

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



**Bc. Jan Kratochvíl**

**Fyziologické aspekty odolnosti čiroku vůči abiotickým stresům**  
**Physiological mechanisms of abiotic stress tolerance in *Sorghum***  
***bicolor***

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Hana Konrádová, Ph.D.

Praha 2017



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:



**Poděkování:**

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Haně Konrádové, Ph.D. za veškerou pomoc při tvorbě této práce, skvělý přístup a ochotu vždy poradit při jakémkoli problému. Déle chci poděkovat doc. RNDr. Heleně Lipavské, PhD. a Ing. Milanu Urbanovi, DiS., kteří se na vzniku této práce též významně podíleli. Velký dík patří též mé rodině za podporu, která mi umožnila tuto práci napsat.



## Abstrakt

Pěstování řady kulturních plodin je v současnosti komplikováno zhoršující se dostupností vody, a to jak výkyvy v úhrnu srážek, tak jejich nepříznivým rozložením během vegetačního období. Z tohoto pohledu patří mezi velmi nadějně plodiny budoucnosti čirok. Šíření pěstování této rostliny schopné tolerovat i značný nedostatek vody ovšem brání její vysoká citlivost k nízkým teplotám. Paradoxně je ovšem podstata nepříznivé reakce rostlin čiroku na působení tohoto stresu málo prozkoumána. Cílem diplomové práce bylo popsat reakci mladých rostlin čiroku na působení chladu, nižší dostupnosti vody a jejich kombinace a ověřit možnost otužení rostlin působením nižší stresové zátěže, a to zejména na úrovni sacharidového metabolismu. Dalšími sledovanými charakteristikami byly osmotický potenciál pletiva listu, změna obsahu prolinu a základní morfometrické charakteristiky. V části experimentů byly rostliny pěstovány v substrátu v klimatizovaných boxech, v druhé části experimentů byla zvolena kontrolovaná kultivace v podmínkách *in vitro*. Experimenty byly provedeny na dvou genotypech čiroku („Ruzrok“ a „01Z1800012“). Rostliny těchto genotypů se v míře odolnosti ani ve sledovaných metabolických reakcích na stres výrazně nelišily. U rostlin obou genotypů bylo zjištěno statisticky významné zvýšení obsahu rozpustných sacharidů a tendence ke zvýšení obsahu prolinu po vystavení chladu nebo nižší dostupnosti vody. Příliš nízká teplota však k akumulaci rozpustných sacharidů nevedla. Obsah prolinu v listech rostlin čiroku se po ukončení působení nízké teploty snižoval pomaleji než obsah rozpustných sacharidů. Zvýšením obsahu rozpustných sacharidů reagovaly rostliny čiroku i při vystavení kombinaci chladu a nižší dostupnosti vody. Obsah rozpustných sacharidů v listech rostlin vystavených kombinovanému stresu byl statisticky významně vyšší i ve srovnání s rostlinami vystavenými působení jednotlivých stresových faktorů samostatně.

Klíčová slova: čirok, chlad, kombinovaný stres, osmotický stres, prolin, sacharidový metabolismus, sucho

## **Abstract**

Current agriculture is facing a serious challenge of decreasing precipitation and irregular occurrence of drought periods including their unfavorable distribution during the vegetation season. This leads to growing interest in planting highly drought-resistant crops like sorghum. In comparison with other crops, sorghum excels in low water demand, though exhibits high susceptibility to low temperatures, which hampers its spread to new regions. Surprisingly, there is not enough information about the nature of sorghum's reaction to cold exposure. The aim of this diploma thesis was to describe reactions of young sorghum plants exposed to cold stress, low water availability and their combination and to verify the possibility of plant hardening through previous low-stress load. The special focus was paid to changes in carbohydrate metabolism, which plays generally very important role in plant defense reactions. The other analyzed physiological traits were leaf tissue osmotic potential, proline content and basic morphometric characteristics. Experimental design consisted of pot experiments conducted in growth chambers and the experiments performed under controlled conditions *in vitro*, using two sorghum genotypes „Ruzrok“ and „01Z1800012“. Both genotypes exhibited similar response to stress treatment. Sorghum plants significantly increased their leaf and stem sugar contents in response to cold or osmotic stress. They also tend to increase leaf proline content in response to these stresses. However, sugar content increased only when a mild low temperature was applied. During subsequent recovery period, the decrease of stress-induced leaf proline content was slower than the decrease in sugar content. Interestingly, the exposure of sorghum plants to combination of osmotic stress and low temperature led to significant increase in sugar content when compared not only to the control plants but also to the plants exposed to cold or osmotic stress individually.

Key words: carbohydrate metabolism, cold, combined stress, drought, osmotic stress, proline, Sorghum

## Seznam zkratek

CBF	C-repeat binding factors
COR	cold responsive genes
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
CAT	katalasa
DREB	dehydration-responsive element-binding factors
ETR	ethylene responsive transcription factors
GC-MS	gas chromatography – mass spectrometry
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSP	heat shock protein
ICE1	inducer of CBF expression 1
LEA	late embryogenesis abundant
LHC	light harvesting complex
MES	2[N-Morpholino]ethanesulfonic acid
Na <sup>+</sup>	sodný ion
PEG	polyethylenglykol
POD	peroxidasa
PSII	fotosystém II
P5CS	δ-1-pyrrolin-5-karboxylátsyntetasa
RUBISCO	1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
R/S	poměr kořene a nadzemní části (root/shoot)
RT	retenční čas
RWC	relativní obsah vody (relative water content)
SET	suma efektivních teplot
SuSy	sacharosasyntasa
SOD	superoxiddismutasa
VÚRV	Výzkumný ústav rostlinné výroby v Praze Ruzyni

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Literární úvod.....	3
2. 1. Modelová rostlina .....	3
2. 2. Reakce čiroku na vybrané abiotické stresové faktory.....	3
2. 2. 1. Sucho .....	4
2. 2. 2. Zasolení.....	10
2. 2. 3. Chlad.....	10
2. 3. Reakce čiroku na kombinovaný stres.....	13
3. Materiál a metody.....	17
3. 1. Rostlinný materiál.....	17
3. 2. Nádobové experimenty .....	17
3. 2. 1. Sterilizace a výsev obilek.....	17
3. 2. 2. Vysazení naklíčených semen a kultivace rostlin.....	17
3. 2. 3. Použitý substrát .....	18
3. 2. 4. Typ zálivky.....	18
3. 2. 5. Příprava MS roztoku.....	18
3. 2. 6. Příprava Hoaglandova roztoku.....	18
3. 2. 7. Přehled provedených experimentů .....	18
3. 2. 8. Výpočet sumy efektivních teplot (SET) .....	20
3. 3. Experimenty in vitro .....	20
3. 3. 1. Optimalizace sterilizace obilek .....	21
3. 3. 2. Podrobný popis sterilizace obilek a kultivace rostlin in vitro .....	21
3. 3. 3. Příprava MS média .....	22
3. 3. 4. Přehled provedených experimentů .....	23
3. 4. Odběr materiálu pro analýzy .....	25
3. 4. 1. Odběr materiálu pro stanovení obsahu a zastoupení rozpustných sacharidů, prolinu a osmotického potenciálu pletiv .....	25
3. 4. 2. Odběr materiálu pro stanovení poměru hmotnosti sušiny kořene a nadzemní části (R/S poměr) .....	25
3. 4. 3. Příprava vzorků pro stanovení obsahu nestrukturních sacharidů .....	25
3. 4. 4. Stanovení obsahu a zastoupení nestrukturních sacharidů .....	26
3. 4. 5. Stanovení obsahu prolinu.....	26
3. 4. 6. Stanovení poměru hmotnosti sušiny kořene a nadzemní části.....	28

3. 4. 7. Stanovení listové plochy .....	28
3. 4. 8. Stanovení osmotického potenciálu pletiva listu .....	28
3. 4. 9. Zpracování dat .....	28
4. Výsledky .....	29
4. 1. Nádobové experimenty.....	29
4. 1. 1. Výběr vhodného substrátu, zjištění rychlosti růstu rostlin čiroku, optimalizace stanovení obsahu a spektra rozpustných sacharidů .....	29
4. 1. 2. Vliv různých variant otužovací a stresové teploty na růst, vývoj a sacharidový metabolismus rostlin čiroku.....	30
4. 1. 3. Vliv otužovací a stresové teploty na růst, vývoj, osmotický potenciál, obsah prolinu a sacharidový metabolismus rostlin čiroku .....	34
4. 2. Experimenty in vitro.....	56
4. 2. 1. Výběr metody sterilizace obilek .....	57
4. 2. 2. Vliv osmotického stresu na podíl sušiny na celkové hmotnosti a sacharidový metabolismus rostlin čiroku.....	57
4. 2. 3. Vliv osmotického stresu na osmotický potenciál a obsah prolinu v listech rostlin čiroku .....	61
4. 2. 3. Vliv kombinace osmotického stresu a nočního chladu na podíl hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti a sacharidový metabolismus rostlin čiroku.....	63
5. Diskuse.....	68
5. 1. Reakce čiroku na nižší dostupnost vody .....	68
5. 2. Reakce čiroku na působení nízké teploty .....	71
5. 3. Reakce čiroku na kombinovaný stres .....	74
6. Závěry .....	76
7. Seznam literatury.....	77



# 1. Úvod

S neustále rostoucí lidskou populací se zvyšují i nároky na efektivitu zemědělské produkce. Výnos zemědělských plodin je velmi významně ovlivněn působením nejrůznějších stresorů. Ideální jsou proto takové plodiny, které mají vysoký výnos, a zároveň dokáží dobře snášet působení stresových faktorů. Také je kvůli nedostatku vhodné zemědělské půdy nebo zhoršujícím se podmínkám nutné využívat genotypy schopné růst i v suboptimálním prostředí. Pro úspěšné šlechtění takovýchto rostlin je potřeba znát detailně následky působení stresu a fyziologické pozadí reakcí vedoucích k vyšší odolnosti. Také je nutné akceptovat skutečnost, že v přirozených podmínkách na rostliny často působí několik stresových faktorů zároveň. Kombinovaný stres může způsobit kvalitativně i kvantitativně odlišný typ poškození než jednotlivé stresy aplikované samostatně. Překvapivě se ale tomuto fenoménu dosud věnovalo jen malé množství studií.

Čirok [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] je významná zemědělská plodina z čeledi lipnicovitých (Poaceae). Díky značné odolnosti čiroku zejména k působení sucha roste zájem jak o jeho pěstování, tak o výzkum mechanismů jeho odolnosti. V chladnějších oblastech ovšem brání úspěšnému pěstování čiroku citlivost k nižším teplotám. Přesto je známo poměrně málo informací o reakci čiroku na působení chladu. Výhodou pro výzkum mechanismů tolerance čiroku k různým stresovým faktorům je existence velkého množství genotypů, což umožňuje vytipovat genotypy kontrastní vzhledem ke konkrétnímu stresoru. Diplomová práce je zaměřena na reakce čiroku na působení chladu, nižší dostupnost vody a jejich kombinaci. Dále se zabývá vlivem otužování rostlin působením nízké teploty na jejich následnou odolnost k tomuto stresovému faktoru.

## **Cíl práce**

Cílem diplomové práce je na základě detailní analýzy vybraných fyziologických charakteristik popsat složky fyziologické odpovědi čiroku na působení nízké teploty, nižší dostupnosti vody a kombinace těchto stresorů; a dále charakterizovat změny vyvolané u mladých rostlin otužovacím působením nízké teploty, s cílem odhadnout jejich potenciál zvýšit toleranci k následnému působení tohoto stresového faktoru.

## **Dílčí cíle:**

- ✓ Porovnání následujících vybraných fyziologických charakteristik a jejich změn při odpovědi na působení chladu nebo nižší dostupnosti vody u dvou genotypů čiroku:
  1. Základní růstové a vývojové parametry rostlin
  2. Osmotický potenciál pletiv
  3. Sacharidová bilance
  4. Obsah prolinu
- ✓ Zhodnocení vlivu otužování působením nízké teploty na výše popsané fyziologické charakteristiky rostlin čiroku s ohledem na zvýšení odolnosti k následnému stresu chladem
- ✓ Charakterizace změn ve vybraných fyziologických parametrech čiroku specifických pro stresovou odpověď vyvolanou kombinovaným stresem nízké teploty a nižší dostupnosti vody

## **Hypotézy**

- I. Rostliny čiroku reagují na sníženou dostupnost vody nebo působení nízké teploty akumulací kompatibilních solutů (rozpuštěných sacharidů a prolinu).
- II. Změny sacharidového metabolismu hrají roli v reakci rostlin čiroku na působení kombinovaného stresu.
- III. Reakce rostlin na působení kombinovaného stresu se liší od reakcí na jednotlivé stresové faktory aplikované samostatně

## 2. Literární úvod

### 2. 1. Modelová rostlina

Čirok obecný [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] je jednoletá (vzácně vytrvalá) bylina z čeledi lipnicovitých (Poaceae), která pochází z Afriky. První zmínky o jeho kultivaci pochází již ze starověkého Egypta, což ho řadí mezi nejstarší kulturní plodiny (BOTANY.CZ, 2017). Od té doby se rozšířil i na další kontinenty a je pěstován v rozmezí přibližně mezi 50 ° severní a 30 ° jižní šířky (Singh *et al.*, 1997). V roce 2014 byl pátou nejpěstovanější obilninou na světě (a sedmou nejpěstovanější kulturní rostlinou), přičemž mezi země s největší produkcí čiroku patří USA, Mexiko, Nigérie a Indie (FAO, 2017). Existuje několik variet čiroku s různým využitím pro člověka. Část rostlin je pěstována jako potravina. Zrno čiroku neobsahuje lepek, navíc jsou určité genotypy díky schopnosti akumulovat vysoké množství železa nebo zinku velmi vhodnou obilninou v oblastech, kde obyvatelé trpí nedostatkem těchto minerálů (Paiva *et al.*, 2016). Dále slouží čirok jako krmivo pro hospodářská zvířata, zdroj vlákniny a k výrobě energie. Výhodou čiroku je jeho relativně vysoká odolnost k působení některých stresových faktorů, jako je zasolení, zvýšená teplota, a zejména sucho.

Čirok je diploidní rostlina ( $n = 20$ ) s poměrně malým genomem (přibližně 730 Mb), který již byl osekvenován (Paterson *et al.*, 2009). To z něj činí vhodnou modelovou rostlinou pro studium dalších plodin disponujících C4 fixací uhlíku včetně výzkumu mechanismů odolnosti k suchu. Mezi kulturní rostliny nejbližší příbuzné čiroku patří cukrová třtina a kukuřice, dále pak rýže (Paterson *et al.*, 2004). Dalšími výhodami čiroku pro využití ve výzkumu je zvládnutá genetická modifikace (Kosambo-Ayoo *et al.*, 2011; Maheswari *et al.*, 2010; Visarada *et al.*, 2013).

### 2. 2. Reakce čiroku na vybrané abiotické stresové faktory

Rostliny jsou vystavovány působení mnoha rozličných stresových faktorů. I různé stresové faktory ovšem mohou rostliny ovlivňovat podobnými mechanismy. Příkladem může být přítomnost osmotického stresu, jehož vliv je přítomen i u komplexnějších stresů jako např. sucha, zasolení, nízké teploty apod. Vzhledem k tomuto faktu není překvapivé, že i reakce rostlin na působení různých stresových faktorů může být podobná, například osmotické přizpůsobení akumulací kompatibilních solutů nebo syntéza látek účastnících se

ochrany buněčných struktur. Dalším rysem společným pro různé stresové faktory je vyvolání tvorby vyššího množství reaktivních forem kyslíku (ROS). Tyto látky mají významnou roli v různých metabolických procesech a je jim připisována i role v rostlinné signalizaci. Kvůli jejich vysoké reaktivitě musí být ovšem jejich hladina velmi přísně regulována (např. del Rio, 2015). Následující text popisuje reakce čiroku na vybrané abiotické stresové faktory. Další rostlinné druhy jsou zmiňovány v případě nedostatku informací zjištěných na čiroku nebo v případě u rostlin obecně platných jevů.

### 2. 2. 1. Sucho

Nedostatek vody a výkyvy v úhrnu srážek patří mezi velké problémy, se kterými se v současnosti zemědělství potýká. Dá se předpokládat, že tento problém se v budoucnosti bude dále zhoršovat (Escalante-Sandoval *et Nunez-Garcia*, 2007; Fauchereau *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2016). V oblastech se sníženým úhrnem srážek je proto vhodné pěstovat plodiny, které jsou schopné růst a poskytovat dostatečný výnos i při nižší dostupnosti vody. Jednou z takových plodin je čirok. Díky svému zeměpisnému původu dobře snáší sucho a v případě nedostatku vody dosahuje vyššího výnosu než jiné plodiny za stejných podmínek [např. kukuřice nebo pšenice, viz Potgieter *et al.* (2016); Schittenhelm *et Schoetter* (2013); Staggenborg *et al.* (2008)]. I přes odolnost čiroku k suchu je ovšem jeho růst a vývoj působením tohoto stresoru negativně ovlivněn, což může vést i ke snížení výnosu rostlin (Nxele *et al.*, 2016; Sankarapandian *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2014).

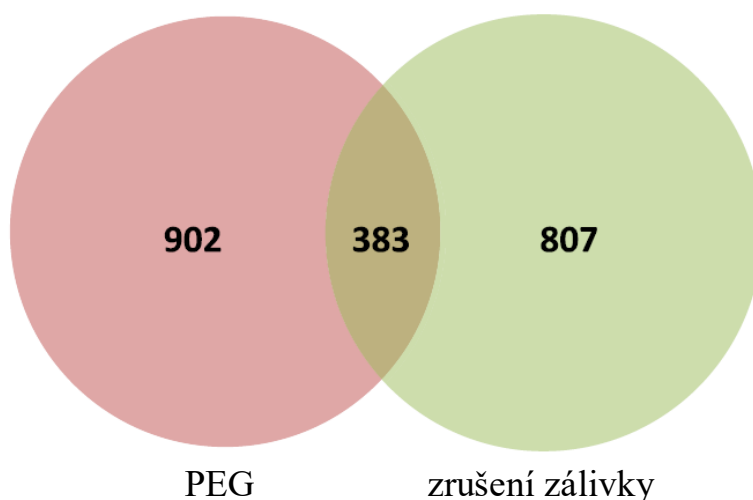
Mezi reakce s časným nástupem na začátku působení sucha patří snížení transpirace a účinnosti fotosyntézy (Ogbaga *et al.*, 2014; Zegada-Lizarazu *et Monti*, 2013). Různé genotypy čiroku se ovšem mohou významně lišit v tom, kdy a v jaké míře k této reakci dochází. Část genotypů po vystavení suchu dokáže udržovat déle otevřené průduchy a aktivní fotosyntézu, naopak druhá část genotypů se brání ztrátě vody uzavřením průduchů (Mutava *et al.*, 2011; Ogbaga *et al.*, 2014; Qazi *et al.*, 2014; Sutka *et al.*, 2016). Někteří autoři označují první skupinu genotypů jako anizohydrické a druhou jako izohydrické. Ke snížení účinnosti fotosyntézy dochází jednak díky poškození fotosyntetického aparátu, a jednak cíleným snížením účinnosti fotosyntetických reakcí, které umožní poškození předejít (Zegada-Lizarazu *et Monti*, 2013). To může zahrnovat i cílenou degradaci Rubisca (ribulóza-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa) a proteinu D1 [protein fotosystému II (PSII)] předpokládanou u izohydrického genotypu vystaveného suchu (Ogbaga *et al.*, 2014). Jak u izohydrických, tak u anizohydrických rostlin byl za stresu zjištěn vyšší obsah

sacharidů v listech a stonku než u rostlin pěstovaných při dostatečné závlivce (Ogbaga *et al.*, 2014; Qazi *et al.*, 2014; Zegada-Lizarazu *et Monti*, 2013). Ke zvýšení obsahu sacharidů v případě anizohydrických rostlin dochází zčásti díky udržení aktivní fotosyntézy, a zčásti díky ztrátám vody. U izohydrických rostlin se na zvýšení obsahu sacharidů podílely hlavně redukující cukry, což pozitivně korelovalo se zvýšením aktivity invertasy. Kromě toho došlo k významnému snížení katabolické aktivity sacharosasyntasy (SuSy) u obou skupin (Qazi *et al.*, 2014).

Rozdílné reakce čiroku na působení sucha je možné pozorovat nejen na úrovni genotypů, ale i v rámci různých vývojových fází jedné rostliny (Sankarapandian *et al.*, 2012; Zegada-Lizarazu *et Monti*, 2013; Zegada-Lizarazu *et al.*, 2015). Zegada-Lizarazu *et Monti* (2013) zjistili, že mladší rostliny čiroku (aplikace stresu 40. den po výsevu) se za sucha brání poškození fotosyntetického aparátu především snížením efektivity fotosyntetických reakcí, zatímco u starších rostlin (aplikace stresu 60. den po výsevu) považují za hlavní ochrannou reakci akumulaci kompatibilních solutů, např. rozpustných sacharidů, jejichž obsah stanovovali. Jak ovšem autoři sami uznávají, k tomuto závěru je třeba přistupovat opatrně, neboť zde stanovovali obsah rozpustných sacharidů pouze ve stonku rostlin (Zegada-Lizarazu *et Monti*, 2013). V dalším experimentu tohoto týmu s podobným tématem autoři stanovovali obsah rozpustných sacharidů v listech rostlin a zjistili, že ke zvýšení obsahu rozpustných sacharidů došlo pouze u mladších rostlin, u starších se obsah významně neměnil (Zegada-Lizarazu *et al.*, 2015). Nicméně jak u mladších, tak u starších rostlin byla po obnovení závlivky zjištěna rychlá obnova fotosyntetického aparátu, což autoři vyhodnocují jako jednu z důležitých vlastností podílejících se na odolnosti čiroku k suchu (Zegada-Lizarazu *et Monti*, 2013).

Sacharidy rostlinám primárně slouží jako zdroj energie a uhlíku. Kromě této role je předpokládána jejich účast v ochraně různých struktur včetně molekul fotosyntetického aparátu (Zegada-Lizarazu *et al.*, 2015; Zegada-Lizarazu *et Monti*, 2013). Dále slouží k osmotickému přizpůsobení rostlin (Ogbaga *et al.*, 2014; Qazi *et al.*, 2014; Zegada-Lizarazu *et Monti*, 2013), jako antioxidanty včetně schopnosti zhaset ROS (Matros *et al.*, 2015; Peshev *et al.*, 2013) a signální molekuly (Chen *et al.*, 2015; Lastdrager *et al.*, 2014). Existence více prolínajících se rolí sacharidů může být pro rostliny výhodná při jejich využití v reakci na stres, studium role sacharidů v konkrétních situacích je tím ovšem komplikováno.

Ve výše uvedených studiích provedených na čiroku autoři stanovovali buď pouze celkový obsah rozpustných sacharidů v pletivu (Ogbaga *et al.*, 2014; Zegada-Lizarazu *et Monti*, 2013), nebo celkový obsah rozpustných sacharidů a obsah redukujících cukrů (Qazi *et al.*, 2014; Zegada-Lizarazu *et al.*, 2015). Nedávno byla publikována zajímavá studie, ve které autoři provedli podrobnější analýzu změn spektra sacharidů u stresovaných rostlin. V listech stresovaných rostlin došlo oproti kontrole ke zvýšení obsahu glukosy, lyxosy, trehalosy, rafinosy, fruktosy, sacharosy, sorbitolu, threitolu a myo-inositolu, a ke snížení obsahu talosy. V kořenech byl u stresovaných rostlin vyšší obsah lyxosy a trehalosy a nižší obsah glukosa-6-fosfátu (Pavli *et al.*, 2013). V této studii bylo k simulaci sucha využito nepenetrující osmotikum polyethylenglykol (PEG) 6000. PEG snižuje dostupnost vody pro rostlinu, a při tom nevstupuje do buněk a neinterferuje s metabolismem. Při interpretaci výsledků z experimentů s PEG je nutné si uvědomit rozdíly proti aplikaci stresu zrušením zálivky, např. okamžitý nástup stresu při použití PEG proti pozvolnému nástupu stresu při zrušení zálivky nebo fakt, že při zrušení zálivky dochází ke zhoršení kontaktu kořenů s půdou a tím i zhoršení příjmu živin. Tyto rozdíly mohou vést k odlišným reakcím rostlin, což bylo pozorováno např. v transkriptomických studiích, které provedli Dugas *et al.* (2011) a Johnson *et al.* (2014). V experimentu s použitím PEG a zrušením zálivky se shodovala pouze část z celkového počtu genů se změněnou expresí (viz Obr. č. 1). Rostliny, kterým byla zrušena zálivka např. exprimovaly více geny zajišťující syntézu vosků než rostliny vystavené PEG. Ty naopak výrazněji zvýšily expresi genů podporujících zhášení ROS (Dugas *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2014).



**Obr. č. 1: Diagram znázorňující počty shodných a rozdílných genů se změněnou expresí v experimentech s využitím PEG a zrušením zálivky. Zahrnuty byly pouze transkripty s více jak dvojnásobnou změnou proti kontrole. Převzato a upraveno z Johnson *et al.* (2014).**

Dalším metabolitem, který rostliny často využívají ke zmírnění následků stresu, je prolin. Tomuto kompatibilnímu solutu je připisována role osmotika, osmoprotektantu a antioxidantu včetně schopnosti zhaset ROS (Reddy *et al.*, 2015). V několika studiích autoři zjistili zvýšení hladiny prolinu u rostlin čiroku stresovaných nedostatkem vody (např. Nxele *et al.*, 2016; Reddy *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 1996). K akumulaci prolinu v rostlinách může docházet zvýšením jeho syntézy (Wood *et al.*, 1996), čemuž odpovídá zjištění, že u stresovaných rostlin čiroku došlo ke zvýšení transkriptů genů kódujících  $\delta$ -1-pyrrolin-5-karboxylátsyntetasu (P5CS) (Su *et al.*, 2011), enzymu s klíčovou rolí v biosyntéze prolinu (Hu *et al.*, 1992). Nižší dostupnost vody též vedla ke zvýšení aktivity P5CS (Hinge *et al.*, 2015). K akumulaci prolinu může ovšem přispět též jeho nižší degradace nebo nižší využití v syntéze proteinů (Wood *et al.*, 1996). V kontrastu se studiemi popisujícími zvýšení obsahu prolinu za stresu jsou výsledky autorů, kteří u stresovaných rostlin významné zvýšení obsahu prolinu nezjistili (Ogbaga *et al.*, 2014; Pavli *et al.*, 2013). Ogbaga *et al.* (2014) sledovali reakce dvou různých genotypů čiroku stresovaných suchem a zjistili, že zvýšením obsahu prolinu reagoval na nedostatek vody pouze jeden ze zkoumaných genotypů. Je tedy možné, že rozdílné výsledky výše zmíněných studií jsou způsobeny buď odlišným experimentálním uspořádáním, nebo odlišnou strategií jednotlivých genotypů čiroku.

Vyjma prolinu dochází u rostlin trpících nedostatkem vody ke změně obsahu některých dalších aminokyselin (např. alanin, glycin, asparagin) (Pavli *et al.*, 2013), zvýšení hladiny aminokyselinového derivátu glycin betainu (Ogbaga *et al.*, 2014; Wood *et al.*, 1996) a změně hladiny malátu, citrátu, glykolátu, glukonátu a putrescinu (Pavli *et al.*, 2013).

Kromě nízkomolekulárních látek dochází u čiroku za stresu ke zvýšení obsahu rozpustných proteinů s ochrannou funkcí pro rostlinné struktury (Hinge *et al.*, 2015). Mezi ty patří tzv. LEA (late embryogenesis abundant) proteiny, u kterých se předpokládá, že mají roli v ochraně membrán, udržují iontovou rovnováhu, váží vodu a fungují jako chaperony (např. Ashraf, 2010). Konkrétně byl u čiroku vystaveného nedostatku vody zjištěn vyšší obsah dehydrinů (LEA proteiny skupiny II) i transkriptu kódujícího tyto proteiny (Pasini *et al.*, 2014; Wood *et al.*, 1997) a vyšší obsah transkriptu kódujícího LEA proteiny skupiny III (Dalal *et al.*, 2013).



*et Ogata, 1987*). Již zmíněná signální role sacharidů byla zkoumána i v experimentu provedeném na čiroku. V této studii autoři zjistili, že zvýšení obsahu rozpustných sacharidů v kombinaci se sníženým obsahem dusíku v listech čiroku vede k posílení senescence starších listů (Chen *et al.*, 2015). Ta umožňuje rostlinám omezit ztráty vody transpirací a využít živiny translokované ze starších listů pro růst a vývoj nových orgánů (Munne-Bosch *et Alegre, 2004*). Mezi další způsoby omezení výparu zjištěné u čiroku patřilo ovlivnění hustoty průduchů a velikosti listů (Borrel *et al.*, 2014). U stresovaných rostlin také docházelo k výraznějšímu růstu kořenů v porovnání s růstem nadzemní části a ke změnám v množství vytvořených odnoží (Borrel *et al.*, 2014; Sutka *et al.*, 2016). Tento soubor reakcí umožňuje rostlinám snížit spotřebu vody před kvetením, která je následně pro rostliny dostupná během zrání obilek. U genotypů čiroku schopných efektivně hospodařit s vodou dochází později k senescenci indukované nedostatkem vody a jejich nadzemní část zůstává déle zelená. S tím je spojena menší náchylnost k poléhání a vyšší výnos (Borrel *et al.*, 2014; Hammer, 2006). Je možné předpokládat, že na rozdíl od optimálních podmínek není výnos čiroku vystaveného suchu při zrání obilek limitován pouze silou sinku, ale i možností zdrojových buněk produkovat asimiláty (Tovignan *et al.*, 2016).

