některé odrůdy mají lodyhu nevětvenou nebo jen slabě větvenou (2 až 5 větví), jiné vytvářejí i 30 a více větví, což do jisté míry ovlivňuje hustota výsevu. Větve zpravidla přerůstají vrchol lodyhy. Spodní listy jsou podlouhlé s hluboce vykrajovanou čepelí. Vrchní listy jsou oválné nebo vejčité, na bázi částečně objímavé, na okrajích pilovité až zubaté a lehce zvlněné. Květy vyrůstají po jednom na vrcholu lodyhy i větví. Korunní plátky mají bílou, červenou, růžovou, fialovou až tmavofialovou barvu. Okraj korunního plátku je rovný nebo zubatý. Mák je převážně samosprašnou rostlinou, možnost cizosprašení je 5 až 30% a dochází k němu při příznivém počasí, kdy je mák navštěvován včelami a čmeláky a tak může dojít i k opylení pylem z jiné rostliny. Většinou se květ opylí sám, a to už v poupěti těsně před rozkvetem. Semeník je svrchní a plodem je tobolka (makovice) různé velikosti, barvy a tvaru. Semena jsou ledvinovitá (Pelikán et al., 2015) a jsou nejčastěji modrošedá, ale mohou být i bílá, žlutá, růžová, hnědá nebo černá (Pazdera, 2015). Klíčí při minimální teplotě 1 až 3 °C, optimální teplota pro klíčení je 20 až 25 °C. Mák v průběhu vývoje má rozdílné požadavky na klimatické podmínky. V době od zasetí do počátku kvetení je náročný na vláhu a méně náročný na teplotu. Od počátku kvetení do dosažení plné zralosti naopak vyžaduje teplejší, sušší počasí s dostatkem slunečního svitu (Pelikán et al., 2015).



Obrázek 1.1: Květ a makovice máku setého (flora-cs.com, 2021)

1.2 Technologie pěstování máku

Pěstování máku má své zvláštnosti. Již při podzimní orbě je zapotřebí orat do větší hloubky a povrch orby neurovnávat. Tím půda lépe přijímá srážky a méně trpí slénavostí. Jarní příprava se co nejvíce minimalizuje, aby bylo možné mák co nejdříve zasít. U setí máku je nejdůležitější včasnost. V přípravě se používají pouze brány i různě agregované, vylučuje se smykování a válení. Na pohled neurovnaný členitý povrch je biologicky žádoucí, mák lépe vzchází a rostliny jsou částečně chráněné.

Na výživu je mák náročný. Základem je vyrovnaný poměr mezi jednotlivými prvky a pH půdy blízko hodnoty 7. Zpravidla se k optimalizaci výživy máku používají průmyslová minerální hnojiva. Dusík se aplikuje nejlépe po zasetí v kapalné formě spolu s preemergentními herbicidy. Tuhé formy dusíku nejpozději do fáze vzcházení, aby pozdě aplikovaný dusík nezvětšoval příliš tvorbu větví. P, K a Ca se aplikuje k předplodině a na základě agrochemického rozboru půdy. Výsledkem setí by měl být porost s počtem rostlin v rozpětí 50 až 70 (maximálně 90) na 1 m². V praxi to znamená vysévat 0,80 až 1,20 kg osiva na 1 ha. Řádky volíme úzké 20 až 25 cm. Způsobů setí máku je ovšem více. Vzhledem k nízké hloubce setí (0,5 až 1,5 cm) je možné vysévat pásově se zvednutými botkami secího stroje a počítat s tím, že na povrch vysetá semena všechna nevzejdou a tím se porost zředí. Další možnost je vysévat normální osivo s osivem chemicky ošetřeným tak, že po vzejití ošetřený mák zahyne a tím se porost prosvětlí. Maximální výnosy skýtá u máku spon 10 x 15 cm. U porostů, které byly zasety příliš hustě, je možné příčným převláčením středně těžkými branami porosty prosvětlit a zředit. Když mák vymrzne, je možné opakovat setí nejpozději do konce dubna. Ozimý mák se vysévá koncem srpna.

Nejvíce škodí v máku vysoké plevely (heřmánky, ježatka) a plevely, jejichž semena se nedají z máku odstranit (laskavec). Pokud neničíme plevely v předplodině, tak agrotechnické prostředky jsou omezené (plečkování v širokých řádcích). Zbývá ochrana chemická. Mák je k herbicidům poměrně citlivý, proto chemická ochrana musí být pouze doporučenými herbicidy při dodržení celého metodického postupu (dávka a čas aplikace).

Mák sklízíme v plné zralosti, kdy je semeno uvolněno a chrastí na dně tobolky. V této zralosti je semeno nejméně mechanicky poškozováno a tím je více chráněno proti žluknutí. Nejlépe je sklízet v době, kdy je nejmenší vlhkost vzduchu (v poledne). Sklízecí mlátička se upraví (utěsní) pro sklizeň drobných semen, žací lišta se zvedne tak, aby seřízla nejnižší umístěné tobolky. Můžeme sklízet semeno i makovi-

nu a později semeno separovat. Ošetření po sklizni spočívá v oddělení makoviny od semen a v jejich sušení. Makovinu je nutné dosušit na vlhkost 15 % a semeno vzhledem k obsahu tuku na 8 % (Diviš, et al. 2010).



Obrázek 1.2: Makové pole (flora-cs.com, 2021)

1.3 Šlechtění máku v ČR

Legendární odrůda Hanácký modrý, vyšlechtěna v roce 1934 ve Šlechtitelské stanici Horní Moštěnice, byla vyškrtuta ze seznamu odrůd povolených k pěstování po velkých diskusích v roce 1980. Byla to odrůda s výrazně blankytně modrým zbarvením semene a na zahraničních trzích dobře uplatnitelná, ale měla nižší výnos. Hanácký modrý výnosově překonaly odrůdy vyšlechtěné v 80. letech s našedlou barvou semene, a proto pro obchodníky nebyly tolik vyhledávané. Druhá významná odrůda Azur, která byla vyšlechtěna v roce 1928 v období první republiky, zaostala v délce povolení pro pěstování za předchozí odrůdou pouze o jeden rok (1928 až 1973). Z dalších odrůd vyšlechtěných českými šlechtiteli je třeba zmínit Amarin ze Šlechtitelské stanice Čelechovice z roku 1975 a odrůdu Modran (1969) ze Šlechtitelské stanice Chlumeck nad Cidlinou. Po roce 1977 šlechtění máku v Čechách skončilo a probíhalo pouze na Slovensku ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby Piešťany ve Šlechtitelské stanici Malý Šariš. Z tohoto pracoviště pochází většina odrůd pěstovaných v současné době na českých polích. Jedná se o odrůdy Opal, Bergam, Gerlach, Maraton, Major a Malsar. Opětovné šlechtění v Čechách zahájila firma Oseva PRO, s.r.o. po

vzniku samostatného Slovenska, na svém odštěpném pracovišti ve Výzkumném ústavu olejnin Opava. Zde se podařilo vyšlechtit celou řadu zajímavých, především bělosemenných odrůd pod názvy Sokol, Racek, Orel, ale i odrůdu s okrovou barvou semene Redy. Jedná se o odrůdy nové, zatím s malým zastoupením na pěstitelských plochách. Tyto odrůdy by však pro svoji oříškovou chuť měly nalézt uplatnění při výrobě cukrářských specialit. Zatím na větší rozšíření pěstitelských ploch ještě čekají (Potměšilová, 2009).

1.4 Klíčivost a vzcházivost

Klíčení a jeho rychlost závisí jak na kvalitě semen, tak i na podmínkách prostředí (voda, teplota, vzduch) (Honsová, 2019). Základním kritériem kvality osiva je procento klíčivosti. Klíčivost osiva se hodnotí ve standardních a optimálních laboratorních podmínkách, kde mohou být v některých případech získány rozdílné výsledky. Objektivní příčinou může být zpravidla dormance semen. Výsledky a přesnost testů bude vždy záviset na úrovni poznatků o fyziologii klíčení semen, zejména na vitalitě a podmínkách prostředí. Záleží také na technických podmínkách při klíčení a zkušenosti pracovníka semenářské laboratoře. Nejlepší vizitkou semenářské firmy je vysoké procento klíčivosti produkovaného osiva. Certifikace vychází ze splnění stanovených limitních hodnot, které jsou specifické podle botanických druhů nebo rodů. Podlimitní klíčivost u osiva vždy počítá pouze s nízkou vitalitou. Výjimkou z normy by mělo být pouze nouzové řešení. Pro pěstitele snížená klíčivost představuje vyšší náklady na osivo, a to v souvislosti se zvýšením výsevku, ale také především vyšší riziko špatně založeného, méně výkonného a nevyrovnaného porostu (Hosnedl, 2003).

