

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Experimentální biologie rostlin

Studijní obor: Fyziologie a anatomie rostlin



Bc. Barbora Skulníková

Adaptace rostlin rodu *Plantago* k podmínkám prostředí: role sacharidové bilance

Adaptation of *Plantago* plants to environmental conditions: the role of carbohydrate balance

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Konrádová, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla 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

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Haně Konrádové, Ph.D. a doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. za odborné rady, podporu, trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnovaly při psaní této práce. Chtěla bych poděkovat RNDr. Editě Tylové, Ph.D. za konzultace a rady týkající se anatomické části mé diplomové práce. Díky patří také všem členům laboratoře studia regulačních faktorů morfogeneze rostlin za přátelskou atmosféru, za jejich veškerou pomoc a zaučení v laboratoři.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za neutuchající podporu a trpělivost, nejen během psaní této práce, ale v průběhu celého studia.

Abstrakt

Sorbitol řadíme mezi lineární cukerné alkoholy, který spolu se sacharózou patří mezi primární fotosyntetické produkty u čeledi Plantaginaceae. Oba tyto sacharidy jsou také využívány pro alokaci fotosynteticky fixovaného uhlíku na dlouhou vzdálenost floémem. Mnoho druhů rostlin akumuluje cukerné alkoholy při stresu ze sucha nebo zasolení, čímž se zvyšuje jejich odolnost vůči danému stresu. Cílem diplomové práce bylo popsat vybrané metabolické a strukturní rozdíly se zaměřením na bilanci sacharózy a sorbitolu mezi dvěma druhy jitrocele, glykofytním *Plantago lanceolata* a halofytním *Plantago maritima* s odlišnými životními strategiemi. Rostliny byly pěstovány v hydroponii v nádobách Araponics. Předchozí výsledky týmu ukazují, že sorbitol je, ve srovnání se sacharózou, v listech jitrocele akumulován až do desetinásobných koncentrací, což je ještě prohloubeno působením stresu, například ze zasolení. Jiný poměr sacharózy a sorbitolu ale rostlina udržuje ve vodivých pletivech a jiný poměr těchto dvou hlavních fotoasimilátů se nachází i ve floému. Předkládaná práce vychází z předpokladu, že odolnost *P. maritima* souvisí s rozdílnou distribucí asimilátů po rostlině i jejich rozdělováním mezi metabolický, skladovací a transportní pool v rámci produkčního listu, což se projevuje i za nestresových podmínek. U obou druhů jitrocele jsem zjišťovala rozdíly v rychlosti růstu za standardních podmínek, sledovala a porovnávala přidělování sacharidů po rostlině s ohledem na celkové množství i podíly jednotlivých sacharidů ve spektru (analýza mladého listu, produkčního listu, kořenů, jímání exudátů produkčního listu a analýza vodivých pletiv). Dále jsem sledovala zastoupení rozpustných sacharidů a škrobu v denním rytmu v produkčním listu. Přestože nebyly pozorovány výrazné odlišnosti v rychlosti čisté fotosyntézy, druhy se lišily rychlostí růstu – glykofytní zástupce rostl rychleji než halofyt. Rozdíly byly také zjištěny v přidělování sacharidů jednotlivým orgánům, druh *P. maritima* akumuloval více rozpustných sacharidů (včetně sorbitolu) v listech než *P. lanceolata*, a druhy se lišily také v hospodaření se sacharidy v průběhu denního cyklu, kdy si rostliny *P. maritima* zachovávaly větší zásoby v podobě škrobu na konci temné periody.

Klíčová slova: *Plantago lanceolata*, *Plantago maritima*, sorbitol, růstové charakteristiky, sacharidová bilance, floémové exudáty, rychlost čisté fotosyntézy

Abstract

Sorbitol is a linear sugar alcohol which is, together with sucrose, the primary photosynthetic product in the Plantaginaceae family. Sorbitol and sucrose are used for long-distance transport of photosynthetically fixed carbon *via* phloem. Many plant species accumulate sugar alcohols during drought or salt stresses, and it leads to higher tolerance to these stress conditions. The aim of this diploma thesis is to describe selected metabolic and structure differences with a focus on the sorbitol and sucrose balance, in two *Plantago* species – glycophytic *Plantago lanceolata* and halophytic *Plantago maritima*, which differ in life strategies. The plants were cultivated hydroponically in Araponics boxes. Previous results of our team show, that sorbitol accumulates in *Plantago* leaves up to ten-times higher concentrations compared with sucrose. This difference is deepened when the plants are exposed to salt stress. Sorbitol to sucrose ratios vary between vascular tissue and phloem sap. We assume that increased salt tolerance of *P. maritima* is based on the different distribution of assimilates through the plant, and by their partitioning between metabolic, storage and transport pools in mature leaf, which also manifests under non-stress conditions. In both genotypes, I compared growth rates under standard conditions, determined and compared the distribution of assimilates with respect to the total amount and proportions of individual carbohydrates in the spectrum (analysis of mature and young leaves, roots, phloem exudates and vascular tissue analysis). Last but not least I described the diurnal dynamics of soluble sugars and starch in mature leaves. Although not many differences were found in net photosynthetic rates, the two studied genotypes differed in growth rates – glycophytic species grew faster than the halophytic one. I observed differences also in saccharide allocation to individual organs, the *P. maritima* leaves contained more soluble sugars (including sorbitol) than *P. lanceolata* plants. The genotypes varied in diurnal carbohydrate balance, when *P. maritima* plants preserved larger amount of starch compared to *P. lanceolata* at the end of the night.

Key words: *Plantago lanceolata*, *Plantago maritima*, sorbitol, growth characteristics, carbohydrate balance, phloem exudates, net photosynthesis rate

Seznam použitých zkratk

CC	Průvodní buňka floému (companion cell)
CC/SE	Komplex průvodních buněk a sítkových elementů
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
HXK1	Hexokináza 1
PAR	Fotosynteticky aktivní záření (photosynthetically active radiation)
PmAQP1	Akvaporin u <i>Plantago major</i>
PmPLT1 a PmPLT2	Transportéry sorbitolu u <i>Plantago major</i> (polyol transporter)
PmPMA2	H ⁺ -ATPáza u <i>Plantago major</i>
PmSPS1	Sacharózafosfátsyntáza u <i>Plantago major</i> (sucrose-phosphate synthase)
PmSUT2	Transportér sacharózy u <i>Plantago major</i> (sucrose transporter)
P _N	Rychlost čisté fotosyntézy (net photosynthetic rate)
RFO	Sacharidy rafinózové řady (raffinose family oligosaccharides)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SDH	Sorbitoldehydrogenáza
SE	Sítkové elementy (sieve elements)
SLA	Specifická listová plocha (specific leaf area)
SLADW	Specifická listová plocha vztažená na suchou hmotnost
SLAFW	Specifická listová plocha vztažená na čerstvou hmotnost
SPP	Sacharózafosfátfosfatáza (sucrose-phosphate phosphatase)
SPS	Sacharózafosfátsyntáza (sucrose-phosphate synthase)
SuSy	Sacharózasyntáza
SUT	Transportér sacharózy (sucrose transporter; označení podle Pommerrenig et al. (2020))
SWEET	Transportér sacharózy (sugar will eventually be exported transporter)