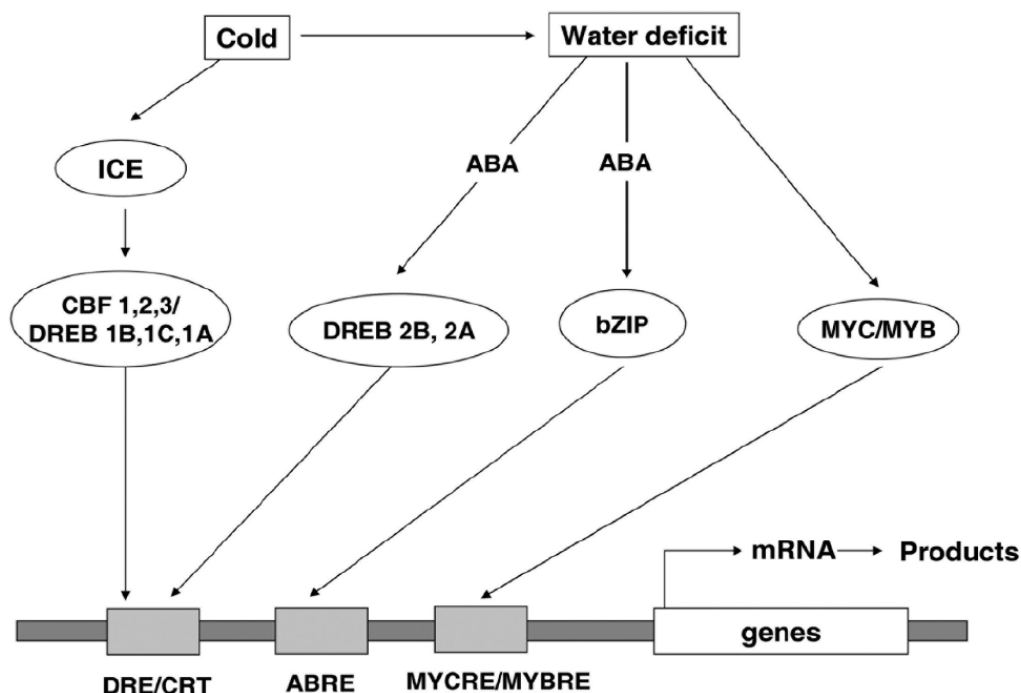
Výzkum odolnosti rostlin k suchu je obecně obtížně uchopitelný problém. Existuje mnoho způsobů simulace tohoto stresu v experimentálních podmínkách (např. různé varianty zrušení nebo snížení závlivky, ošetření různými osmotiky nebo aplikací soli), které se podle různých autorů více nebo méně blíží přirozeným podmínkám. Výsledky experimentů je poté obtížné srovnávat, neboť na fyziologický stav rostlin mají kromě zvoleného způsobu navození stresu velký vliv i samotné podmínky kultivace. Také je nutné si uvědomovat, že rostliny jsou v různém vývojovém stadiu různě citlivé a mají rozdílný čas na zotavení po stresu (Sankarapandian *et al.*, 2012; Zegada-Lizarazu *et Monti, 2013*). Jak vyplývá z předchozího textu, reakce rostlin na suchu je velmi komplexní a provázaná. Tento fakt ovšem komplikuje výzkum významu jednotlivých reakcí rostliny pro celkovou odolnost vůči stresu. Dále je při posuzování odolnosti rostlin ke stresu důležité zvážit, z jakého úhlu pohledu tuto odolnost posuzujeme. Pro potřeby zemědělství je např. výhodná reakce anizohydrických rostlin (podrobně popsána výše), které dokáží při vystavení suchu déle udržet aktivní fotosyntézu a růst. Pro přežití samotné rostliny (zejména při déletrvajícím suchu) ovšem může být výhodnější reakce izohydrických rostlin, které neztrácí tolik vody a jsou schopné vhodněji upravit metabolismus vzhledem ke zhoršeným podmínkám (Ogbaga *et al.*, 2014).

### 2. 2. 2. Zasolení

Snížená dostupnost vody může být vyvolána též vystavením rostlin zvýšenému obsahu solí v substrátu. Rostliny se ovšem v tomto případě musí vyrovnat nejen s osmotickým stresem, ale i s narušením iontové rovnováhy způsobené akumulací velkého množství iontů v buňkách (Tester *et Davenport*, 2013; Yin *et al.*, 2013). Některé reakce sice mohou být podobné reakcím rostlin vystavených suchu [např. zvýšení obsahu sacharosy a glukosy zjištěné v listech mladých rostlin čiroku vystavených vyšší koncentraci NaCl v médiu (Yin *et al.*, 2013)], v dalších charakteristikách už se ovšem reakce rostlin liší. Příkladem může být akumulace vysokého množství draslíku zjištěná u rostlin čiroku vystavených zasolení (Wang *et al.*, 2014), nebo odlišné reakce klíčících semen čiroku ošetřených NaCl nebo PEG (Gill *et al.*, 2003). Aplikace soli proto není vhodným způsobem simulace sucha v experimentálních podmínkách a mělo by být bráno jako samostatný a jedinečný stresový faktor.

### 2. 2. 3. Chlad

Působení chladu na rostliny má některé znaky společné s působením sucha. Podobně jako za sucha dochází u rostlin trpících chladem ke zhoršení hospodaření s vodou, dále může chlad indukovat tvorbu ROS a způsobovat změny v integritě cytoplazmatické membrány (Aroca *et al.*, 2011; Nishizawa *et al.*, 2008; Orvar *et al.*, 2000; Razmi *et al.*, 2013). Proto není překvapením, že část signálních drah odpovědi na suchu a chlad je pro tyto stresové faktory společná (viz Obr. č. 3) (Beck *et al.*, 2007). Další složky působení chladu na rostliny se suchem již společné nejsou. Nízká teplota ovlivňuje metabolismus rostlin (jednotlivé složky jsou různě citlivé k působení chladu), transport látek v rostlině a její růst a vývoj (Bekele *et al.*, 2014; Maulana *et Tesso*, 2014; Razmi *et al.*, 2013; Zegada-Lizarazu *et al.*, 2016). Tyto odlišné složky stresového působení mohou být důvodem proč čirok, který je považován za rostlinu odolnou k suchu, je naopak poměrně citlivý k působení nízké teploty.



**Obr. č. 3: Překryv signálních drah odpovědi na sucho a chlad.** Chlad nebo nedostatek vody indukuje přes zvýšení exprese transkripčního faktoru ICE nebo změnu v hladině kyseliny abscisové v určitých pletivech expresi transkripčních faktorů CBF 1, 2, 3/DREB 1B, 1C, 1A; DREB 2B, 2A; bZIP a MYC/MYB, které dále ovlivňují transkripci genů s promotory DRE/CRT, ABRE a MYCRE/MYBRE. Převzato z Beck *et al.* (2007)

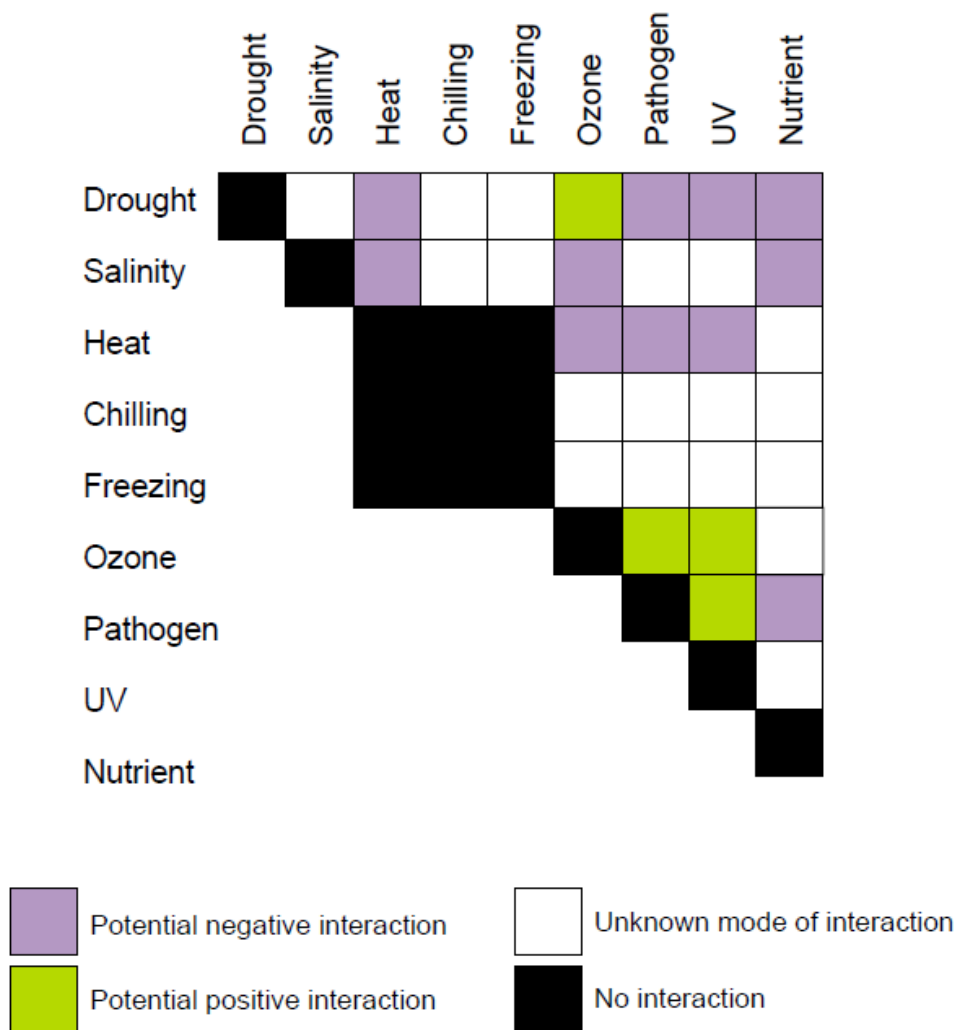
Optimální teplota pro klíčení obilek čiroku se nachází mezi 21 – 35 °C (Maiti, 1996; cit. v Prasad *et al.*, 2006). Nižší teplota vede ke snížení množství vyklíčených obilek a prodloužení doby klíčení. Vliv nízké teploty na rostliny čiroku je patrný i po vyklíčení. U mladých rostlin bylo pozorováno vadnutí, které je projevem horší schopnosti hospodařit s vodou (Bekele *et al.*, 2014). Ta je způsobena nerovnováhou mezi příjmem vody kořeny a jejím výdejem transpirací (Aroca *et al.*, 2011). Proti rostlinám pěstovaným v optimální teplotě mají rostliny vystavené chladu kratší kořeny i prýt, což koreluje s nižším výnosem sušiny rostlinného těla (Razmi *et al.*, 2013, Zegada-Lizarazu *et al.*, 2016). Největší náchylnost k poškození působením nízké teploty byla zjištěna u semenáčů přibližně 5 dní poté, co vyrostou nad úroveň substrátu. Zajímavé je zjištění, že rostliny vystavené chladu od začátku klíčení snášely stres lépe než rostliny vystavené chladu až poté, co vyrostly nad úroveň substrátu (Bekele *et al.*, 2014). Fyziologická podstata této aklimace u čiroku ovšem zatím popsána nebyla.

Určité informace o fyziologickém pozadí reakcí rostlin široku spojených s vyšší odolností k chladu byly zjištěny především až v posledních dvou letech. Stejně jako při působení sucha dochází u rostlin široku stresovaných nízkou teplotou k reakci na úrovni fotosyntetického aparátu (Zegada-Lizarazu *et al.*, 2016; Zegada-Lizarazu *et Monti*, 2013). Při srovnání odolného a citlivého genotypu bylo zjištěno, že odolný genotyp zvládal při vystavení chladu lépe rozdělovat přicházející světelnou energii mezi PS II a alternativní příjemce, a byl schopný udržet aktivní reakční centra PS II. Naopak u citlivého genotypu došlo k rychlejší a rozsáhlejší deepoxidaci violaxanthinu, a následnému uzavírání reakčních center PS II. Je možné, že na reakci zjištěné u odolného genotypu se podílí efektivnější regulace LHC komplexů (light harvesting complex) a vyšší obsah plastochinonu A. U citlivého genotypu též došlo v porovnání s odolným k mnohem výraznější degradaci chlorofylů, což se projevilo na delší době nutné k regeneraci fotosyntetického aparátu po ukončení stresu. Kromě toho u citlivého genotypu došlo po ukončení působení chladu k nadprodukcí enzymů fixace CO<sub>2</sub>, což dále snižuje množství asimilátů využitelných k zabudování do rostlinných struktur (Zegada-Lizarazu *et al.*, 2016). Při porovnání genové exprese genotypů kontrastních v odolnosti k chladu bylo zjištěno, že u odolného genotypu došlo při vystavení chladu na rozdíl od citlivého k výraznému zvýšení exprese transkripčních faktorů jako C-repeat binding factors (CBF), Dehydration-responsive element-binding factors (DREB) a Ethylene responsive transcription factors (ETR). Je známo, že tyto faktory mají roli ve zvýšení odolnosti rostlin k chladu. Další z genů se zvýšenou expresí za stresu u odolného genotypu byly geny pro cytochromy P450. Ty se účastní redoxních reakcí a jsou akumulovány v rostlinách při vystavení chladu (Chopra *et al.*, 2015). Zajímavé je zjištění, že na rozdíl od působení sucha a zasolení chlad nevyvolává zvýšení transkripce genů kódujících LEA proteiny skupiny III (Dalal *et al.*, 2013). V souladu s výsledky Chopra *et al.* (2015) jsou i zjištění Fiedler *et al.* (2016), kteří mapovali oblasti na chromozomech široku související s odolností k chladu. V oblastech na chromozomech určených autory se nachází již zmíněné transkripční faktory CBF a DREB, dále transkripční faktor ICE1 (inducer of CBF expression 1), geny COR (cold responsive genes) a geny podobné genům pro lipasu OSIGBa0111L12.4 (patří do proteinové rodiny cytochromů P450) a kyselou fosfatasu (hydroxylasa mastných kyselin). Ty by mohly mít dle autorů vliv na fluiditu membrán ovlivněním poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin (Fiedler *et al.*, 2016). Informace o reakcích rostlin široku vystavených působení nízké teploty na úrovni metabolomu a proteomu ovšem stále chybí.

Chlad vyvolává změny i v celkové stavbě rostlinného těla. Podobně jako za sucha byl u rostlin vystavených nízké teplotě zjištěn výraznější růst kořenů oproti nadzemní části (Razmi *et al.*, 2013). Toto zjištění je v souladu s hypotézou, že nízká teplota zhoršuje schopnost rostlin hospodařit s vodou (Aroca *et al.*, 2011; Bekele *et al.*, 2014).

### **2. 3. Reakce čiroku na kombinovaný stres**

V přirozených podmínkách působí na rostliny velmi často společně několik různých stresových faktorů. Výsledný vliv na rostliny a míru jejich poškození způsobenou kombinovaným stresem nelze jednoduše předpovědět na základě vědomostí o působení jednotlivých stresových faktorů. Kombinace stresových faktorů může způsobit kvalitativně odlišný typ poškození než působení stresových faktorů samostatně. Kromě toho může dojít k rozsáhlejšímu poškození rostlin, které může být vyvoláno prohloubením účinku jednoho stresového faktoru působením dalšího. Například nedostatek živin může být dále umocněn působením sucha, které snižuje kontakt kořene s okolní půdou, a tím způsobuje nižší schopnost rostliny přijímat živiny. Kombinovaný stres také může vyvolávat protichůdné požadavky na ochrannou reakci rostlin (viz review Mittler, 2006). Příkladem může být působení sucha a vysoké teploty zároveň, kdy si rostlina z důvodu nedostatku vody nemůže dovolit efektivně snižovat teplotu listů transpirací (Rhizsky *et al.*, 2002; Zandalinas *et al.*, 2016). Existují ovšem i případy, kdy vystavení rostliny působení jednoho stresového faktoru vede ke zvýšení odolnosti k působení dalšího stresového faktoru. Vysvětlením může být fakt, že některé stresové faktory mají podobný charakter působení na rostliny, a rostliny na ně mohou reagovat stimulací stejných signálních a metabolických drah (Bowler *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 1996). Jako příklad bývá uváděno působení ozonu, které může vyvolat vyšší odolnost rostlin k napadení patogenními organismy (Bilgin *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 1996). Na Obr. č. 4 je znázorněn přehled dalších možných interakcí působení různých stresových faktorů na rostliny.



**Obr. č. 4: Přehled možných interakcí působení různých stresových faktorů na rostliny.** Převzato z Mittler (2006)

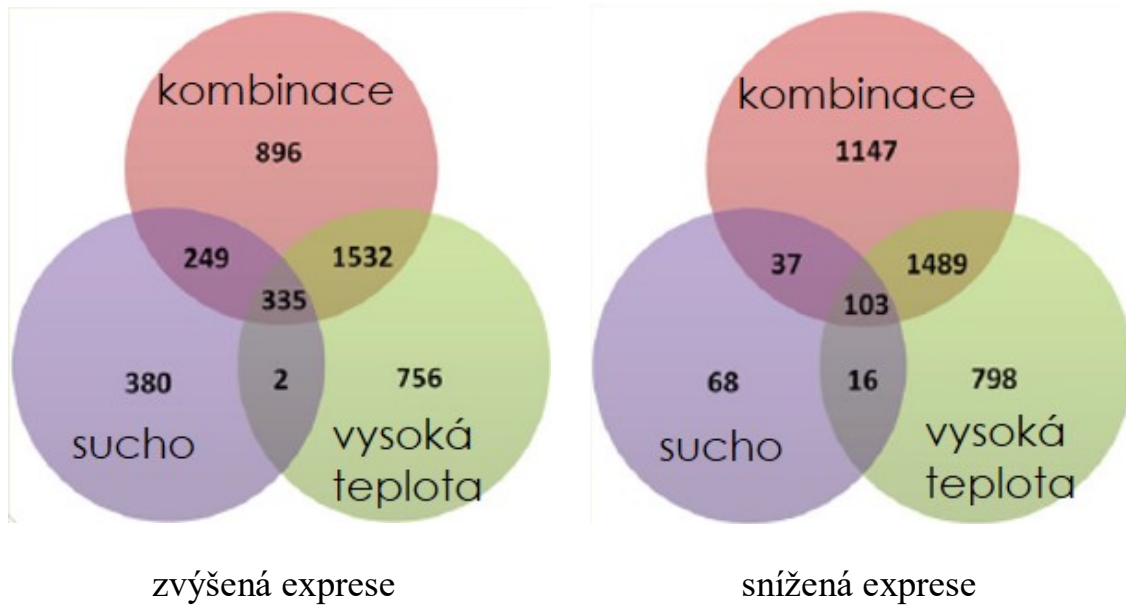
Pozitivní vliv interakce dvou stresových faktorů na odolnost rostlin souvisí mimo jiné s jevem označovaným jako tzv. priming. Jedná se o fenomén, kdy působení určitého podnětu ovlivní reakci rostliny na budoucí stresový podnět. Reakce takto ovlivněné rostliny je poté efektivnější v porovnání s reakcí rostliny tzv. naivní (v orig. naíve, rostlina, která neprošla primingem). Přitom podnětem vedoucím k primingu může být jak stresový faktor shodný s následujícím stresovým působením v budoucnu, tak podnět odlišný. Zásadní podmínka pro to, aby mohl priming fungovat, je schopnost rostliny uchovat informaci o reakci na prvotní podnět. To umožňuje například modifikace histonů v reakci na působení prvotního podnětu (Jaskiewicz *et al.*, 2011; Sani *et al.*, 2013). Problematika primingu je do detailů popsána např. v review Hilker *et al.* (2016).

Tvrzení, že vliv kombinovaného stresu na rostliny nelze popsat pouhým součtem působení jednotlivých stresových faktorů, podporují i zjištění transkriptomických studií provedených na tabáku a huseníčku. Ze všech genů se změnou exprese po vystavení kombinovanému stresu tvořila část skupina genů, jejichž exprese se měnila i po vystavení rostliny jednotlivým stresovým faktorům samostatně. V další části byly ovšem zastoupeny geny, jejichž exprese se při působení samostatného stresového faktoru neměnila, a jejichž exprese se změnila pouze po vystavení kombinovanému stresu (Rizhsky *et al.*, 2002; Rizhsky *et al.*, 2004).

Několik studií zaměřených na vliv kombinovaného stresu bylo provedeno již i na čiroku. Machado *et Paulsen* (2001) zjistili, že pokud mají rostliny čiroku dostatek vody v substrátu, relativní obsah vody (RWC – relative water content) v listech se významně nemění ani při působení vysokých teplot. Naopak nedostatek vody v kombinaci s vysokou teplotou vedl k významnému snížení RWC, vodního i osmotického potenciálu a turgoru v listech (Machado *et Paulsen*, 2001). Analýzou transkriptomu bylo zjištěno, že i u čiroku je odpověď na kombinaci sucha a vysoké teploty unikátní (viz obr. č 5). Do skupiny genů, jejichž exprese se změnila pouze při působení sucha a vysoké teploty zároveň, patřily např. geny kódující enzymy syntézy polyaminů, geny kódující specifické HSP (heat shock protein) a LEA proteiny, geny kódující iontové kanály a různé transkripční faktory. Naopak mezi geny se změnou exprese jak za sucha, vysoké teploty i jejich kombinace patřily geny kódující některé HSP, glutathion transferasy a geny asociované se stárnutím (Johnson *et al.*, 2014).

V experimentu provedeném Zhao *et al.* (2014), kde byly rostliny zalévány roztoky o různé koncentraci sodných iontů ( $\text{Na}^+$ ) a o různé hodnotě pH, došlo k nejvýznamnějšímu poškození též vlivem kombinovaného stresu. Autoři zjistili, že při koncentraci  $\text{Na}^+$  100 mM nemá různá hodnota pH významný vliv na dobu klíčení a počet vyklíčených obilek. Při vyšší koncentraci  $\text{Na}^+$  již vliv hodnoty pH patrný byl. Na rozdíl od klíčení byl růst vyklíčených semenáčů ovlivněn zvýšením pH i při 100mM koncentraci  $\text{Na}^+$ . S rostoucí koncentrací  $\text{Na}^+$  i hodnotou pH se též zvyšovalo oxidativní poškození membrán. Zajímavé je zjištění, že při neutrální hodnotě pH došlo u semenáčů vystavených 100mM koncentraci  $\text{Na}^+$  ke zvýšení obsahu rozpustných proteinů a aktivity SOD, CAT a POD proti kontrolním rostlinám. Při zvýšení hodnoty pH nebo zvýšení koncentrace  $\text{Na}^+$  se obsah rozpustných proteinů a aktivita antioxidantních enzymů buď neměnily, nebo došlo k jejich snížení.

Autoři z těchto výsledků uzavírají, že kombinovaný stres snižuje schopnost ochrany semenáčů proti oxidativnímu stresu (Zhao *et al.*, 2014).



**Obr. č. 5: Diagramy znázorňující počty shodných a rozdílných genů se zvýšenou nebo sníženou expresí u rostlin vystavených suchu, vysoké teplotě a kombinaci těchto dvou stresorů. Zahrnuty byly pouze transkripty s více jak dvojnásobnou změnou proti kontrole. Převzato a upraveno z Johnson *et al.* (2014).**

### 3. Materiál a metody

#### 3. 1. Rostlinný materiál

Použity byly 2 genotypy čiroku *Sorghum bicolor* (L.) Moench s nízkou citlivostí k fotoperiodě – „01Z1800012“ (evidenční číslo genové banky) a „Ruzrok“. Osivo pochází z genové banky Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze Ruzyni (VÚRV) v. v. i. Více informací o genotypch viz Hermuth *et al.* (2011) a Hermuth *et Kosová* (2017).

#### 3. 2. Nádobové experimenty

Nádobové experimenty byly provedeny ve VÚRV ve spolupráci s Ing. Urbanem, DiS z týmu Odboru genetiky a šlechtění rostlin (vedoucí RNDr. Ilja Tom Prášil, CSc.).

##### 3. 2. 1. Sterilizace a výsev obilek

Obilky byly ručně protřepány 1,5 minuty v 70% ethanolu s kapkou komerčního detergentu Jar, poté promyty v destilované vodě a dále sterilizovány za občasného protřepání 25 minut v 20% roztoku Savo (cca 9,4 g chlornanu sodného na 1 kg roztoku). Po promytí (3x v destilované vodě) byly obilky vysety na polystyren omotaný filtračním papírem, umístěný do uzavřené nádoby bránící jejich vysychání při klíčení.

##### 3. 2. 2. Vysazení naklíčených semen a kultivace rostlin

Po třech dnech klíčení ve tmě při 25 °C byly obilky přeneseny do květináčů obsahujících buď výsevni substrát, zahradnický substrát, zeminu, písek nebo perlit. V případě písku a perlitu bylo dno květináče vystláno fólií propustnou pro vodu, v případě substrátu a zeminy filtračním papírem. Obilky byly po třech nebo šesti v závislosti na experimentu umístěny cca 2 cm pod okraj květináče (substrát a zemina byly před vložením obilek lehce udusány pro obnovení kapilarity) a zasypány. Květináče byly po 24 kusech umístěny do plastových přepravek s pevným dnem (které byly v případě experimentu ČIROK 10 vystlané cca 0,5 cm tlustou vrstvou filcu přikrytého propustnou plastovou fólií, což zabraňovalo vysychání a umožňovalo rovnoměrnější přísun vody v čase) a přeneseny do klimatizovaných boxů (teplota 25 ± 2 °C ve dne, 20 ± 2 °C v noci; fotoperioda 14 hodin den, 10 hodin; intenzita záření 400 μmol m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>). Rostliny byly obden zalévány (cca 2,5 l na přepravku) dle následujícího rozpisu.

### 3. 2. 3. Použitý substrát

- ✓ písek (velikost částic 1–2 mm)
- ✓ perlit
- ✓ komerční zahradnický substrát (Zahradnický substrát B univerzální, Rašelina Soběslav)
- ✓ zahradnická zemina obsahující kompost (VÚRV Ruzyně)

### 3. 2. 4. Typ zálivky

Varianty v písku a perlitu byly zalévány buď roztokem VEGAFLOOR (Nera Agro; 10 ml / 5 l vody) nebo VEGAFLOOR (10 ml / 5 l vody) + KRISTALON (Agro CS; 5 ml / 5 l vody), varianty v písku dále 1/3 MS roztokem nebo ¼ Hoaglandovým roztokem. Varianty v substrátu a zemině byly zalévány vodovodní vodou.

### 3. 2. 5. Příprava MS roztoku

1/3 MS roztok byl namíchán rozpuštěním příslušného množství komerčně dodávaných solí základního MS média (Murashige and Skoog Basal Medium, kat. č. M5519, Sigma-Aldrich) ve vodě (1,433 g/l vody).

### 3. 2. 6. Příprava Hoaglandova roztoku

¼ Hoaglandův roztok byl namíchán podle práce Laštůvka (1967) s využitím zásobních roztoků se složením popsáním v diplomové práci Kofroňová (2013). Připravené zásobní roztoky byly uchovány v lednici. Před aplikací zálivky byl finální roztok vždy připraven rozmícháním příslušného objemu zásobních roztoků ve vodovodní vodě.

### 3. 2. 7 Přehled provedených experimentů

KT	kontrolní teplota (25 °C den / 20 °C noc)
VOT	vyšší otužovací teplota (13 °C den / 8 °C)
NOT	nižší otužovací teplota (9 °C den / 6 °C noc)
VST	vyšší stresová teplota (8 °C den / 5 °C noc)
NST	nižší stresová teplota (3,5 °C den / 2 °C)

**Tabulka č. 1: Seznam zkratk využitých v přehledu provedených experimentů**

Označení experimentu	ČIROK I
Genotyp	"Ruzrok"
Teplota a doba kultivace	<i>kontrolní rostliny</i> : KT - 29 dnů
	<i>stresové ošetření</i> : KT - 22 dnů; 13 °C den / 10 °C noc - 7 dnů
Použitý substrát a typ zálivky	perlit + zálivka roztokem VEGAFLOR nebo VEGAFLOR + KRISTALON
	písek + zálivka roztokem VEGAFLOR nebo VEGAFLOR + KRISTALON
	komerční zahradnický substrát
	zahradnická zemina obsahující kompost
Analýzy	zhodnocení růstu rostlin v různých kultivačních podmínkách (viz Použitý substrát a Typ zálivky)
	měření délky listů (23. a 30. den)
	optimalizace stanovení obsahu a zastoupení rozpustných sacharidů a stanovení podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku (odběr 30. den)

Označení experimentu	ČIROK II
Genotyp	"Ruzrok"
Teplota a doba kultivace	<i>kontrolní rostliny</i> : KT - 29 dnů
	<i>stresové ošetření VOT + VST</i> : KT - 17 dnů; VOT - 4 dny; VST - 4 dny; KT - 4 dny
	<i>stresové ošetření VOT + NST</i> : KT - 17 dnů; VOT - 4 dny; NST - 4 dny; KT - 4 dny
	<i>stresové ošetření NOT + VST</i> : KT - 17 dnů; NOT - 4 dny; VST - 4 dny; KT - 4 dny
	<i>stresové ošetření NOT + NST</i> : KT - 17 dnů; NOT - 4 dny; NST - 4 dny; KT - 4 dny
Použitý substrát a typ zálivky	písek + zálivka roztokem VEGAFLOR, ¼ Hoaglandovým roztokem nebo 1/3 MS roztokem
	zahradnická zemina obsahující kompost
Analýzy	zhodnocení růstu rostlin zalévaných roztokem hnojiva VEGAFLOR, Hoaglandovým roztokem nebo MS roztokem (viz Použitý substrát a typ zálivky)
	stanovení obsahu a zastoupení rozpustných sacharidů (odběr 17., 21., 22., 25., 28. a 29. den)
	stanovení podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku (odběr 17., 21., 22., 25., 28. a 29. den)

Označení experimentu	ČIROK X
Genotyp	"Ruzrok" a "01Z1800012"
Teplota a doba kultivace	<i>kontrolní rostliny</i> : KT - 29 dnů <i>stresové ošetření VOT + VST</i> : KT - 17 dnů; VOT - 4 dny; VST - 4 dny; KT - 4 dny <i>stresové ošetření VST</i> : KT - 21 dnů; VST - 1 den
Použitý substrát a typ závlivky	komerční zahradnický substrát
Analýzy	stanovení obsahu a zastoupení rozpustných sacharidů (odběr 17., 19., 20., 21., 22., 24., 25., 26. a 29. den) stanovení podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku (odběr 17., 19., 20., 21., 22., 24., 25., 26. a 29. den) stanovení obsahu prolinu v listech (odběr 17., 19., 20., 21., 22., 24., 25., 26. a 29. den) stanovení osmotického potenciálu pletiva listu (odběr 17., 19., 20., 21., 22., 24., 25., 26. a 29. den) stanovení míry lipidové peroxidace membrán (odběr 17., 19., 20., 21., 22., 24., 25., 26. a 29. den) stanovení listové plochy a hmotnosti kořene a nadzemní části (odběr 17., 19., 20., 21., 24., 25. a 29. den)

### 3. 2. 8. Výpočet sumy efektivních teplot (SET)

V experimentu ČIROK X byl k určení příslušné kontroly o podobném vývojovém stádiu využít výpočet sumy efektivních teplot dle následujícího vzorce:

$$SET = t_d \cdot T_d + t_n \cdot T_n$$

$t_d$  – délka dne [hod];  $T_d$  – průměrná denní teplota [°C];  $t_n$  - délka noci [hod];  $T_n$  – průměrná noční teplota [°C]

Po provedení výpočtu pro jednotlivé varianty ošetřených rostlin byla ke každé variantě ošetření přiřazena kontrola s nejbližší vypočítanou hodnotou SET.

### 3. 3. Experimenty *in vitro*

Experimenty *in vitro* byly provedeny na Katedře experimentální biologie rostlin PřF UK. Zde byly také provedeny veškeré analýzy kromě stanovení osmotického potenciálu pletiva listu.

### 3. 3. 1. *Optimalizace sterilizace obilek*

Nejprve bylo provedeno několik experimentů s cílem zjistit vhodnou sterilizaci obilek. Níže je uveden seznam vyzkoušených postupů sterilizace popisující jednotlivé kroky ve sterilizačním postupu v experimentu ČIROK III. V dalších experimentech jsou uvedeny pouze kroky odlišné od experimentu ČIROK III.