Nejdůležitějším semenářským znakem kvality osiva je především vysoká klíčivost a dobrý zdravotní stav, ale pro pěstitele jsou rozhodujícími kritérii polní vzcházivost a vyrovnanost vzcházení. Požadované optimum se často liší a vychází z vnitřní kvality semen a kvality podmínek prostředí. Význam mají fyzikální a agrochemické vlastnosti půdy. S přípravou půdy, formou setí a střídání plodin souvisí komplexní arotechnické faktory. Rychlé a vyrovnané vzcházení přispívá k lepšímu zakořenění rostlin a maximalizuje růstové období a také ovlivňuje uniformitu a vzájemnou konkurenceschopnost rostlin v prostoru. Přitom charakteristickým projevem snížené vitality osiva může být větší redukce počtu rostlin při vzcházení a pomalejší a méně

vyrovnané vzcházení (Hosnedl, 2003). Rozdíl mezi klíčivostí a vzcházivostí osiva souvisí se životností čili vitalitou osiva, která popisuje přirozený potenciál zdravých semen, umožňující rychlé klíčení a vzcházení po zasetí. Obecně vyjadřuje stupeň tolerance osiva k nepříznivým podmínkám při klíčení a vzcházení a stabilitu kvality při uskladnění (Honsová, 2019).

1.5 Abiotické stresy

Produktivita zemědělství je omezena různými faktory prostředí, z nichž hlavní jsou stresy. Zdlouhavé stresové podmínky způsobují mimo jiné produkci reaktivních forem kyslíku (ROS). Akumulace ROS v organismu naruší neměnný mechanismus buněk, který nakonec vede k buněčné smrti. Organismy postupně vyvinuly pokročilé složité fyziologické a metabolické mechanismy pro odbourávání reaktivních forem kyslíku produkovaných stresory z prostředí (Shefali, et al., 2021).

Na rostliny působí různé stresové faktory a abiotický stres je hlavní příčinou omezení celosvětové produkce plodin (Wang, et al., 2003). Množství a intenzita jejich působení ovlivňuje růst rostlin. Pro optimální růst rostlin je určité množství abiotických faktorů prostředí zapotřebí. Jakákoli změna těchto faktorů prostředí či odchylka od normálu optimálních podmínek prostředí, je považována za abiotický stres a nebezpečně ovlivňuje růst, vývoj a produktivitu rostlin (Bray, et al., 2000). V současnosti probíhá globální změna životního prostředí prakticky ve všech klimatických pásmech na zeměkouli a způsobuje tak environmentální rizika (Gleick, 1994). Tyto anomálie prostředí vytvářejí právě abiotické stresy, které jsou hlavními činiteli omezujícími produkci plodin (Padgham, 2009, Boyer, 1982).

Mezi abiotické stresy patří chlad, teplo, alkalické podmínky, sucho, intenzita světla, zamokření, zasolení a nedostatek živin (Bailey-Serres a Voeselek, 2008), (Wang, et al., 2003). 64% celosvětové rozlohy půdy je ovlivněno suchem, 6% zasolením, 13% anoxií, 9% minerální deprivací, 15% zásaditostí půdy a 57% zimou (Mittler, 2006). Rostliny se díky svým obranným mechanismům přizpůsobují rychlé změně v životním prostředí a chorobám (Simontacchi, 2015), vyvinuly různé strategie pro zvládnutí stresových podmínek kombinací metabolických, fyziologických a morfologických adaptací (Bray, et al., 2000). Na vývojové úrovni mohou rostliny uniknout stresu prostřednictvím mnohostranných změn buněčné a orgánové struktury. Tyto procesy jsou řízeny fytohormony, včetně ethylenu, giberelinu a kyseliny

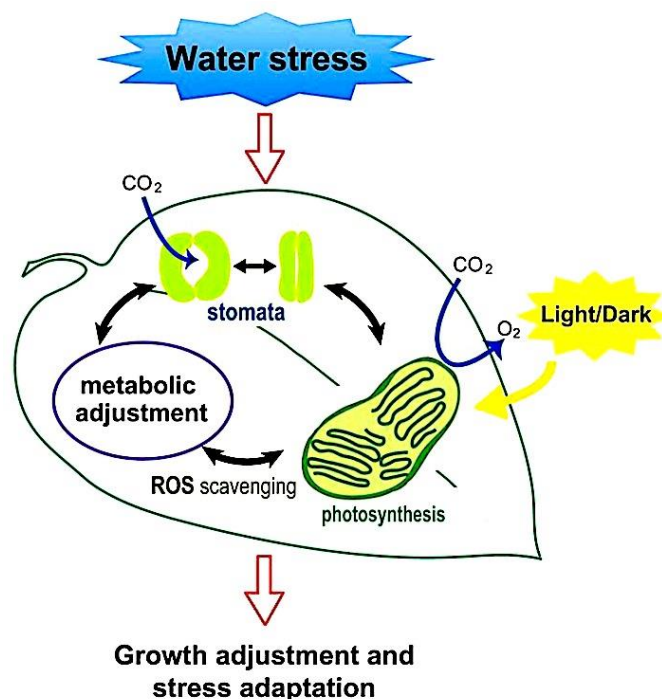
abscisové (Bailey-Serres a Voesenek, 2008). Molekulární kontrolní mechanismy tolerance k abiotickému stresu jsou také založeny na aktivaci a regulaci specifických genů souvisejících se stresem. Tyto geny jsou zapojeny do celé řady stresových reakcí, jako je signalizace, kontrola transkripce, ochrana membrán a proteinů a vychytávání volných radikálů a toxických sloučenin (Wang, et al., 2003).

Šlechtění na odolnost vůči suchu a zasolení u zemědělských plodin a u lesních dřevin by měla mít vysokou prioritu v programech biotechnologického výzkumu. V poslední době začal výzkum molekulárních mechanismů stresových reakcí přinášet své ovoce a souběžně s tím genetické modifikace stresové tolerance ukázaly také slibné výsledky, které se mohou v konečném důsledku vztahovat na zemědělsky a ekologicky významné rostliny. Důraz je kladen na transgenní rostliny, které byly vyvinuty na základě různých mechanismů reakce na stres. V úvahu připadají následující aspekty: regulační kontrola, inženýrství metabolitů, transport iontů, antioxidanty a detoxikace, „late embryogenesis abundant“ proteiny (LEA) a proteiny tepelného šoku (heat shock) (Wang, et al., 2003). Předmětem intenzivního výzkumu je sledování stresových podmínek, jako je sucho, slanost a teplo současně nebo sledování těchto podmínek samostatně (Cushman, 2000). Na poli jsou však plodiny a jiné rostliny běžně vystavovány kombinaci různých abiotických stresů (Moffat, 2002). Například v oblastech zasažených suchem se mnoho plodin setkává s kombinací sucha a jiných dalších stresorů, jako je horko nebo zasolení (Heyne a Brunson, 1940). Nedávné studie ukázaly, že molekulární a metabolická odpověď rostlin na kombinaci sucha a horka je jedinečná a nelze ji přímo extrapolovat z reakce rostlin na každý z těchto různých stresů aplikovaných jednotlivě (Pnueli et al., 2002). Studie současné expozice stresu v různých rostlinách jsou dobře zdokumentovány v řadě odborných publikací. Kromě toho je tolerance ke kombinaci dvou různých abiotických stresorům jedním z hlavních šlechtitelských cílů u kukuřice a dalších plodin (Craufurd a Peacock, 1993). Přesto je stále málo známo o molekulárních mechanismech, které jsou základem aklimatizace rostlin na kombinaci dvou různých stresů (Rizhsky et al., 2004). Protože většina studií abiotického stresu prováděných za kontrolovaných podmínek v laboratoři neodráží skutečné podmínky, které se v terénu vyskytují, může existovat značná propast mezi znalostmi získanými těmito studiemi a znalostmi požadovanými pro vývoj rostlin a plodin se zvýšenou tolerancí na polní podmínky. Tato mezera by mohla vysvětlit, proč některé z transgenních rostlin vyvinutých v laboratoři se zvýšenou tolerancí ke konkrétnímu stavu biotického nebo abiotického

stresu nevykazovaly zvýšenou toleranci při testování v polních podmínkách (McKersie et al., 1999). K překlenutí této mezery a usnadnění vývoje plodin a rostlin se zvýšenou tolerancí vůči polním stresovým podmínkám je třeba se zaměřit na molekulární, fyziologické a metabolické aspekty kombinace stresorů (Mittler, 2006).