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Cíl práce.....	2
2. Literární přehled.....	3
2.1 Charakteristika rodu <i>Plantago</i>	3
2.2 Cukerné alkoholy.....	4
2.2.1 Sorbitol	6
2.3 Vztahy zdroje a sinku.....	7
2.3.1 Nakládání sacharidů do floému, transport a vykládání v sinku	7
2.3.2 Rozdělování asimilovaného uhlíku mezi sacharózu a sorbitol	9
2.3.3 Regulace alokace sacharidů	11
2.3.4 Změny transportu sacharidů při stresu	12
2.4 Dynamika obsahu sacharidů během dne a noci.....	15
3. Materiál a metody.....	20
3.1 Rostlinný materiál	20
3.1.1 Výsev semen.....	20
3.1.2 Kultivace	20
3.1.3 Kultivační médium.....	21
3.1.4 Kultivační doba.....	21
3.2 Růstové analýzy.....	22
3.3 Stanovení obsahu sacharidů v listech, kořenech a floému	22
3.3.1 Příprava vzorků pro analýzu obsahu rozpustných sacharidů a škrobu v listech a kořenech	22
3.3.2 Jímání floémových exudátů a jejich příprava pro analýzu obsahu sacharidů.....	24
3.4 Analýza obsahu sacharidů.....	25
3.5 Měření rychlosti čisté fotosyntézy, rychlosti transpirace a vodivosti průduchů	26
3.6 Anatomicko-histochemická analýza.....	27
3.7 Zpracování dat.....	28
4. Přehled experimentů.....	29
5. Výsledky.....	31
5.1 Optimalizace délky kultivační doby.....	31
5.2 Růstové analýzy.....	32
5.3 Stanovení obsahu sacharidů v listech, kořenech a v exudátech floému.....	35
5.3.1 Obsah rozpustných sacharidů a škrobu v listech a kořenech	35

5.3.2	Obsah rozpustných sacharidů a škrobu na začátku a na konci světelné periody	37
5.3.3	Obsah rozpustných sacharidů ve floémových exudátech	39
5.4	Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy (P_N)	41
5.5	Anatomicko-histochemická analýza listů a kořenů	43
6.	Diskuse	49
6.1	Denní dynamika obsahu sacharidů v listech	54
6.2	Přítomnost endodermis v listech	56
7.	Závěry	59
8.	Seznam použité literatury	60
9.	Příloha	68

1. Úvod

Rostliny jsou, jakožto přisedlé organismy, během svého života vystaveny různým nepříznivým podmínkám prostředí, které mohou vést k dramatickému omezení růstu či až k jejich úhynu. V současnosti jsou největším problémem zemědělské produkce abiotické stresy, zejména pak nedostatek vody, který se velmi často objevuje v kombinaci se zasolením půdy. Zasolení půd se dělí na primární, tedy přírodního původu, a sekundární, které je způsobené činností člověka (Ondrasek *et al.*, 2011). Zasolením a nedostatkem vody jsou zasaženy převážně aridní a semiaridní oblasti, kde je neúrodná až 1 miliarda hektarů půdy (Kuiper and Bos, 1992). Se stejným problémem se potýká 20 % zavlažovaných oblastí na světě a toto číslo bude dále narůstat (FAO, 2015). Zvyšující se koncentrace solí v půdě je škodlivá pro všechny složky půdního ekosystému, což ale dále zpětně ovlivňuje růst a vývoj rostlin. Celosvětově se tak působením zasolení významně snižuje zemědělská produkce. Nicméně světová populace neustále roste a odhaduje se, že okolo roku 2050 překročí 9 miliard lidí a požadavek na produkci potravin se zvýší, a to téměř o 60 %. Výzkumy se proto čím dál více zaměřují na šlechtění nových odrůd plodin, které by zajistily zvyšující se poptávku po potravinách, a to i za nepříznivých podmínek prostředí. Oblastí zájmu jsou také mechanismy a technologie, které by zmírnily zasolení a znovu zúrodnily zasažené půdy. Současný stav problematiky včetně detailů k výše uvedeným odhadům shrnuje práce Sahab *et al.* (2021).

Rostliny vyskytující se na zasolených stanovištích mají problémy s nedostupností vody způsobenou nepříznivým gradientem vodního potenciálu mezi cytosolem buněk a půdním roztokem, toxicitou některých iontů a se zhoršením vlastností samotné půdy. Rostliny, které nejsou na takovéto prostředí adaptované a vyšší množství solí je pro ně toxické, se nazývají glykofyty. Mezi ně patří většina kulturních plodin a z ostatních rostlin je to například modelová rostlina huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Mnohé rostlinné druhy přizpůsobily v průběhu evoluce své životní funkce nepříznivým podmínkám a dokáží v takovém prostředí dokončit vývojový cyklus. Tyto rostliny se nazývají halofyty a mechanismy jejich tolerance jsou častým objektem studia s cílem využít získané poznatky při šlechtění nových druhů rostlin.

Rod *Plantago* (čeleď Plantaginaceae) zahrnuje téměř 300 druhů rostlin, mezi kterými jsou glykofyty i halofyty. Z tohoto důvodu jsou jitrocele vhodné pro porovnávací studie, protože i když jsou blízce příbuzné, mají odlišné životní strategie, díky kterým se také liší tolerancí k solnému stresu. Jako modelové druhy byly pro tuto diplomovou práci zvoleny druhy jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata*) a jitrocel přímořský (*P. maritima*). Cílem mé práce bylo přispět k objasnění metabolických a strukturních rozdílů mezi oběma druhy, které by mohly vést k rozdílné toleranci ke stresu ze zasolení.

1.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je popsat vybrané metabolické a strukturní rozdíly mezi dvěma druhy rodu *Plantago*, glykofytním *P. lanceolata* a halofytním *P. maritima*, a to se zaměřením na sacharidovou bilanci - syntézu asimilátů a jejich přidělování jednotlivým orgánům a rozdělování do různých poolů – což může představovat základ pro odlišnou toleranci obou druhů ke stresu zasolení.

Dílčí cíle

- Porovnání růstových rychlostí za standardních podmínek
- Sledování distribuce a alokace sacharidů u obou druhů s ohledem na celkové množství i podíly jednotlivých sacharidů ve spektru – pomocí analýzy mladého listu, produkčního listu, kořenů, jímání exudátů produkčního listu a analýzy stavby vodivých pletiv
- Sledování denní dynamiky obsahu a spektra rozpustných sacharidů a škrobu v produkčním listu

Hypotézy

Sledované druhy jitrocele s odlišnou tolerancí k salinitě se liší za nestresových podmínek

- růstovými rychlostmi
- fotosyntetickou kapacitou
- rozdělováním sacharidů mezi metabolický, transportní a skladovací pool v rámci produkčního listu
- distribucí sacharidů (sacharózy a sorbitolu) po rostlině a jejich akumulací v různých orgánech
- rychlostí/účinností transportu na dlouhou vzdálenost

2. Literární přehled

2.1 Charakteristika rodu *Plantago*

Jitrocele (*Plantago* sp.) jsou největším rodem čeledi jitrocelovité (Plantaginaceae) a patří mezi významné léčivé byliny v tradiční i v moderní medicíně. Bylo zjištěno, že obsahují řadu biologicky aktivních sloučenin, například fenylpropanoidní glykosidy, triterpeny, flavonoidy, fenolické látky a také polysacharidy získané z mucigelu, který je produkován osemením. Extrakty z listů se tradičně přikládaly na kožní poranění a urychlovaly jejich hojení. Jitrocele se využívají jako potravina, doplněk stravy na podporu trávení, v některých zemích se přidávají do salátů a polévek, a některé druhy se používají jako krmivo pro zvířata za účelem zlepšení jejich zdraví a snížení nutnosti využívání antibiotik (Samuelsen, 2000; Gonçalves and Romano, 2016). Jitrocel větší (*P. major*) je díky svým léčivým účinkům nejvyužívanějším druhem jitrocele na světě. Přispívá k lepšímu hojení ran, vyléčení kožních infekcí, trávicích a respiračních onemocnění a pomáhá ke zmírnění bolestí (Samuelsen, 2000). Mezi významné léčivé byliny se řadí i jitrocel kopinatý (*P. lanceolata*). Ten urychluje hojení ran, má protizánětlivé, antibakteriální a diuretické účinky (Fons *et al.*, 1998). V současnosti se používá zejména k léčbě onemocnění dutiny ústní, krku a horních cest dýchacích a při kožních onemocněních (Oloumi *et al.*, 2011).