#### ČIROK III

1. odstranění pluchy z obilek
2. 10 minut pod tekoucí vodou
3. 1 minuta 70% ethanol + kapka Jaru
4. promytí v destilované vodě
5. aplikace jedné z následujících variant ošetření
  - a) 25 minut 20% Savo
  - b) 20 minut 30% Savo
  - c) 15 minut 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - d) 15 minut 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - e) 15 minut 0,1% HgCl<sub>2</sub>
6. 2 x promytí ve sterilní vodě
7. výsev ve sterilním prostředí

#### ČIROK IV

5. - 15 minut 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- promytí ve sterilní vodě
- 15 minut 20% Savo
6. 3 x promytí ve sterilní vodě

#### ČIROK V

2. 1 hodina pod tekoucí vodou
5. 20 minut 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- promytí v destilované vodě
- 25 minut 25% Savo
6. 3 x promytí ve sterilní vodě

ČIROK VI a další experimenty *in vitro* viz podrobný popis níže

### 3. 3. 2. *Podrobný popis sterilizace obilek a kultivace rostlin in vitro*

Jako optimální (nejnižší podíl kontaminovaných klíčnicích rostlin a nejnižší poškození obilek) byl vyhodnocen následující postup. Obilky byly zbaveny pluchy a umístěny na 1 hodinu do kádinky pod tekoucí vodu. Odplavení obilek bylo zabráněno přichycením gázy přes hrdlo kádinky. Poté byly obilky 1 minutu protřepávány v 70%

ethanolu s kapkou Jaru, promyty v destilované vodě a 20 minut protřepávány na třepače (IKA KS 130) v kádince s 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Poté byly obilky promyty v destilované vodě a 25 minut protřepávány na třepače s 25% roztokem Sava. Následovalo promytí ve sterilní vodě (3x ve sterilním prostředí ve flow-boxu *Heraeus LaminAir*® TL2448, kde byly prováděny i všechny následující operace. Používané nástroje byly před použitím sterilizovány v autoklávu (Tuttnauer 2540EK-N, Chirana PS20A nebo Systec DX-23) a mezi jednotlivými úkony ponořením do 96% ethanolu a zapálením. Následně byly obilky pomocí sterilní pinzety přeneseny do plastových Petriho misek (průměr 6 cm) s MS médiem bez sacharosy (1 obilka na misku). Poté byly Petriho misky zapečetěny pomocí Parafilmu a vloženy v igelitových sáčcích do papírové krabice, která byla přenesena do kultivační místnosti. Zde byly obilky ponechány tři dny klíčit při teplotě 25 °C.

Naklíčené obilky byly přeneseny do skleněných zkumavek (délka 20 cm, průměr 3 cm) s MS médiem s 3% sacharosou, případně variantou s přidaným 7,5% PEG 4000. Zkumavky byly uzavřeny překrytím hrdla průhlednou autoklávovatelnou polypropylenovou fólií, umístěny do kultivační místnosti a pěstovány při fotoperiodě 16 hodin (kromě ČIROK VII a XV – zde byly rostliny pěstovány při fotoperiodě 14 hodin) a ozáření v průměru 100 μmol m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (570 Lux). Teplota a délka kultivace v jednotlivých experimentech je uvedena níže v kapitole Přehled provedených experimentů.

### 3. 3. 3. Příprava MS média

MS médium pro výsev obilek (bez sacharosy)

Do kádinky s destilovanou vodou bylo přidáno příslušné množství komerčně dodávaných solí základního MS média (Murashige and Skoog Basal Medium, M5519, Sigma-Aldrich) (4,3 g/l vody). Kádinka s míchací tyčinkou byla umístěna na magnetické míchadlo. Po rozmíchání bylo přidáno příslušné množství složky D (vitamíny-viz tabulka č. 2). Médium bylo v odměrném válci doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem. Poté bylo pomocí pH metru (pH metr Orion 410 A+) upraveno pH přidáním roztoku KOH nebo HCl na finální hodnotu pH 5,8. Následně byl přidán agar (7 g/l média) a médium bylo rozlito do 0,5l autoklávovatelných skleněných lahví s plastovým víčkem. Lahve s médiem byly sterilizovány v autoklávu (121 °C, tlak 0,144 MPa, 20 minut). Po sterilizaci bylo médium rozlito ve sterilním prostředí flow-boxu do Petriho misek. Po ztuhnutí média byly Petriho misky vloženy do polyethylenových sáčků a uchovány do použití na výsev obilek.

MS médium se sacharosou

Stejně jako u předchozí varianty média bylo do kádinky s destilovanou vodou přidáno příslušné množství komerčně dodávaných solí základního MS média (4,3 g/l vody) a přidána složka D (vitamíny). Poté bylo za pokračujícího míchání přidáno příslušné množství pufru MES (2[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) (300 mg/l roztoku) a sacharosy (30 g/l roztoku). Po rozpuštění sacharosy bylo upraveno pH na finální hodnotu 5,8. Následně byl přidán agar (7 g/l média) a médium bylo dvakrát přivedeno k varu v mikrovlnné troubě. Převařené médium bylo nalito do zkumavek, ty byly uzavřeny překrytím hrdla alobalem a sterilizovány.

MS médium se sacharosou a PEG 4000

Byl použit stejný postup jako při přípravě MS média se sacharosou, pouze po přidání pufru MES a sacharosy bylo navíc přidáno odpovídající množství PEG 4000 (75 g/l roztoku).

Zásobní roztok	Složka zásobního roztoku	Navážka na objem 500 ml zásobního roztoku (g)	Zásobní roztok na litr média (ml)
D	Myo-inositol	10	5
	Kyselina nikotinová	0,05	
	Pyridoxin- HCl	0,05	
	Thiamin-HCl	0,05	

**Tabulka č. 2: Složení zásobního roztoku D**

### 3. 3. 4. Přehled provedených experimentů

MS0	MS médium bez sacharosy
MS	MS médium s 3% sacharosou
PEG	MS médium s 3% sacharosou a 7,5% PEG 4000
NCH	noční chlad (25 °C den / 10 °C noc)

**Tabulka č. 3: Seznam zkratk využitých v přehledu provedených experimentů**

Označení experimentu	ČIROK III, IV
Genotyp	"Ruzrok"
Teplota a doba kultivace	25 °C - 3 dny
Kultivační médium a doba kultivace	MS0 - 3 dny
Analýzy	zjištění počtu vyklíčených, nevyklíčených a kontaminovaných obilek

Označení experimentu	ČIROK V, VI, VIII, IX
Genotyp	"Ruzrok"
Teplota a doba kultivace	25 °C - 10 dní
Kultivační médium a doba kultivace	<i>kontrolní rostliny:</i> MS0 - 3 dny; MS - 7 dní <i>stresové ošetření:</i> MS0 - 3 dny, PEG - 7 dní
Analýzy	stanovení obsahu a zastoupení rozpustných sacharidů (odběr 10. den) - ČIROK V, VI stanovení podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku (odběr 10. den) - ČIROK V, VI stanovení hmotnosti kořene a nadzemní části (odběr 10. den) - ČIROK VI stanovení obsahu prolinu v listech (odběr 10. den) - ČIROK VIII, IX stanovení osmotického potenciálu pletiva listu (odběr 10. den) - ČIROK VIII, IX

Označení experimentu	ČIROK VII, XV
Genotyp	"Ruzrok"
Teplota a doba kultivace	a) <i>kontrolní rostliny:</i> 25 °C - 9 dní b) <i>stresové ošetření:</i> <b>(PEG)</b> 25 °C - 9 dní c) <i>stresové ošetření:</i> <b>(noční chlad)</b> 25 °C - 6 dní; <b>NCH</b> - 3 dny d) <i>stresové ošetření:</i> <b>(noční chlad + PEG)</b> 25 °C - 6 dní; <b>NCH</b> - 3 dny
Kultivační médium a doba kultivace	a) <i>kontrolní rostliny:</i> MS0 - 3 dny; MS - 6 dní b) <i>stresové ošetření:</i> MS0 - 3 dny, PEG - 6 dní c) <i>stresové ošetření:</i> MS0 - 3 dny; MS - 6 dní d) <i>stresové ošetření:</i> MS0 - 3 dny, PEG - 6 dní
Analýzy	stanovení obsahu a zastoupení rozpustných sacharidů (odběr 9. den) - ČIROK VII, XV stanovení podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku (odběr 9. den) - ČIROK VII, XV stanovení hmotnosti kořene a nadzemní části (odběr 9. den) - ČIROK VII

Označení experimentu	ČIROK XI, XII, XIII, XIV
Genotyp	"01Z1800012"
Teplota a doba kultivace	25 °C - 10 dní
Kultivační médium a doba kultivace	<i>kontrolní rostliny</i> : MS0 - 3 dny; MS - 7 dní
	<i>stresové ošetření</i> : MS0 - 3 dny, PEG - 7 dní
Analýzy	stanovení obsahu a zastoupení rozpustných sacharidů (odběr 10. den) - ČIROK XI, XII
	stanovení podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku (odběr 10. den) - ČIROK XI, XII
	stanovení obsahu prolinu v listech (odběr 10. den) - ČIROK XIII, XIV

### 3. 4. Odběr materiálu pro analýzy

#### 3. 4. 1. Odběr materiálu pro stanovení obsahu a zastoupení rozpustných sacharidů, prolinu a osmotického potenciálu pletiv

Listy nebo stonky byly ustříhány, vloženy do mikrozkuhavky (3 ml) s dvakrát proděravěným víčkem, která byla předem zvážena na analytických laboratorních vahách (Sartorius). Pro stanovení obsahu a zastoupení rozpustných sacharidů bylo odebíráno 0,1 – 0,2 mg čerstvé hmotnosti, pro stanovení obsahu prolinu cca 1 g čerstvé hmotnosti a pro stanovení osmotického potenciálu pletiv dva listy na mikrozkuhavku. Rostlinný materiál ve zkuhavce byl zvážen na analytických laboratorních vahách a co nejrychleji ponořen do tekutého dusíku v termosce. Poté byly vzorky uchovávány hluboce zmražené v mrazicím boxu při -80 °C.

#### 3. 4. 2. Odběr materiálu pro stanovení poměru hmotnosti sušiny kořene a nadzemní části (R/S poměr)

Rostliny pěstované v podmínkách *in vitro* byly vytaženy z agaru, opláchnuty a vysušeny mezi papírovými ubrousky. Rostliny pěstované v nádobách v substrátu byly přestříhány na rozhraní stonku a hypokotylu. Kořeny a hypokotyl byly zbaveny substrátu promytím ve vodě v sítku a vysušeny mezi papírovými ubrousky.

#### 3. 4. 3. Příprava vzorků pro stanovení obsahu nestrukturních sacharidů

Odebrané vzorky v mikrozkuhavkách byly přeneseny do lyofilizátoru (Lyovac GT 2, Finn-Aqua) a mrazově vysušeny (cca 20 hodin). Poté byly zváženy na analytických laboratorních vahách a ke každému vzorku bylo přidáno 0,5 ml 80% methanolu. Vzorky

s methanolem byly umístěny do termobločku (Grant QBT1 nebo CS Cleaver TCDB-02) předem zahřátého na 75 °C. Vzorky byly 30 minut zahřívány a poté byl methanol vakuově odpařen v přístroji SpeedVac Plus SC110A, Savant (program V-AL, 45 °C, 3 hodiny). Ke vzorkům bylo poté v závislosti na obsahu sušiny přidáno odpovídající množství demineralizované vody (Mili Q, Millipore) (viz tabulka č. 4). Vzorky s demineralizovanou vodou byly na 15 minut vloženy do vodní ultrazvukové lázně (BANDELIN Sonorex) a po vyjmutí centrifugovány 10 minut při 14 000×g (centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 D). Poté byl supernatant odebrán injekční stříkačkou s jehlou a přefiltrován přes filtr (Millex Milipore, velikost pórů 0,22 µm) do nové mikrozkuhavky. Pro každý vzorek byl použit nový filtr, stříkačka s jehlou byly po každém použití vypláchnuty demineralizovanou vodou a vysušeny. Mikrozkuhavky se vzorky byly skladovány v mrazáku při -20 °C.

DW / mg	ml H <sub>2</sub> O
< 5	0,2
5 – 10	0,3
10 – 20	0,5
20 – 30	1
30 – 40	1,5
40 – 50	2

**Tabulka č. 4: Množství přidávané ultračisté vody v závislosti na hmotnosti sušiny**

#### 3. 4. 4. Stanovení obsahu a zastoupení nestrukturních sacharidů

Stanovení obsahu a zastoupení nestrukturních sacharidů probíhalo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s refraktometrickou detekcí. Měření probíhalo za následujících podmínek - mobilní fáze: ultračistá (MiliQ) voda, průtoková rychlost: 0,5 ml za minutu, objem injikovaného vzorku: 50 µl, teplota kolony: 80 °C, kolony: Shodex Ca<sup>2+</sup> nebo Watrex Pb<sup>2+</sup> s příslušnými předkolumnami, isokratická pumpa: SISw HPI-300 nebo Delta Chrom SDS 030, detektor: Shodex RI-71, standardy: Sigma-Aldrich, software: CLARITY.

#### 3. 4. 5. Stanovení obsahu prolinu

Obsah prolinu v listech byl stanovován podle upravené metodiky vycházející z Bates (1973). 0,5 g mražených listů bylo pomocí tloučku homogenizováno v třecí misce

s tekutým dusíkem. Vzorek byl vypláchnut 4 ml destilované vody do 15ml plastové zkumavky. Ke vzorku byl přidán 1 ml 15% kyseliny sulfosalicylové a obsah byl promíchán. Po půl hodině byl vzorek centrifugován 5 minut při 5000 otáčkách za minutu (centrifuga Hettich universal 32 R). Poté byl (z přibližně stejné výšky sloupce) odebrán 1 ml supernatantu a přenesen do skleněné zkumavky. K supernatantu byl přidán 1 ml roztoku ninhydrinu (složení viz tabulka č. 5) a 1 ml kyseliny octové (99,8%). Obsah zkumavky byl promíchán na Vortexu, následně byly zkumavky ve vhodném stojanu vloženy do hrnce s vařící vodou a zahřívány 60 minut. Poté byly zkumavky vloženy do krabice s ledem (zastavení reakce), do každé zkumavky byly přidány 3 ml toluenu a promíchány na Vortexu (20 sekund). Poté byly zkumavky přeneseny do lednice a zde ponechány 12 hodin. Obsah prolinu v horní vrstvě vzorku byl poté stanoven spektrofotometricky (spektrofotometr Unicam Helios  $\alpha$ ) při vlnové délce 520 nm. Jako blank byl použit toluen. Pro kvantitativní stanovení obsahu prolinu ve vzorku bylo nutné připravit kalibrační křivku prolinu. Do plastových zkumavek bylo přeneseno pipetou odpovídající množství 1mM roztoku prolinu a 3% kyseliny sulfosalicylové (viz tabulka č. 6), následující postup přípravy se shoduje s výše popsáním postupem přípravy vzorků od kroku po centrifugaci.

<b>1mM roztok prolinu [<math>\mu</math>l]</b>	<b>3% kyselina sulfosalicylová [<math>\mu</math>l]</b>
0	2000
20	1980
40	1960
60	1940
80	1920
100	1900
200	1800
300	1700
400	1600
500	1500

**Tabulka č. 6**

<b>sloučeniny</b>	<b>množství</b>
ninhydrin	1 g
kyselina octová (99,8%)	24 ml
kyselina trihydrogenfosforečná	6,096 ml
destilovaná voda	9,904 ml

**Tabulka č. 5**

### *3. 4. 6. Stanovení poměru hmotnosti sušiny kořene a nadzemní části*

Kořeny a nadzemní část byly zváženy na analytických laboratorních vahách (čerstvá hmotnost), vloženy do obálek z alobalu a umístěny do sušárny (130 °C, 16 hodin). Po usušení byly kořeny a nadzemní část opět zváženy (sušina).

### *3. 4. 7. Stanovení listové plochy*

Listy byly ostříhány, rozprostřeny do průhledné folie, opatřeny měřítkem pro kalibraci a oskenovány. Jejich plocha byla poté určena pomocí softwaru ImageJ.

### *3. 4. 8. Stanovení osmotického potenciálu pletiva listu*

Zmražené listy byly rozmrazeny při pokojové teplotě (20 minut). Poté byly vloženy do injekční stříkačky a do připravené mikrozkušavky byl vytlačen roztok z pletiva listu. Osmotický potenciál roztoku byl stanoven pomocí hygrometrické metody determinace tlaku vodní páry (přístroj Wescor Vapro 5600). Tento typ analýzy probíhal na pracovišti VÚRV v Praze Ruzyni.

### *3. 4. 9. Zpracování dat*

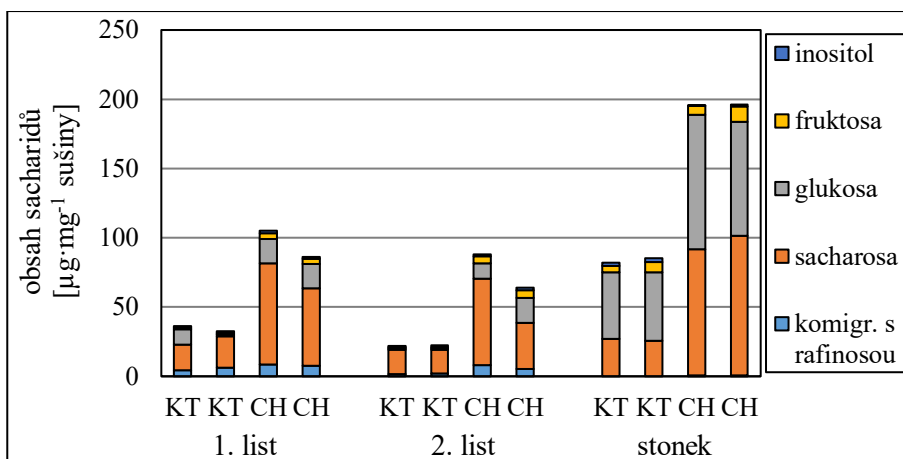
Grafy a tabulky byly vytvořeny v programu Microsoft Office Excel, který byl též využit k výpočtu průměrů, určení směrodatných odchylek a výsledků jednoduchých rovnic. Data byla statisticky vyhodnocena v programu NCSS97 (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA). Pro porovnání souboru kontrolních rostlin se souborem rostlin vystavených působení stresu byla využita analýza rozptylu jednoduchého třídění – One-Way ANOVA. Normálně rozdělená data byla srovnána pomocí Tukey-Kramer testu, nenormálně rozdělená data pomocí Kruskal-Wallis Z testu. Srovnání byla provedena na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 4. Výsledky

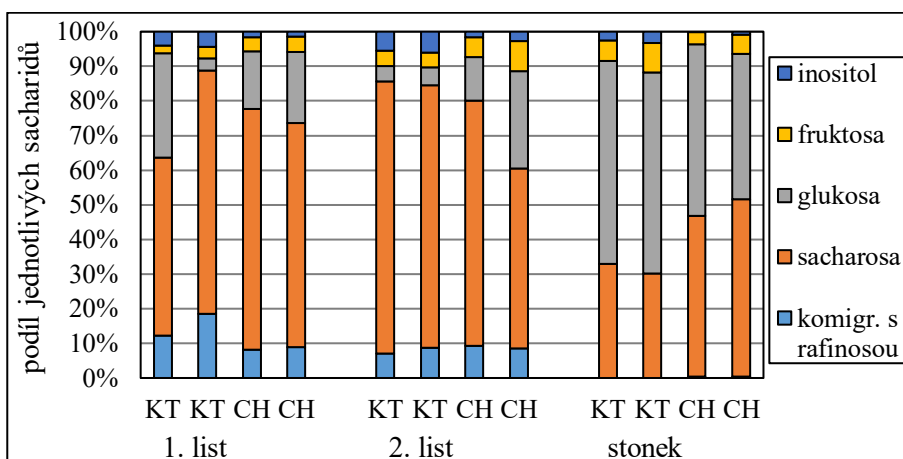
### 4. 1. Nádobové experimenty

#### *4. 1. 1. Výběr vhodného substrátu, zjištění rychlosti růstu rostlin čiroku, optimalizace stanovení obsahu a spektra rozpustných sacharidů*

Cílem experimentu ČIROK I bylo zjistit vhodný substrát pro kultivaci rostlin, rychlost jejich růstu a otestovat možnou teplotu vhodnou k otužovacímu ošetření rostlin. Na základě posouzení vzhledu rostlin a srovnání změřené délky listů u jednotlivých variant byly jako vhodné k pěstování vyhodnoceny komerční zahradnický substrát a standardní zahradnická zemina obsahující kompost. Část rostlin pěstovaných v těchto substrátech při kontrolní teplotě (KT: 25 °C den / 20 °C noc) byla 22. den po výsevu přenesena na týden do nižší teploty (CH: 13 °C den / 10 °C noc). Tyto rostliny se po týdnu nelišily v délce listů od rostlin pěstovaných při kontrolní teplotě, nicméně u nich došlo k mírnému opoždění vývoje. Po týdnu pěstování při nižší teplotě byly rostliny ve fázi vyvíjejícího se 3. pravého listu. U kontrolních rostlin byl třetí pravý list již vyvinutý a u některých jedinců začínal prorůstat 4. pravý list. Nižší teplota též u rostlin vyvolala změny v obsahu rozpustných sacharidů v listech a stonku (Graf č. 1). Z důvodu nízkého počtu vzorků nebylo provedeno statistické srovnání. U všech vzorků odebraných z rostlin vystavených nižší teplotě je ovšem patrný homogenní trend ke zvýšení obsahu rozpustných sacharidů proti vzorkům odebraným z rostlin pěstovaných v kontrolní teplotě. Graf č. 2 zobrazuje rozdíl mezi kontrolními rostlinami a rostlinami vystavenými působení nižší teploty v zastoupení jednotlivých rozpustných sacharidů na celkovém obsahu rozpustných sacharidů v listech a stonku. Pro analýzu obsahu a spektra rozpustných sacharidů byl odebírán 1. a 2. pravý list.



**Graf č. 1: Vliv snížení teploty na obsah rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK I.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **KT** – 7 dnů, **CH** – 7 dnů. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 22 dnů při **KT**. Jednotlivé sloupce v tomto případě výjimečně značí obsah rozpustných sacharidů v jednotlivých vzorcích (biologických replikátech).

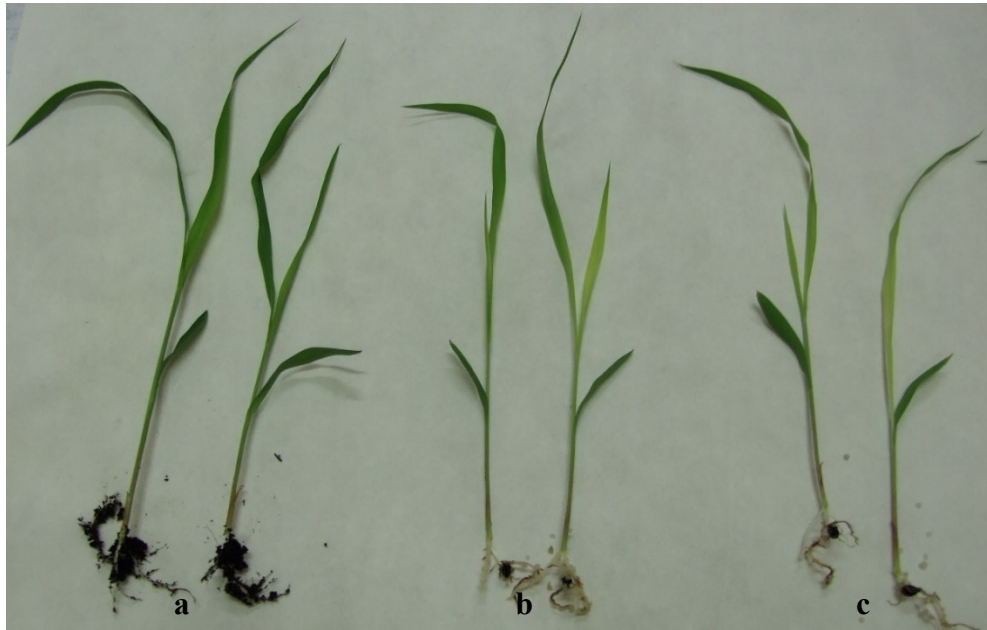


**Graf č. 2: Vliv snížení teploty na podíl jednotlivých rozpustných sacharidů na celkovém obsahu rozpustných sacharidů v listech a stonku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK I.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **KT** - 7 dnů, **CH** – 7 dnů. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 22 dnů při **KT**. Jednotlivé sloupce v tomto případě výjimečně značí podíl jednotlivých rozpustných sacharidů na celkovém obsahu rozpustných sacharidů v jednotlivých vzorcích (biologických replikátech).

#### 4. 1. 2. Vliv různých variant otužovací a stresové teploty na růst, vývoj a sacharidový metabolismus rostlin čiroku

V experimentu ČIROK II byla testována reakce rostlin na další varianty otužovací teploty a zjišťována vhodná stresová teplota. Dále byla testována možnost pěstování rostlin v písku při výživě 1/3 MS roztokem nebo 1/4 Hoaglandovým roztokem. Pěstování rostlin v písku se zálivkou MS nebo Hoaglandovým roztokem se ukázalo jako nevhodné. Rostliny

pěstované tímto způsobem nejspíš trpěly nedostupností některého z prvků, což se projevilo chlorózou listů (viz Obr. č. 6).



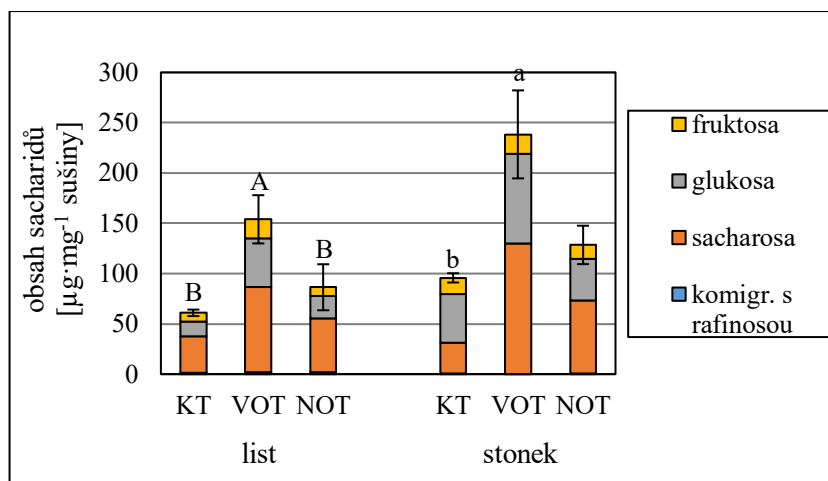
**Obrázek č. 6: Fotografie rostlin čiroku 17. den po výsevu. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK II.** Jednotlivé varianty ošetření: a) rostliny pěstované v substrátu, b) rostliny pěstované v písku a zalévané MS roztokem, c) rostliny pěstované v písku a zalévané Hoaglandovým roztokem. Rostliny byly pěstovány při kontrolní teplotě (KT: 25 °C den / 20 °C noc).

Jako vhodnější se ukázala vyšší varianta otužovací teploty (VOT: 13 °C den / 8 °C noc). Proti nižší variantě otužovací teploty (NOT: 9 °C den / 6 °C noc) nedocházelo u rostlin k tak výraznému omezení růstu a usychání listů (viz Obr. č. 7). Dvě varianty stresové teploty (VST: 8 °C den / 5 °C noc nebo NST: 3,5 °C den / 2 °C noc) byly testovány na rostlinách, které byly předtím vystaveny působení otužovacích teplot po dobu 4 dnů (viz výše). Podobně jako v případě otužovacích teplot byla pro další použití zvolena varianta s vyšší stresovou teplotou. Rostliny vystavené předchozímu otužování byly schopné tuto zvolenou teplotu snášet se zachováním dostatečné listové plochy umožňující provést odběry vzorků na analýzu obsahu rozpustných sacharidů.

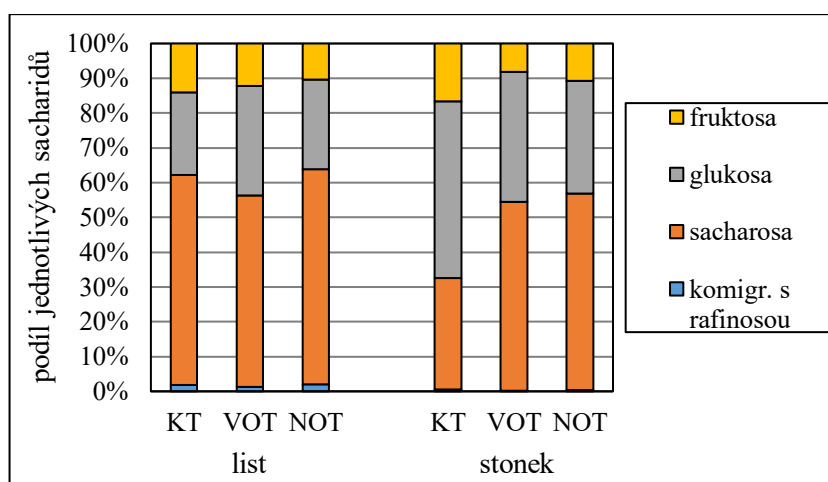


**Obrázek č. 7: Fotografie rostlin čiroku vystavených různým variantám otužovací a následně stresové teploty. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK II. Jednotlivé varianty ošetření: a) KT – 5 dnů; b) VOT + NST: VOT - 4 dny, NST - 1 den; c) VOT + VST: VOT - 4 dny, VST - 1 den; d) NOT + NST: NOT - 4 dny, NST - 1 den; e) NOT + VST: NOT - 4 dny, VST - 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT.**

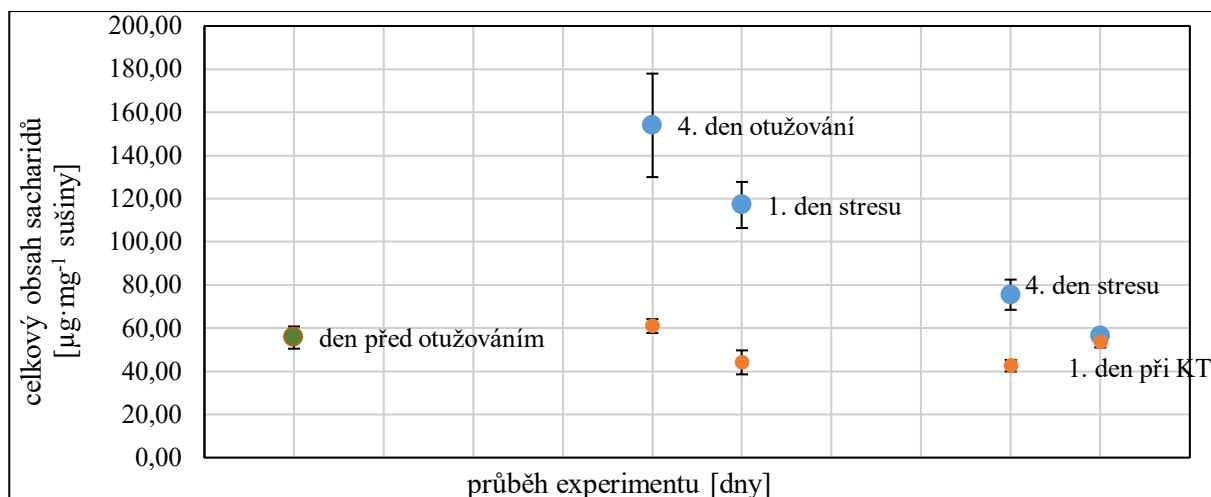
Podobně jako v předchozím experimentu reagovaly rostliny pěstované při VOT zvýšením obsahu rozpustných sacharidů v listech i stoncích. Po působení NOT se obsah rozpustných sacharidů ve srovnání s kontrolou významně nelišil (viz Graf č. 3). Podíl jednotlivých rozpustných sacharidů na celkovém obsahu se v listech výrazně nezměnil, zatímco ve stonku ošetřených rostlin je patrná tendence ke zvýšení podílu sacharosy na úkor ostatních sacharidů (viz Graf č. 4). Graf č. 5 graficky znázorňuje průběh změn celkového obsahu rozpustných sacharidů v listech od začátku působení otužovací teploty až po ukončení působení stresové teploty. Jako srovnání jsou uvedeny hodnoty celkového obsahu rozpustných sacharidů u kontrolních rostlin. Z důvodů nízkého počtu opakování není provedeno statistické srovnání ošetřených rostlin s kontrolními, a proto je třeba tento graf brát pouze jako orientační.