1.6 Stres suchem

Sucho patří mezi abiotické stresy (Procházka et al., 1998, Pavlová, 2005). Stres suchem je jedním z nejdůležitějších environmentálních stresů a vyskytuje se z několika důvodů, mimo jiné včetně nízkých srážek, zasolení, vysokých a nízkých teplot a vysoké intenzity světla (Salehi-Lisar a Bakhshayeshan-Agdam, 2016). Schopnost přežít nepříznivé podmínky se označuje jako rezistence neboli odolnost. Rezistence zahrnuje schopnost vyhnout se stresovým podmínkám a toleranci k nim (Procházka et al., 1998, Pavlová, 2005). Molekulární a fyziologické mechanismy spojené s tolerancí vodního stresu a účinností využívání vody byly rozsáhle studovány (Osakabe, et al., 2014). Když rostliny nedostávají dostatek vody, jsou vystaveny stresu, který se nazývá vodní deficit. Ten v rostlině narušuje mnoho celulárních funkcí, což má negativní dopad na její růst a následnou reprodukci (Bray, 2007). Rostliny si vyvinuly složité fyziologické a biochemické adaptace, aby se přizpůsobily různým stresům prostředí (Osakabe, et al., 2014), vyvinuly mnoho různých mechanismů a v případě, že dochází v jejich prostředí k navození stresových podmínek, tyto mechanismy chrání rostlinu. Dostupnost vody je nejdůležitějším faktorem v prostředí, který snižuje produkci našich plodin (Bray, 2007). Mechanismy, které se podílejí na toleranci rostlin vůči suchu, se obvykle řídí obecným plánem a to například udržováním homeostázy buněk v situacích s nedostatkem vody, což je možné zvýšením přívodu vody do buněk. Vyhýbání se suchu je dalším běžným mechanismem odolnosti vůči suchu u jednoletých rostlin. S tímto mechanismem je únik ze stresových podmínek hlavní strategií pro růst rostlin za sucha (Salehi-Lisar a Bakhshayeshan-Agdam, 2016). Systémy, které regulují adaptaci rostlin na nedostatek vody, procházejí sofistikovanou regulační sítí a jsou předmětem aktuálního výzkumu (Osakabe, et al., 2014).



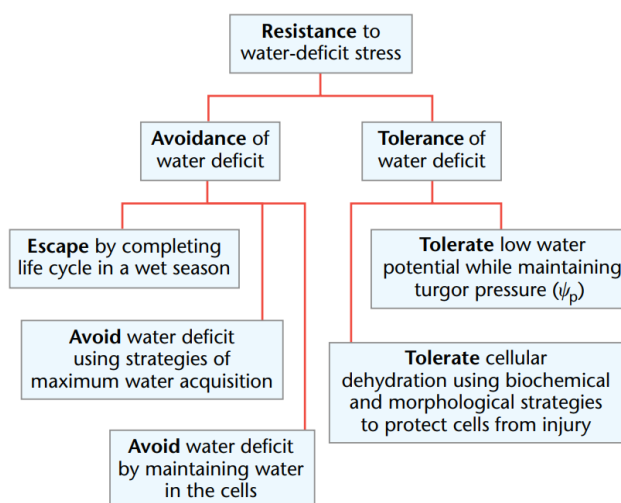
Obrázek 1.3: Ilustrace reakce rostlin na vodní stres. Stomatální reakce, odbourání ROS, metabolické změny a fotosyntéza jsou ovlivněny, když jsou rostliny vystaveny stresu suchem. Tento soubor reakcí vede k úpravě rychlosti růstu rostlin jako adaptivní reakci pro přežití (Osakabe, et al., 2014).

1.6.1 Obranné mechanismy proti stresu suchem

Rostliny si vytvořily dva kontrastní fyziologické mechanismy k obraně proti stresu suchem: tolerance vůči stresu, které lze dosáhnout úpravou osmotických vlastností a změnami pružnosti tkání a vyhýbání se stresu, které dále omezuje ztráty vody snížením vodivosti průduchů a změnami morfologie nebo orientace listů (Touchette, et al., 2009).

U tolerantních rostlin, které jsou schopné odolávat stresu suchem, se předpokládá vysoká účinnost využití vody (WUE) a nízká průduchová vodivost. Nástup stresu suchem na začátku sezóny může vyhovovat spíše rostlinám, které se vyhýbají stresu suchem a proto je jejich WUE spíše nízká a pro tyto druhy je typická časná reprodukce, zatímco pozdější sucho vyhovuje spíše druhům, které mají vysokou WUE (Heschel a Riginos, 2005). Proteiny kódované geny indukovanými stresem fungují jak při počáteční stresové reakci, tak při vytváření tolerance k rostlinnému stresu (Shinozaki a Yamaguchi-Shinozaki, 2006). Plodiny disponující těmito funkčními geny by byly pro pěstitele velice prospěšné, ale pouhým výběrem je vyšlechtit nelze. Geneticky modifikovaná rostlina transformována velkým počtem genů by mohla být odolná proti suchu. Již byly provedeny polní pokusy se zastavením zavlažování a

ukazují odolnost vůči suchu u GM rostlin v podobě pozdějšího vývoje stresu než u rostlin divokých. To je způsobeno pomalejším celkovým výparem vody z GM rostlin, které mají nebo mohou mít menší celkovou plochu listů (LAI) nebo sníženou vodivost průduchů, spojenou s anatomickými změnami (hustší mezofyl a menší buňky). Současné důkazy ukazují, že GM rostliny nemusí být schopny se lépe vyrovnat se stresem suchem než kultivary šlechtěné pouhou selekcí (Lawlor, 2012).

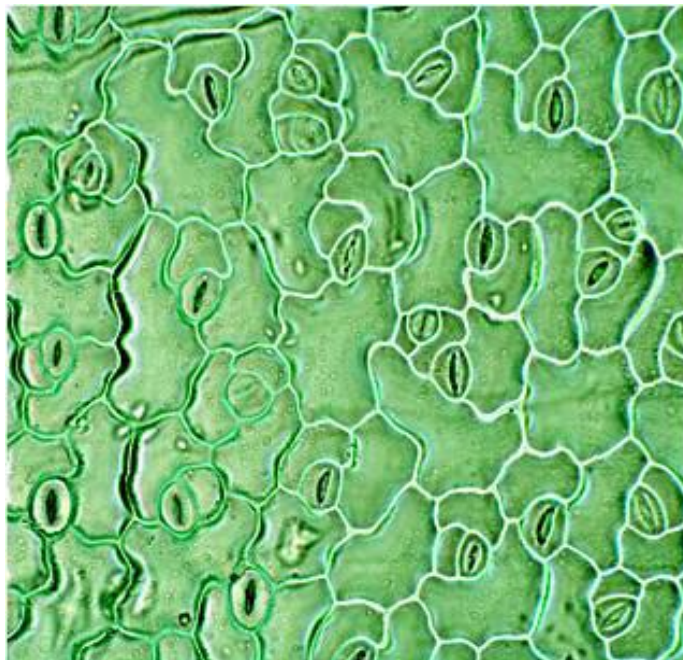


Obrázek 1.4: Odolnost proti stresu z nedostatku vody může vyplývat z mechanismů zahrnujících vyhýbání se nebo toleranci nedostatku vody (Bray, 2007).

1.6.2 Průduchy

Průduchy jsou mikroskopické struktury v nadzemních částech kvetoucích rostlin tvořené dvěma specializovanými svěřacími buňkami lemujícími centrální pór. Úlohou průduchů je optimalizovat výměnu plynů (příjem a výdej oxidu uhličitého a úbytek vodní páry) mezi rostlinou a atmosférou tak, aby vyhovovaly převládajícím podmínkám prostředí. Za tímto účelem rostliny otevírají a uzavírají průduchové póry a regulují jejich počet, které se vyvíjejí na povrchu rostlinných orgánů, zejména listů. Obě tyto reakce jsou řízeny integrací informací z podnětů prostředí a hormonálních signálů (Casson a Hetherington, 2010). Zavřením průduchů je snížen výdej vody a zároveň dochází ke snížení rychlosti čisté fotosyntézy, neboť je omezena dostupnost CO₂ a není možný výdej tepla transpirací. Důležitou roli v regulaci turgoru ve svěřacích buňkách hrají iontové kanály, které jsou významnou složkou signalizace, včetně

té stresové (Luan, 2002). Otevírání průduchů je způsobeno zvýšením koncentrace osmoticky aktivních látek ve svěracích buňkách a následným příjmem vody, který vede k nárůstu objemu, a tedy i turgorovému tlaku svěracích buněk. Zavírání průduchů je způsobeno snížením hladiny osmoticky aktivních látek ve svěracích buňkách, výdejem vody a snížením turgoru svěracích buněk (Pavlová, 2005). Aktivitu průduchů reguluje kyselina abscisová (ABA) (Assmann, 1993, Blatt a Grabov, 1997, Mac Robbie, 1997), jako rostlinný hormon reguluje otevírání a zavírání průduchů, ale také může ovlivňovat vývoj průduchů v návaznosti na vlhkostní poměry prostředí (Casson a Hetherington, 2010). Akumuluje se v kořenech za sucha a poté se dostává transpiračním proudem do listů. Nárůst její koncentrace v okolí svěracích buněk způsobuje uzavření průduchů (Schachtman a Goodger, 2008). ABA funguje jako fyziologický signál vodního stresu a zprostředkovává zejména stresem indukované uzavření průduchů (Walton 1980), je syntetizována během období stresu suchem a hromadí se v listových tkáních, včetně svěracích buněk (Behl a Hartung 1986). Kromě toho je kyselina abscisová známá také jako antiantagonista na akumulaci solí K^+ (Hartung 1983).