Většina druhů jitrocelů jsou malé byliny s eliptickým tvarem listů a květenstvím v podobě klasu (Gonçalves and Romano, 2016). V diplomové práci se věnuji dvěma druhům jitrocelů – glykofytnímu jitroceli kopinatému (*Plantago lanceolata*) a halofytnímu jitroceli přímořskému (*P. maritima*). Pro tyto dva druhy platí, že to jsou vytrvalé byliny s listy v přízemní růžici, se souběžnou žilnatinou a nevýrazným řapíkem. Rozdíl je ve tvaru a struktuře listu – *P. lanceolata* má listy kopinaté s větší listovou plochou, zatímco *P. maritima* je má čárkovité a dužnaté. To odráží adaptaci *P. maritima* na stanoviště, na kterých se vyskytuje, což jsou skály na mořských pobřežích a v okolí brakických mokřadů. *P. maritima* se tedy řadí mezi halofytní rostliny, které jsou adaptované na zasolení a s tím související nedostatek vody (botany.cz, 2007, 2019; Kuiper and Bos, 1992). Důležitým anatomickým znakem jitrocelů je přítomnost endodermis okolo cévních svazků listů (Trapp, 1933).

Cévní svazky nadzemní části sledovaných druhů jitrocelů jsou bikolaterální s centrálně umístěným xylémem, abaxiálním a adaxiálním floémem, přítomny jsou průvodní a parenchymatické buňky. Parenchymatické buňky mají relativně hustou cytoplazmu, velký počet mitochondrií, malé chloroplasty a obsahují škrobová zrna. Podobně je tomu u průvodních buněk, které ale mají plastidy s vytvořeným vnitřním membránovým systémem, nemají škrobová zrna a vakuoly jsou většinou menší než u parenchymatických buněk (Pommerrenig *et al.*, 2007; Reidel *et*

al., 2009). Modifikované parenchymatické buňky floému jsou specializované jako tzv. transferové buňky (popsány u *Plantago ovata* a *P. lagopus*) (Pate and Gunning, 1969), které mají roli v nakládání sacharidů do floému.

Uvažovaných mechanismů, které zprostředkovávají odolnost halofytních jitrocelů k zasolení, je celá řada. Jako první bývá při vystavení stresu inhibován růst rostlin, což je ale důsledek působení většiny abiotických stresů. Zasolení má vliv na morfologii kořenů, u rostlin *P. maritima* došlo při zvýšení koncentrace soli v půdě ke zvýšení akumulace biomasy a prodloužení kořenů (Rubinigg *et al.*, 2003). Rostliny rodu *Plantago* nemají na listech solné žlázy, proto je jednou z možností, jak regulovat množství soli, senescence listů, kterou využívá například *P. maritima* (Sheehy Skeffington and Jeffrey, 1988), nebo sukulence listů popsaná u *P. crassifolia* (Vicente *et al.*, 2004). Tolerance k zasolení závisí ve velké míře na kompartmentalizaci toxických iontů v buňce. Tolerantní rostliny mají schopnost akumulovat Na^+ a Cl^- ve vakuole, čímž zabrání inhibici metabolických procesů (Flowers *et al.*, 1986). K uložení sodíku do vakuoly slouží Na^+/H^+ antiportery na tonoplastu. U glykofytních rostlin *P. media* došlo se zvyšující se koncentrací soli k poklesu aktivit enzymů superoxiddismutázy, katalázy a askorbátperoxidázy, naopak u *P. maritima* aktivity všech zmíněných enzymů vzrostly a představovaly ochranu před oxidativním stresem (Hediye Sekmen *et al.*, 2007). Udržení osmotické rovnováhy v cytoplazmě vyžaduje syntézu a akumulaci kompatibilních solutů, které neinhibují metabolismus ani při vysokých koncentracích. U rostlin jsou to především polyoly (glycerol, sorbitol, manitol; detailněji budou probrány v následující kapitole), sacharidy (sacharóza, fruktany a sacharidy rafinózové řady (RFO)) a některé aminokyseliny a jejich deriváty (prolin, glycinbetain). Jsou syntetizovány řadou druhů, nejen halofyty, jako univerzální odpověď na negativní podmínky prostředí, tedy i osmotický stres (Flowers *et al.*, 1986; Bohnert and Jensen, 1996).

2.2 Cukerné alkoholy

Cukerné alkoholy jsou formy monosacharidů, které vznikají redukcí aldo- nebo ketoskupiny cukru na odpovídající hydroxylovou skupinu. Řada rostlin je syntetizuje souběžně se sacharózou jako primární produkty fotosyntézy (Noiraud *et al.*, 2001; Pommerrenig *et al.*, 2007). Jsou to neredukující sacharidy (Bohnert *et al.*, 1995), které mohou být lineární (nazývané také acyklické polyoly nebo alditoly), nebo uspořádané do kruhu (cyklické polyoly, cyklitoly). U vyšších rostlin bylo nalezeno 17 lineárních cukerných alkoholů, nejméně 13 z nich se nachází u rostlin krytosemenných. Nejběžnější lineární polyoly u rostlin jsou šestiuhlíkaté hexitoly manitol (odvozený od manózy; syntetizován například zástupci čeledi miříkovité (Apiaceae) a olivovníkovité (Oleaceae)), sorbitol

(odvozený od glukózy; u zástupců čeledi jitrocelovité (Plantaginaceae) a růžovité (Rosaceae)) a galaktitol (odvozený od galaktózy; u zástupců čeledi jesencovité (Celastraceae)). Z cyklitolů je nejrozšířenější myo-inositol, který ale na rozdíl od výše jmenovaných polyolů není primárním produktem fotosyntézy. U všech dosud popsaných zástupců rostlin produkujících a transportujících polyoly jsou cukerné alkoholy vždy doprovázeny sacharózou, u rostlin obecně nejzastoupenějším sacharidem (Noiraud *et al.*, 2001; Pommerrenig *et al.*, 2007). Udržení kompletní a na první pohled zastupitelné syntetické, degradační a pravděpodobně i signalizační dráhy sacharózy a cukerného alkoholu se v evoluci zachovalo u nepříbuzných skupin rostlin. Přestože je to jistě spojeno s mnoha výdaji, musí z toho mít rostliny důležitý prospěch. V této oblasti máme však informací velmi málo a této problematice jsme stále nebyli schopni plně porozumět.

Stejně jako sacharóza slouží zmíněné polyoly k transportu energie a uhlíku na dlouhé vzdálenosti floémem (Noiraud *et al.*, 2001). Kromě transportu mají cukerné alkoholy další dvě významné funkce, které se uplatňují především při stresu – účast na osmotickém přizpůsobení a osmoprotekce (Bohnert *et al.*, 1995). Při osmotickém přizpůsobení fungují polyoly jako typické kompatibilní soluty, které se při stresu hromadí v cytosolu do vysokých koncentrací. Snižují osmotický potenciál buněčného obsahu a umožňují rostlině získávat vodu, i když je v prostředí její dostupnost snižena (Bohnert *et al.*, 1995; Giri, 2011; Sharma *et al.*, 2019). Výhodou těchto sloučenin je, že při investici stejného množství uhlíku působí ve srovnání se sacharózou zhruba dvojnásobný pokles osmotického potenciálu, a při degradaci poskytují větší množství energie. Jako osmoprotektanty stabilizují buněčné struktury a proteiny (Smirnov and Cumbes, 1989; Vernon *et al.*, 1993; Bohnert *et al.*, 1995). Dále je jejich funkcí zhášení reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují peroxidaci lipidů a poškozují fotosyntetický aparát (Smirnov and Cumbes, 1989; Bohnert *et al.*, 1995; Bartels and Sunkar, 2005; Sharma *et al.*, 2019). V neposlední řadě polyoly také zvyšují mobilitu boru. Bor je mikroprvek, který řadíme mezi významné a unikátní rostlinné živiny, a to kvůli velmi úzkému rozpětí koncentrací, kdy je pro rostlinu esenciální, při vyšších hladinách je už toxický. Cukerné alkoholy tvoří s borem komplexy v listech, což bylo prokázáno například u hrušně a jabloně (Brown and Hu, 1996). Bor tak nemůže tvořit komplexy s nerozpustnými sloučeninami, a tím se zvyšuje jeho pohyblivost (Brown and Hu, 1996).