**Graf č. 3: Vliv rozdílných otužovacích teplot na obsah rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK II. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 4 dny; VOT - 4 dny; NOT - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 3$ , varianta „NOT – stonek“  $n = 2$ .**



**Graf č. 4: Vliv rozdílných otužovacích teplot na podíl jednotlivých rozpustných sacharidů na celkovém obsahu rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK II. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 4 dny; VOT - 4 dny; NOT - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT.  $n = 3$ , varianta „NOT – stonek“  $n = 2$ .**



**Graf č. 5: Vliv otužovací a stresové teploty na celkový obsah sacharidů v listech rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK II.** Osa x znázorňuje průběh experimentu. Oranžové body – varianta KT – 9 dnů; modré body - varianta V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT – 1 den). Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Varianty „den před otužováním“ a „4. den otužování“ n = 3, zbývající varianty n = 2.

Před vystavením otužovací teplotě byly rostliny ve stadiu vyvíjejícího se 2. pravého listu. Na začátku periody působení stresové teploty měly otužované rostliny plně vyvinutý 2. pravý list, u kontrolních rostlin již začínal růst 3. pravý list. Na konci periody stresové teploty byl vývojový stav stresovaných rostlin stejný jako na začátku, u kontrolních rostlin se vyvíjel 3. pravý list. Čtyři dny po ukončení stresu a pěstování při KT byly stresované rostliny stále ve fázi vyvinutých 2 pravých listů. U kontroly začínal růst 4. pravý list. K analýzám byl odebíráán 1. a 2. pravý list.

#### 4. 1. 3. Vliv otužovací a stresové teploty na růst, vývoj, osmotický potenciál, obsah prolinu a sacharidový metabolismus rostlin čiroku

Cílem experimentu ČIROK X bylo zopakovat experiment ČIROK II a rozšířit ho o další analýzy. Kromě genotypu „Ruzrok“ byl v tomto experimentu použit další genotyp – „01Z1800012“. Na základě předchozího experimentu byly vybrány tyto varianty otužovací a stresové teploty - VOT: 13 °C den / 8 °C noc a VST: 8 °C den / 5 °C noc. V tomto experimentu byly ošetřené rostliny srovnávány s kontrolními rostlinami v podobné vývojové fázi, nikoli o stejném stáří. Příslušná kontrola k dané variantě stresového ošetření byla určena pomocí modifikovaného výpočtu sumy efektivních teplot (SET). Způsob výpočtu je uveden v kapitole Materiál a metody. V Tabulce č. 7 je uvedena doba kultivace při variantách otužovací a

stresové teploty s odpovídající dobou kultivace při KT (kontrolní teplota, 25 °C den / 20 °C noc).

Typ a doba ošetření rostlin	Odpovídající doba kultivace při KT
4 dny při VOT	2 dny
4 dny při VOT, 1 den při VST	2 dny
4 dny při VOT, 4 dny při VST	3 dny
4 dny při VOT, 4 dny při VST, 1 den při KT	4 dny
4 dny při VOT, 4 dny při VST, 4 dny při KT	7 dnů
1 den při VST	0 dnů

**Tabulka č. 7: Doba kultivace rostlin při KT odpovídající době kultivace při otužovací a stresové teplotě.**

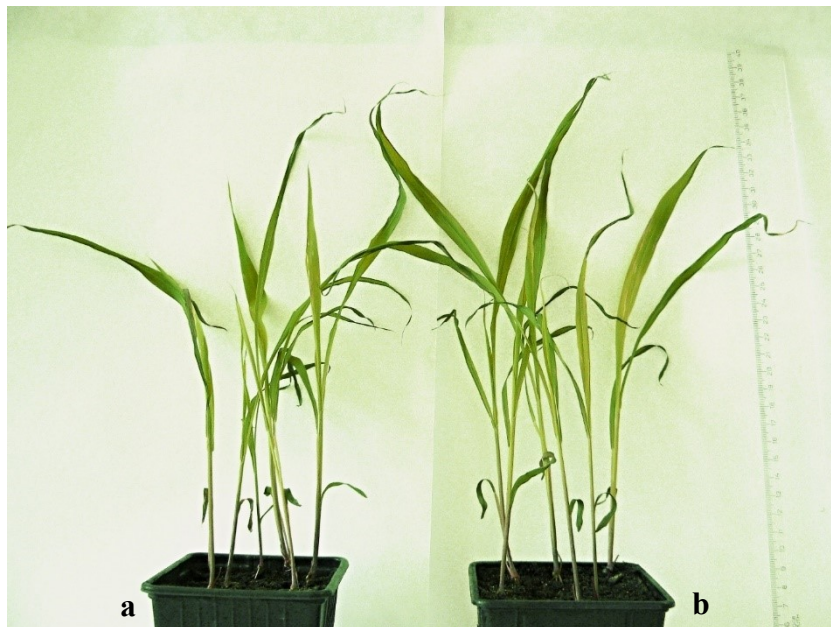
Na obrázku č. 8 jsou zobrazeny rostliny vystavené 4 dnům VOT a následně 1 dnu VST, příslušná kontrola je na Obr. č. 9. Dále jsou prezentovány fotografie rostlin vystavených 4 dnům VOT, následně 4 dnům VST a 1 dni KT (viz Obr. č. 10) spolu s kontrolou [viz Obr. č. 11 – a), b)]. Na Obr. č. 11 je dále vidět srovnání kontrolních - a), b) a ošetřených rostlin – c), d) ve stejný den (stejně stáří).



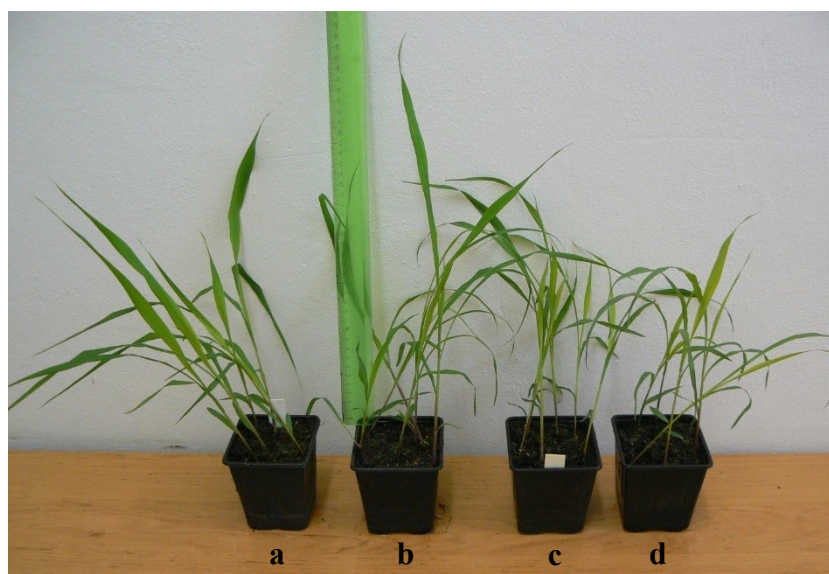
**Obrázek č. 8 (na předchozí straně): Fotografie rostlin čiroku vystavených působení otužovací a následně stresové teploty. a) genotyp „01Z1800012“, b) genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK X. Ošetření rostlin: VOT + VST: VOT - 4 dny, VST - 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT.**



**Obrázek č. 9: Fotografie rostlin čiroku pěstovaných 19 dnů při KT. a) genotyp „01Z1800012“, b) genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK X.**

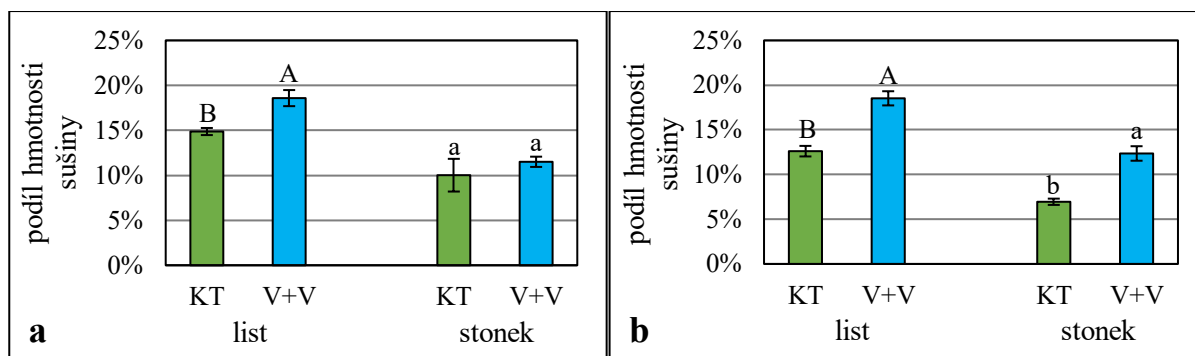


**Obrázek č. 10: Fotografie rostlin čiroku vystavených působení otužovací a následně stresové teploty. a) genotyp „01Z1800012“, b) genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK X. Ošetření rostlin: VOT + VST: VOT - 4 dny; VST 4 dny; KT - 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT.**

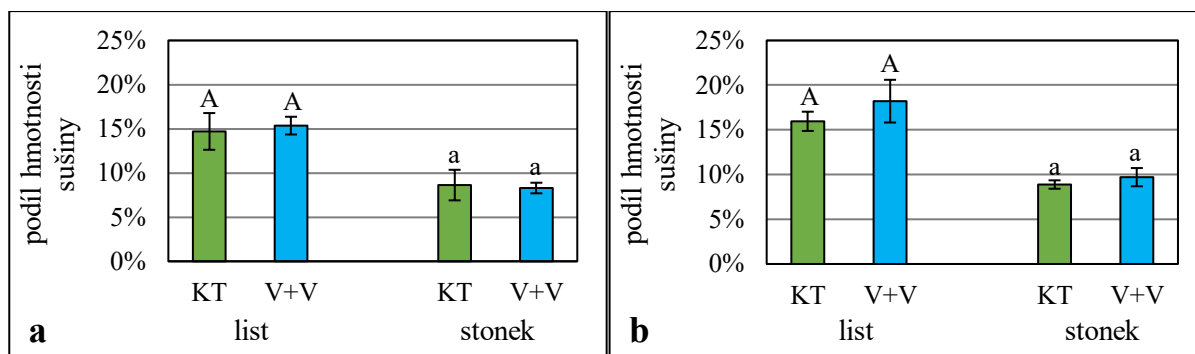


**Obrázek č. 11: Fotografie porovnávací kontrolní rostliny čiroku s rostlinami vystavenými působení otužovací teploty. Experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin a genotypy: a) KT – 4 dny, genotyp „Ruzrok“; b) KT – 4 dny, genotyp „01Z1800012“; c) VOT - 4 dny, genotyp „Ruzrok“; d) VOT - 4 dny, genotyp „01Z1800012“. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT.**

V listech i stoncích rostlin obou genotypů čiroku byla v průběhu vystavení VOT následované VST patrná tendence ke zvyšování podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku oproti kontrole (Graf č. 6). Po ukončení VST a přenesení rostlin do KT se rozdíly mezi ošetřenými rostlinami a kontrolou téměř vyrovnaly a 4. den po přenesení do KT se ani jeden z ošetřených genotypů významně nelišil od kontrolních rostlin (Graf č. 7). Grafy znázorňující rozdíl ošetřených rostlin v podílu sušiny na celkové hmotnosti vzorku proti kontrole ze všech odběrů (viz tabulka č. x v kapitole Materiál a metody) jsou umístěny v příloze.



**Graf č. 6: Vliv otužovací a stresové teploty na podíl hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku listů a stonků rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **KT** – 2 dny; **V+V**: VOT - 4 dny, VST - 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 6$ .

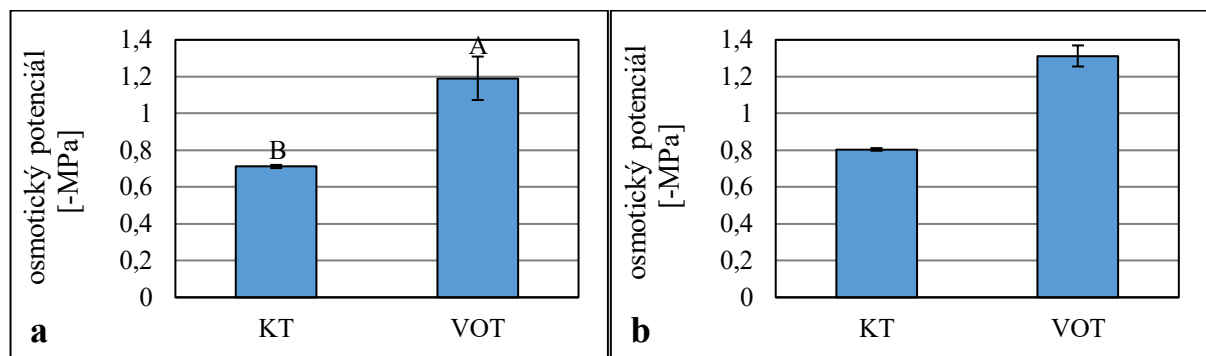


**Graf č. 7: Vliv otužovací a stresové teploty na podíl hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku listů a stonků rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **KT** – 7 dnů; **V+V**: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT – 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 6$ .

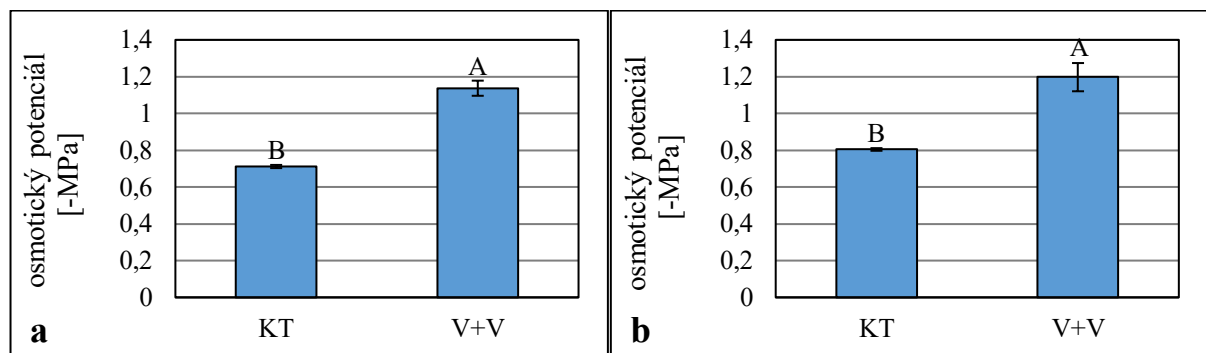
V tomto experimentu byl stanoven poměr hmotnosti sušiny podzemní a nadzemní části (R/S – root/shoot). Kvůli velké variabilitě ve zjištěných hodnotách R/S způsobené velkým rozptylem hmotnosti sušiny kořenů u jednotlivých variant nebylo možné z výsledků vyvodit žádné závěry. Důvodem velkého rozptylu hmotnosti sušiny kořenů je nejspíš nevhodnost zvolené metodiky (promývání kořenů) pro substrát obsahující velké množství organických zbytků.

Hodnota osmotického potenciálu pletiva listu u kontrolních rostlin se v průběhu experimentu neměnila (viz Graf č. 14, 15). U rostlin obou genotypů vystavených 4 dnům

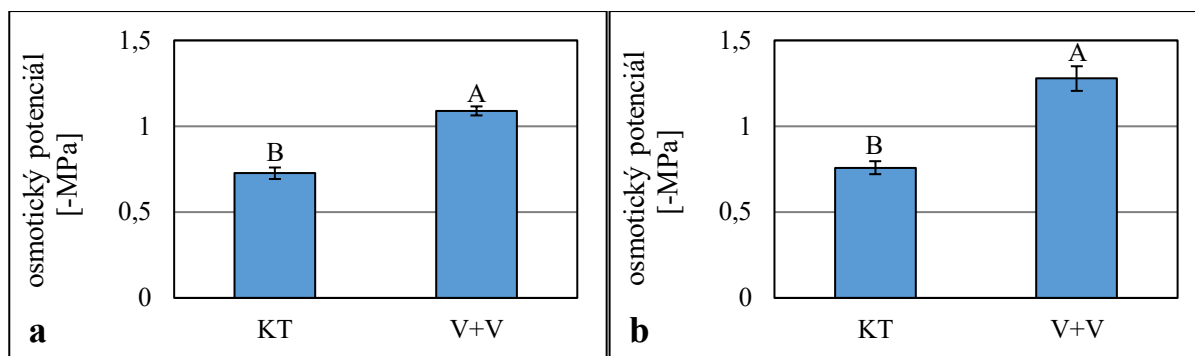
otužovací teploty došlo k významnému snížení hodnoty osmotického potenciálu proti kontrole. Při následném vystavení stresové teplotě si rostliny udržovaly stále podobnou hodnotu osmotického potenciálu, která se zvýšila až 4. den po ukončení působení VST a kultivaci v KT (viz Grafy č. 8–12). Hodnotu osmotického potenciálu pletiva listu u kontrolních i ošetřených rostlin v průběhu experimentu dále zobrazují Grafy č. 14 (genotyp „Ruzrok“) a 15 (genotyp „01Z1800012“). Ke snížení hodnoty osmotického potenciálu došlo i v pletivu listu rostlin přenesených z KT rovnou do VST (viz Graf č. 13).



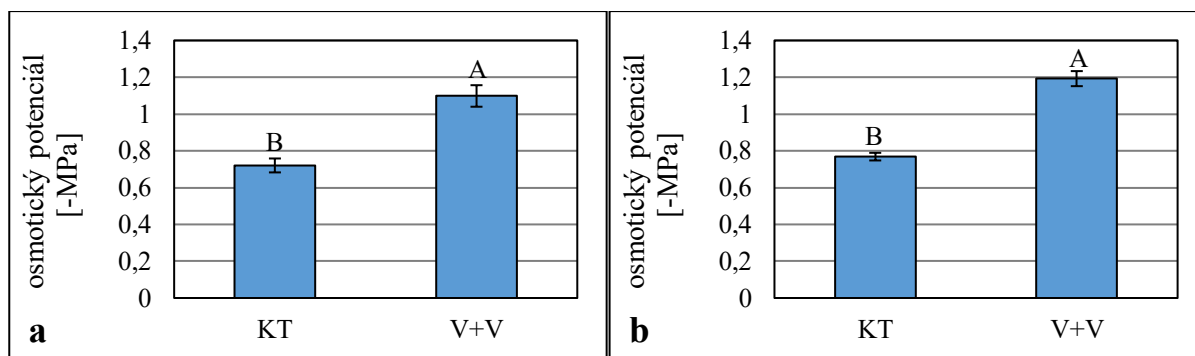
**Graf č. 8: Vliv otužovací teploty na hodnotu osmotického potenciálu pletiva listu rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 2 dny; VOT - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku hodnoty osmotického potenciálu pletiva listu. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA; n = 3, varianta „b) VOT“ n = 2.



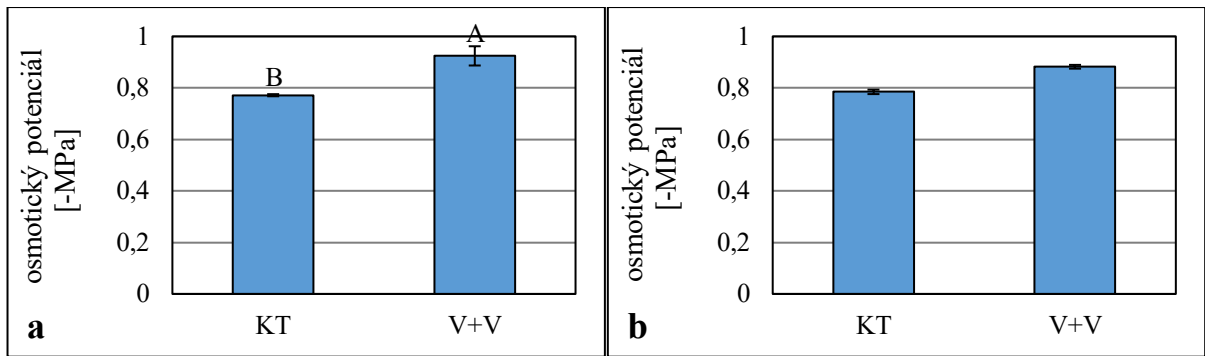
**Graf č. 9: Vliv otužovací a stresové teploty na hodnotu osmotického potenciálu pletiva listu rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 2 dny; V+V: VOT - 4 dny, VST - 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku hodnoty osmotického potenciálu pletiva listu. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA; n = 3.



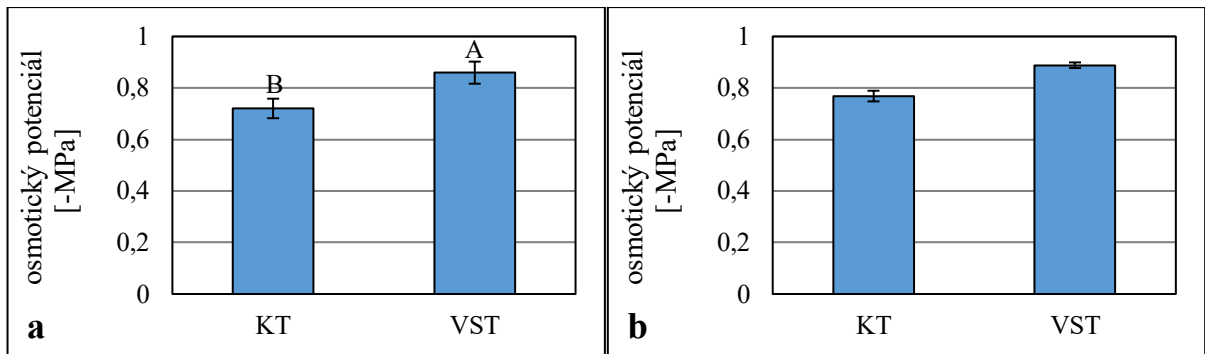
**Graf č. 10: Vliv otužovací a stresové teploty na hodnotu osmotického potenciálu pletiva listu rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **KT** - 3 dny; **V+V**: VOT - 4 dny, VST – 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku hodnoty osmotického potenciálu pletiva listu. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 3$ .



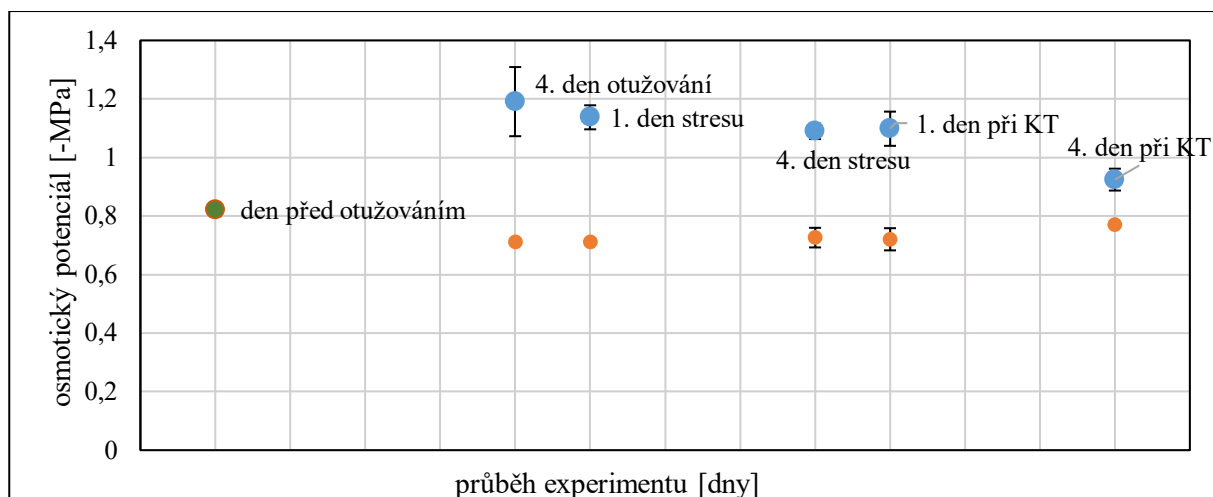
**Graf č. 11: Vliv otužovací a stresové teploty na hodnotu osmotického potenciálu pletiva listu rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **KT** - 4 dny; **V+V**: VOT - 4 dny, VST – 4 dny, **KT** – 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku hodnoty osmotického potenciálu pletiva listu. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 3$ .



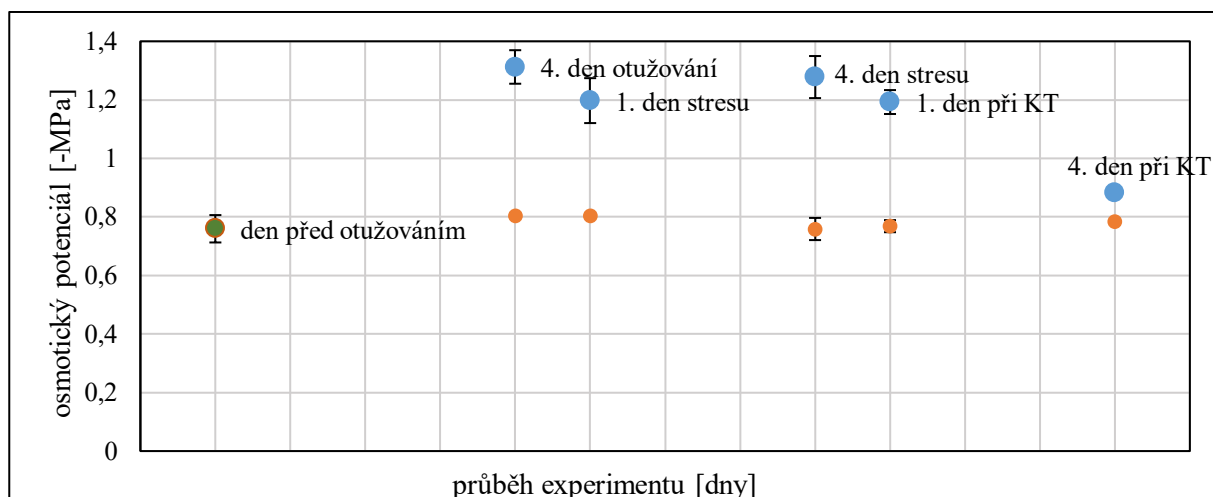
**Graf č. 12: Vliv otužovací a stresové teploty na hodnotu osmotického potenciálu pletiva listu rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **KT** – 7 dnů; **V+V**: VOT - 4 dny, VST – 4 dny, KT – 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku hodnoty osmotického potenciálu pletiva listu. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 3$ , varianta „b) VOT + VST“  $n = 2$ .



**Graf č. 13: Vliv stresové teploty na hodnotu osmotického potenciálu pletiva listu rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **KT** – 0 dnů; **VST**: - 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku hodnoty osmotického potenciálu pletiva listu. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 3$ , varianta „b) VST“  $n = 2$ .



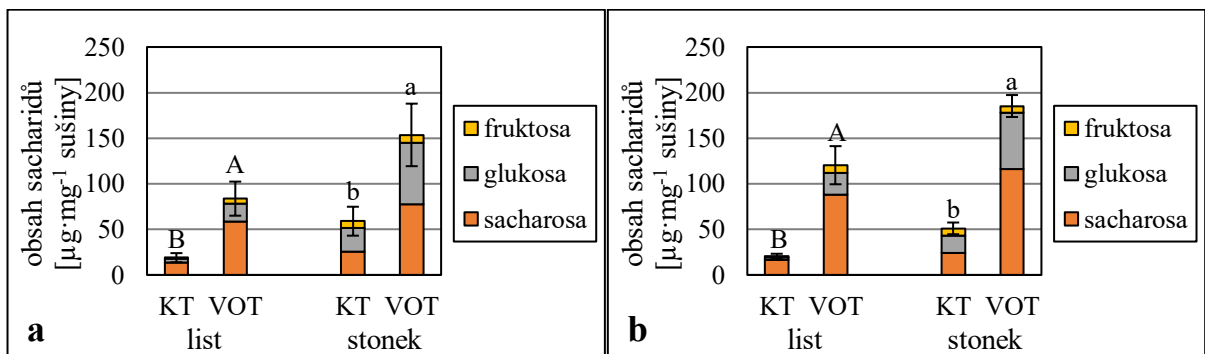
**Graf č. 14: Vliv otužovací a stresové teploty na hodnotu osmotického potenciálu pletiva listu rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK X.** Osa x znázorňuje průběh experimentu. Oranžové body – varianta **KT** – 12 dnů; modré body - varianta **V+V**: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT – 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku hodnoty osmotického potenciálu pletiva listu. n = 3.



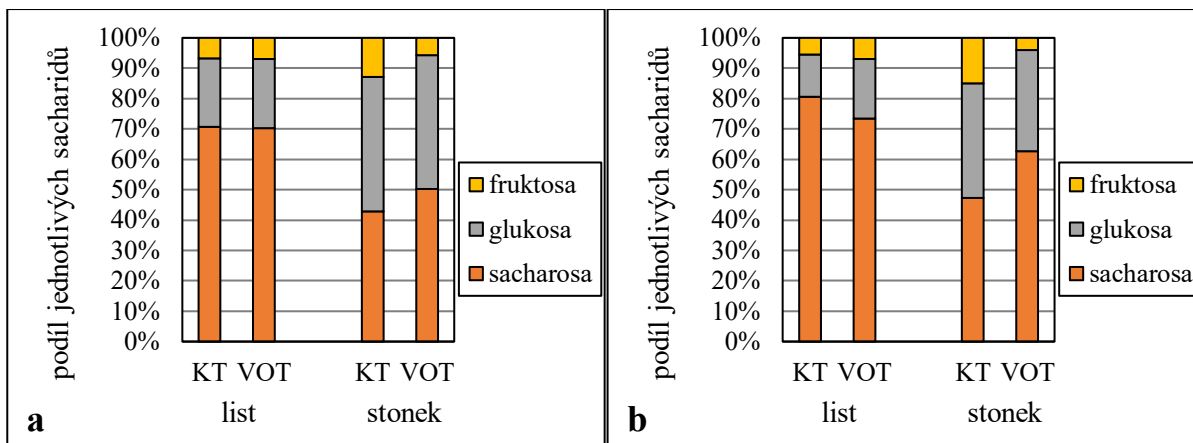
**Graf č. 15: Vliv otužovací a stresové teploty na hodnotu osmotického potenciálu pletiva listu rostlin čiroku. Genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Osa x znázorňuje průběh experimentu. Oranžové body – varianta **KT** – 12 dnů; modré body - varianta **V+V**: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT – 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku hodnoty osmotického potenciálu pletiva listu. n = 3, varianta „4. den otužování“ a „4. den při KT“ n = 2.