Obrázek 1.5: Průduchy a epidermální buňky (natur.cuni.cz, 2011)

1.6.3 Dehydriny

Dehydriny jsou bílkoviny přítomné v rostlinách, které se produkují v reakci na stres chladem a suchem (Puhakainen, et al., 2004). Tyto proteiny jsou hydrofilní, spolehlivě termostabilní a mají neuspořádanou konformaci (Graether a Boddington 2014). Vyskytují se primárně v cytoplazmě a v jádře, ale mohou se vyskytovat i v jiných organelách, jako jsou mitochondrie a chloroplasty (Rorat, 2006). Jedná se o stresové proteiny obsahující typicky doménu zvanou K-segment (Yang, et al., 2012), které patří do skupiny LEA-II proteinů (Late Embryogenesis Abundant) (Ingram a Bartels, 1996). V průběhu dehydratace hrají LEA proteiny významnou roli hlavně při udržování struktury dalších proteinů, membrán a endoplasmatických struktur. Fungují jako molekulární chaperony a ovlivňují vodní režim v buňce (Close 1996). Všechny LEA proteiny se vyznačují vysokým obsahem glycinu, hydrofilními vlastnostmi a malou sekundární strukturou (Garay-Arroyo et al., 2000). Jedním z chemických mechanismů souvisejících s produkcí dehydrinů je přítomnost fytohormonu ABA, ta zvyšuje produkci dehydrinu, což poskytuje další důkazy o vztahu mezi dehydriny a tolerancí vůči suchu (Borovskii G, et al., 2002).

2 Cíle práce

1. Provést nádobový pokus s rostlinami máku kontrolními a stresovanými suchem.
2. U semen získaných z nádobového pokusu zjistit klíčivost osiva v podmínkách simulovaného sucha.
3. Ověřit využití metody SPR pro studium akumulace vybraných stresových proteinů u máku.

3 Materiál a metody

3.1 Rostlinný materiál

V nádobovém pokusu byly použity odrůdy máku setého Zavolzskij a Stupický bělosemenný (špatná klíčivost semen, dále byla použita pouze odrůda Zavolzskij). Obě odrůdy byly získány ze šlechtitelské stanice OSEVA PRO s.r.o. v Opavě.



Obrázek 3.1: Odrůdy máku setého Zavolzskij a Stupický bělosemenný

3.2 Podmínky pěstování

Semena máku pro experiment byly vysety do čtyř nádob (maltovníků) o rozměrech 30x79x48 cm (v,š,h) a o objemu 90 l naplněných zahradnickým substrátem. Dvě nádoby představovaly variantu pravidelně zavlažovanou a dvě nádoby se sníženým zavlažováním. Nádoby byly umístěny vedle sebe a byly zakryté přístřeškem, který byl zkonstruován přímo na míru nad všechny čtyři nádoby. Do každé nádoby byly zasety semena do dvou řádků vzdálených 15 cm od sebe a 2 cm do hloubky. Ihned po zasetí a zahrnutí slabou vrstvou substrátu byly všechny nádoby zality stejným množstvím vody. Rostliny byly takto pěstovány po dobu 6 týdnů. Poté již rostliny dosahovaly 10 cm do výšky a musely být vyjednoceny. Na jeden řádek zůstalo zhruba 8 rostlin. Po tuto dobu byly obě varianty zavlažovány stejně – přirozenými srážkami v celkovém úhrnu 100 mm. Varianta s pravidelnou zálivkou byla nadále zavlažována v množství odpovídajícímu úhrnu srážek 25 mm týdně a varianta se sníženou

zálivkou byla zavlažována v množství odpovídajícímu úhrnu srážek 5 mm. Po odkvětu již obě varianty nebyly zavlažovány, neboť kvůli snížení transpirace rostlin nebylo již závlahy potřeba.



Obrázek 3.2: Nádobový pokus s přístřeškem

3.3 Stanovení počtu průduchů a průduchového indexu listů

Otisky listů byly odebírány ve fázi listové růžice (6 týdnů po vzejití) a po odkvětu. Z každé rostliny byla ustříhnuta část listu a přiložena do předem připravené hmoty ze Stomaflexu Light a Stomaflexu Gel Catalyst smíchaných v poměru 2:1 nanesené v tenké vrstvě na list papíru s označením odrůdy, varianty (suchá/mokrý) a datumem odběru. List se musí co nejrychleji po utrnutí přitisknout do hmoty, než buňky ztratí turgor. Po zatuhnutí hmoty byly listy odlepeny a vzniklý otisk byl natřený bezbarvým lakem na nehty (značky Flormar). Vrstva laku musí být tenká a nanášena bez jakýchkoli nečistot a bublin. Po zaschnutí se lak z otisku přenesl pomocí průhledné lepicí pásky na podložní sklíčko. Při pozorování v mikroskopu jsou vidět povrchové nerovnosti listu otištěné do laku – tedy obrysy epidermálních buněk, průduchů, popř. trichomů apod. Z každého listu byly pod mikroskopem (Nikon, Japan) vyfoceny 3 různé pole o velikosti cca 0,16 mm² při zvětšení 400x. V těchto polích byly počítány průduchy a epidermální buňky, jejich počty byly následně přepočítávány na 1 mm². Výsledná data byla zpracována v programu ImageJ a Microsoft Excel 2010.



Obrázek 3.3: Otisky listů do předem připravené hmoty

3.4 Stanovení průměrné výšky rostlin a HTS semen

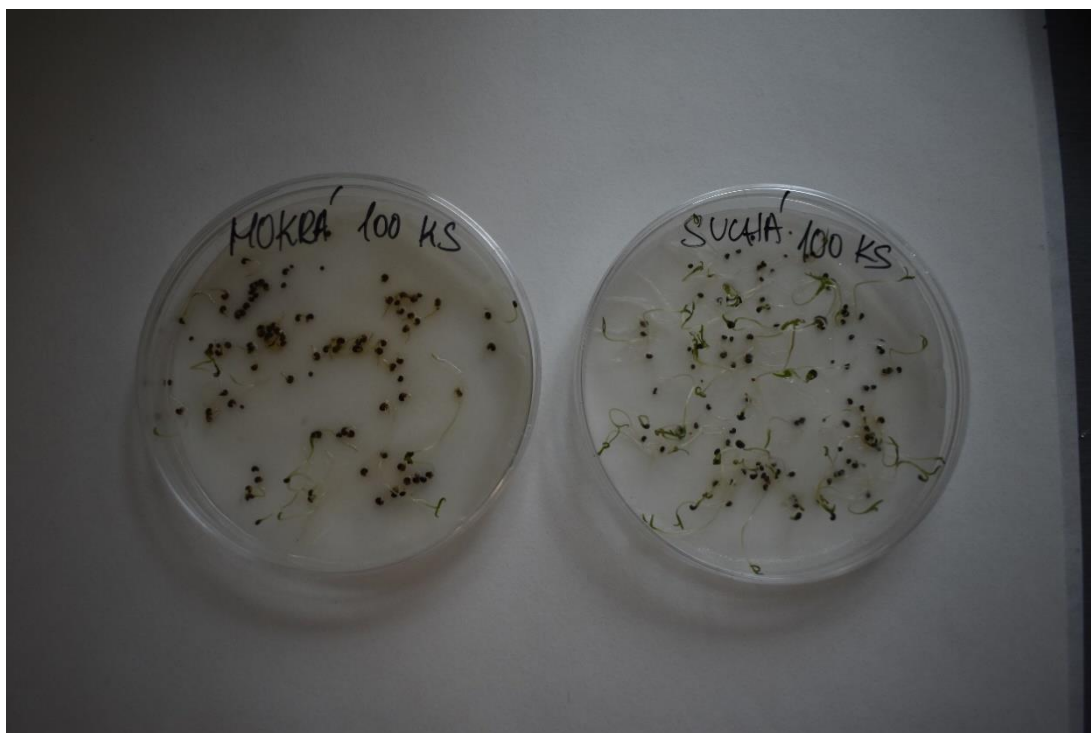
Po ukončení vegetace, resp. po úplném zaschnutí makovic byly všechny rostliny změřeny od povrchu substrátu po makovici a ze získaných hodnot byla vypočítána průměrná výška rostlin. Ze získaných semen byla vypočítána hmotnost tisíce semen (HTS) tak, že bylo napočítáno 2 x 500 ks semen, ta byla zvlášť zvážena (rozdíl v hmotnosti obou stanovení nesmí být vyšší než 10% u osiva s HTS do 25g, jinak by se musely provést měření celkem 4 a zprůměrovat) a hodnota HTS byla vypočtena jako součet získaných hodnot.

3.5 Zkouška klíčivosti

Stanovení klíčivosti při simulovaném stresu suchem bylo provedeno na filtračním papíru s vodou a PEG 6000 (polyethylenglykol). Semena, která byla testovaná na klíčivost byla hned po sklizni uložena po dobu tří měsíců při teplotě 4°C. 100 semen máku (2 x pro semena získaná z rostlin s pravidelnou závlivkou a 2 x pro semena

z rostlin se sníženou závlivkou) bylo vloženo na petriho misky s navlhčeným (6 ml vody) filtračním papírem. Po týdnu byla spočítána vyklíčená semena s děložními listy, nevyklíčená semena a semena, která sice vyklíčila, ale ještě před objevením děložních listů uhynula.

Pro porovnání klíčivosti v podmínkách simulovaného sucha bylo vyseto 50 ks semen získaných z rostlin s pravidelnou závlivkou i z rostlin se sníženou závlivkou, vždy ve dvou opakováních na misky kontrolní - s 6 ml vody a misky simulující sucho – 6 ml roztoku PEG 6000 (v koncentraci odpovídající osmotickému potenciálu -0,4 MPa dle metodiky Toosi, 2014).