Jitrocele patří mezi ty rostlinné modely, které kromě sacharózy, produkované a transportované všemi vyššími rostlinami, syntetizují a transportují na dlouhou vzdálenost ve značné míře také cukerný alkohol sorbitol (Pommerrenig *et al.*, 2007), kterému bude věnována následující kapitola.

2.2.1 Sorbitol

Sorbitol je, jak už bylo zmíněno výše, jedním z nejrozšířenějších lineárních cukerných alkoholů. Je odvozený od glukózy, u které došlo k přeměně aldehydicke skupiny na hydroxylovou skupinu. Poprvé ho izoloval ve druhé polovině 19. století francouzský chemik J. Boussingault z jeřábu ptačího. Sorbitol se nachází u zástupců čeledi růžovité (Rosaceae), například u broskvoně (*Prunus persica*) a jabloně (*Malus domestica*), dále také u příslušníků čeledi jitrocelovité (Plantaginaceae), například u jitrocele většího (*Plantago major*) (Bieleski, 1982; Noiraud *et al.*, 2001; Williamson *et al.*, 2002). U čeledi Rosaceae je tato problematika dobře prostudovaná, naopak u Plantaginaceae máme informací zatím velmi málo. U některých zástupců čeledi Rosaceae tvoří sorbitol ve fotosynteticky aktivních pletivech 60 až 80 % všech rozpustných sacharidů (Bieleski, 1982; Zhang *et al.*, 2014). U Plantaginaceae (výsledky experimentů s *P. coronopus*) je zastoupení sorbitolu podobné - tvoří až 70 % všech rozpustných sacharidů v listech (Smekens and Van Tienderen, 2001). Sorbitol je významnou složkou spektra také u ostatních z hlediska sorbitolu popsaných druhů jitrocelů. Většina informací o sorbitolu u zástupců čeledi Plantaginaceae je získaná studiem jitrocele většího (*Plantago major*), což je robustní, rychle rostoucí vytrvalá bylina, která je schopná akumulovat v listech sorbitol do více než desetinásobných koncentrací v porovnání se sacharózou (Pommerrenig *et al.*, 2007; Nadwodnik and Lohaus, 2008). Informace o metabolismu sorbitolu u dvou sledovaných druhů *P. lanceolata* a *P. maritima* jsem nenalezla téměř žádné (Briens and Larher, 1983; Nadwodnik and Lohaus, 2008).

Na buněčné úrovni se sorbitol nachází ve stromatu chloroplastů, v cytosolu a ve vakuole mezofylových buněk (Nadwodnik and Lohaus, 2008). Syntéza sorbitolu je dvoukroková, probíhá v produkčních listech a vychází z glukóza-6-fosfátu. Ten je pomocí NADPH-dependentní reduktázy přeměněn na sorbitol-6-fosfát a následně dochází k defosforylaci pomocí sorbitol-6-fosfátfosfatázy za vzniku sorbitolu. Utilizaci sorbitolu v sincích zajišťuje enzym sorbitoldehydrogenáza (SDH), který oxiduje sorbitol na fruktózu (Negm and Loescher, 1981; Zhou *et al.*, 2003; Pommerrenig *et al.*, 2007). U Rosaceae je popsána navíc i degradace pomocí sorbitoloxidázy, která oxiduje sorbitol na glukózu (Yamaki, 1980). Z hlediska udržování redoxní balance je důležité připomenout fakt, že při syntéze sorbitolu dochází přijetím elektronů k přeměně NADPH/H⁺ na NADP⁺. Při stresu se ve fotosystémech hromadí elektrony, které se mohou tímto způsobem účinně odčerpávat a sníží se tak riziko vzniku ROS. Také je to výhodné při degradaci v sinku, kdy je ze sorbitolu vyšší zisk energie, než při zpracování stejného hmotnostního množství sacharózy (Pharr *et al.*, 1995). Výsledky analýzy obsahu sorbitolu v cévních svazcích a mezofylových buňkách ukázaly, že při zasolení dochází až k pětinasobnému nárůstu obsahu sorbitolu v cévních svazcích (v mezofylových buňkách se jeho

koncentrace také zvýšila, ale ne tak výrazně). Zvýšení obsahu sorbitolu ukazuje na zvýšenou biosyntézu sorbitolu a/nebo na jeho sníženou oxidaci (Pommerrenig *et al.*, 2007).

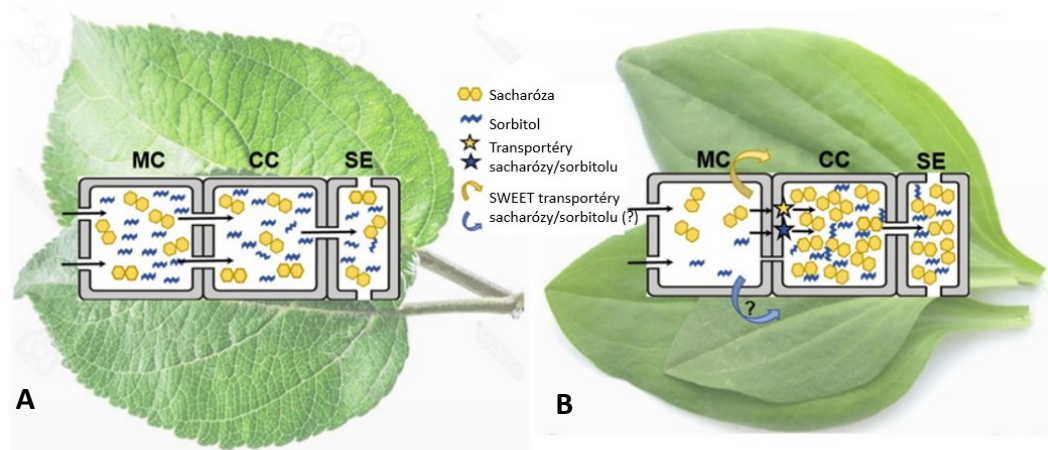
2.3 Vztahy zdroje a sinku

Fotoasimiláty jsou produkovány převážně fotosynteticky aktivními zdrojovými pletivy, ale export zdroje uhlíku a energie může být také výsledkem mobilizace zásob ve skladovacích orgánech, jako jsou například kořeny, hlízy nebo zásobní stonky. Sinky jsou pak pletiva, která jsou závislá na dodávce uhlíku a energie ze zdrojových pletiv (Smith and Stitt, 2007; López-Salmerón *et al.*, 2019; Pommerrenig *et al.*, 2020). Termíny zdroj a sink nepopisují statické charakteristiky jednotlivých orgánů a pletiv, ale zahrnují dynamické vlastnosti a mění se v závislosti na vývoji nebo stresových podnětech (López-Salmerón *et al.*, 2019; Pommerrenig *et al.*, 2020). Oba typy pletiv, sinkové i zdrojové, se mohou nacházet v rámci jednoho orgánu, například listu, kdy se všechny jeho části nevyvíjejí zároveň - špička listu může být autotrofní, tedy zdroj, zatímco báze má stále ještě charakter sinku (Loescher *et al.*, 1982). V porovnání se zdroji jsou sinky více různorodé, a to ve tvaru, funkci i plasticitě. Obecně mohou být sinky rozděleny na meristémy, vyvíjející se listy, kořeny, semena, plody, hlízy, cibule a řadu dalších. Transport a metabolismus fotoasimilátů se může lišit mezi jednotlivými sinky a jejich vývojovými stádii (Ferne *et al.*, 2020).