Celkový obsah rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin obou genotypů se statisticky významně zvýšil proti kontrole po 4 dnech pěstování při VOT (Graf č. 16). Zvýšení tohoto parametru v listech a stonku rostlin obou genotypů bylo statisticky významné ještě 1. a 4. den při VST (Grafy č. 18, 20). Po ukončení stresu a pěstování při KT (1. a 4. den KT) již v tomto parametru v listech ani ve stonku nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl proti

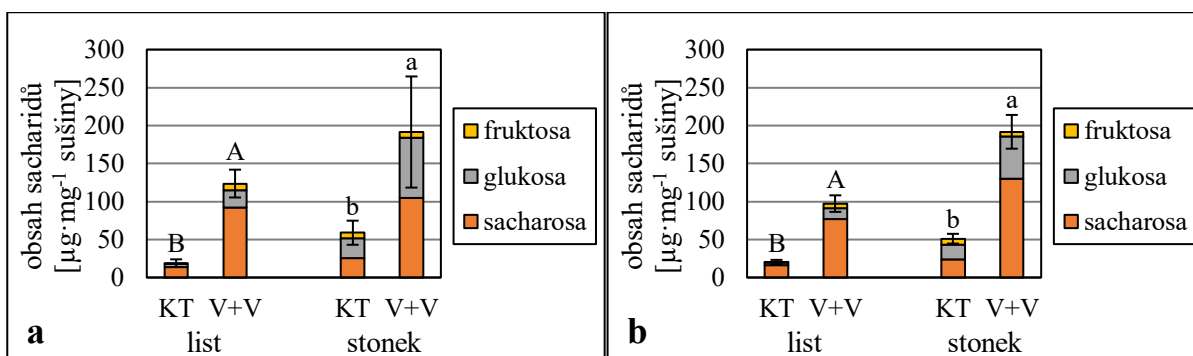
kontrole (Grafy č. 22, 24). Celkový obsah rozpustných sacharidů v listech kontrolních rostlin byl v průběhu experimentu poměrně stabilní u obou genotypů (Grafy č. 28, 29). V tomto experimentu došlo i ke změnám v podílu jednotlivých rozpustných sacharidů na celkovém obsahu rozpustných sacharidů v listech nebo stonku rostlin. Konkrétně ve stonku rostlin obou genotypů je 4. den při VOT, 1. den při VST a 4. den při VST patrné snížení podílu fruktosy na celkovém obsahu rozpustných sacharidů oproti kontrole, které je kompenzováno zvýšením podílu sacharosy (Grafy č. 17, 19, 21). Dále je 4. den při VST a následující dny při KT v listech ošetřených rostlin obou genotypů ve srovnání s kontrolou patrná tendence ke snížení podílu sacharosy a zvýšení podílu glukosy a fruktosy na celkovém obsahu rozpustných sacharidů (Grafy č. 21, 23, 25). U rostlin obou genotypů přenesených z KT přímo do VST nedošlo po 1 dni při VST k významné změně v celkovém obsahu rozpustných sacharidů (Graf č. 26). Při tomto ošetření je ve stonku rostlin obou genotypů a v listech genotypu „01Z1800012“ patrný trend ke snížení podílu glukosy a fruktosy a zvýšení podílu sacharosy na celkovém obsahu rozpustných sacharidů proti kontrole (Graf č. 27). V tomto (a několika dalších experimentech) nebyla kvantifikace množství inositolu a sacharidu komigrujícího s rafinosou možná kvůli interferujícím látkám na pozadí, proto zde nejsou uvedeny. To platí i pro látku s retenčním časem (RT) 24,9 v experimentech *in vitro*.



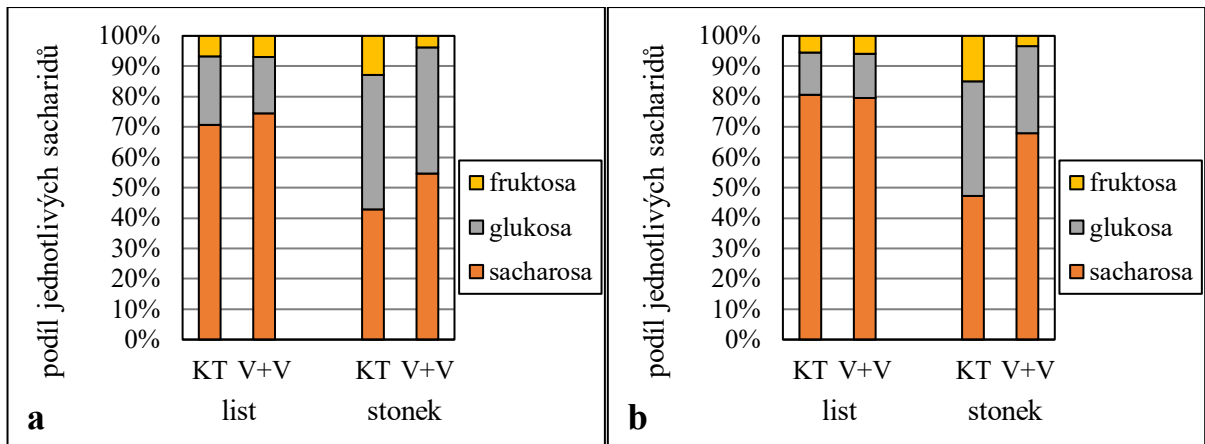
**Graf č. 16: Vliv otužovací teploty na obsah rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 2 dny; VOT - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 6$ .**



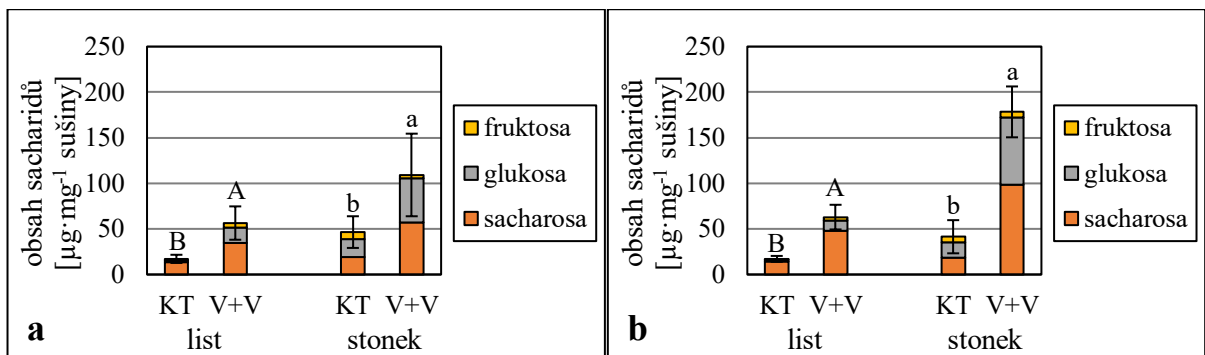
**Graf č. 17: Vliv otužovací teploty na podíl jednotlivých sacharidů na celkovém obsahu sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 2 dny; VOT - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. n = 6.**



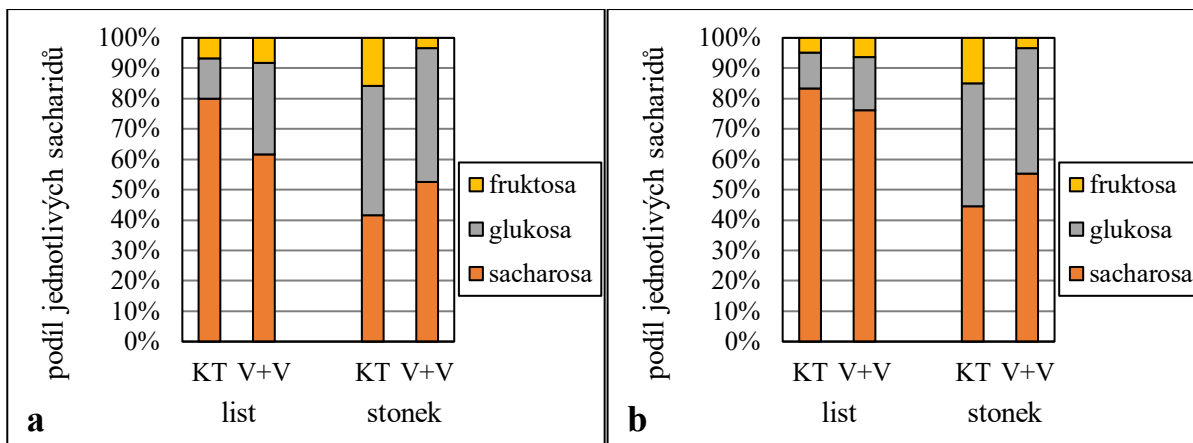
**Graf č. 18: Vliv otužovací a stresové teploty na obsah rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 2 dny; V+V: VOT - 4 dny, VST - 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA; n = 6.**



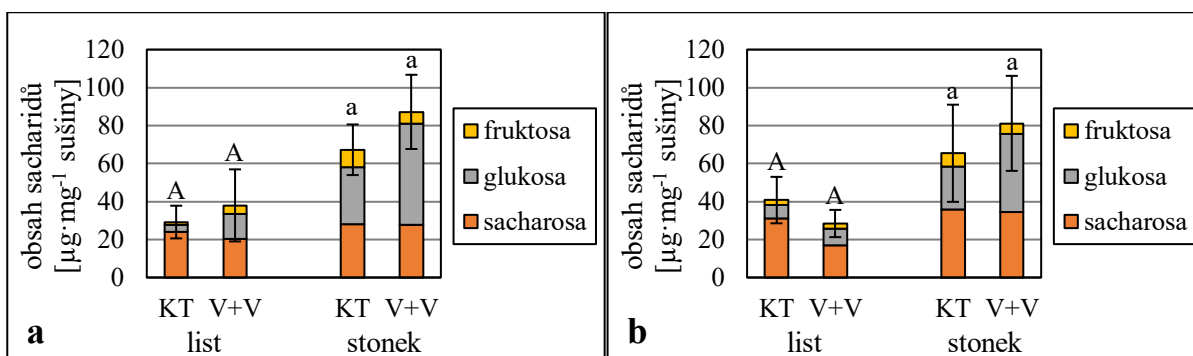
**Graf č. 19: Vliv otužovací a stresové teploty na podíl jednotlivých sacharidů na celkovém obsahu sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 2 dny; V+V: VOT - 4 dny, VST - 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. n = 6.**



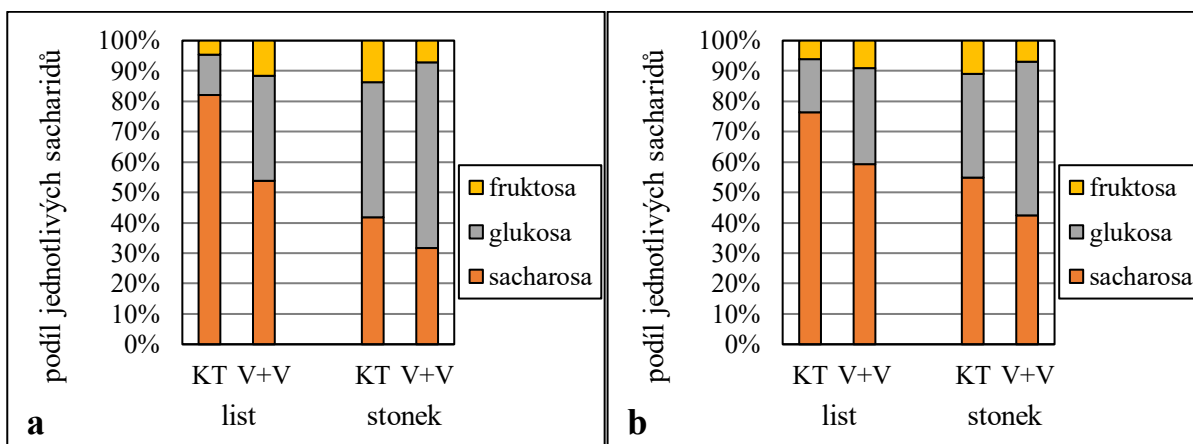
**Graf č. 20: Vliv otužovací a stresové teploty na obsah rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 3 dny; V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA; n = 6.**



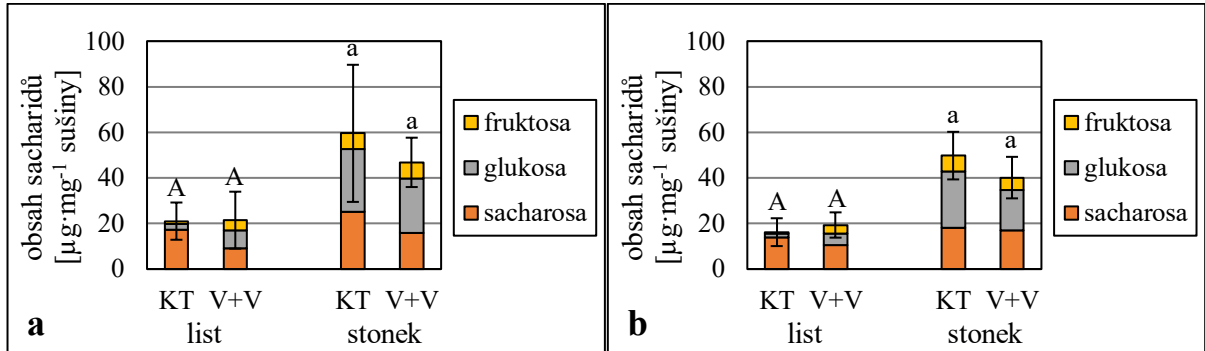
**Graf č. 21:** Vliv otužovací a stresové teploty na podíl jednotlivých sacharidů na celkovém obsahu sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 3 dny; V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. n = 6.



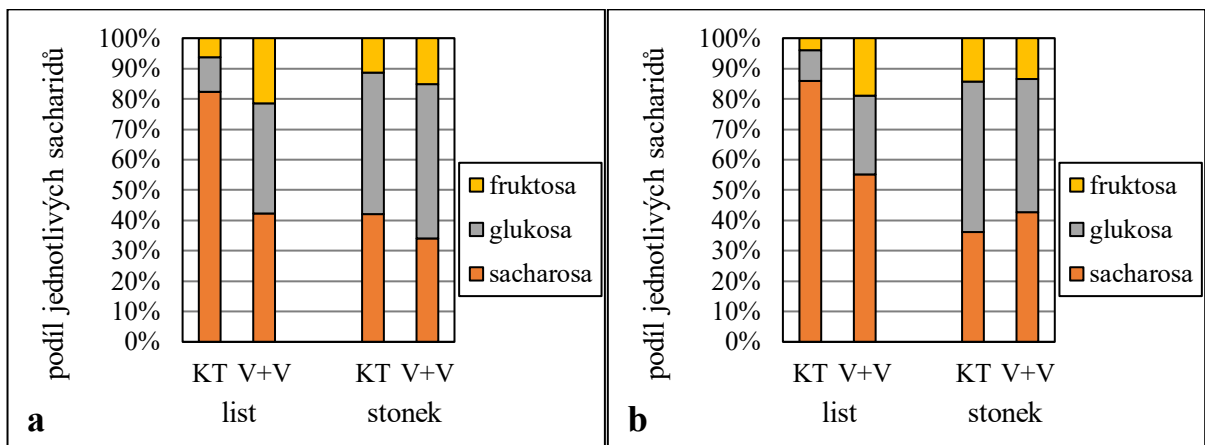
**Graf č. 22:** Vliv otužovací a stresové teploty na obsah rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 4 dny; V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT - 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA; n = 6.



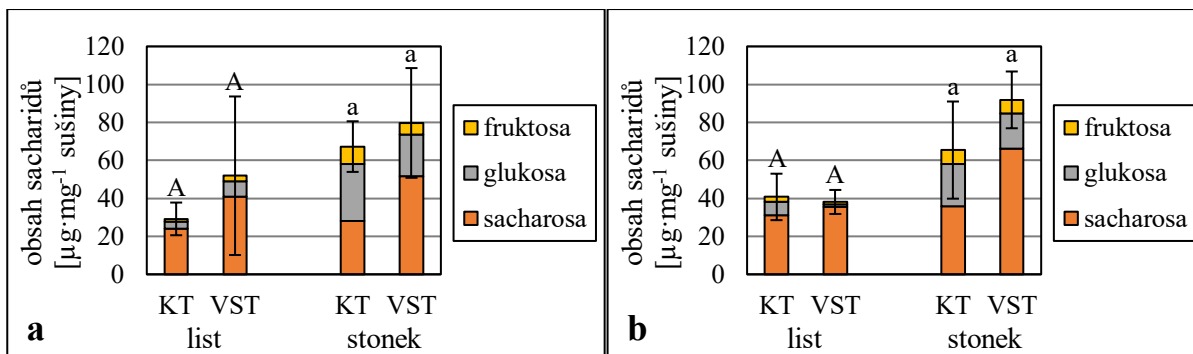
**Graf č. 23:** Vliv otužovací a stresové teploty na podíl jednotlivých sacharidů na celkovém obsahu sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 4 dny; V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT - 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. n = 6.



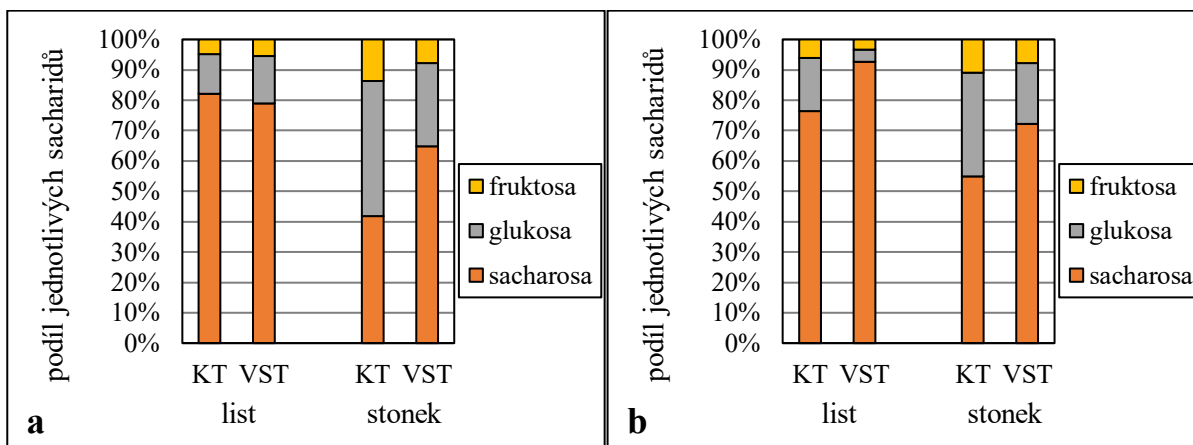
**Graf č. 24:** Vliv otužovací a stresové teploty na obsah rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 7 dnů; V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA; n = 6.



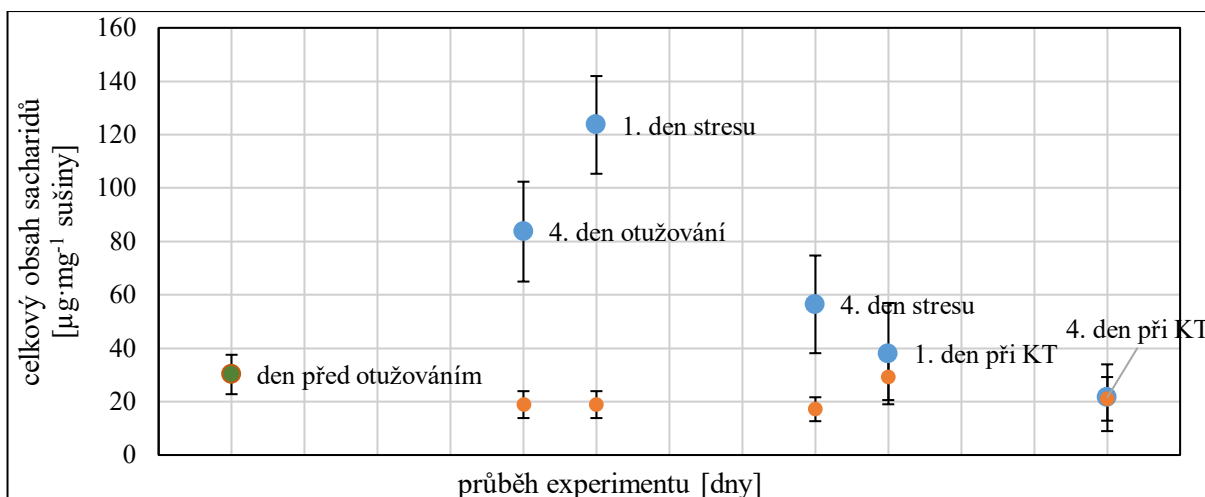
**Graf č. 25:** Vliv otužovací a stresové teploty na podíl jednotlivých sacharidů na celkovém obsahu sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 7 dnů; V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. n = 6.



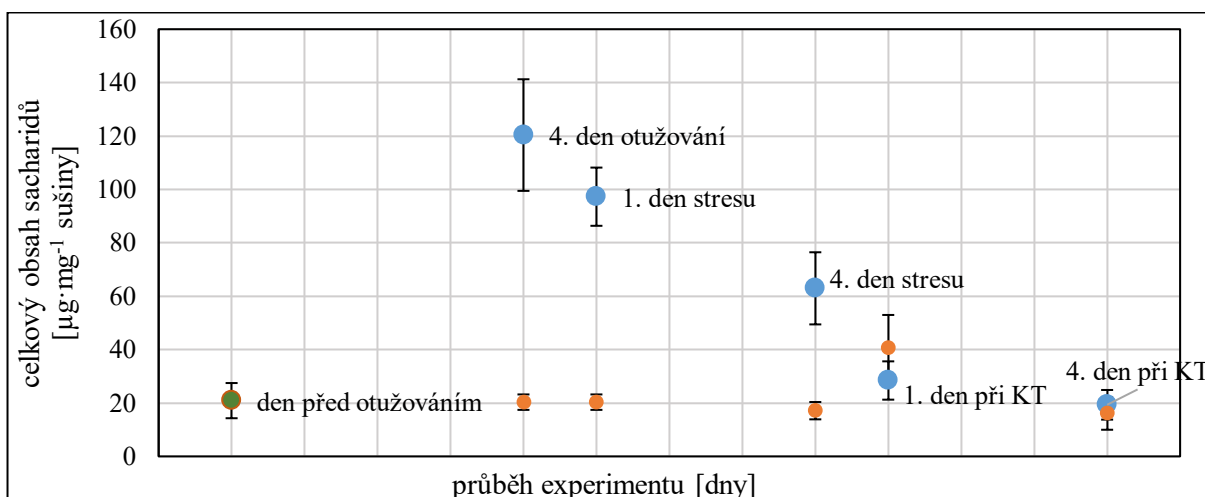
**Graf č. 26: Vliv stresové teploty na obsah rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT – 0 dnů; VST – 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 21 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 6$ .**



**Graf č. 27: Vliv stresové teploty na podíl jednotlivých sacharidů na celkovém obsahu sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT – 0 dnů; VST – 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 21 dní při KT.  $n = 6$ .**



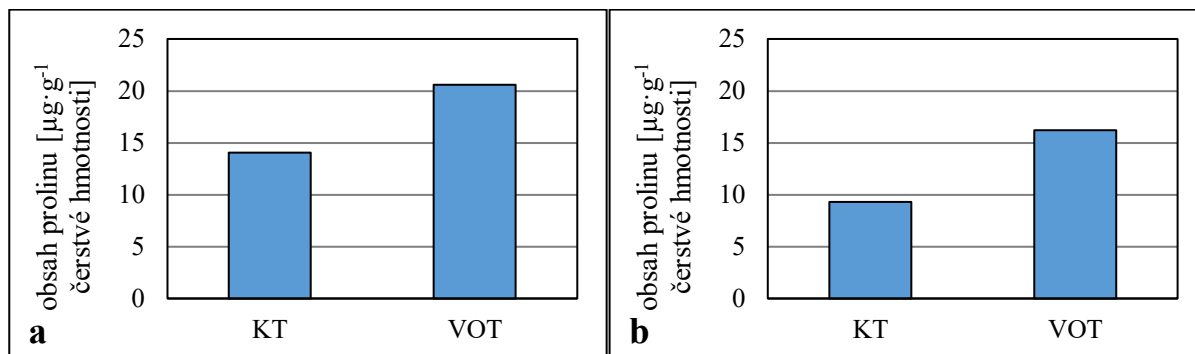
**Graf č. 28: Vliv otužovací a stresové teploty na celkový obsah rozpustných sacharidů v listech rostlin široku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK X.** Osa x znázorňuje průběh experimentu. Oranžové body – varianta KT – 12 dnů; modré body - varianta V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT – 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. n = 6.



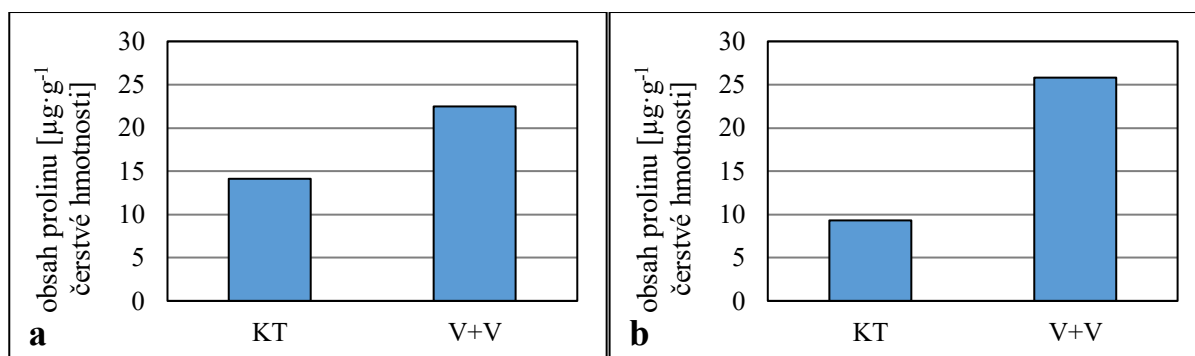
**Graf č. 29: Vliv otužovací a stresové teploty na celkový obsah rozpustných sacharidů v listech rostlin široku. Genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Osa x znázorňuje průběh experimentu. Oranžové body – varianta KT – 12 dnů; modré body - varianta V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT – 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. n = 6.

Další sledovanou charakteristikou byl obsah prolinu v listech rostlin. Po vystavení rostlin otužovací teplotě se obsah prolinu zvýšil (viz Graf č. 30) a udržoval na podobné úrovni i po vystavení stresové teplotě (viz Grafy č. 31, 32). Po ukončení stresu (genotyp „01Z1800012“) a prvním dnu pěstování při KT (genotyp „Ruzrok“) se u ošetřených rostlin obsah prolinu začal snižovat (viz Grafy č. 33, 34). Na Grafech č. 36 a 37 je znázorněn obsah

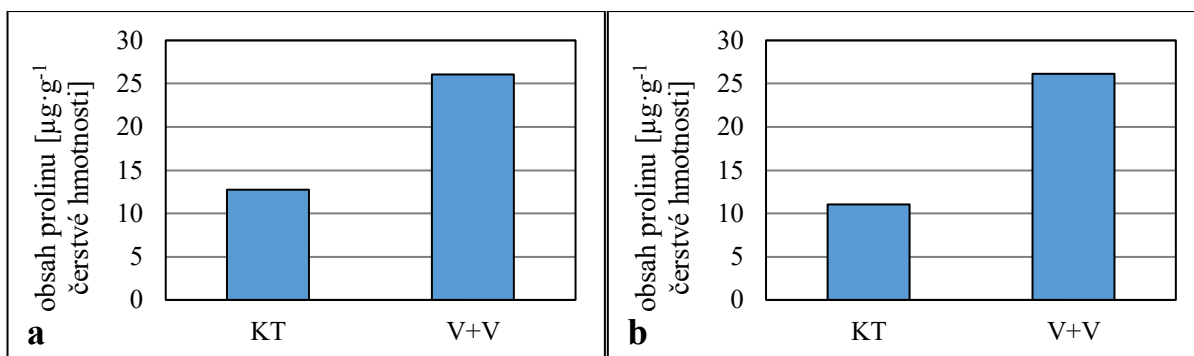
prolinu v listech rostlin v průběhu experimentu ve srovnání s kontrolou (Graf č. 36 – genotyp „Ruzrok“, Graf č. 37 - genotyp „01Z1800012“). U rostlin přenesených z KT do VST je po 1 dnu patrná tendence ke zvýšení obsahu prolinu pouze u genotypu „Ruzrok“ (viz Graf č. 35).



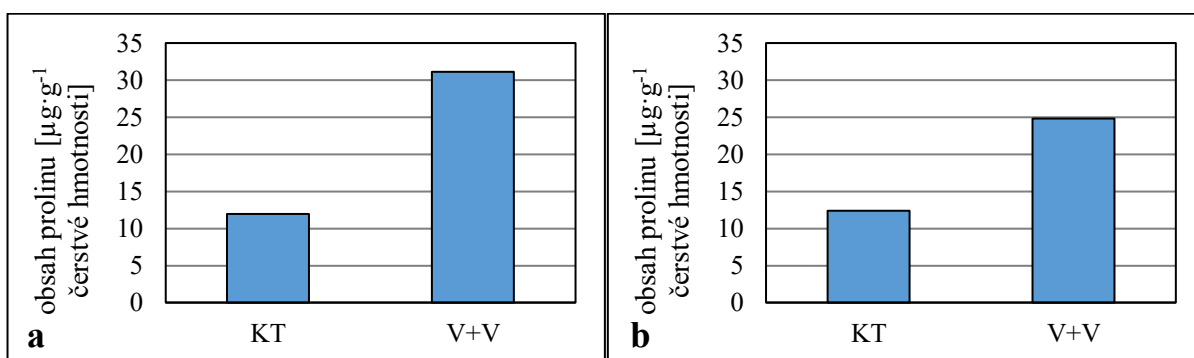
**Graf č. 30: Vliv otužovací teploty na obsah prolinu v listech rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 2 dny; VOT - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Směsný vzorek z 12 rostlin.**



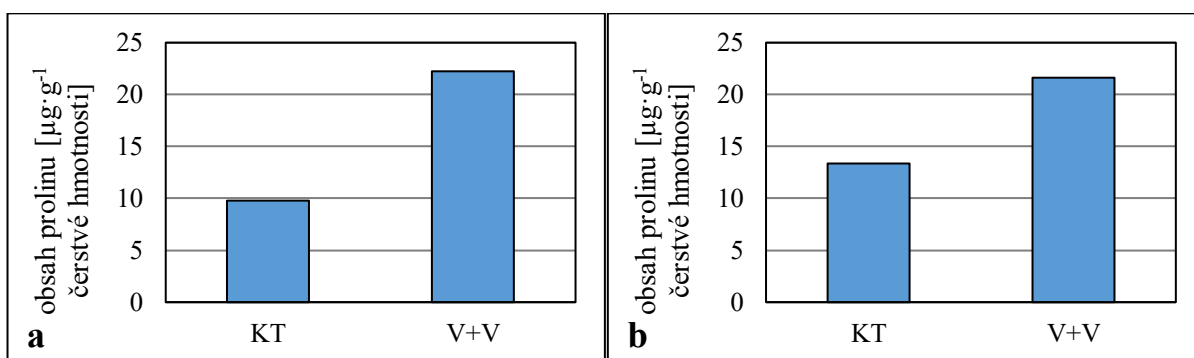
**Graf č. 31: Vliv otužovací a stresové teploty na obsah prolinu v listech rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 2 dny; V+V: VOT - 4 dny, VST - 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Směsný vzorek z 12 rostlin.**



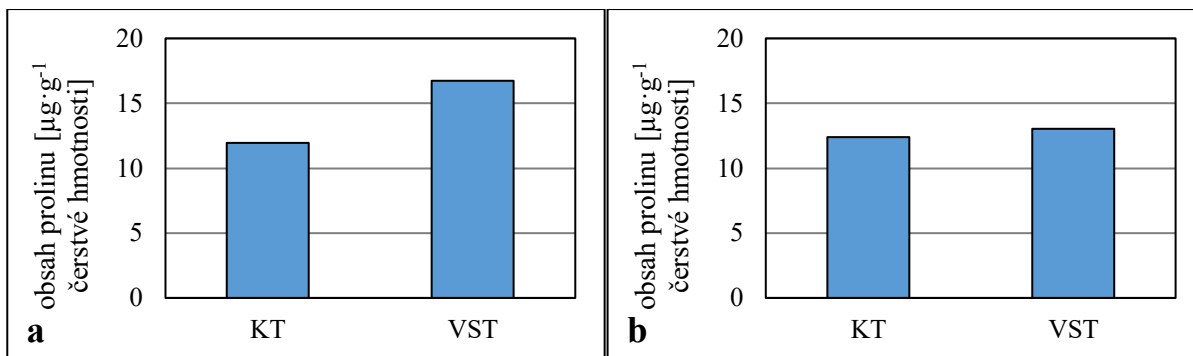
**Graf č. 32:** Vliv otužovací a stresové teploty na obsah prolinu v listech rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 3 dny; V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Směsný vzorek z 12 rostlin.