Obrázek 3.4: Zkouška klíčivosti probíhající na petriho miskách s navlhčeným filtračním papírem.

3.6 Měření akumulace dehydrinů

V rámci této bakalářské práce bylo také ověřeno použití metody rezonance povrchového plazmonu (SPR) pro stanovení akumulace stresových proteinů (dehydrinů) v klíčících rostlinách máku. Tato metoda byla u máku použita historicky poprvé. Pro tuto analýzu bylo využito osivo 6ti odrůd máku (Ferrara, Opava-Komarov, R2, Florian, Malsar, Papaver 41). Mnou připravené vzorky termostabilních proteinů extrahovaných z děložních lístků vyklíčených semen byly pro vlastní analýzu SPR zaslány na suchém ledu do laboratoře vod institutu environmentálních technologií Báňské

univerzity v Ostravě pod vedením Mgr. Martiny Vráblové, Ph.D. Metoda SPR je moderní optická metoda, která umožňuje studovat velmi nízké koncentrace nativních proteinů i v přítomnosti jiných látek, umožňuje kvantifikaci konkrétních proteinů vazbou na specifické protilátky. Metoda využívá plazmon vznikající na rozhraní kovu a dielektrika k detekci interakcí molekul umístěných na povrchu kovu. V případě tohoto experimentu bylo kovem zlato, na němž byla nanášena speciální vrstva umožňující ukotvení makromolekul. Pro experiment byl využit komerčně dodávaný biočip CS-LD (Horiba), který obsahuje chemickou vrstvu obsahující funkční skupiny vhodné pro navázání protilátky.

3.6.1 Izolace termostabilních proteinů

Termostabilní proteiny byly izolovány podle metody Castaneda-Saucedo et al., (2014) ze směsného vzorků děložních listů klíčnicích rostlin. Vzorek byl homogenizován pomocí kapalného dusíku v třecí misce. K 250 mg vzorku byl přidán 1 ml extrakčního pufru (20 mM Tris-HCl, pH=7,5 + 0,5 M NaCl) a směs byla smíchána pomocí vortexu. Poté bylo vše centrifugováno při 14 000 x g při 4°C po dobu 20 minut. Odebraný supernatant byl zahříván k bodu varu po dobu 15 minut a poté 10 minut chlazen na ledu. Po centrifugaci při 14 000 x g při 4°C po dobu 20 minut byl odebrán supernatant, který byl nadále skladován při -20°C. Takto získané vzorky byly označeny na víčkách zkumavek a ve stojánku uloženy do polystyrénové krabice se suchým ledem a odeslány k analýze SPR.

4 Výsledky

Vzhledem k velmi nízké klíčivosti semen odrůdy Stupický bělosemenný nebylo možné vyhodnotit žádné výsledky pro tuto odrůdu. Zmíněné výsledky jsou tedy pouze pro odrůdu Zavolzkij.

4.1 Stanovení průměrné výšky rostlin a HTS semen

Po ukončení vegetace byla spočítána průměrná výška rostlin. Rostliny se sníženou zálivkou měly průměrnou výšku 41,9 cm. Rostliny s pravidelnou zálivkou měly průměrnou výšku 62,3 cm.

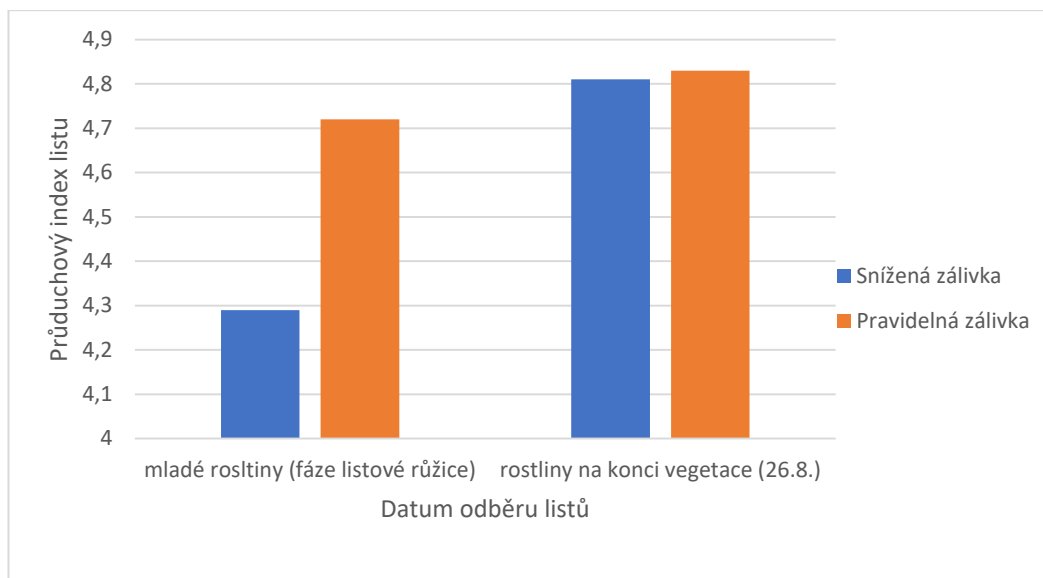
U sklizených semen byla určena jejich hmotnost tisíce semen (HTS). HTS získaných z rostlin se sníženou zálivkou byla 0,372 g. HTS získaných z rostlin s pravidelnou zálivkou byla 0,446 g.

4.2 Stanovení počtu průduchů a průduchového indexu listů

U rostlin máku pěstovaných v nádobovém pokusu byly odebrány otisky listů ve fázi listové růžice (6 týdnů po vzejití) a na konci vegetace. Byly počítány průduchy a epidermální buňky, z obou hodnot byly dále vyjádřeny průduchové indexy (tj. poměr počtu průduchů k počtu průduchů a epidermálních buněk na jednotku plochy) u jednotlivých skupin listů (obr. 4.1.).

Tabulka 4.1: Počet průduchů, epidermálních buněk a průduchový index u rostlin s pravidelnou a sníženou zálivkou pěstovaných v polním pokusu

Růstová fáze	Varianta	Počet průduchů na mm ²	Počet epidermálních buněk na mm ²	Průduchový index
mladé rostliny (20.5.)	Snížená zálivka	127,5	420	4,29
	Pravidelná zálivka	101,25	377,5	4,72
rostliny na konci vegetace (26.8.)	Snížená zálivka	77,31	295,31	4,81
	Pravidelná zálivka	61,87	237,12	4,83



Obrázek 4.1: Průduchový index u rostlin s pravidelnou a sníženou zálivkou pěstovaných v polním pokusu

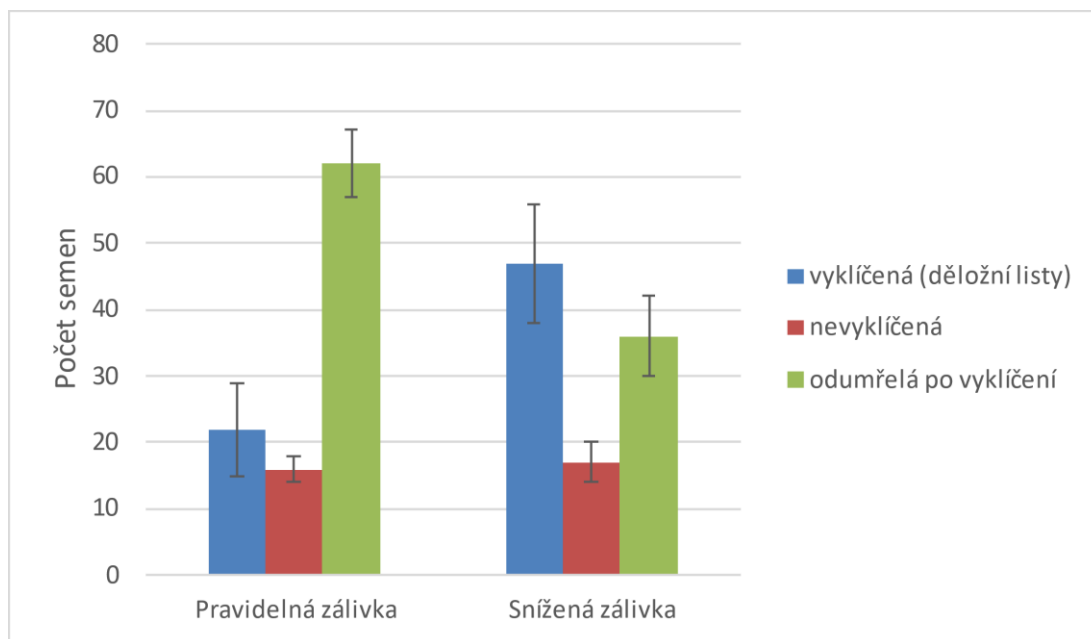
V tabulce 4.1 jsou shrnuty počty průduchů na mm² a počty epidermálních buněk na mm². Poměr těchto dvou hodnot je zaznamenán jako průduchový index (obr. 4.1). U mladých rostlin se sníženou zálivkou byl průduchový index nižší než u mladých rostlin pravidelně zalévaných. U rostlin na konci vegetace nebyl zjištěn žádný významný rozdíl mezi variantou se sníženou zálivkou a rostlinami se zálivkou pravidelnou. Počet průduchů a epidermálních buněk na mm² byl u mladých rostlin i rostlin na konci vegetace nižší u varianty s pravidelnou zálivkou než u varianty se zálivkou sníženou.