2.3.1 Nakládání sacharidů do floému, transport a vykládání v sinku

Pro pochopení hospodaření rostlin se sacharidy a jejich následný transport je užitečné definovat dva pojmy, a to rozdělování a přidělování sacharidů. Rozdělování, nebo také distribuce, znamená vlastní rozdělení asimilátů mezi jednotlivé pooly/případně typy sacharidů. Přidělování sacharidů jednotlivým orgánům/pletivům neboli alokace, zahrnuje transport asimilovaného uhlíku po rostlině, jeho uložení a využití. Hlavním faktorem určujícím růst a vývoj rostlin je transport sacharidů od zdrojů k sinkům, který je daný efektivním a kontrolovaným přidělováním sacharózy a dalších sacharidů (například RFO a cukerných alkoholů) rostlinným orgánům prostřednictvím floému (Rennie and Turgeon, 2009; Lemoine *et al.*, 2013). Až 80 % asimilovaného uhlíku je z produkčních listů exportováno. Pokud vážně export sacharidů floémem, začnou se v listu hromadit a může dojít ke snížení rychlosti fotosyntézy (Lemoine *et al.*, 2013). Oproti předpokladům to není světlo ani dostupnost vody, které rozhodují. Největší řídicí roli v přizpůsobení těchto procesů mají samotné sacharidy, přesněji řečeno jejich vzorec hromadění, vyčerpání, distribuce a typ (Bläsing *et al.*, 2005).

Nejčastěji přijímaným vysvětlením mechanismu transportu na dlouhou vzdálenost je hromadný tok poháněný tlakovým gradientem, původně navržený E. Münchem v roce 1930. Sacharidy, které jsou syntetizovány v mezofylových buňkách, putují symplastem až do parenchymatických buněk floému, které jsou napojené na mezofylové buňky pomocí početných plasmodesmů s velkým SEL (průchodnost plasmodesmů; z angl. size exclusion limit) (Turgeon, 2010). Protože jsou sacharidy produkovány převážně ve zdrojových listech, musí být transportovány do ostatních závislých orgánů. Existují tři mechanismy nakládání sacharidů do floému – pasivní symplastické (pohyb přes plasmodesmy podél koncentračního gradientu; tento typ nakládání u rostlin produkujících sacharózu a sorbitol je znázorněn na obrázku 1A). Dalším typem je polymerní pasta, která ovšem ve své podstatě je cestou symplastickou (syntéza RFO z prekurzorů, které jsou transportované do průvodních buněk floému (CC) symplasticky, CC jsou funkčně odlišené, tzv. intermediární buňky) a apoplastické nakládání (transport do apoplastu v okolí CC a následně aktivní nakládání do CC proti koncentračnímu gradientu pomocí přenašečů; obrázek 1B) (Turgeon, 2010; Braun *et al.*, 2014).



Obrázek 1: Schématické znázornění způsobů nakládání sacharidů do floému u rostlin produkujících sorbitol - jabloně domácí (*Malus domestica*; A) a jitrocele většího (*Plantago major*; B). MC – mezofylové buňky, CC – průvodní buňky floému, SE – sítkové elementy. A: Pasivní způsob nakládání sacharózy a sorbitolu vyžadující propojení buněk plasmodesmy a vysokou koncentraci sacharidů v cytosolu mezofylových buněk. B: Aktivní transport z apoplastu zprostředkovaný H^+ symportery sacharózy a sorbitolu (žluté a modré hvězdy na membráně). Tok sacharózy z mezofylových buněk do apoplastu je zajištěn SWEET transportéry (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) (žlutá zahnutá šipka), podobný mechanismus je předpokládán i pro sorbitol (modrá zahnutá šipka). Převzato a upraveno, Pleyerová *et al.* (2022).

Transport sacharidů musí být specificky kontrolován, zejména prostřednictvím činnosti transportérů, ale zároveň je řízen aktivitou zdrojových (zejména fotosynteticky aktivních) i sinkových pletiv. Akumulace sacharidů i jejich transport po rostlině je rozhodující pro sacharidovou signalizaci, která je podstatnou složkou mechanismů kontrolujících jednotlivé růstové a vývojové procesy. Transportéry sacharidů jsou zásadní pro koordinaci jejich alokace. Rostlina mění

transportní aktivity v závislosti na vývoji tak, aby vytvořila nebo naplnila sinky (Pommerrenig *et al.*, 2020). Zdroje a sinky jsou propojeny floémem, který slouží k transportu látek na dlouhé vzdálenosti, přičemž hlavní formou uhlíku transportovanou floémem je nejčastěji sacharóza. Kromě sacharózy některé rostliny floémem transportují také cukerné alkoholy a RFO (Rennie and Turgeon, 2009).

Vykládání sacharidů z floému může probíhat jak symplasticky, tak apoplasticky. O způsobu vykládání rozhoduje konkrétní sink a jeho vývojové stádium. Při dodání do sinků jsou fotoasimiláty z floému vykládány často symplasticky skrze plasmodesmy propojující okolní buňky (Braun *et al.*, 2014). V některých případech může také docházet ke změně apoplastického způsobu vykládání na symplastický, například při tuberizaci bramboru (Viola *et al.*, 2001). Změny v rozdělování uhlíku a „přepínání“ mezi symplastickou a apoplastickou cestou se objevují v průběhu vývoje i jako odpověď na podmínky prostředí (Lemoine *et al.*, 2013). Skladovacími orgány mohou být například kořeny nebo hlízy. Skladovány jsou často polymery jako škrob v plastidech, nebo fruktany ve vakuole. Rozpustné sacharidy mohou být skladovány ve vakuolách, například ve stonkových pletivech cukrové třtiny. Důležitými sinky jsou, kromě skladovacích, také rostoucí kořeny, listy a vzrostné vrcholy (Hedrich *et al.*, 2015). U sinků, kde dochází k buněčnému dělení a elongaci (tedy růstu), často dochází ke štěpení sacharózy v apoplastu stěnovými invertázami a vzniklé hexózy jsou pomocí hexózových transportérů transportovány do buňky. V sincích, které mají sloužit jako skladovací, je dominantní import nerozštěpené sacharózy (Weschke *et al.*, 2003).