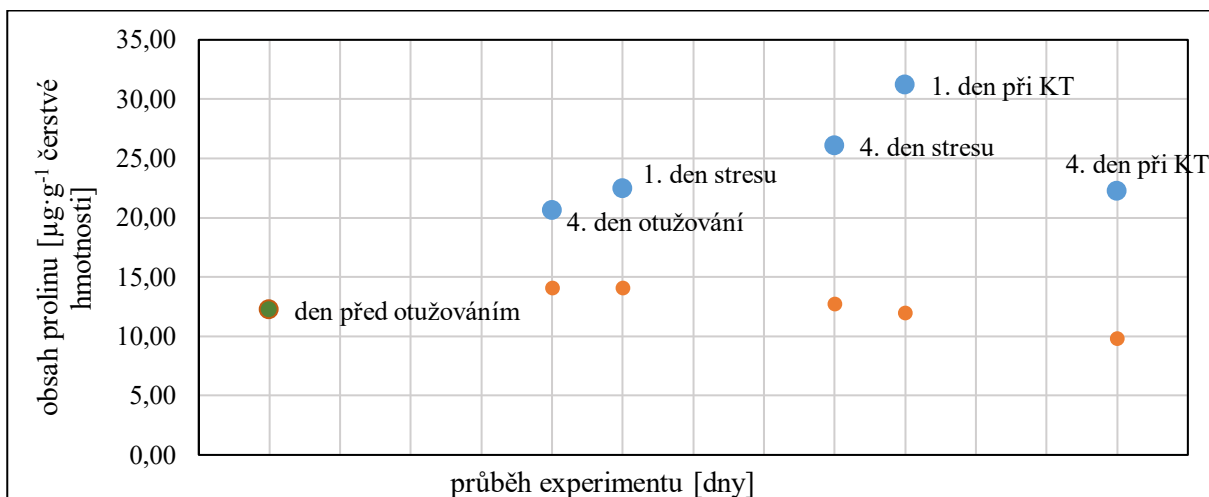
**Graf č. 33:** Vliv otužovací a stresové teploty na obsah prolinu v listech rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 4 dny; V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT - 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Směsný vzorek z 12 rostlin.



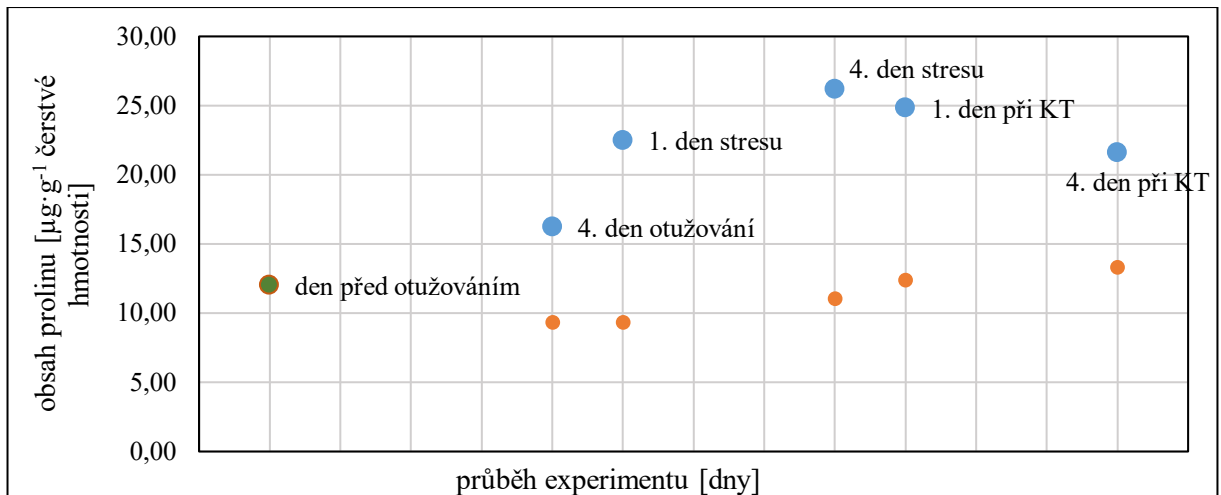
**Graf č. 34:** Vliv otužovací a stresové teploty na obsah prolinu v listech rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 7 dnů; V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Směsný vzorek z 12 rostlin.



**Graf č. 35: Vliv stresové teploty na obsah prolinu v listech rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT – 0 dnů; VST – 1 den. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 21 dní při KT. Směsný vzorek z 12 rostlin.**

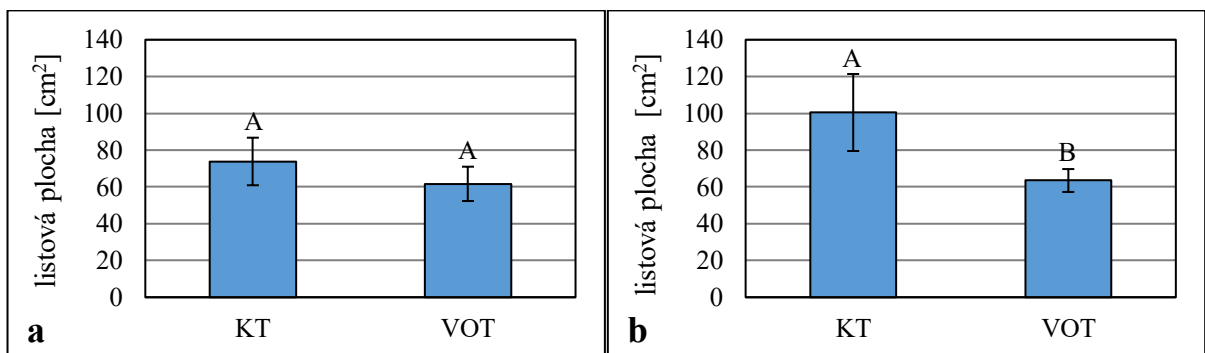


**Graf č. 36: Vliv otužovací a stresové teploty na obsah prolinu v listech rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK X. Osa x znázorňuje průběh experimentu. Oranžové body – varianta KT – 12 dnů; modré body - varianta V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT – 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Směsné vzorky z 12 rostlin.**

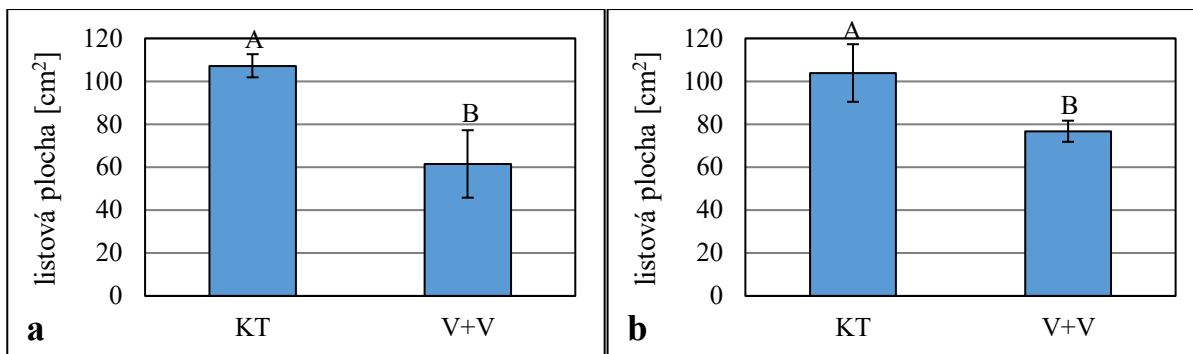


**Graf č. 37: Vliv otužovací a stresové teploty na obsah prolínu v listech rostlin čiroku. Genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Osa x znázorňuje průběh experimentu. Oranžové body – varianta KT – 12 dnů; modré body - varianta V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT – 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Směsné vzorky z 12 rostlin.

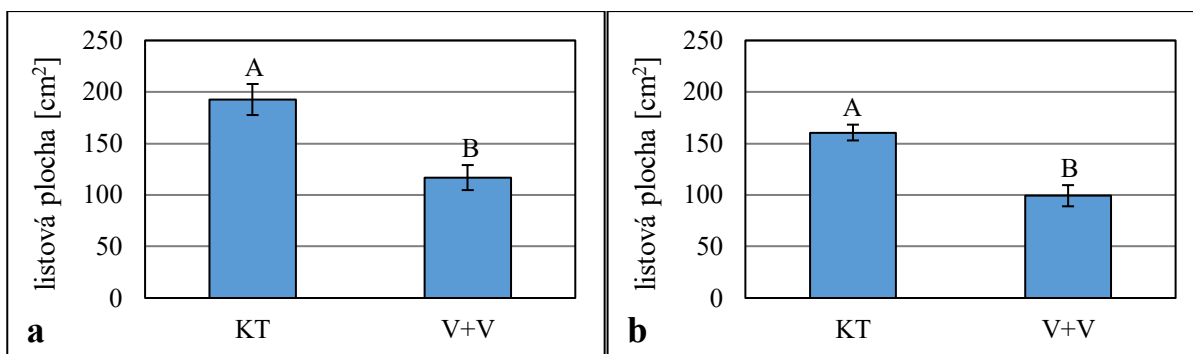
Velikost listové plochy u rostlin pěstovaných 4 dny při VOT byla ve srovnání s kontrolou statisticky významně nižší pouze u genotypu „01Z1800012“ (Graf č. 38). Po následujícím vystavení rostlin 4 dnům VST již byla velikost listové plochy statisticky významně nižší proti kontrole u obou genotypů (Graf č. 39). To se nezměnilo ani po ukončení VST a kultivaci rostlin 4 dny při KT (Graf č. 40). Tyto výsledky jsou shrnuty v Grafech č. 41 a 42.



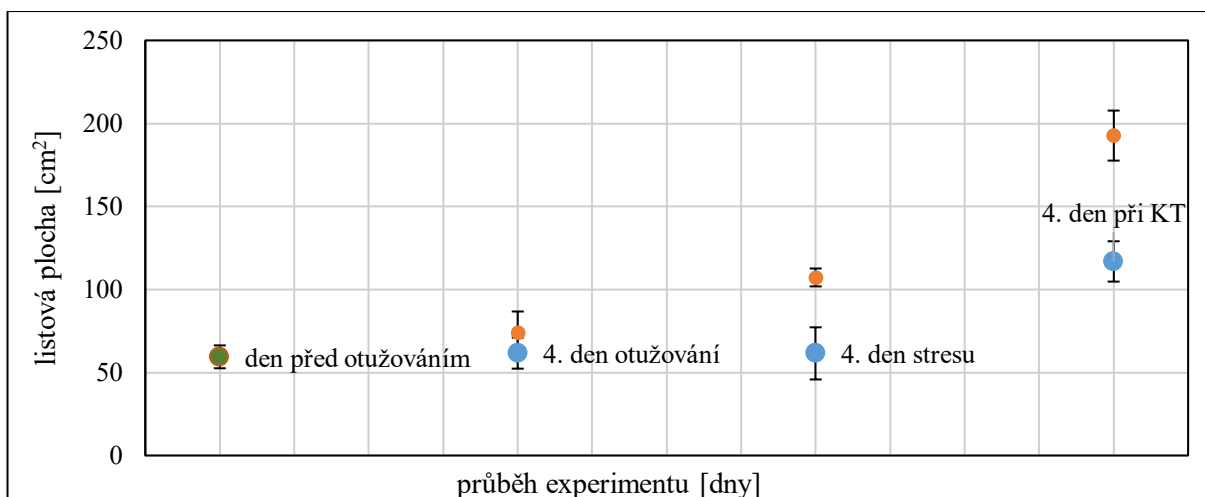
**Graf č. 38: Vliv otužovací teploty na velikost listové plochy rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 2 dny; VOT - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku velikosti listové plochy. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl velikosti listové plochy na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 4$ .



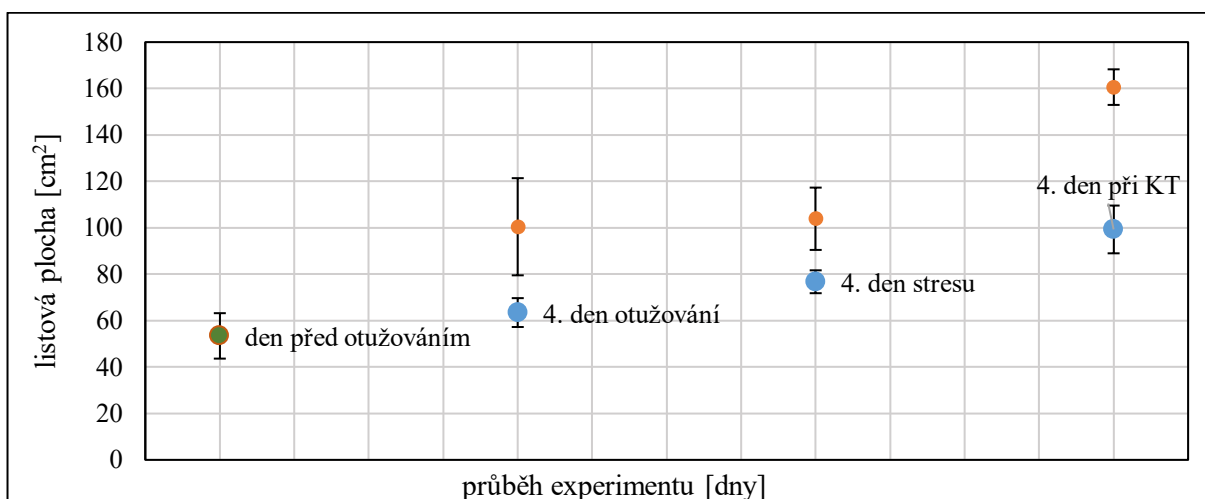
**Graf č. 39: Vliv otužovací a stresové teploty na velikost listové plochy rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 3 dny; V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku velikosti listové plochy. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl velikosti listové plochy na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 4$ .**



**Graf č. 40: Vliv otužovací a stresové teploty na velikost listové plochy rostlin čiroku. a) genotyp „Ruzrok“, b) genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: KT - 7 dnů; V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT - 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku velikosti listové plochy. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl velikosti listové plochy na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 4$ .**



**Graf č. 41: Vliv otužovací a stresové teploty na velikost listové plochy rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK X.** Osa x znázorňuje průběh experimentu. Oranžové body – varianta KT – 12 dnů; modré body - varianta V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT – 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku velikosti listové plochy; n = 4.



**Graf č. 42: Vliv otužovací a stresové teploty na listovou plochu rostlin čiroku. Genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK X.** Osa x znázorňuje průběh experimentu. Oranžové body – varianta KT – 12 dnů; modré body - varianta V+V: VOT - 4 dny, VST - 4 dny, KT – 4 dny. Před ošetřením byly rostliny pěstovány 17 dní při KT. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku velikosti listové plochy; n = 4.

Rostliny před začátkem otužování byly ve stadiu vyvíjejícího se 3. pravého listu, což se během 4 dnů při VOT nezměnilo. Příslušná kontrola (na základě SET) k 4. dnu VOT měla již většinou 3. pravý list plně vyvinutý. Na konci VST byly rostliny stále ve stadiu vyvíjejícího se 3. pravého listu, u rostlin příslušné kontroly již začínal prorůstat 4. pravý list. Stresované rostliny měly po ukončení stresu a pěstování 4 dny při KT plně vyvinutý 3. pravý list a u

některých již prorůstal 4. pravý list. Rostliny příslušné kontroly již měly plně vyvinutý 4. pravý list. Odebírán byl 2. pravý list.

Během tohoto experimentu došlo k závadě na spínači světla v kultivační místnosti, kde byly pěstovány rostliny v otužovací teplotě. Není možné vyloučit, že tyto rostliny byly kvůli závadě vystaveny kontinuálnímu osvětlení po dobu tří následujících dnů a nocí. K výsledkům tohoto experimentu (kromě varianty, ve které byly rostliny přeneseny z KT rovnou do VST) je proto třeba přistupovat opatrně a počítat s tím, že mohou být působením kontinuálního osvětlení významně ovlivněny.

#### 4. 2. Experimenty *in vitro*

Cílem těchto experimentů bylo ověřit chování rostlin při působení stresových faktorů v kontrolovaných podmínkách. Vzhledem k typické stavbě těla trav se osvědčila kultivace v širokých zkumavkách (délka 20 cm, průměr 3 cm) uzavřených průhlednou fólií (Obr. č. 12).

Odběry v těchto experimentech probíhaly z devítidenních (ČIROK VII a XV) nebo desetidenních (ČIROK V, VI, VIII, IX, X, XI, XII, XIII a XIV) rostlin. Většina rostlin byla ve fázi plně vyvinutého 1. pravého listu (který byl odebírán), případně se u některých jedinců začínal vyvíjet 2. pravý list.



**Obr. č. 12: Fotografie rostliny čiroku pěstované 10 dnů. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK VI. Rostlina byla pěstována na MS médiu s 3% sacharosou.**

#### 4. 2. 1. Výběr metody sterilizace obilek

Cílem experimentů ČIROK III a IV bylo vybrat vhodný postup sterilizace obilek zajišťující co nejvyšší počet vyklíčených obilek bez kontaminace, které zároveň nejsou poškozené příliš silnou sterilizací. Sterilizaci u čiroku komplikuje fakt, že obilky jsou kryty pluchami pouze částečně, což umožňuje průnik kontaminace k obilkám. V těchto experimentech bylo využito osivo čiroku sklizené ve dvou následujících rocích, což mělo též vliv na množství kontaminovaných obilek. Podíl vyklíčených obilek bez kontaminace a morfologických abnormalit vůči celkovému počtu obilek v experimentech ČIROK III, IV a několika dalších experimentech je uveden v Tabulce č. 8

Experiment	Podíl použitelných obilek
ČIROK III	13 %
ČIROK IV	23 %
ČIROK V	55 %
ČIROK VI	72 %
ČIROK VII	75 %
ČIROK VIII	65 %

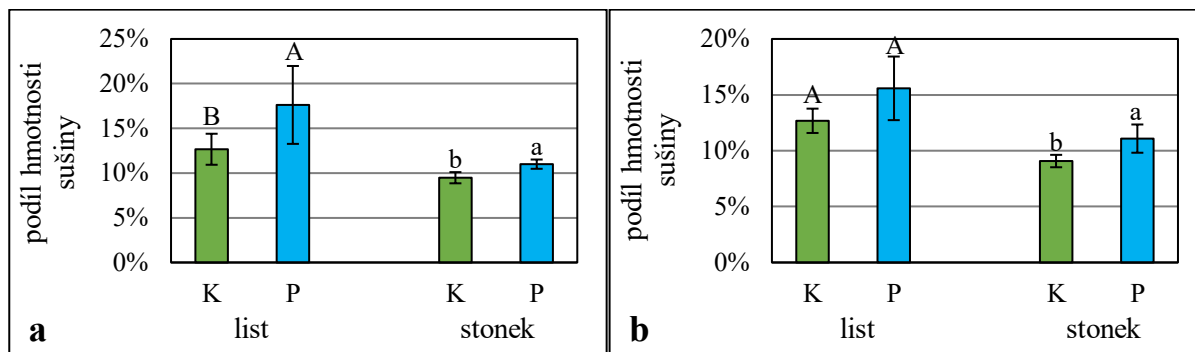
**Tabulka č. 8: Podíl vyklíčených obilek bez kontaminace a morfologických abnormalit vůči celkovému počtu sterilizovaných obilek**

#### 4. 2. 2. Vliv osmotického stresu na podíl sušiny na celkové hmotnosti a sacharidový metabolismus rostlin čiroku

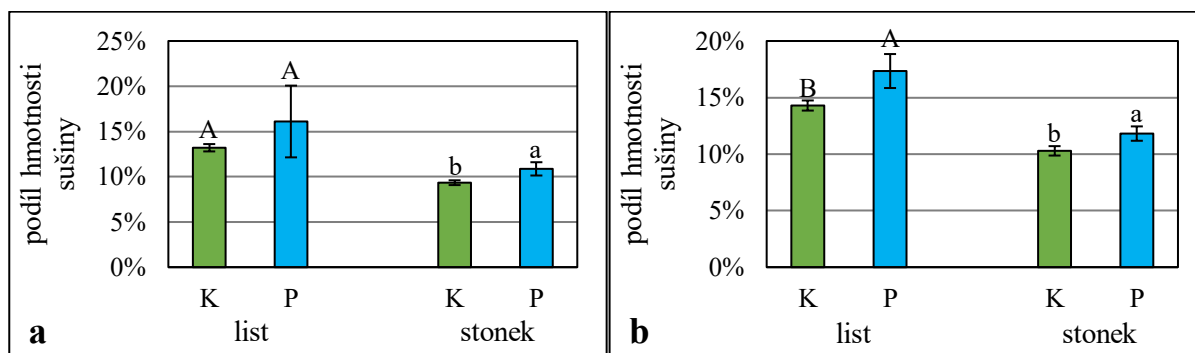
V experimentech ČIROK V, VI, XI a XII byl testován vliv osmotického stresu na podíl hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku a na obsah a zastoupení rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin. Kromě toho byl v experimentu ČIROK VI stanovován poměr hmotnosti podzemní a nadzemní části rostliny. Osmotický stres byl vyvolán přidáním PEG 4000 do média. V experimentech ČIROK V a VI byl použit genotyp „Ruzrok“, v experimentech ČIROK XI a XII genotyp „01Z1800012“.

Podíl hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku byl u rostlin obou genotypů vystavených osmotickému stresu statisticky významně vyšší oproti kontrole v případě vzorků odebraných ze stonku (Grafy č. 43, 44). V případě vzorků odebraných z listu byl tento parametr

u obou genotypů statisticky významně vyšší vždy pouze v jednom ze dvou experimentů (Grafy č. 43 a, 44 b). V druhé polovině experimentů je patrná tendence ke zvýšení podílu, která však díky vysokému rozptylu stanovených hodnot není statisticky průkazná (Grafy č. 43 b, 44 a).



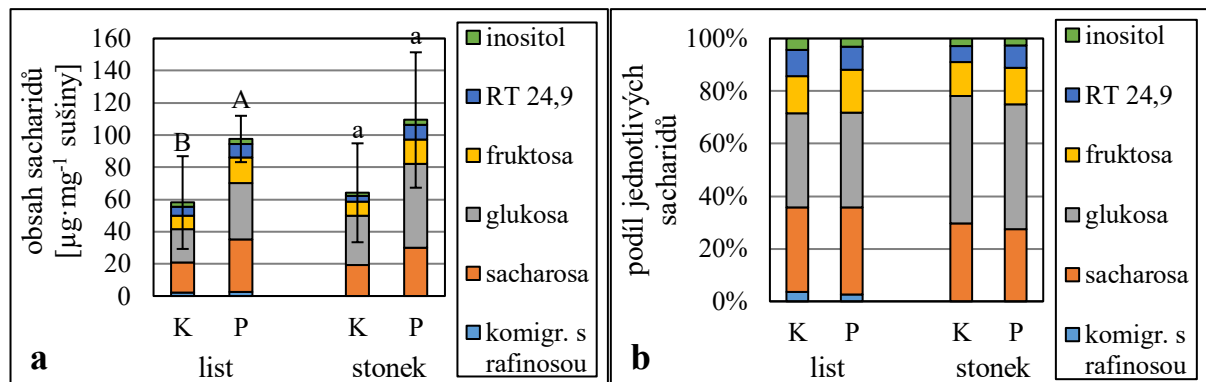
**Graf č. 43: Vliv osmotického stresu na podíl hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku listů a stonků rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, a) experiment ČIROK V; b) experiment ČIROK VI.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **K**: MS médium, **P**: MS médium + 7,5% PEG. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 6$ .



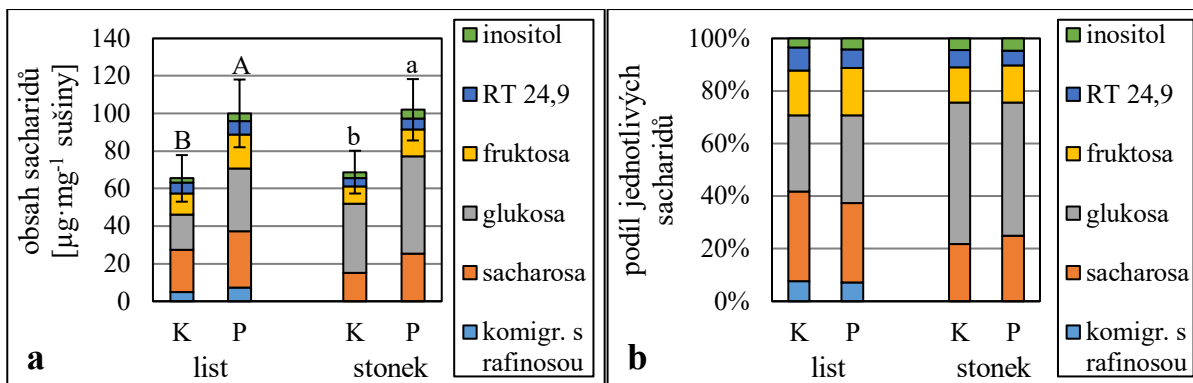
**Graf č. 44: Vliv osmotického stresu na podíl hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku listů a stonků rostlin čiroku. Genotyp „01Z1800012“, a) experiment ČIROK XI; b) experiment ČIROK XII.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **K**: MS médium, **P**: MS médium + 7,5% PEG. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 6$ .

V experimentu ČIROK VI byl stanoven poměr hmotnosti sušiny podzemní a nadzemní části. U rostlin pěstovaných na MS médiu s přidáním PEG byla patrná mírná tendence ke zvýšení hodnoty R/S.

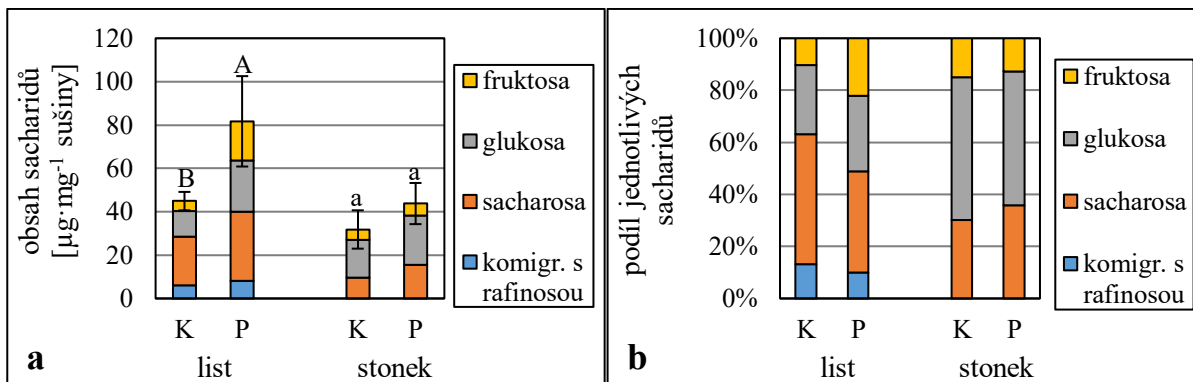
Celkový obsah rozpustných sacharidů v listech se u stresovaných rostlin obou genotypů statisticky významně zvýšil proti kontrole v případě všech experimentů (Grafy č. 45 a, 46 a, 47 a, 48 a). Ke zvýšení obsahu sacharidů u stresovaných rostlin došlo i ve stonku, statisticky významný rozdíl oproti kontrole byl ovšem zjištěn pouze v experimentu ČIROK VI provedeném na genotypu „Ruzrok“ (Grafy č. 45 a, 46 a, 47 a, 48 a). Podíl jednotlivých sacharidů na celkovém obsahu se v případě genotypu „Ruzrok“ zásadně neměnil (Grafy č. 45 b, 46 b), zatímco u stresovaných rostlin genotypu „01Z1800012“ se přibližně dvakrát zvýšil podíl fruktosy na celkovém obsahu rozpustných sacharidů v listech (Grafy č. 47 b, 48 b). V experimentech *in vitro* byl v sacharidovém spektru stabilně identifikován peak o retenčním čase 24,9 minut, který nekomigroval s žádným z dostupných obvyklých sacharidů.



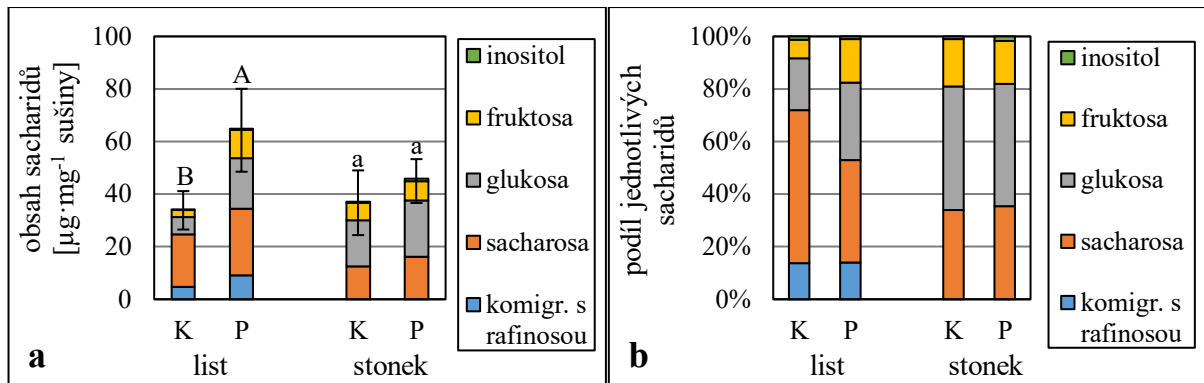
**Graf č. 45: Vliv osmotického stresu na obsah (a) a zastoupení (b) rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK V. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: K: MS médium, P: MS médium + 7,5% PEG. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 6$ .**



**Graf č. 46: Vliv osmotického stresu na obsah (a) a zastoupení (b) rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK VI.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **K**: MS médium, **P**: MS médium + 7,5% PEG. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 6$ .



**Graf č. 47: Vliv osmotického stresu na obsah (a) a zastoupení (b) rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. Genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK XI.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **K**: MS médium, **P**: MS médium + 7,5% PEG. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 6$ .

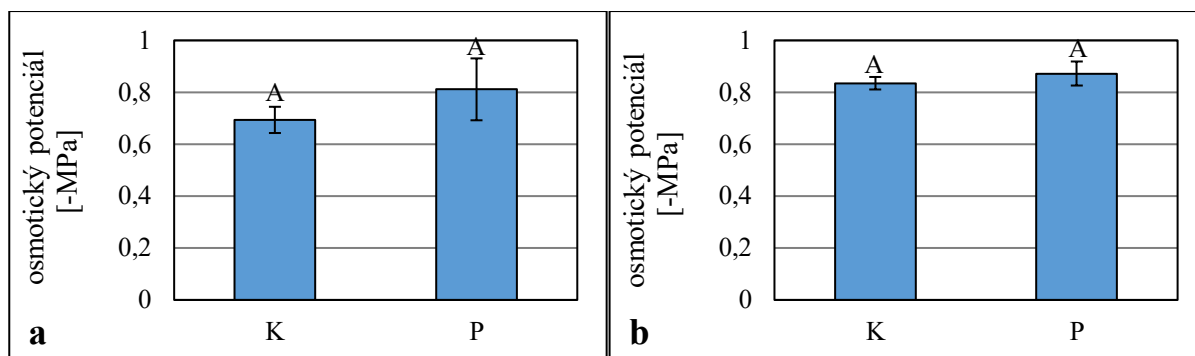


**Graf č. 48: Vliv osmotického stresu na obsah (a) a zastoupení (b) rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. Genotyp „01Z1800012“, experiment ČIROK XII.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **K**: MS médium, **P**: MS médium + 7,5% PEG. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 6$ .