4.3 Zkouška klíčivosti

U semen máku získaných z rostlin s pravidelnou zálivkou a u semen z rostlin se sníženou zálivkou byla provedena zkouška klíčivosti. Experiment byl proveden na filtračním papíru s vodou na petriho miskách. Výsledek zkoušky klíčivosti shrnuje tabulka č. 4.2 a ilustruje obrázek č. 4.2.

Tabulka 4.2: Porovnání klíčivosti semen získaných z rostlin s pravidelnou a sníženou zálivkou.

Varianta	Vyklíčená semena (děložní listy)	Nevyklíčená semena	Semena odumřelá po vyklíčení
Pravidelná zálivka	22	16	62
Snížená zálivka	47	17	36



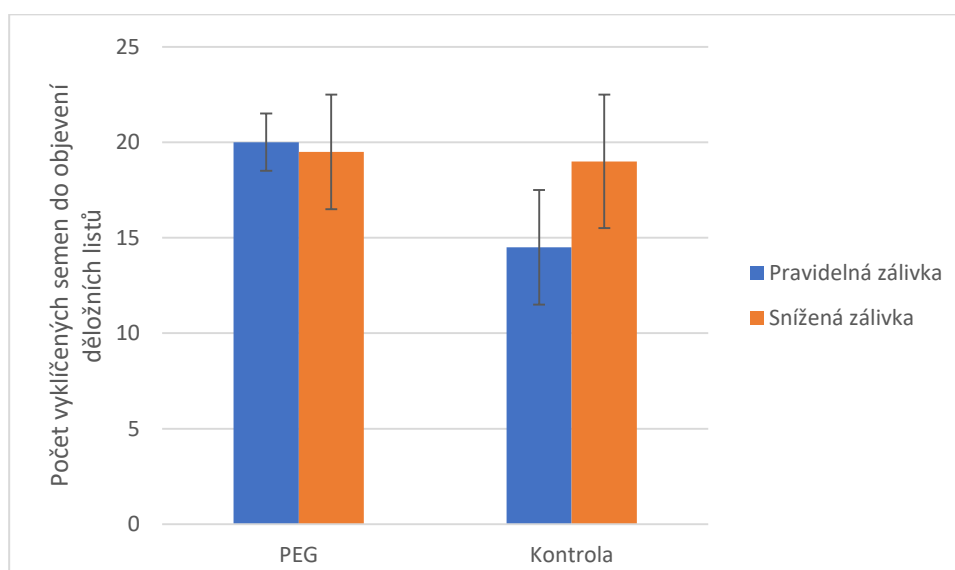
Obrázek 4.2: Počet semen vyklíčených, nevyklíčených a odumřelých po vyklíčení s pravidelnou a se sníženou závlivkou.

Zkouška klíčivosti prokázala, že semena získaná z rostlin s pravidelnou závlivkou měla téměř stejnou klíčivost, jako semena získaná z rostlin se sníženou závlivkou. U klíčenců získaných z osiva z rostlin s pravidelnou závlivkou však došlo v 74% případů k odumření klíčící rostliny ještě před objevením děložních listů. U klíčenců získaných ze semen rostlin se sníženou závlivkou došlo k odumření klíčenců pouze ve 43% případů.

U semen máku získaných z polního pokusu byla dále stanovena klíčivost při simulovaném stresu suchem. Experiment byl proveden ve dvou opakováních (hodnoty v tabulce 4.3 jsou průměrné hodnoty z těchto dvou opakování) na filtračním papíru s vodou (kontrola) a roztokem PEG 6000 na petriho miskách. Získané výsledky klíčivosti v kontrolních podmínkách a podmínkách simulovaného sucha shrnuje tabulka č. 4.3 a ilustruje obrázek č. 4.3.

Tabulka 4.3: Porovnání klíčivosti semen získaných z rostlin s pravidelnou závlivkou a z rostlin se závlivkou sníženou v podmínkách simulovaného sucha a kontrolních

	Varianta	Vyklíčená semena (děložní listy)	Nevyklíčená semena a odumřelá po vyklíčení
Pravidelná závlivka	PEG 6000	20	30
Snížená závlivka	PEG 6000	19,5	30,5
Pravidelná závlivka	Kontrola	14,5	35,5
Snížená závlivka	Kontrola	19	31



Obrázek 4.3: Počet semen vyklíčených do objevení děložních listů u semen získaných z rostlin s pravidelnou zálivkou a se sníženou zálivkou (PEG)

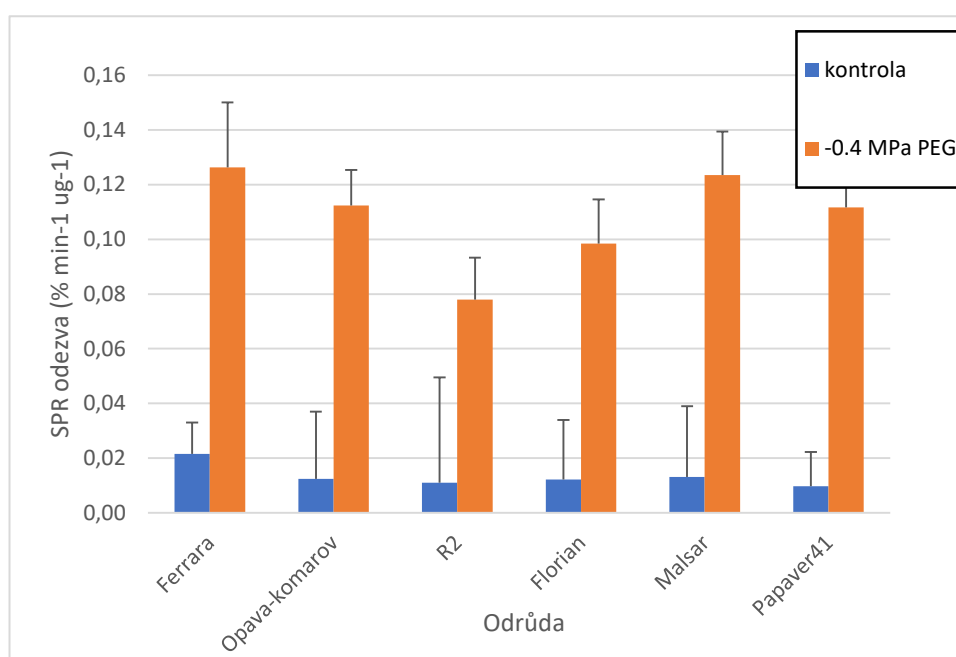
Zkouška klíčivosti semen v podmínkách simulovaného sucha (PEG 6000) prokázala stejnou schopnost klíčit u semen získaných z rostlin s pravidelnou zálivkou i z rostlin se zálivkou sníženou. V kontrolní variantě lépe klíčila semena získaná z rostlin se sníženou zálivkou v porovnání se semeny získanými z rostlin se zálivkou pravidelnou.

4.4 Měření akumulace dehydrinů

Pro ověření možnosti použití metody rezonance povrchového plazmonu (SPR) pro stanovení akumulace stresových proteinů (dehydrinů) v klíčících rostlinách máku byly izolovány termostabilní proteiny z klíčících rostlin pěstovaných na Petriho miskách s filtračním papírem navlhčeným vodou (kontrola) a roztokem PEG 6000 (simulovaný stres suchem). Pro vlastní analýzu SPR byly vzorky zaslány do laboratoře vod institutu environmentálních technologií Báňské univerzity v Ostravě. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 4.4 a graficky znázorněny na obrázku č. 4.4.

Tabulka 4.4: Relativní akumulace dehydrinů v dělohách klíčnicích rostlin pěstovaných v podmínkách simulovaného sucha a kontrolních

Odrůda	Relativní akumulace dehydrinů - kontrola	Relativní akumulace dehydrinů – PEG 6000
Ferrara	0,0215	0,1263
Opava-komarov	0,0124	0,1123
R2	0,0110	0,0779
Florian	0,0121	0,0984
Malsar	0,0131	0,1235
Papaver 41	0,0097	0,1117



Obrázek 4.4: Relativní akumulace dehydrinů v dělohách klíčnicích rostlin pěstovaných v podmínkách simulovaného sucha a kontrolních

Z výsledků analýzy SPR vyplývá, že akumulace dehydrinů je v děložních listech rostlin pěstovaných na Petriho miskách v podmínkách simulovaného sucha výrazně vyšší než u rostlin pěstovaných v podmínkách kontrolních. Tento efekt se projevil u všech šesti testovaných odrůd.