2.3.2 Rozdělování asimilovaného uhlíku mezi sacharózu a sorbitol

Spektrum a množství sacharidů na konkrétním místě v rostlině je výsledkem koordinované aktivity souboru enzymů degradace a syntézy, ale i efektivity transportních pochodů. Všechny tyto složky jsou neustále modulovány během vývojových procesů i při působení stresu. Zdroje a sinky se liší enzymatickou aktivitou. Ve zdrojích jsou aktivní zejména enzymy podílející se na syntéze sacharózy, tedy sacharózafosfátsyntáza (SPS) a sacharózafosfátfosfatáza (SPP) (Ruffy and Huber, 1983). SPS využívá jako substrát pro syntézu sacharózy UDP-glukózu a fruktóza-6-fosfát. Vzniklý sacharóza-6-fosfát je v dalším kroku defosforylován pomocí SPP a vzniká sacharóza (Ruan, 2014). Pro efektivní přenos sacharózy přes membránu při nakládání do floému jsou nezbytné dva typy transportérů – SWEET, které zajišťují transport sacharózy do apoplastu (Chen *et al.*, 2012) a transportéry rodiny SUT (terminologie podle Pommerrenig *et al.* (2020)) pro naložení sacharózy do průvodních buněk (Gahrtz *et al.*, 1994; Riesmeier *et al.*, 1994). SUTy symportují sacharózu s H^+ a jejich aktivita je závislá na membránovém protonovém gradientu (Riesmeier *et al.*, 1994; Sauer, 2007; Pommerrenig *et al.*, 2020). U rostlin produkujících sorbitol jako primární produkt fotosyntézy je ve zdrojových pletivech

aktivní také enzym NADPH-dependentní aldóza-6-fosfátreduktáza (A6PR) (Loescher *et al.*, 1982). V sincích je naopak vyšší aktivita enzymů podílejících se na degradaci, pro sacharózu jsou to enzymy invertáza (štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu) a sacharózasyntáza (štěpí sacharózu na UDP-glukózu a fruktózu) (Barratt *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012; Fernie *et al.*, 2020). Protože v průběhu vývoje rostlin dochází k přeměnám sinků na zdroje, mění se adekvátně i aktivita enzymů uplatňujících se v metabolismu sacharózy a sorbitolu. To bylo potvrzeno u jabloně, kdy na jaře dochází k přeměně mladých sinkových listů na zdrojové, aktivita degradačních enzymů sacharózy a sorbitolu v těchto listech klesala, zatímco aktivita enzymů podílejících se na jejich syntéze rostla (Loescher *et al.*, 1982). Pokud rostliny rostou při neměnných podmínkách prostředí, například při konstantní délce dne, vlhkosti, teplotě a dostatku živin, pohybují se změny v jejich sacharidovém metabolismu ve velmi malém rozpětí závislém především na denním cyklu (Hummel *et al.*, 2010).

Protože je sorbitol, stejně jako sacharóza, syntetizován převážně ve zdrojových listech, musí být transportován do ostatních pletiv. Sorbitol byl detekován ve floému (Bielecki, 1982; Moing *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2014), předpokládá se proto, že je floémem transportován na dlouhou vzdálenost. Lokalizace cukrů a cukerných alkoholů v buňce a jejich transport floémem byl studován u dvou druhů jitrocele, *P. major* a *P. maritima*. V případě *P. major* byla ve stromatu chloroplastů, v cytosolu a ve vakuole mezofylových buněk zjištěna nižší koncentrace sacharózy než sorbitolu, avšak ve floému byla situace opačná. U *P. maritima* byla zjištěna nižší koncentrace sacharózy než sorbitolu ve stromatu chloroplastů a ve vakuole a koncentrace těchto dvou sacharidů byly v cytosolu a ve floému srovnatelné (Nadwodnik and Lohaus, 2008). Bylo navrženo, že zástupci rodu *Plantago* pravděpodobně využívají apoplastický způsob nakládání floému (obrázek 1B), a to na základě existujícího koncentračního gradientu sorbitolu mezi floémem a mezofylovými buňkami (Nadwodnik and Lohaus, 2008; Reidel *et al.*, 2009). Nakládání sorbitolu do průvodních buněk floému je zajištěno odpovídajícími transportéry (Ramsperger-Gleixner *et al.*, 2004; Pommerrenig *et al.*, 2007), jejichž aktivita může být modifikována v případě vystavení rostliny abiotickému stresu, například zasolení (Pommerrenig *et al.*, 2007) nebo nedostatku boru (Pommerrenig *et al.*, 2019). Transportéry, které zprostředkovávají nakládání sorbitolu do floému u *P. major*, jsou H⁺ symportéry PmPLT1 a PmPLT2 (Ramsperger-Gleixner *et al.*, 2004). Z výsledků studie týmu Ramsperger-Gleixner *et al.* (2004) vyplývá, že existuje určitá vývojová posloupnost v expresi genů pro transportéry sacharózy a sorbitolu. U nejmladších komplexů průvodních buněk a sítkových elementů (tedy těch nejbližších xylému) dochází nejdříve k expresi *PmSUT2*. Exprese obou *PmPLT* je zahájena až v pozdějších vývojových stádiích a je charakteristická pro zdrojová pletiva (Ramsperger-Gleixner *et al.*, 2004). U *P. major* byl kromě PmSUT1 a PmSUT2 popsán transportní protein tohoto typu i v sítkových elementech – PmSUT3. Tyto transportéry se liší lokalizací exprese, *PmSUT1* se exprimuje

pouze v květenstvích a nemá tedy roli v nakládání floému (Gahrtz *et al.*, 1996). PmSUT2 a PmSUT3 se nachází v průvodních buňkách a liší se afinitou k sacharóze (vyšší afinita u PmSUT3) (Barth *et al.*, 2003). Předpokládá se, že by to mohl být mechanismus k regulaci nakládání a vykládání sacharózy během transportu floémem a v apoplastickém vykládání do sinků (Ramsperger-Gleixner *et al.*, 2004).

2.3.3 Regulace alokace sacharidů

Růst a vývoj sinku je závislý na dodávce sacharózy (nebo jiných sacharidů) floémem. Tím se mezi sinky vytváří systém priorit. Ve vegetativní fázi jsou hlavními sinky kořeny a mladé listy, v pozdějších fázích (období reprodukce) jsou to potom hlízy, plody a semena (Wardlaw, 1990; Lemoine *et al.*, 2013). Optimalizace souhry mezi sinky a zdroji má zásadní význam pro pokrok ve šlechtění, což potvrzuje i fakt, že napříč staletími šlechtění byly vybírány odrůdy s největšími gradienty mezi zdroji a sinky, což vede k nejvyšším výnosům (Lichthardt *et al.*, 2020). Aby rostliny dosáhly harmonického růstu a zajistily reprodukční fitness, musí mezi sinky docházet k neustálé optimalizaci vzorce přednosti přístupu k asimilátům.

Základem dominance sinku, neboli jeho předností, je síla sinku (Lemoine *et al.*, 2013). Síla sinku odráží jeho velikost a schopnost efektivně snižovat koncentraci osmoticky aktivních fotoasimilátů v sinku, a tím ustavit příznivý tlakový gradient mezi zdrojem a sinkem (Wardlaw, 1990). Pomocí změn v rychlosti využití dopravených sacharidů může být síla sinkových orgánů nebo pletiv efektivně modulována (Herbers and Sonnewald, 1998). Akumulace sacharózy v sinku může být regulována aktivitami enzymů zapojených v biosyntéze konkrétních skladovacích látek, nebo transportem sacharózy přes tonoplast (Hedrich *et al.*, 2015). V tomto ohledu bývá zdůrazňována role stěnových invertáz v sinkových orgánech, které zvyšují vykládání sacharózy tím, že ji štěpí na hexózy, které jsou následně aktivně transportovány do buňky pomocí monosacharidových transportérů (například Patrick, 1997). Z toho, co bylo řečeno výše, je tedy zřejmé, že transport fotoasimilátů je závislý na nabídce, ale významnou měrou také na poptávce. Pokud je poptávka sinku snížena, dochází k hromadění sacharózy ve vodivých pletivech, ke snižování aktivity transportérů, které nakládají asimiláty do floému, tím dojde k hromadění sacharózy v mezofylových buňkách obklopujících vodivá pletiva a sníží se rychlost fotosyntézy. Pokud je naopak poptávka sinku zvýšena, dojde ke snížení hladiny sacharózy ve floému, ke zvýšení aktivity transportérů a nakládání do floému, sníží se koncentrace sacharózy v mezofylu a zvýší se rychlost fotosyntézy (Chiou and Bush, 1998).