#### 4. 2. 3. Vliv osmotického stresu na osmotický potenciál a obsah prolinu v listech rostlin čiroku

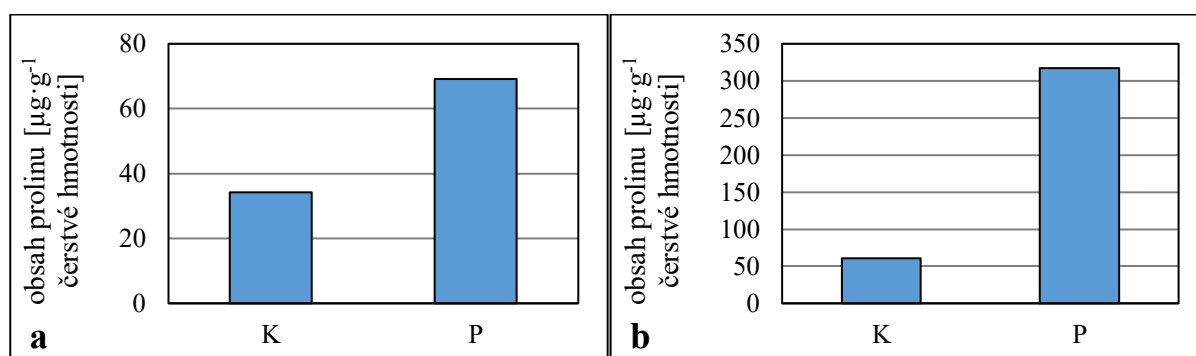
Cílem experimentů ČIROK VIII, IX, XIII a XIV bylo zjistit vliv osmotického stresu na obsah prolinu v listech rostlin. Kromě toho byl v experimentech ČIROK VIII a ČIROK IX stanovován osmotický potenciál pletiva listu. Osmotický stres byl vyvolán přidáním PEG do média. Experimenty ČIROK VIII a IX byly provedeny na rostlinách genotypu „Ruzrok“, experimenty ČIROK XIII a ČIROK XIV na rostlinách genotypu „01Z1800012“.

Stresované rostliny se v experimentech ČIROK VIII a ČIROK IX významně nelišily v hodnotě osmotického potenciálu pletiva listu od kontroly, pouze v experimentu ČIROK VIII je patrná tendence ke snížení hodnoty osmotického potenciálu u stresovaných rostlin proti kontrole (Graf č. 49).

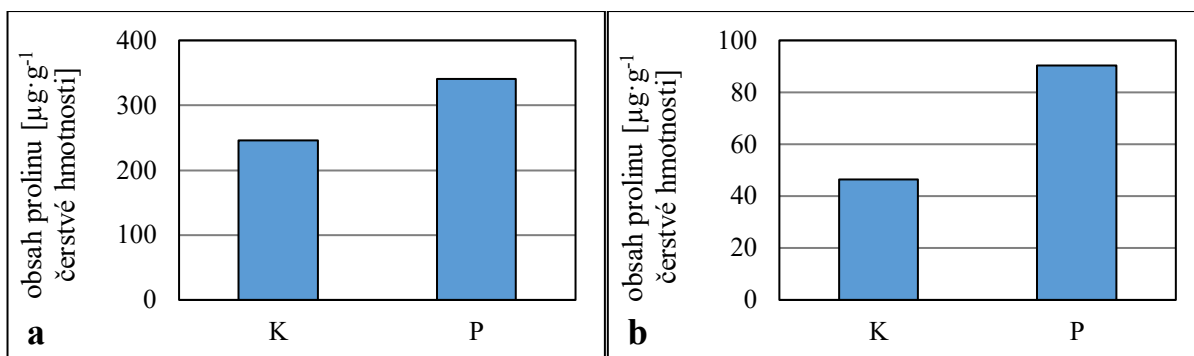


**Graf č. 49: Vliv osmotického stresu na hodnotu osmotického potenciálu pletiva listu rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, a) experiment ČIROK VIII; b) experiment ČIROK IX. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: K: MS médium, P: MS médium + 7,5% PEG. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku hodnoty osmotického potenciálu v pletivu listu, různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v hodnotě osmotického potenciálu pletiva listu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA;  $n = 3$ .**

Mezi rostlinami v jednotlivých experimentech byly poměrně velké rozdíly v obsahu prolinu v listech. Ve všech experimentech je ovšem patrná tendence ke zvýšení obsahu prolinu u stresovaných rostlin oproti kontrole (Graf č. 50, 51).



**Graf č. 50: Vliv osmotického stresu na obsah prolinu v listech rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, a) experiment ČIROK VIII; b) experiment ČIROK IX. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: K: MS médium, P: MS médium + 7,5% PEG. Směsný vzorek z 30 rostlin, průměr ze 2 technických replikátů.**

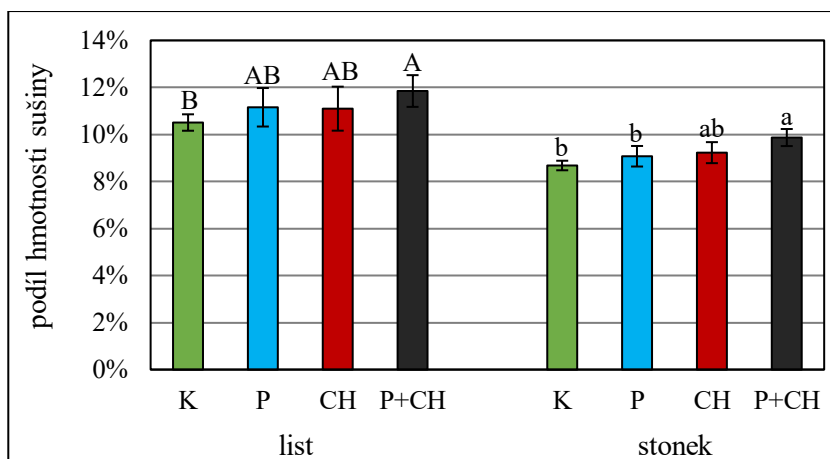


**Graf č. 51: Vliv osmotického stresu na obsah prolinu v listech rostlin čiroku. Genotyp „01Z1800012“, a) experiment ČIROK XIII; b) experiment ČIROK XIV. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: K: MS médium, P: MS médium + 7,5% PEG. Směsný vzorek z 30 rostlin.**

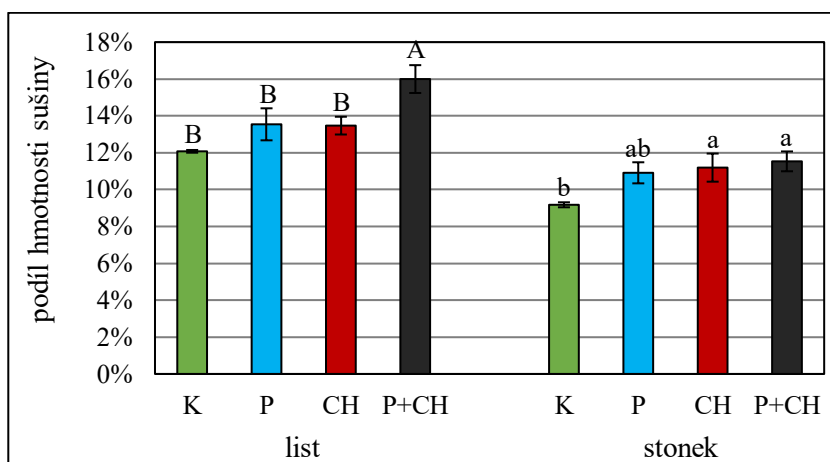
#### 4. 2. 3. Vliv kombinace osmotického stresu a nočního chladu na podíl hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti a sacharidový metabolismus rostlin čiroku

Experimenty ČIROK VII a XV byly zaměřeny na zjištění vlivu osmotického stresu, nočního chladu a kombinace těchto stresových faktorů na rostliny čiroku genotypu „Ruzrok“. Sledované charakteristiky byly podíl hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku, obsah a zastoupení rozpustných sacharidů a v experimentu ČIROK VII poměr hmotnosti sušiny podzemní a nadzemní části.

V obou experimentech se v podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku listu lišila od kontroly pouze varianta vystavená kombinovanému stresu (viz Graf č. 35 a 36). V případě vzorku stonku se v experimentu ČIROK VII lišila od kontroly opět pouze varianta vystavená kombinovanému stresu (viz Graf č. 35), v experimentu ČIROK XV se od kontroly odlišovaly obě varianty vystavené nočnímu chladu (viz Graf č. 36). V experimentu ČIROK VII byl dále stanoven poměr hmotnosti sušiny podzemní a nadzemní části. U varianty „P“ byla patrná mírná tendence ke zvýšení R/S proti kontrole u variant „CH“ a „P+CH“ byla tato tendence výraznější.



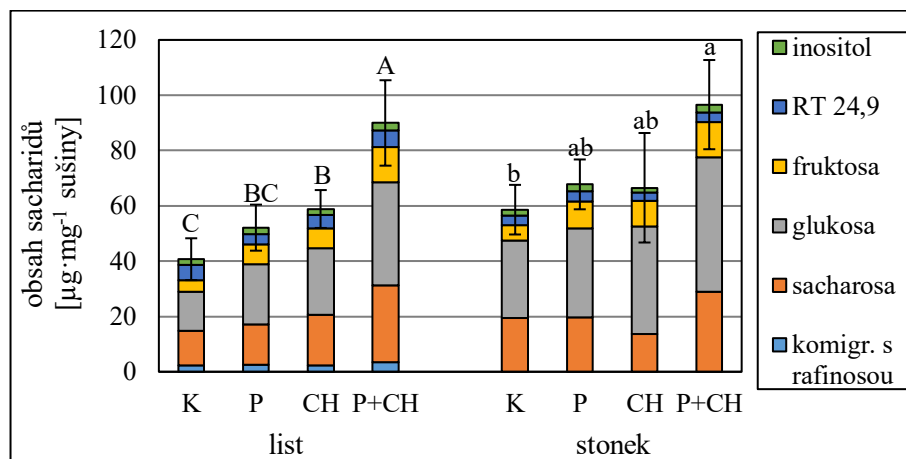
**Graf č. 52: Vliv osmotického stresu, nočního chladu a jejich kombinace na podíl hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku listů a stonků rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK VII.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **K:** MS médium, **P:** MS médium + 7,5% PEG, **CH:** MS médium + působení nočního chladu 10 °C tři po sobě následující noci, **P+CH:** MS médium + 7,5 % PEG + působení nočního chladu 10 °C tři po sobě následující noci. Chlad byl aplikován na 6 dní staré rostliny přenesené 3 dny po výsevu na MS médium (var. K, CH) nebo MS médium s PEG (var. P, P+CH). Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA; n = 6.



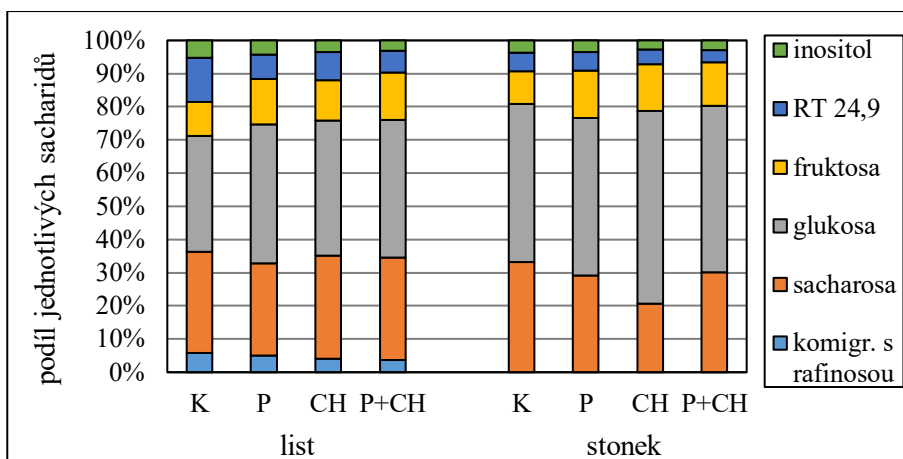
**Graf č. 53: Vliv osmotického stresu, nočního chladu a jejich kombinace na podíl hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku listů a stonků rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK XV.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **K:** MS médium, **P:** MS médium + 7,5% PEG, **CH:** MS médium + působení nočního chladu 10 °C tři po sobě následující noci, **P+CH:** MS médium + 7,5 % PEG + působení nočního chladu 10 °C tři po sobě následující noci. Chlad byl aplikován na 6 dní staré rostliny přenesené 3 dny po výsevu na MS médium (var. K, CH) nebo MS médium s PEG (var. P, P+CH). Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA; n = 3.

Celkový obsah rozpustných sacharidů v listech se proti kontrole statisticky významně zvýšil u rostlin vystavených kombinovanému stresu v obou experimentech (Grafy č. 54, 56).

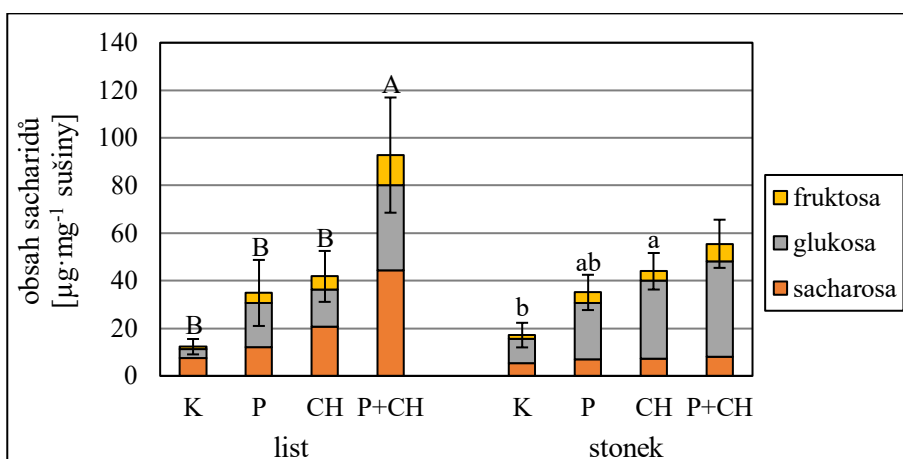
V experimentu ČIROK VII se v tomto parametru od kontroly statisticky významně odlišovaly ještě rostliny vystavené samotnému působení chladu (Graf č. 54). V obou experimentech byl celkový obsah rozpustných sacharidů v listech rostlin varianty „P+CH“ statisticky významně vyšší než obsah sacharidů v listech rostlin ostatních variant (Grafy č. 54, 56). Ve stonku stresovaných rostlin došlo též ke zvýšení celkového obsahu rozpustných sacharidů proti kontrole, a to u varianty „P+CH“ v experimentu ČIROK VII a „CH“ v experimentu ČIROK XV (Grafy č. 54, 56). V obou experimentech je proti kontrolním rostlinám patrný trend ke zvýšení poměru glukosy vůči sacharose ve stoncích rostlin varianty „CH“ (Grafy č. 55, 57). Dále je v listech rostlin vystavených kombinovanému stresu proti kontrole patrný mírný trend ke zvýšení podílu glukosy a fruktosy na celkovém obsahu rozpustných sacharidů, který je kompenzován snížením podílu sacharidu „RT 24,9“ (experiment ČIROK VII, Graf č. 55) nebo sacharosy (experiment ČIROK X, Graf č. 57).



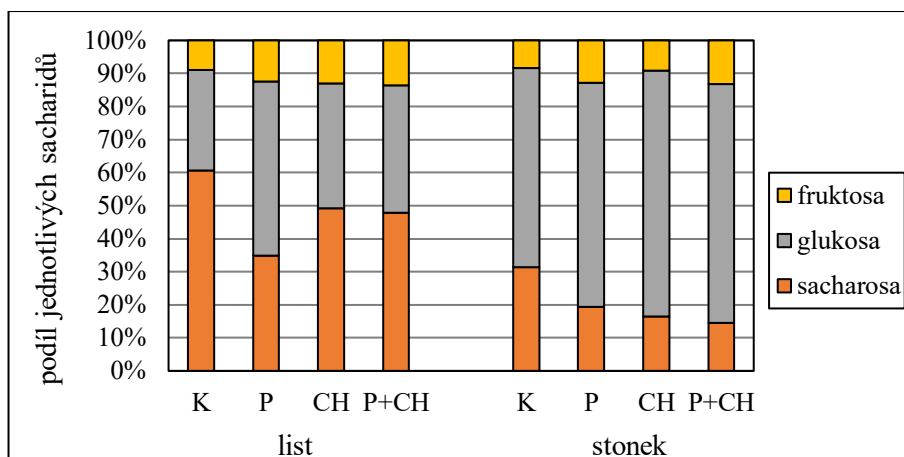
**Graf č. 54: Vliv osmotického stresu, nočního chladu a jejich kombinace na obsah rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK VII.** Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **K:** MS médium, **P:** MS médium + 7,5% PEG, **CH:** MS médium + působení nočního chladu 10 °C tři po sobě následující noci, **P+CH:** MS médium + 7,5 % PEG + působení nočního chladu 10 °C tři po sobě následující noci. Chlad byl aplikován na 6 dní staré rostliny přenesené 3 dny po výsevu na MS médium (var. K, CH) nebo MS médium s PEG (var. P, P+CH). Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu rozpustných sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v celkovém obsahu rozpustných sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA; n = 6.



**Graf č. 55:** Vliv osmotického stresu, nočního chladu a jejich kombinace na podíl jednotlivých rozpustných sacharidů na celkovém obsahu rozpustných sacharidů v listech a stonku genotypu rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK VII. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **K**: MS médium, **P**: MS médium + 7,5% PEG, **CH**: MS médium + působení nočního chladu 10 °C tři po sobě následující noci, **P+CH**: MS médium + 7,5 % PEG + působení nočního chladu 10 °C tři po sobě následující noci. Chlad byl aplikován na 6 dní staré rostliny přenesené 3 dny po výsevu na MS médium (var. K, CH) nebo MS médium s PEG (var. P, P+CH). n = 6.



**Graf č. 56:** Vliv osmotického stresu, nočního chladu a jejich kombinace na obsah rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK XV. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: **K**: MS médium, **P**: MS médium + 7,5% PEG, **CH**: MS médium + působení nočního chladu 10 °C tři po sobě následující noci, **P+CH**: MS médium + 7,5 % PEG + působení nočního chladu 10 °C tři po sobě následující noci. Chlad byl aplikován na 6 dní staré rostliny přenesené 3 dny po výsevu na MS médium (var. K, CH) nebo MS médium s PEG (var. P, P+CH). Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku celkového obsahu rozpustných sacharidů. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v celkovém obsahu rozpustných sacharidů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; One-Way ANOVA; n = 3, varianta „stonek P+CH“ n = 2.



**Graf č. 57: Vliv osmotického stresu, nočního chladu a jejich kombinace na podíl jednotlivých rozpustných sacharidů na celkovém obsahu rozpustných sacharidů v listech a stonku genotypu rostlin čiroku. Genotyp „Ruzrok“, experiment ČIROK XV. Jednotlivé varianty ošetření rostlin: K: MS médium, P: MS médium + 7,5% PEG, CH: MS médium + působení nočního chladu 10 °C tři po sobě následující noci, P+CH: MS médium + 7,5 % PEG + působení nočního chladu 10 °C tři po sobě následující noci. Chlad byl aplikován na 6 dní staré rostliny přenesené 3 dny po výsevu na MS médium (var. K, CH) nebo MS médium s PEG (var. P, P+CH). n = 6, varianta „stonek P+CH“ n = 2.**

## 5. Diskuse

Reakce čiroku na působení nízké teploty jsou po fyziologické stránce v současnosti poměrně málo prozkoumány, přičemž informace o reakcích na úrovni sacharidového metabolismu zcela chybí. Vědomostí o odpovědi čiroku na různé kombinace stresových faktorů je publikováno ještě méně. Tato diplomová práce popisuje reakci mladých rostlin čiroku na působení nízké teploty, nižší dostupnost vody a jejich kombinaci, se zaměřením na reakce na úrovni sacharidového metabolismu rostlin, které jsou dávány do souvislosti s dalšími vybranými fyziologickými charakteristikami. Dále je diskutován potenciál zjištěných reakcí na nízkou teplotu ve vztahu ke zvýšení odolnosti k následnému působení chladu.

V části experimentů byly rostliny pěstovány v klimatizovaných boxech v květináčích v substrátu. Tento způsob kultivace se v určitých ohledech blíží pěstování v přirozených podmínkách, a zároveň umožňuje odfiltrovat vliv náhodných jevů jako množství dopadajícího slunečního záření nebo úhrn srážek. Druhá část experimentů byla provedena na rostlinách kultivovaných v kontrolovaných podmínkách *in vitro*. Cílem těchto experimentů bylo potvrdit robustnost trendů zjištěných v nádobových experimentech s vyloučením faktorů jako variabilní složení půdy nebo přítomnost dalších organismů, které mohou reakci rostlin významně ovlivnit. Pro ověření obecnější platnosti zjištěných reakcí byly experimenty provedeny na dvou genotypech čiroku („Ruzrok“ a „01Z1800012“).

### 5. 1. Reakce čiroku na nižší dostupnost vody

Odpověď čiroku na nižší dostupnost vody byla zjišťována u mladých rostlin pěstovaných v podmínkách *in vitro* na tuhém MS médiu s přidaným PEG 4000. Tento způsob navození nižší dostupnosti vody byl zvolen vzhledem k nutnosti zajistit působení stejné úrovně stresu ve všech experimentech. Osmotický stres se u obou použitých genotypů projevil zvýšením podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku odebraného z rostliny. V případě této charakteristiky reagovaly oba genotypy srovnatelně, a to statisticky významným zvýšením podílu hmotnosti sušiny stonku ve všech provedených experimentech, zatímco v listech došlo ke statisticky průkaznému zvýšení tohoto parametru pouze v polovině provedených experimentů (ve druhé polovině experimentů byla ovšem patrná tendence ke zvýšení podílu hmotnosti sušiny, která nebyla statisticky významná díky velkému rozptylu hodnot). Z těchto výsledků je možné usuzovat, že zvolené genotypy čiroku se nijak výrazně

neliší ve strategii hospodaření s vodou. Toto zjištění je třeba brát v úvahu při interpretaci dalších výsledků, neboť jednotlivé genotypy široku se mezi sebou v rámci hospodaření s vodou za sucha mohou významně lišit. V předchozích studiích bylo zjištěno, že u genotypů označovaných jako anizohydrické dochází během působení sucha k výraznému snížení obsahu vody v rostlině, zatímco u genotypů izohydrických se obsah vody zásadně nemění (Mutava *et al.*, 2011; Ogbaga *et al.*, 2014; Qazi *et al.*, 2014; Sutka *et al.*, 2016; detailně shrnuto v kapitole 2. 2. 1. Sucho).

Jedním z cílů těchto experimentů bylo zjistit, zda mladé stresované rostliny zareagují na sníženou dostupnost vody akumulací kompatibilních solutů, jak již bylo u rostlin široku vystavených suchu popsáno dříve v literatuře (např. Chen *et al.*, 2015; Nxele *et al.*, 2016; Ogbaga *et al.*, 2014; Pavli *et al.*, 2013; Qazi *et al.*, 2014; Zegada-Lizarazu *et Monti*, 2013). Co se týká rozpustných sacharidů, tak v listech rostlin obou genotypů bylo ve většině experimentů zjištěno statisticky významné zvýšení celkového obsahu rozpustných sacharidů oproti kontrole. Jedinou výjimkou byl experiment ČIROK VII, kde byl zjištěn pouze trend ke zvýšení obsahu rozpustných sacharidů. Zde je ovšem třeba brát v úvahu, že působení osmotického stresu na rostliny v tomto experimentu bylo z technických důvodů o 1 den kratší než v případě ostatních experimentů (10 dnů), a rostliny tak měly méně času na akumulaci rozpustných sacharidů. Zjištěná akumulace rozpustných sacharidů v listech je v souladu s výsledky předchozích studií, podobný jev v listech široku popisují např. Chen *et al.* (2015), Ogbaga *et al.* (2014), Pavli *et al.* (2013) nebo Zegada-Lizarazu *et Luna* (2014). V případě stonku byl celkový obsah rozpustných sacharidů oproti kontrole statisticky významně vyšší jen v jednom experimentu provedeném na genotypu „Ruzrok“. V ostatních experimentech je u obou genotypů patrná pouze tendence ke zvýšení celkového obsahu rozpustných sacharidů ve stonku. Srovnání s již provedenými studiemi poněkud komplikuje fakt, že v mých experimentech byly využity velmi mladé rostliny, zatímco v ostatních studiích byl zjišťován stav rozpustných sacharidů ve stonku rostlin starších. Qazi *et al.* (2014) popisují zvýšení koncentrace rozpustných sacharidů ve šťávě získané ze stonku u většiny z testovaných genotypů vystavených suchu po dobu 20 dnů, přičemž uvádí, že u rostlin muselo docházet k akumulaci rozpustných sacharidů, protože pouhá ztráta vody k tak výraznému zvýšení koncentrace vést nemohla. Zegada-Lizarazu *et Monti* (2013) zjistili statisticky významné zvýšení celkového obsahu rozpustných sacharidů ve stonku pouze u rostlin v generativní fázi vystavených 40 dnům sucha, zatímco u mladších rostlin nebo po kratší době působení sucha (20 dnů) byla patrná pouze tendence ke zvýšení obsahu.

Zajímavou otázkou řešenou v mých experimentech bylo, zda se na stresové reakci rostlin čiroku bude významně podílet i jiný rozpustný sacharid než v dřívějších studiích popisovaná sacharosa, glukosa a fruktosa. Sledováním kompletního spektra rozpustných sacharidů u čiroku se v minulosti zabývala pouze jedna studie, ve které bylo zjištěno např. zvýšení obsahu trehalosy, lyxosy, rafinosy a dalších rozpustných sacharidů v listech rostlin čiroku (Pavli *et al.*, 2013). Vzhledem k použité metodice stanovení (citlivost detekce použitého systému) v mých experimentech nicméně nebyl detekován kromě sacharosy, glukosy a fruktosy další rozpustný sacharid, jehož obsah by se za stresu významně a opakovaně změnil. To je možné vysvětlit využitím odlišné metodiky rozdělení a detekce jednotlivých rozpustných sacharidů než ve studii provedené Pavli *et al.* (2013), kde byl obsah jednotlivých rozpustných sacharidů stanovován pomocí plynové chromatografie v kombinaci s hmotností spektrometrií (GC-MS). Podíl jednotlivých rozpustných sacharidů na celkovém obsahu rozpustných sacharidů ve stonku rostlin obou genotypů se nijak výrazně neměnil. V případě listů nebyla u rostlin genotypu „Ruzrok“ též patrná žádná výrazná změna, ovšem u genotypu „01Z1800012“ došlo ke zdvojnásobení podílu fruktózy na celkovém obsahu rozpustných sacharidů. Zdá se tedy, že reakce na úrovni jednotlivých rozpustných sacharidů může být specifická pro určitý genotyp. Tomu nasvědčují i výsledky Zegada-Lizarazu *et Luna* (2014), kteří v listech rostlin čiroku vystavených suchu zjistili proti kontrole zvýšený obsah sacharosy a glukosy, ale fruktosy nikoli.

Kromě rozpustných sacharidů byl zjišťován též obsah prolinu, dalšího významného kompatibilního solutu v listech rostlin. Ve většině dosud provedených prací bylo u rostlin čiroku stresovaných suchem zjištěno zvýšení obsahu prolinu (Nxele *et al.*, 2016; Ogbaga *et al.*, 2014; Reddy *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 1996), ale existuje i několik výjimek, kdy autoři žádnou změnu v obsahu prolinu nezaznamenali (Ogbaga *et al.*, 2014; Pavli *et al.*, 2013). V mých experimentech byly zjištěny poměrně velké rozdíly v obsahu prolinu v listech rostlin mezi jednotlivými experimenty. Nicméně ve všech experimentech je u obou genotypů patrná tendence ke zvýšení obsahu prolinu u stresovaných rostlin oproti kontrole. I když nelze zvýšení obsahu prolinu u stresovaných rostlin označit jako obecný trend pro všechny genotypy druhu *Sorghum bicolor*, je možné předpokládat, že alespoň u některých genotypů (včetně genotypů „Ruzrok“ a „01Z1800012“) se zvýšení obsahu prolinu účastní přizpůsobení rostliny na sníženou dostupnost vody.

Poněkud překvapivé je zjištění, že i přes zjištěné zvýšení obsahu osmoticky aktivních látek (rozpustných sacharidů a prolinu) v listech čiroku nedošlo u rostlin k významnému

snížení osmotického potenciálu listů. Osmotický potenciál byl stanovován ve dvou experimentech provedených na genotypu „Ruzrok“, přičemž v jednom se osmotický potenciálu stresovaných rostlin nelišil od kontroly, a ve druhém byla patrná mírná, statisticky nevýznamná tendence ke snížení osmotického potenciálu za stresu. Je možné, že v tomto případě byly rostliny ovlivněné pěstováním *in vitro* na standardním, na minerální látce bohatém kultivačním médiu s přidanou 3% sacharosou, což může rostlinám samo o sobě navodit určitou hladinu osmotického stresu. Podobně překvapivé výsledky ovšem zjistili ve své studii i Sutka *et al.* (2016), kteří ve stonku rostlin čiroku vystavených suchu zjistili významné snížení hodnoty vodního potenciálu oproti kontrole, ale osmotický potenciál zůstal nezměněn. Z toho autoři vyvozují, že se na snížení vodního potenciálu v tomto případě nepodílela akumulace kompatibilních solutů (Sutka *et al.*, 2016).

## 5. 2. Reakce čiroku na působení nízké teploty

Vliv působení nízkých teplot na rostliny čiroku byl zjišťován v nádobových experimentech, při kterých byly rostliny kultivovány v substrátu v klimatizovaných boxech. Celkem jsem provedl dva experimenty věnující se tomuto tématu (ČIROK II a ČIROK X), kterým předcházela pilotní studie (ČIROK I). V těchto experimentech byly rostliny vystavené působení nižších teplot sledovány po delší dobu. V experimentu ČIROK II bylo zjištěno zpomalení růstu a vývoje ošetřených rostlin ve srovnání s kontrolou o stejném stáří. Proto bylo v následujícím experimentu ČIROK X zvoleno srovnání s kontrolou o podobném vývojovém stáří stanoveném na základě výpočtu sumy efektivních teplot.

Ve většině odběrů provedených z rostlin vystavených určité době působení nízké teploty bylo zjištěno statisticky významné zvýšení podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku proti kontrole nebo alespoň tendence k jeho zvýšení. Tyto výsledky naznačují, že nižší teplota vede ke zhoršení schopnosti rostlin hospodařit s vodou. V souladu s tím je zjištění Bekele *et al.* (2014), kteří pozorovali vadnutí mladých rostlin čiroku vystavených chladu a Razmi *et al.* (2013), kteří u stresovaných rostlin popisují zvýšení poměru délky kořene vůči nadzemní části. Po ukončení stresu a pěstování rostlin při kontrolní teplotě (KT) došlo v experimentu ČIROK X k poměrně rychlému vyrovnání rozdílu mezi ošetřenými a kontrolními rostlinami. Data z experimentu ČIROK II pro toto období nelze využít ke srovnání z důvodu nízkého počtu opakování vzorků.