5 Diskuse

Mák má v České republice velkou tradici pěstování. Vzhledem k tomu, že se v jiných zemích pro potravinářské účely téměř nepěstuje, má u nás tradici i jeho šlechtění. Vzhledem ke globálnímu oteplování jsou zemědělské plodiny, tedy i mák, vystavovány abiotickému stresu, zejména stresu suchem. Pro výběr vhodných genotypů pro šlechtění je zapotřebí znát obranné mechanismy a účinné metody selekce.

V rámci této práce jsem na zahradě rodičů provedla nádobový pokus s dvěma odrůdami máku – Zavolzkij a Stupický bělosemenný. Bohužel, odrůda Stupický bělosemenný měla velmi nízkou klíčivost, proto se mi podařilo získat výsledky pouze pro odrůdu Zavolzkij. Přesná zálivka byla umožněna díky přístřešku z polykarbonátu. Byly tak pěstovány dvě varianty rostlin – rostliny s pravidelnou zálivkou a se sníženou zálivkou. Rostliny s pravidelnou zálivkou měly vyšší průměrnou výšku – 62,3 cm, než rostliny se zálivkou sníženou – 41,9 cm, což odpovídá mému předpokladu a je to podloženo i v odborných studiích, např. u aksamitníku (Riaz et al., 2013). Semena získaná z pravidelně zalévaných rostlin měla také vyšší HTS v porovnání se semeny z rostlin se sníženou zálivkou, což jsem také předpokládala. U těchto rostlin jsem také stanovila průduchový index neboli poměr počtu průduchů k počtu všech buněk na povrchu listu. Sucho ovlivňuje vývoj průduchů na listech, resp. průduchový index (Casson a Gray, 2008). U listů mladých rostlin se sníženou zálivkou byl průduchový index nižší, což odpovídá předpokladu. Překvapením ale bylo zjištění, že u listů rostlin na konci vegetace se průduchový index téměř nelišil. Zaměříme-li se na počet epidermálních buněk a průduchů na jednotku plochy listu, výsledky ukazují, že listy rostlin se sníženou zálivkou měly více epidermálních buněk a průduchů na mm² než listy rostlin s pravidelnou zálivkou. Z toho vyplývá, že tyto buňky byly menší, méně rozvinuté do plochy, což odpovídá i menšímu celkovému vzrůstu méně zalévaných rostlin. Soubor těchto zjištěných parametrů rostlin tedy potvrzuje, že rostliny se sníženou zálivkou byly v porovnání s rostlinami se zálivkou pravidelnou, opravdu limitovány suchem.

Semena získaná z mnou provedeného nádobového pokusu byla podrobena zkoušce klíčivosti. Tato zkouška může být ovlivněná dormancí semen (Hosnedl, 2003), proto jsem získaná semena uložila na 3 měsíce do lednice (4°C) a až poté provedla testy. Semena získaná z pravidelně zalévaných rostlin začala na Petriho miskách s vodou klíčit o den dříve než semena z rostlin se sníženou zálivkou. Celková klíčivost pak byla u obou variant srovnatelná (84 % u semen z rostlin s pravidel-

nou a 83 % u semen z rostlin se sníženou zálivkou). Překvapivě, u klíčenců získaných z osiva z rostlin s pravidelnou zálivkou však došlo v 74% případů k odumření klíčící rostliny ještě před objevením děložních listů. U klíčenců získaných ze semen rostlin se sníženou zálivkou pak došlo k odumření klíčících rostlin pouze ve 43% případů. Důvod, proč tak vysoké procento klíčících rostlin uhynulo ještě před objevením děložních listů se mi bohužel nepodařilo zjistit, určitě ale bude předmětem dalšího zkoumání.

Další test, který jsem provedla byl test klíčivosti získaných semen v podmínkách simulovaného sucha. K simulaci sucha jsem použila roztok PEG 6000 podle metodiky Toosi et al., (2014). I při tomto testu došlo u obou skupin semen k odumření nezanedbatelné části klíčících rostlin. Na Petriho miskách s filtračním papírem navlhčeným roztokem PEG 6000 vyklíčily obě varianty semen se stejnou úspěšností. Na kontrolních Petriho miskách, tedy s filtračním papírem vlhčeným pouze vodou jsem pozorovala více úspěšně vyklíčených semen u varianty semen získaných z rostlin se sníženou zálivkou (38%) než u semen získaných z rostlin s pravidelnou zálivkou (29%). Vypadá to, že podobně jako u dalších rostlinných druhů (např. u řepky, jak uvádí Hatzig et al., 2018), i u máku stres suchem u rostlin určených k produkci osiva sice snižuje výnos a kvalitu osiva (HTS semen z nádobového pokusu), ale zároveň zlepšuje energii klíčivosti a samotnou klíčivost takto získaných semen.

V rámci této práce jsem dále testovala metodu rezonance povrchového plazmonu (SPR) jako potenciálně využitelnou metodu pro testování reakce klíčících rostlin na stres suchem, resp. pro analýzu akumulace dehydrinů. Tato metoda je relativně nová a k tomuto účelu se u máku nepoužívá. Její použití bylo v minulosti ověřeno u řepky stresované chladem (Jelínková et al., 2017). Pro analýzu jsem připravila vzorky podle metody Castaneda-Saucedo et al., (2014), čímž jsem ověřila využitelnost této izolační metody pro rostliny máku. Z výsledků SPR analýzy provedené u klíčících rostlin máku v rámci této práce vyplývá, že simulované sucho má velký vliv na akumulaci dehydrinů. V porovnání s kontrolními rostlinami docházelo k výrazně vyšší akumulaci těchto stresových proteinů. Tato metoda tedy zřejmě funguje i u máku a je potenciálně využitelná i pro další rostlinné druhy.

6 Závěr

V rámci této bakalářské práce jsem provedla nádobový pokus, ve kterém jsem díky přístřešku ovlivnila množství závlivky rostlin máku. Mohla jsem tedy porovnat vlastnosti semen získaných z rostlin máku pravidelně zalévaných a z rostlin se sníženou závlivkou. Podařilo se mi zjistit, že stres suchem u rostlin máku určených k produkci osiva sice snižuje výnos a kvalitu osiva, ale zároveň zlepšuje energii klíčivosti a samotnou klíčivost takto získaných semen.

V rámci této práce jsem dále testovala metodu rezonance povrchového plazmonu (SPR) jako potenciálně využitelnou metodu pro analýzu akumulace dehydrinů. Podařilo se mi ověřit využitelnost metody pro izolaci termostabilních proteinů a zároveň jsem potvrdila, že metoda SPR je potenciálně využitelná i pro analýzu akumulace dehydrinů v klíčících rostlinách máku.

7 Seznam použité literatury

Assmann, S. M. (1993). Signal Transduction in Guard Cells. *Annual Review of Cell Biology*, 9(1):345-375.

Bailey-Serres, J. a Voesenek, L.A.C.J. (2008). Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1):313-339.

Behl, R. a Hartung, W. (1986). Movement and compartmentation of abscisic acid in guard cells of *Valerianella loeusta*: effects of osmotic stress, external H⁺ concentration and fusicoccin. *Planta*, 168(5):360-368.

Blatt, M. R. a Grabov, A. (1997). Signalling gates in abscisic acid-mediated control of guard cell ion channels. *Physiologia Plantarum*, 100(3):481-490.

Borovskii, G. et al. (2002). Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biology*, 2(5):5.

Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218(1):443-448.

Bray, E. A. (2007). Plant Response to Water-deficit Stress. *Encyclopedia of Life Sciences*, 55(1):1-7.

Bray, E. A. et al. (2000). Responses to abiotic stress. Biochemistry & molecular biology of plants. In: Gruissem, W. and Jones, R., Eds., *American Society of Plant Physiologists*, Rockville, pp. 1158-1203.

Casson, S. A. a Hetherington, A. M. (2010). Environmental regulation of stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(1):90-95.

Casson, S. a Gray, J. E. (2008). Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist*, 178(1):9-23.

Castaneda-Saucedo, C. M. et al. (2014). Dehydrins Patterns in Common Bean Exposed to Drought and Watered Conditions. *Rev. Fitotec. Mex*, 37(1):59–68.

Close, T. J. (1996). Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, 97(4):795–803.

Craufurd, P. Q. a Peacock, J. M. (1993). Effect of heat and drought stress on sorghum. *Exp. Agric*, 29(1):77-86.

Cushman, J. C. a Bohnert, H. J. (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol*, 3(1):117-124.

Český modrý mák, (2019). *Obecné informace o máku*. [online] [cit. 08.03.2021]. Dostupné z: <https://ceskymodrymak.cz/cs/mak/obecne-informace>.

Diviš, J. et al. (2010) *Pěstování rostlin: Systémy rostlinné výroby*. 2. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, ISBN 978-80-7394-216-8.

Flora-cs.com (2021). Obrázky máku setého [online] [cit. 08.03.2021]. Dostupné z: <https://www.flora-cs.com/foto/cz/116151/>.

Garay-Arroyo, A. et al. (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(8):5668–74.

Gleick, P. (1994). Water, War & Peace in the Middle East, Environment. *Science and Policy for Sustainable Development*, 36(3):6-42.

Graether, S. P. a Boddington K. F. (2014). Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Frontiers in Plant Science*, 576(5):1-9.

Hatzig, S. V. et al. (2018). Drought stress has transgenerational effects on seeds and seedlings in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *BMC Plant Biol*, 18(1):297.