Stále není jasné, jakým konkrétním mechanismem je v sinkových pletivech vnímána koncentrace sacharidů a jak se tyto informace přenášejí do regulace SUT nebo SWEET transportérů. Tým Vaughn et al. (2002) předpokládá, že sacharidem, který nese informaci a ovlivňuje aktivitu SUT1 u cukrové řepy, je sacharóza. Konkrétně bylo zjištěno, že vysoké koncentrace sacharózy down-regulovaly transkripci genu pro transportér SUT1 (Vaughn *et al.*, 2002), avšak vliv sacharózy na aktivitu tohoto transportéru stále nebyl prokázán. Taková down-regulace měla za následek akumulaci sacharózy v apoplastu a zpětně také v cytosolu mezofylových buněk. Zvýšení koncentrace sacharidů v cytosolu může být přímo vnímáno pomocí hexokinázy HXK1 (Moore *et al.*, 2003) nebo nepřímo prostřednictvím aktivity SPS nebo cytosolických invertáz (Tiessen and Padilla-Chacon, 2013).

Transportéry sacharidů tedy plní řadu rolí – kromě zprostředkování alokace sacharidů na dlouhou vzdálenost také utváří sacharidový profil na buněčné a pletivově specifické úrovni tím, že balancují hladiny těchto molekul v různých kompartmentech. Proto aktivita transportérů představuje cíl pro klasické i cílené šlechtitelské postupy, například na zvýšení nakládání do floému nebo zvýšení síly sinků u plodin (Ainsworth and Bush, 2011). Růst na přirozených stanovištích však neprobíhá za optimálních podmínek a rostliny musí neustále využívat množství aklimatizačních a adaptačních mechanismů, aby si i za proměnlivých podmínek prostředí udržely určitou homeostázu s ohledem na rychlost fotosyntézy (Pommerrenig *et al.*, 2018). Lze tedy shrnout, že rostliny provádí řadu úprav metabolismu díky čemuž jsou schopné modulovat translokaci uhlíku v závislosti na jeho dostupnosti ve zdrojích a na poptávce sinků, a to například i za podmínek sucha, chladu nebo zasolení (Keller *et al.*, 2021).

2.3.4 Změny transportu sacharidů při stresu

Nedostatek vody, ať již přímo ze sucha, nebo kvůli nedostupnosti vody například při zasolení, je hlavní abiotický faktor, který vede k velkým morfologickým a/nebo fyziologickým změnám v časovém i prostorovém měřítku, včetně redukce expanze nadzemních orgánů, udržování růstu kořenů, poklesu transpirace a rychlosti fotosyntézy. Dochází také ke změnám v metabolismu zdrojových i sinkových pletiv, zejména se akumulují osmoticky aktivní látky (například sacharidy, prolin, organické kyseliny nebo draselné ionty) (Pelleschi *et al.*, 1997). Dále dochází k aktivaci detoxifikačních procesů (například antioxidační mechanismy) a paralelně také k regulaci transkripce velké řady genů (například geny pro transportéry sacharidů). U rostlin vystavených stresu dochází ke změnám v produkci, rozdělování a přidělování asimilátů, a to jim umožní se postupně přizpůsobit daným stresovým podmínkám. Rozpustné sacharidy se při stresu často akumulují ve vakuole a

slouží k osmoregulaci, ale nejsou přímo dostupné pro růst rostliny (Clifford *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2020). Avšak k hromadění sacharidů v listech může docházet i v důsledku snížené poptávky kvůli zastavení růstu prýtu za podmínek nedostatku vody (experimenty s *A. thaliana*) (Hummel *et al.*, 2010).

Nedostupnost vody pro rostliny je, jak už bylo řečeno, kromě sucha spojená i se zasolením půdy. Odolnost k zasolení se často objevuje u rostlin, které syntetizují polyoly, které fungují jako osmoticky aktivní sloučeniny a mají antioxidační funkci. Když jsou takové rostliny vystaveny zasolení, dojde u nich k nárůstu hladin polyolů v různých orgánech. U rostlin, které je syntetizují, jsou polyoly považovány za hlavní sloučeniny, které jim umožňují vypořádat se se stresem (Stoop *et al.*, 1996; Lemoine *et al.*, 2013). Kromě syntézy je při stresu také posílen jejich transport na dlouhou vzdálenost, jak dokazují výsledky studií na jitroceli (Pommerrenig *et al.*, 2007), celeru (Landouar-Arsivaud *et al.*, 2011) a olivovníku (Conde *et al.*, 2011), a také se uplatňuje snížení aktivit degradačních enzymů. Při zasolení se, navzdory očekávání autorů (Pommerrenig *et al.*, 2007), zvýšil obsah sacharózy v cévních svazcích, což bylo způsobeno pravděpodobně snížením exportu asimilátů z listů. Přesto došlo k nárůstu poměru sorbitolu ku sacharóze. Souběžně bylo popsáno, že dochází k up-regulaci exprese *PmPLT1*, *PmPLT2*, *PmAQP1* (akvaporin) a *PmPMA2* (H^+ -ATPáza), ale zároveň nedochází k žádné změně v expresi *PmSUT2*. To naznačuje, že transportéry cukerných alkoholů jsou regulovány v závislosti na zasolení, a že transportéry polyolů a sacharózy mohou být regulovány odlišně (Pommerrenig *et al.*, 2007).

Mechanismy tolerance rostlin k zasolení byly popsány u řady druhů, ale stále existuje velmi málo prací, které by se zabývaly porovnáváním geneticky příbuzných druhů adaptovaných na různé přírodní habitaty. Právě tento typ výzkumu může poskytnout vhled do nejdůležitějších mechanismů tolerance k zasolení u konkrétního rodu rostlin. Studie týmu Ltaeif *et al.* (2021) je zaměřena na porovnání odpovědi na stres zasolení u dvou typických halofytních (*Plantago crassifolia* a *P. coronopus*) a příbuzných glykofytních (*P. ovata* a *P. afra*) druhů jitrocele, které jsou k zasolení citlivé, ale současně vykazují adaptaci na suché prostředí. Rostliny byly vystaveny koncentracím soli 200, 400, 600 a 800 mM NaCl. Halofytní zástupci přežili všechny koncentrace soli v půdě, rostliny *P. ovata* nepřežily nejvyšší koncentrace a *P. afra* naopak přežily pouze ty nejnižší. Obecnou odpovědí rostlin na abiotický stres byla inhibice fotosyntézy, způsobená zejména degradací fotosyntetických pigmentů. U všech čtyř studovaných druhů došlo se zvyšující se koncentrací soli ke snížení obsahu chlorofylu *a* i *b* a karotenoidů ve srovnání s kontrolními rostlinami. U všech sledovaných druhů také došlo k nárůstu koncentrace Na^+ a Cl^- v kořenech a listech, paralelně se zvyšující se koncentrací soli v půdě. Prolin je jeden z nejběžnějších osmolytů, který se akumuloval v listech v odpovědi na stres zasolení u halofytních druhů *P. crassifolia* a *P. coronopus* a při 800 mM NaCl byly hladiny prolinu

nejvyšší (okolo 50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny). Koncentrace prolinu narostla také u *P. ovata*, ale méně než u halofytů. U *P. afra* zůstal prolin na velmi nízkých hladinách. Při stresu se u všech druhů akumuloval sorbitol, avšak rozdíly v jeho absolutním množství nevysvětlují odlišnou toleranci k zasolení u jednotlivých druhů. Za vyšší toleranci halofytů dle autorů stojí aktivní transport iontů do listů, akumulace prolinu, relativní rezistence k oxidativnímu stresu a nárůst hladin antioxidantů, například fenolických sloučenin a flavonoidů (Ltaeif *et al.*, 2021).