V literatuře zatím není dostupný žádný údaj, zda rostliny čiroku reagují na zhoršenou možnost hospodařit s vodou vyvolanou chladem (a na další složky stresového působení nízké teploty) zvýšením obsahu kompatibilních solutů v pletivech. Výsledky mých experimentů naznačují, že alespoň rozpustné sacharidy a prolin jsou za nízké teploty akumulovány. V experimentech ČIROK II a X došlo ke statisticky významnému zvýšení celkového obsahu rozpustných sacharidů v listech i stonku rostlin čiroku proti kontrole po působení otužovací teploty (VOT: 13 °C den / 10 °C noc). Tendence ke zvýšení obsahu rozpustných sacharidů v listech a stonku byla patrná i po působení podobné otužovací teploty (13 °C den / 10 °C noc) v případě experimentu ČIROK I. U rostlin vystavených působení nižší teploty (NOT: 9 °C den / 6 °C noc nebo VST: 8 °C den / 5 °C noc) ovšem ke zvýšení obsahu rozpustných sacharidů v listech a stonku rostlin nedošlo. Zde je třeba brát v úvahu, že v případě experimentu ČIROK X byly rostliny působení VST vystaveny pouze 1 den a reakce se u nich po tak krátkém působení nemusela projevit. V průběhu experimentů byl nejvyšší obsah celkového obsahu rozpustných sacharidů v pletivech ošetřených rostlin zjištěn buď na konci periody při VOT nebo po 1 dni při VST (kterému předcházela kultivace při VOT). Během dalšího působení stresové teploty se obsah sacharidů u ošetřených rostlin snížil, 4. den při VST byl však stále statisticky významně vyšší než obsah sacharidů u kontroly. Po ukončení stresu, ve fázi zotavení, se obsah rozpustných sacharidů u ošetřených rostlin dále snižoval, a již po prvním dni pěstování při KT se ošetřené rostliny významně nelišily v celkovém obsahu rozpustných sacharidů od kontroly. Reakce rostlin vystavených chladu není na úrovni rozpustných sacharidů dostatečně prozkoumána ani u rostlin blízce příbuzných čiroku. Z výsledků studií provedených na kukuřici (Riva-Roveda *et al.*, 2016), cukrové třtině (Uehara *et al.*, 2009) a rýži (Zhao *et al.*, 2013) lze shrnout pouze to, že akumulace rozpustných sacharidů není obecně platným jevem při vystavení rostlin z této skupiny nízké teplotě, a že tento fenomén nejspíš záleží na řadě specifických faktorů (druh rostliny, genotyp, rostlinný orgán, míra stresu a doba jeho aplikace apod.).

Kromě celkového obsahu rozpustných sacharidů se měnil u ošetřených rostlin i podíl jednotlivých sacharidů na jejich celkovém obsahu. Ve stonku rostlin bylo 4. den při VOT, 1. den při VST a 4. den při VST zjištěno proti kontrole zvýšení poměru sacharosy ku fruktose. V listech ošetřených rostlin byla ve srovnání s kontrolou zjištěna tendence ke zvýšení poměru redukujících sacharidů vůči sacharose 4. den při VST a následující dny při KT.

Jak v reakcích na úrovni celkového obsahu sacharidů, tak v reakcích na úrovni změn zastoupení jednotlivých rozpustných sacharidů nebyl mezi odpovědí obou genotypů žádný

rozdíl. Obecnou platnost zjištěného trendu akumulace rozpustných sacharidů u rostlin široku vystavených chladu mohou podporovat i výsledky experimentů ČIROK VII a XV, ve kterých byla u rostlin pěstovaných v podmínkách *in vitro* po třídenním působení nočního chladu v listech i stoncích patrná tendence ke zvýšení celkového obsahu rozpustných sacharidů, která byla v polovině experimentů statisticky významná.

Podobně jako u rostlin vystavených osmotickému stresu vyvolanému pomocí PEG i v případě vystavení nízké teplotě došlo u rostlin pěstovaných v substrátu ke zvýšení obsahu prolinu v listech. V porovnání s celkovým obsahem rozpustných sacharidů dosáhl obsah prolinu v listech stresovaných rostlin maxima později. V případě genotypu „Ruzrok“ to bylo 1. den při KT po ukončení stresu, v případě genotypu „01Z1800012“ o den dříve. 4. den po ukončení stresu a pěstování při KT již došlo k poklesu obsahu prolinu, stále však byl vyšší než u kontrolních rostlin. Zde je opět patrný rozdíl proti časovému průběhu změn celkového obsahu rozpustných sacharidů v listech ošetřených rostlin, který byl 4 dny po ukončení stresu již téměř shodný s obsahem sacharidů v listech kontroly. Ani u rostlin blízkce příbuzných široku se mi nepodařilo dohledat dostatek prací zabývajících se změnou obsahu prolinu při vystavení chladu. Z důvodu naprosto rozdílných experimentálních uspořádání nelze z prací provedených na kukuřici (Chen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2014), cukrové třtině (Jain *et al.*, 2007) a rýži (Hussain *et al.*, 2016) vyvodit žádné obecné závěry.

V experimentu ČIROK X byla dále stanovována hodnota osmotického potenciálu pletiv listu. Na rozdíl od výsledků experimentů s PEG popsaných výše došlo současně se zvýšením obsahu osmoticky aktivních látek u ošetřených rostlin v experimentu ČIROK X ke statisticky významnému snížení hodnoty tohoto parametru proti kontrole. Hodnota osmotického potenciálu byla u ošetřených rostlin obou genotypů statisticky významně nižší proti kontrole od 4. dne pěstování při VOT až do 4. dne po ukončení stresu (genotyp „Ruzrok“) nebo do 1. dne po ukončení stresu (genotyp „01Z1800012“). 4. den po ukončení stresu již ovšem bylo u ošetřených rostlin obou genotypů patrné zvýšení tohoto parametru proti předchozím dnům. Hodnota osmotického potenciálu pletiv listu se ve srovnání s kontrolou statisticky významně snížila i u rostlin genotypu „Ruzrok“ vystavených 1 dnu působení VST, do které byly rostliny přeneseny rovnou k KT. U druhého genotypu byla v tomto případě patrná tendence ke snížení tohoto parametru, avšak kvůli malému množství vzorků nebylo možné provést statistické srovnání.

Působení nižší teploty vedlo u ošetřených rostlin ke zpomalení růstu a vývoje, které je dokumentováno statisticky významným snížením velikosti listové plochy (kromě rostlin genotypu „Ruzrok“ 4. den při VOT, kde je patrná pouze statisticky nevýznamná tendence ke snížení velikosti listové plochy) proti kontrole. Rozdíl ve velikosti listové plochy mezi ošetřenými rostlinami a kontrolou se v průběhu experimentu zvyšoval. Na konci experimentu se ošetřené a kontrolní rostliny lišily i v počtu vyvinutých listů, v případě ošetřených rostlin to byly 3 plně vyvinuté listy, zatímco v případě kontroly 4. Zpomalení růstu a vývoje bylo u mladých rostlin čiroku vystavených chladu zjištěno i v předchozích studiích (Maulana *et Tesso*, 2013; Razmi *et al.*, 2013, Zegada-Lizarazu *et al.*, 2016).

Výše popisované experimenty potvrzují, že i v případě stresového působení nízké teploty reagují rostliny čiroku zvýšením obsahu kompatibilních solutů. Akumulace rozpustných sacharidů je ovšem závislá na míře stresu (po přenesení rostlin do VOT k akumulaci docházelo, po přenesení do NOT ne). V případě prolinu nebylo zjišťováno, zda dochází k jeho akumulaci i po přenesení z KT přímo do NOT. Nicméně tendence ke zvýšení jeho obsahu zjištěná 1 den po přenesení rostlin z KT do VST naznačuje, že obsah prolinu v listech rostlin by se mohl zvyšovat i po vystavení teplotám nižším než VOT. Zajímavé je zjištění, že rostliny udržují zvýšený obsah prolinu v listech po ukončení stresu déle než zvýšený obsah sacharidů. Prolin by tudíž mohl hrát významnou roli ve zvýšení efektivity reakce rostlin čiroku na působení následujícího stresu i v případě delšího časového úseku mezi jednotlivými stresovými působeními.

### **5. 3. Reakce čiroku na kombinovaný stres**

Cílem experimentů bylo zjistit reakci mladých rostlin čiroku na krátkodobé působení snížené teploty v kombinaci se sníženou dostupností vody. Žádná podobná studie, která by se zabývala vlivem kombinace sucha a chladu na rostliny čiroku, dosud nebyla publikována. Odpověď na kombinovaný stres byla zjišťována po třech dnech působení nočního chladu (teplota snížena na 10 °C po dobu 3 za sebou následujících temných period) na rostliny čiroku genotypu „Ruzrok“ pěstované v podmínkách *in vitro* na standardním MS médiu s 3% sacharosou nebo MS médiu s 3% sacharosou a 7,5% PEG 4000.

V obou opakováních tohoto experimentu došlo u rostlin čiroku vystavených kombinovanému stresu ke statisticky významnému zvýšení podílu hmotnosti sušiny na celkové hmotnosti vzorku listů a stonků proti kontrole. V případě samostatných stresových ošetření

došlo ke statisticky významnému zvýšení tohoto parametru proti kontrole pouze v jednom experimentu ve stonku rostlin vystavených nočnímu chladu. Zdá se, že v tomto případě je snížená dostupnost vody způsobená PEG dále umocněna zhoršenou schopností rostlin hospodařit s vodou při nízké teplotě (viz výše).

Hlavní otázkou těchto experimentů bylo, zda stejně jako v případě působení samostatných stresových faktorů zareagují rostliny vystavené kombinovanému stresu změnou na úrovni rozpustných sacharidů, a jestli se případná změna bude lišit od reakcí na působení jednotlivých stresových faktorů aplikovaných samostatně. V obou experimentech došlo u rostlin vystavených kombinovanému stresu ke zvýšení celkového obsahu rozpustných sacharidů v listech i stonku proti kontrole, které bylo statisticky významné (kromě varianty ve stonku rostlin v experimentu ČIROK XV, kde nebylo kvůli nízkému množství vzorků možné provést statistické srovnání). V případě listů byla hodnota tohoto parametru statisticky významně vyšší dokonce i ve srovnání s rostlinami vystavenými buď nižší dostupnosti vody nebo nočnímu chladu samostatně. V listech rostlin vystavených kombinovanému stresu je proti kontrole patrná mírná tendence ke zvýšení podílu glukosy a fruktosy na celkovém obsahu rozpustných sacharidů, která je kompenzovaná snížením podílu látky „RT 24,9“ (experiment ČIROK VII) nebo sacharosy (experiment ČIROK X). Vzhledem k velmi výrazné reakci rostlin na úrovni obsahu rozpustných sacharidů lze uzavřít, že rozpustné sacharidy nejspíš hrají podstatnou roli v reakci rostlin čiroku na působení kombinovaného stresu.

V literatuře se mi nepodařilo dohledat studii, která by se zabývala vlivem kombinovaného stresu sucha a nízké teploty na sacharidový metabolismus rostlin blíže příbuzných čiroku. Z rostlin fylogeneticky vzdálenějších čiroku byla tato problematika studována např. na rostlinách pistácie (Sperling *et al.*, 2017) nebo zelí (Sasaki *et al.*, 1998). Ve studii provedené na pistácii (*Pistacia*) autoři zjistili, že rostliny vystavené působení sucha snášely lépe případné působení mrazu než rostliny pravidelně zalévané. Tuto odolnost autoři připisují zvýšenému obsahu rozpustných sacharidů a prolinu ve stonku rostlin vystavených suchu. Zajímavé je též zjištění, že stejně jako v případě mých experimentů, vystavení rostlin kombinovanému stresu vyvolalo statisticky významné zvýšení obsahu rozpustných sacharidů i proti variantě vystavené samotnému působení sucha (Sperling *et al.*, 2017). Podobné výsledky byly zjištěny ve studii provedené na rostlinách zelí (*Brassica oleracea*), kde u rostlin vystavených kombinaci sucha a nízké teploty došlo v listech ke zvýšení obsahu rozpustných sacharidů ve srovnání se zalévanými rostlinami vystavenými působení nízké teploty. To se dle

autorů podílelo na vyšší odolnosti těchto rostlin proti rostlinám pravidelně zalévaným (Sasaki *et al.*, 1998).

## 6. Závěry

- ✓ Akumulace rozpustných sacharidů a pravděpodobně i prolinu je součástí reakce rostlin čiroku na sníženou dostupnost vody i na působení nízké teploty.
- ✓ Rostliny čiroku reagují v listech na kombinaci snížené dostupnosti vody a nočního chladu dalším statisticky významným zvýšením celkového obsahu rozpustných sacharidů.
- ✓ Při vystavení rostlin čiroku příliš nízké teplotě k akumulaci rozpustných sacharidů nedochází.
- ✓ Otuzování rostlin nižší úrovní chladového stresu vede na úrovni akumulace sacharidů k plnému rozvinutí stresové odpovědi charakteristické pro individuální stres.
- ✓ Po ukončení působení nízké teploty se ve fázi zotavení obsah rozpustných sacharidů v listech rostlin čiroku snižuje rychleji než obsah prolinu.
- ✓ Rostliny genotypu „Ruzrok“ a „01Z1800012“ reagovaly na působení osmotického stresu nebo chladu podobně. U žádného z genotypů nebyla zjištěna reakce, která by indikovala vyšší odolnost nebo odlišný mechanismus stresové odpovědi.

## 7. Seznam literatury

- Aroca R., Porcel R., Ruiz-Lozano J. M. (2011) Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 63: 43–57
- Ashraf M. (2009) Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnology Advances* 28: 169-183
- Beck E. H., Fettig S., Knake C., Hartig K., Bhattarai T. (2007) Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences* 32: 501-510
- Bekele W. A., Fiedler K., Shiringani A., Schnaubelt D., Windpassinger S., Uptmoor R., Friedt W., Snowdon R. J. (2014) Unravelling the genetic complexity of sorghum seedling development under low-temperature conditions. *Plant, Cell and Environment* 37: 707-723
- Bilgin D. D., Aldea M., O'Neil B. F., Benitez M., Li M., Clough S. J., DeLucia E. H. (2008) Elevated ozone alters soybean-virus interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1297-1308
- Borrell A. K., Mullet J. E., George-Jaeggli B., van Oosterom E. J., Hammer G. L., Klein P. E., Jordan D. R. (2014) Drought adaptation of stay-green sorghum is associated with canopy development, leaf anatomy, root growth, and water uptake. *Journal of Experimental Botany* 65: 6251-6263
- BOTANY.cz: SORGHUM BICOLOR (L.) Moench – širok obecný. BOTANY.cz - Zajímavosti ze světa rostlin [online]. © www.botany.cz [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/sorghum-bicolor/>
- Bowler Ch., Fluhr R. (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends In Plant Science* 5: 241-246
- Dalal M., Kumar G. S., Mayandi K. (2013) Identification and expression analysis of group 3 LEA family genes in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 979-984
- del Rio L. A. (2015) ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany* 65: 2827-2837
- Dugas D. V., Monaco M. K., Olson A., Klein R. R., Kumari S., Ware D., Klein P. E. (2011) Functional annotation of the transcriptome of *Sorghum bicolor* in response to osmotic stress and abscisic acid. *BMC Genomics* 12: 514
- Escalante-Sandoval C., Nunez-Garcia P. (2017) Meteorological drought features in northern and northwestern parts of Mexico under different climate changes scenarios. *Journal of arid land* 9: 65-75
- FAO (2017): FAOSTAT. FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. [online]. © FAO 2017 [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Fauchereau N., Trzaska S., Rouault M., Richard Y. (2003) Rainfall Variability and Changes in Southern Africa during the 20th Century in the Global Warming Context. *Natural Hazards* 29: 139–154
- Fiedler K., Bekele W. A., Matschegewski A., Snowdon R., Wieckhorst S., Zacharias A., Uptmoor R. (2016) Cold tolerance during juvenile development in sorghum: a comparative analysis by genome-wide association and linkage mapping. *Plant Breeding* 135: 598–606
- Gill P. K., Sharma A. D., Singh P., Bhullar S. S. (2003) Changes in germination, growth and soluble sugar contents of *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds under various abiotic stresses. *Plant Growth Regulation* 40: 157-162
- Hammer G. L. (2006) Pathways to Prosperity: Breaking the Yield Barrier in Sorghum. *Agricultural Science* 19: 16-22

Hermuth J., Janovská D., Stehno Z., Prohasková A. KVALITATIVNÍ HODNOCENÍ ČIROKU PRO BIOMASU. In: NOVÉ POZNATKY Z GENETIKY A ŠLACHTENIA POĽNOHOSPODÁRSKÝCH RASTLÍN. Piešťany, 8. – 9. 11. 2011. 1. vydání: 113-115. ISBN 978-80-89417-29-2

Hermuth J., Kosová K. (2017) Characterization of the First Czech Sorghum Variety Ruzrok Tested in the Czech Republic. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 53: 37-44

Hilker M., Schwachtje J., Baier M., Balazadeh S., Bäurle I., Geiselhardt S., Hinch D. K., Kunze R., Mueller-Roeber B., Rillig M. C., Rolff J., Romeis T., Schmölling T., Steppuhn A., van Dongen J., Whitcomb S., J., Wurst S., Zuther E., Kopka J. (2016) Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biological reviews* 91: 1118-1133

Hinge P., Kale A., Pawar B., Jadhav A., Chimote V., Gadakh S. (2015) Effect of PEG induced water stress on chlorophyll content, membrane injury index, osmoprotectants and antioxidant enzymes activities in sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Maydica* 60

Hu Ch-A. A., Delauney A. J., Verma D. P. S. (1992) A bifunctional enzyme ( $\delta$ -1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National academy of sciences of the United states of America* 89: 9354-9358

Hussain S., Khan F., Hussain H. A., Nie L. (2016) Physiological and Biochemical Mechanisms of Seed Priming-Induced Chilling Tolerance in Rice Cultivars. *Frontiers in Plant Science* 7: 116

Chen D., Wang S., Xiong B., Cao B., Deng X. (2015) Carbon/Nitrogen Imbalance Associated with Drought-Induced Leaf Senescence in *Sorghum bicolor*. *PLoS ONE* 10: e0137026

Chen W. P., Li P. H. (2002) Membrane stabilization by abscisic acid under cold aids proline in alleviating chilling injury in maize (*Zea mays* L.) cultured cells. *Plant, Cell and Environment* 25: 955-962

Chen X., Song F., Liu F., Tian Ch., Liu S., Xu H., Zhu X. (2014) Effect of Different Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth and Physiology of Maize at Ambient and Low Temperature Regimes. *Scientific World Journal* 956141

Chopra R., Burow G., Hayes Ch., Emendack Y., Xin Z., Burke J. (2015) Transcriptome profiling and validation of gene based single nucleotide polymorphisms (SNPs) in sorghum genotypes with contrasting responses to cold stress. *BMC Genomics* 16:1040

Jain R., Shrivastava A. K., Solomon S., Yadav R. L. (2007) Low temperature stress-induced biochemical changes affect stubble bud sprouting in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). *Plant Growth Regulation* 53: 17-23

Jaskiewicz M., Conrath U., Peterhänsel Ch. (2010) Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Reports* 12: 50-55

Johnson S. M., Lim F.-L., Finkler A., Fromm H., Slabas A. R., Knight M. R. (2014) Transcriptomic analysis of *Sorghum bicolor* responding to combined heat and drought stress. *BMC Genomics* 15: 456

Kofroňová, M. 2013. Vliv těžkých kovů na sacharidový metabolismus rostlin (diplomová práce), Univerzita Karlova v Praze. 114 stran.

Kosambo-Ayoo L. M., Bader M., Loerz H., Becker D. (2011) Transgenic sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) developed by transformation with chitinase and chitosanase genes from *Trichoderma harzianum* expresses tolerance to anthracnose. *African Journal of Biotechnology* 10: 3659-3670

Lastdrager J., Hanson J., Smeekens S. (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* 65: 799-807

Laštůvka Z. 1967. Metoda vodních kultur vyšších rostlin. In Minár J: Univerzita J. E. Purkyne v Brne, Brno, 83s.

- Lu G., Wu H., Xiao H., He H., Wu Z. (2016) Impact of Climate Change on Drought in the Upstream Yangtze River Region. *Water* 8: 576
- Maheswari M., Varalaxmi Y., Vijayalakshmi A., Yadav S. K., Sharmila P., Venkateswarlu B., Vanaja M., Pardha Saradhi P. (2010) Metabolic engineering using mtID gene enhances tolerance to water deficit and salinity in sorghum. *Biologia Plantarum* 54: 647-652
- Machado S., Paulsen G. M. (2001) Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum. *Plant and Soil* 233: 179-187
- \*Maiti R. K. (1996) *Sorghum Science*. Science Publishers Inc., Lebanon, New Hampshire, USA
- Matros A., Peshev D., Peukert M., Mock H.-P., Van den Ende W. (2015) Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in Arabidopsis. *The Plant Journal* 82: 822-839
- Maulana F., Tesso T. T. (2013) Cold Temperature Episode at Seedling and Flowering Stages Reduces Growth and Yield Components in Sorghum. *Crop Science* 53: 564-574
- Mitler R. (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends In Plant Science* 11: 15-19
- Munne-Bosch S., Alegre L. (2004) Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* 31: 203-216
- Mutava R. N., Prasad P. V. V., Tuinstra M. R., Kofoid K. D., Yu J. (2011) Characterization of sorghum genotypes for traits related to drought tolerance. *Field Crops Research* 123: 10-18
- Nishizawa A., Yabuta Y., Shigeoka S. (2008) Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. *Plant Physiology* 147: 1251-1263
- Nxele X., Klein A., Ndimba B. K. (2016) Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *South African Journal of Botany* 108: 261-266
- Ogbaga Ch. C., Stepien P., Johnson G. N. (2014) Sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties adopt strongly contrasting strategies in response to drought. *Physiologia Plantarum* 152: 389-401
- Orvar B. L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R. S. (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant Journal* 23: 785-794
- Paiva C. L., Queiroz V. A. V., Simeone M. L. F., Schaffert R. E., Oliveira A. C., Silva C. S. (2016) Mineral content of sorghum genotypes and the influence of water stress. *Food Chemistry* 214: 400-405
- Pasini L., Bergonti M., Fracasso A., Marocco A., Amaducci S. (2013) Microarray analysis of differentially expressed mRNAs and miRNAs in young leaves of sorghum under dry-down conditions. *Journal of Plant Physiology* 171: 537-548
- Paterson A. H., Bowers J. E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H., Haberer G., Hellsten U., Mitros T., Poliakov A., Schmutz J., Spannagl M., Tang H. B., Wang X. Y., Wicker T., Bharti A. K., Chapman J., Feltus F. A., Gowik U., Grigoriev I. V., Lyons E., Maher C. A., Martis M., Narechania A., Ollillar R. P., Penning B. W., Salamov A. A., Wang Y., Zhang L. F., Carpita N. C., Freeling M., Gingle A. R., Hash C. T., Keller B., Klein P., Kresovich S., McCann M. C., Ming R., Peterson D. G., Mehboob-ur-Rahman, Ware D., Westhoff P., Mayer K. F. X., Messing J., Rokhsar D. S. (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457: 551-556
- Paterson A. H., Bowers J. E., Chapman B. A. (2004) Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 9903-9908

- Pavli O. I., Vlachos Ch. E., Kalloniati Ch., Flemetakis E., Skaracis G. N. (2013) Metabolite profiling reveals the effect of drought on sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) metabolism. *Plant Omics Journal* 6: 371-376
- Peshev D., Vergauwen R., Moglia A., Hideg E., Van den Ende W. (2013) Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *Journal Of Experimental Botany* 64: 1025-1038
- Potgieter A. B., Lobell D. B., Hammer G. L., Jordan D. R., Davis P., Brider J. (2016) Yield trends under varying environmental conditions for sorghum and wheat across Australia. *Agricultural And Forest Meteorology* 228: 276-285
- Prasad P. V. V., Boote K. J., Allen Jr H. (2006) Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain-sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. *Agricultural and Forest Meteorology* 139: 237-251
- Qazi H. A., Rao P. S., Kashikar A., Suprasanna P., Bhargava S. (2014) Alterations in stem sugar content and metabolism in sorghum genotypes subjected to drought stress. *Functional Plant Biology* 41: 954-962
- Razmi Z., Hamidi R., Pirasteh-Anosheh H. (2013) Seed germination and seedling growth of three sorghum (*Sorghum bicolor* L.) genotypes as affected by low temperatures. *International Journal of Farming and Allied Sciences* 2: 851-856
- Reddy P. S., Jogeswar G., Rasineni G. K., Maheswari M., Reddy A. R., Varshney R. K., Kishor P. B. K. (2015) Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Plant Physiology and Biochemistry* 94: 104-113
- Riva-Roveda L., Escale B., Giauffret C., Périlleux C. (2016) Maize plants can enter a standby mode to cope with chilling stress. *BMC Plant Biology* 16: 212
- Rizhsky L., Liang H., Mittler R. (2002) The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiology* 130: 1143-1151
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler R. (2004) When Defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134: 1683-1696
- Saneoka H., Ogata S. (1987) Relationship between Water use Efficiency and Cuticular Wax Deposition in Warm Season Forage Crops Grown under Water Deficit Conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 33:3: 439-448
- Sani E., Herzyk P., Perrella G., Colot V., Amtmann A. (2013) Hyperosmotic priming of Arabidopsis seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome. *Genome Biology* 14: R59
- Sankarapandian R., Adilakshmi S., Sharma V., Ganesamurthy K., Talwar H. S., Patil J. V. (2012) Effect of morpho-physiological traits on grain yield of sorghum grown under stress at different growth stages, and stability analysis. *Journal of Agricultural Science* 151: 630-647
- Sasaki H., Ichimura K., Okada K., Oda M. (1998) Freezing tolerance and soluble sugar contents affected by water stress during cold-acclimation and de-acclimation in cabbage seedlings. *Scientia Horticulturae* 76: 161-169
- Sharma Y. K., Léon J., Raskin I., Davis K. R. (1996) Ozone-induced responses in Arabidopsis thaliana: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 93: 5099-5104

- Schittenhelm S., Schroetter S. (2013) Comparison of Drought Tolerance of Maize, Sweet Sorghum and Sorghum-Sudangrass Hybrids. *Journal Of Agronomy And Crop Science* 200: 46-53
- Singh F., Rai K. N., Reddy B., V.S., Diwakar B. (1997) Development of cultivars and seed production techniques in sorghum and pearl millet. Training manual. Training and Fellowships Program and Genetic Enhancement Division, ICRISAT Asia Center, India. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics: 118 (Semi-formal publication)
- Sperling O., Secchi F., Godfrey J., Zwieniecki M. A. (2017) Acclimation of *Pistacia integerrima* trees to frost in semi-arid environments depends on autumn's drought. *Planta* 245: 671-679
- Staggenborg S. A., Dhuyvetter K. C., Gordon W. B. (2008) Grain Sorghum and Corn Comparisons: Yield, Economic, and Environmental Responses. *Agronomy Journal* 100: 1600-1605
- Su M., Li X-F., Ma X-Y., Peng X-J., Zhao A-G., Cheng L-Q., Chen S-Y., Liu G-S. (2011) Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. *Plant Science* 181: 652-659
- Sundar D., Perianayaguy B., Reddy A. R. (2004) Localization of antioxidant enzymes in the cellular compartments of sorghum leaves. *Plant Growth Regulation* 44: 157-163
- Sutka M. R., Manzur M. E., Vitali V. A., Micheletto S., Amodeo G. (2016) Evidence for the involvement of hydraulic root or shoot adjustments as mechanisms underlying water deficit tolerance in two *Sorghum bicolor* genotypes. *Journal of Plant Physiology* 192: 13-20
- Tester M., Davenport R. (2003) Na<sup>+</sup> Tolerance and Na<sup>+</sup> Transport in Higher Plants. *Annals of Botany* 91: 503-527
- Tovignan T. K., Fonceka D., Ndoye I., Cisse N., Luquet D. (2016) The sowing date and post-flowering water status affect the sugar and grain production of photoperiodic, sweet sorghum through the regulation of sink size and leaf area dynamics. *Field Crops Research* 192: 67-77
- Uehara N., Sasaki H., Aoki N., Ohsugi R. (2009) Effects of the Temperature Lowered in the Daytime and Night-time on Sugar Accumulation in Sugarcane. *Plant Production Science* 12: 420-427
- Visarada K. B. R. S., Padmaja P. G., Saikishore N., Pashupatinath E., Royer M., Seetharama N., Patil J. V. (2014) Production and evaluation of transgenic sorghum for resistance to stem borer. *In Vitro Cellular & Developmental biology-Plant* 50: 176-189
- Wang T-T., Ren Z-J., Liu Z-Q., Feng X., Guo R-Q., Li B-G., Li L-G., Jing H-Ch. (2014) SbHKT1;4, a member of the high-affinity potassium transporter gene family from *Sorghum bicolor*, functions to maintain optimal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> balance under Na<sup>+</sup> stress. *Journal of Integrative Plant Biology* 56: 315-332
- Wood A. J., Saneoka H., Rhodes D., Joly R. J., Goldsbrough P. B. (1996) Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum - Molecular cloning and expression of two related genes. *Plant Physiology* 110: 1301-1308
- Wood J., Goldsbrough P. B. (1997) Characterization and expression of dehydrins in water-stressed *Sorghum bicolor*. *Physiologia Plantarum* 99: 144-152
- Yi B., Zhou Y., Gao M., Zhang Z., Han Y., Yang G., Xu W., Huang R. (2014) Effect of Drought Stress During Flowering Stage on Starch Accumulation and Starch Synthesis Enzymes in Sorghum Grains. *Journal of Integrative Agriculture* 13: 2399-2406
- Yin L., Wang S., Li J., Tanaka K., Oka M. (2013) Application of silicon improves salt tolerance through ameliorating osmotic and ionic stresses in the seedling of *Sorghum bicolor*. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 3099-3107

- Zandalinas S., Rivero R. M., Martínez V., Gómez-Cadenas A., Arbona V. (2016) Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration modulated by a reduction in abscisic acid levels. *BMC Plant Biology* 16: 105
- Zegada-Lizarazu W., Luna D. F., Monti A. (2015) Photosynthetic acclimation of sweet sorghum under progressive water stress. *Industrial Crops And Products* 66: 216-219
- Zegada-Lizarazu W., Luna D. F., Monti A. (2016) Differential characteristics of photochemical acclimation to cold in two contrasting sweet sorghum hybrids. *Physiologia Plantarum* 157: 479–489
- Zegada-Lizarazu W., Monti A. (2013) Photosynthetic response of sweet sorghum to drought and re-watering at different growth stages. *Physiologia Plantarum* 149: 56-66
- Zhang J., Kirkham M. B. (1996) Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist* 132: 361-373
- Zhao X., Wang W., Zhang F., Zhang T., Zhao W., Fu B., Li Z. (2013) Temporal profiling of primary metabolites under chilling stress and its association with seedling chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Rice* 6: 23
- Zhao Y., Lu Z., He L. (2014) Effects of Saline-Alkaline Stress on Seed Germination and Seedling Growth of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Appl Biochem Biotechnol* 173: 1680–1691