Hartung, W. (1983). The site of action of abscisic acid at the guard cell plasmalemma of *Valerianella locusta*. *Plant, Cell and Environment*, 6(5):427–428.

Havel, J. et al. (2018). *Pěstitelská technologie máku pro snížení rizikovosti pěstování*. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., Zubří, provozovna Opava. ISBN 978-80-905808-1-7.

Heschel, M. S. a Riginos, C. (2005). Mechanisms of selection for drought stress tolerance and avoidance in *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). *American Journal of Botany*, 92(1):37–44.

Heyne, E. G. a Brunson, A. M. (1940). Genetic studies of heat and drought tolerance in maize. *J. Am. Soc. Agro*, 32(1):803-814.

Honsová, H. (2019). *Vitalita osiva máku ve vztahu k polní vzcházivosti a výnosu*. [online] Agromanual.cz [cit. 20.03.2021]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/osivo-a-sadba-1/vitalita-osiva-makuve-vztahu-k-polni-vzchazivosti-a-vynosu>.

Hosnedl, V. (2003). *Klíčivost a vzcházivost osiva*. [online] Agris.cz [cit. 23.03.2021]. Dostupné z: <http://www.agris.cz/clanek/125695>.

Ingram, J. a Bartels, D. (1996). The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1):377–403.

Kfrserver.natur.cuni.cz (2011). Obrázek průduchu a epidermálních buněk [online] [cit. 08.03.2021]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/anatomie/LS2011/vrablova/vrablova.html>

Kuchtová, P. et al. (2013). *Pěstitelská technologie máku pro ekologické zemědělství*. 1. vyd. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha. ISBN 978-80-213-2429-9.

Jelínková, I. et al. (2017). Využití metody rezonance povrchového plazmonu k selekci chladu odolných genotypů řepky ozimé (*Brassica napus* subsp. *napus*). *Úroda*. Profi Press, pp. 215-217.

Kulovaná, E. (2001). *Pěstování máku v Česku*. [online] *Úroda* [cit. 08.03.2021]. Dostupné z: <https://www.uroda.cz/pestovani-maku-v-cesku/>.

Lawlor, D. W. (2012). Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *Journal of Experimental Botany*, 64(1):83–108.

Luan, S. (2002). Signalling drought in guard cells. *Plant, Cell and Environment*, 25(2): 229-237.

MacRobbie, E. A. C. (1997). Signalling in guard cells and regulation of ion channel activity. *Journal of Experimental Botany*, 48(1):515-528.

McKersie, B. D. et al. (1999). Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol*, 119(3):839-848.

Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1):15-19.

Moffat, A. S. (2002). Finding new ways to protect drought-stricken plants. *Science*. 296(5):1226-1229.

Národní zemědělské muzeum, s.p.o. (2018). Co roste na poli. [online] [cit. 09.03.2021]. Dostupné z: <https://www.nzm.cz/co-roste-na-poli/mak-sety>.

Osakabe, Y. et al. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 86(5):1-5.

Padgham, J. (2009). Agricultural development under a changing climate: opportunities and challenges for adaptation. *World Bank*, 93(1):1-24.

Pavlová, L. (2005). *Fyziologie rostlin*. Karolinum, Praha. ISBN 80-246-0985-1.

Pazdera, Z. (2015). *Papaver somniferum – mák setý*. [online] Botanika wendys [cit. 09.03.2021]. Dostupné z: <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/487-papaver-somniferum-mak-sety>.

Pelikán, J. et al. (2015). *Atlas olejnatých rostlin*. Olomouc. ISBN 978-80-86908-37-3.

Pnueli, L. et al. (2002). Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J.*, 31(1):319-330.

Poole, I. et al. (2000). Effect of elevated CO₂ on the stomatal distribution and leaf physiology of *Alnus glutinosa*. *New Phytologist*, 145(1):511–521.

Potměšilová, J. (2009). *Světovi v produkci makového semene*. [online] Zemědělec [cit. 09.03.2021]. Dostupné z: <https://www.zemedelec.cz/svetovi-v-produkci-makoveho-semene/>.

Procházka, S. (1998). *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha. vyd. 1., ISBN 80-200-0586-2.

Puhakainen, T. et al. (2004). Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 54(5):743–53.

Rizhsky, L. et al. (2004). When defense pathways collide: the response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol*, 134(1):1683-1696.

Rorat, T (2006). Plant dehydrins—tissue location, structure and function. *Cell and Molecular Biology Letters*, 11(4):536–56.

-
- Riaz, A. et al. (2013). Effect of drought stress on growth and flowering of marigold (*Tagetes erecta* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 45(1):123–131.
- Salehi-Lisar, S. Y. a Bakhshayeshan-Agdam H. (2016). Drought Stress in Plants: Causes, Consequences, and Tolerance. *Drought Stress Tolerance in Plants*, 4(1):1-16.
- Shefali, et al. (2021). Phytomicrobiome Studies for Combating the Abiotic Stress in Biointerface Research in Applied Chemistry. *Review*, 11(3):10493-10509.
- Shinozaki, K. a Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2):221–227.
- Schachtman, D. P a Goodber, J. Q. D. (2008). Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*, 13(6):281-287.
- Simontacchi, M. et al. (2015). Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Frontiers in plant science*, 977(6):1-4.
- Toosi, A. F. et al. (2014). Effect of drought stress by using PEG 6000 on germination and early seedling growth of *Brassica juncea* Var. Ensabi. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*, 57(2):360-363.
- Touchette, B. W. et al. (2009). Tolerance and avoidance: Two contrasting physiological responses to salt stress in mature marsh halophytes *Juncus roemerianus* Scheele and *Spartina alterniflora* Loisel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 380(1-2):106–112.
- Vašák, J. et al. (2003). *Český mák a jeho perspektivy*. [online] Agris [cit. 08.03.2021]. Dostupné z: <http://www.agris.cz/clanek/127318>.
-

Venclová, B. (2020). *Jak se hnojil mák v minulosti a jak hnojíme nyní?* [online] Úroda [cit. 08.03.2021]. Dostupné z: <https://www.uroda.cz/jak-se-hnojil-mak-v-minulosti-a-jak-hnojime-nyni/>.

Walton, D. C. (1980). Biochemistry and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 31(1):453-489.

Wang, W. et al. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1):1–14.

Yang Y, et al. (2012). Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness of various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biology*, 54(5):743–53.

8 Seznam obrázků

Obrázek 1.1: Květ a makovice máku setého (flora-cs.com, 2021)	10
Obrázek 1.2: Makové pole (flora-cs.com, 2021)	12
Obrázek 1.3: Ilustrace reakce rostlin na vodní stres. (Osakabe, et al., 2014)	17
Obrázek 1.4: Odolnost proti stresu z nedostatku vody může vyplývat z mechanismů zahrnujících vyhýbání se nebo toleranci nedostatku vody (Bray, 2007)	18
Obrázek 1.5: Průduchy a epidermální buňky (natur.cuni.cz, 2011).....	19
Obrázek 3.1: Odrůdy máku setého Zavolzkij a Stupický bělosemenný.....	22
Obrázek 3.2: Nádobový pokus s přístřeškem.....	23
Obrázek 3.3: Otisky listů do předem připravené hmoty	24
Obrázek 3.4: Zkouška klíčivosti probíhající na petriho miskách s navlhčeným filtračním papírem.....	25
Obrázek 4.1: Průduchový index u rostlin s pravidelnou a sníženou zálvkou pěstovaných v polním pokusu.....	28
Obrázek 4.2: Počet semen vyklíčených, nevyklíčených a odumřelých po vyklíčení s pravidelnou a se sníženou zálvkou.....	29
Obrázek 4.3: Počet semen vyklíčených do objevení děložních listů u semen získaných z rostlin s pravidelnou zálvkou a se sníženou zálvkou (PEG).....	30
Obrázek 4.4: Relativní akumulace dehydrinů v dělohách klíčících rostlin pěstovaných v podmínkách simulovaného sucha a kontrolních	31

9 Seznam tabulek

Tabulka 4.1: Počet průduchů, epidermálních buněk a průduchový index u rostlin s pravidelnou a sníženou zálivkou pěstovaných v polním pokusu 27

Tabulka 4.2: Porovnání klíčivosti semen získaných z rostlin s pravidelnou a sníženou zálivkou 28

Tabulka 4.3: Porovnání klíčivosti semen získaných z rostlin s pravidelnou zálivkou a z rostlin se zálivkou sníženou v podmínkách simulovaného sucha a kontrolních 29

Tabulka 4.4: Relativní akumulace dehydrinů v dělohách klíčících rostlin pěstovaných v podmínkách simulovaného sucha a kontrolních 31

10 Seznam použitých zkratek

ABA Kyselina abscisová

ČSÚ Český statistický úřad

GM Genetická modifikace

HTS Hmotnost tisíce semen

LAI Celková plocha listu

LEA Hojná pozdní embryogeneze (Late Embryogenesis Abundant)

PEG Polyethylenglykol

ROS Reaktivní forma kyslíku

SPR Rezonance povrchového plazmonu

WUE Účinnost využití vody