Další z porovnávacích studií je práce týmu Al Hassan *et al.* (2016), ve které se věnovali třem druhům rostlin rodu *Plantago*, které jsou adaptované na různé podmínky prostředí. Stejně jako v předchozím případě to byly halofytní zástupci *P. crassifolia* a *P. coronopus*, a dále *P. major*, který je často považován za druh citlivý k zasolení, protože nebyl nalezen na zasolených stanovištích. Výsledky analýz této studie však ukázaly, že je *P. major* ke stresu zasolení poměrně odolný, i když v menší míře než halofytní zástupci (Al Hassan *et al.*, 2016). Jedním ze společných mechanismů odolnosti k zasolení u halofytních rostlin je transport toxických Na^+ a Cl^- iontů do listů, kde se akumulují ve vakuole, čímž se zabrání jejich škodlivému vlivu (Flowers *et al.*, 1977). I Al Hassan *et al.* (2016) prokázali, že hladina Na^+ v listech rostla s rostoucí koncentrací soli v půdě u všech studovaných druhů, ale v případě *P. major* byl jeho maximální obsah v listech až poloviční než u halofytů. U halofytů byla pozorována při zasolení (600 až 800 mM) výrazná akumulace prolinu. I když byly nárůsty obsahu prolinu u halofytů velké (16krát vyšší hladina prolinu u *P. crassifolia* a 90krát vyšší hladina u *P. coronopus* oproti kontrolám), jeho nejvyšší koncentrace byly stále příliš nízké na to, aby výrazně přispíval k osmotické rovnováze u zasolením stresovaných rostlin. Molekuly prolinu při stresu fungují pravděpodobně jako nízkomolekulární chaperony, signální molekuly a podílí se na zhášení ROS. Podobné výsledky byly pozorovány i v případě glycinbetainu. Se zvyšující se koncentrací soli se zvyšovala také hladina sorbitolu v listech všech tří druhů jitrocele. Byly pozorovány rozdíly mezi druhy – u kontrolních rostlin měly druhy *P. coronopus* a *P. major* až o polovinu vyšší obsah sorbitolu v listech než *P. crassifolia*. Maximální hladiny sorbitolu v listech při 800 mM NaCl dosáhl právě druh *P. crassifolia* a tyto hodnoty byly nejvyšší naměřené v celém experimentu. Absolutní hodnoty obsahu sorbitolu byly až o 3 řády vyšší než hladiny prolinu a glycinbetainu. Zatímco obsah sorbitolu v listech jitrocelů za stresu i nestresových podmínek je podle autorů preadaptací na působení stresu, schopnost akumulace prolinu u halofytních zástupců by mohla představovat mechanismus, díky kterému se rostliny rychle přizpůsobí rostoucí salinitě (Al Hassan *et al.*, 2016).

Podobné výsledky byly publikovány v práci týmu Koyro (2006) věnující se pouze halofytnímu druhu *P. crassifolia*. Sorbitol byl hojně obsažen ve všech orgánech rostlin (nejvíce v řapících listů, kde tvořil až 5,5 % sušiny). Zasolení vedlo k velkému nárůstu hladin sorbitolu

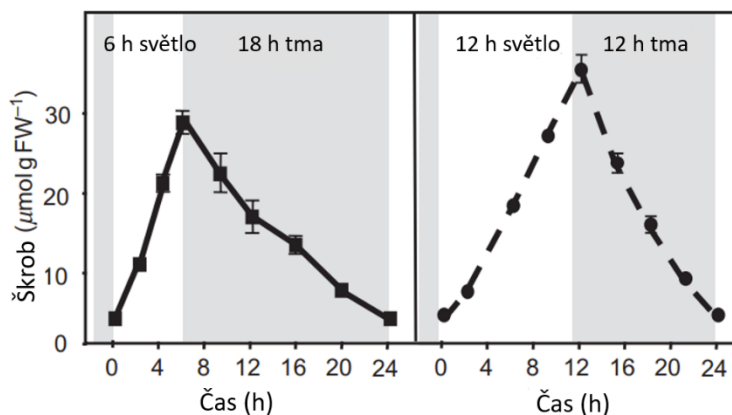
v kořenech a listech tohoto druhu. Koncentrace sorbitolu byla více než 4krát vyšší v kořenech rostlin vystavených vysoké koncentraci soli (375 a 500 mM NaCl) v porovnání s kontrolami (Koyro, 2006). Vztah obsahu sorbitolu v listech *P. crassifolia* a obsahu soli v půdě v jednotlivých částech roku sledoval na přirozených stanovištích tým Gil et al. (2011). Obsah sorbitolu vykazoval sezónní změny a koreloval s kondicí rostlin v přirozených podmínkách. Nejvyšší obsah sorbitolu byl naměřen ve vzorcích nasbíraných v létě ($340 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) a signifikantně se lišil od obsahu ve vzorcích nasbíraných v ostatních obdobích. Změny v hladině sorbitolu v listech odpovídaly změnám v množství soli v půdě. Rozdíl v obsahu sorbitolu mezi jarem, kdy byla salinita půdy nižší, a létem, kdy byla vyšší, byl až pětinasobný (Gil et al., 2011). Podobné výsledky byly publikovány ve studii skupiny Vicente et al. (2004), kde byly ovšem rostliny *P. crassifolia* pěstovány ve skleníku a byly vystaveny zvyšující se koncentraci soli v zálivce.

2.4 Dynamika obsahu sacharidů během dne a noci

Je dobře známo, že ačkoli fotosyntetická asimilace probíhá pouze v těsné vazbě na světlo, růst a další procesy, které vyžadují asimilovaný uhlík, probíhají i v noci. Rostlina je schopná zajistit dostupnost zdroje uhlíku a energie v noci tak, že asimilace za světla pokryje nejen okamžité náklady na růst, ale uhlík se také skladuje v podobě zásobních sloučenin v listech (převážně ve formě nestrukturních sacharidů). Zásoby se poté mobilizují a rostlina je tak schopná růst a zásobovat sinky i v noci (Smith and Stitt, 2007; Stitt and Zeeman, 2012; Ruan, 2014; Liang et al., 2021), přičemž jsou tyto zásoby na konci noci téměř, ale ne úplně, mobilizovány (Smith and Stitt, 2007).

Rozdělování sacharidů je závislé na aktivitě fotosyntézy (fixaci uhlíku), stáří rostliny, vývojové fázi a podmínkách prostředí. Na základě toho se rostliny rozhodují, kolik uhlíku uloží do škrobu v chloroplastu, kolik exportují ve formě triózafosfátu z chloroplastu do cytosolu, kde bude následně sloužit například k syntéze sacharózy nebo kolik uhlíku se poté přechodně do vakuoly (Lemoine et al., 2013). Vakuola je největší organela rostlinných buněk a mimo jiné funguje také jako zásobárna sacharózy, cukerných alkoholů, fruktanů a RFO. Rozdělování sacharidů mezi cytosol a vakuolu je regulováno transportéry, které patří do rodin monosacharidových (Slewinski, 2011), sacharózových (Schneider et al., 2012) a SWEET (Eom et al., 2015) transportérů. Uložené sacharidy zajišťují zásobu k udržení pokračujícího růstu rostlin a k předejití akutnímu nedostatku uhlíku v měnících se podmínkách prostředí. Dočasná nerovnováha mezi zásobami uhlíku a jeho využitím může snadno způsobit výrazné poškození růstu a vývoje rostliny a negativní dopad má také na výnosy kulturních plodin (Liang et al., 2021). Rostliny proto musí neustále ustavovat rovnováhu mezi asimilací uhlíku, jeho skladováním a růstem.

Koordinace procesů asimilace, skladování a využití uhlíku během dne a noci je velmi komplexní, flexibilní proces, který musí být přísně kontrolován. Z hlediska denního cyklu, asimilovaný uhlík slouží jednak k podpoře kontinuálního růstu během denního cyklu, a také zajišťuje prostřednictvím akumulace zásobních látek „očekávanou“ poptávku během noci. To znamená, že rostlina má mechanismy, pomocí kterých „předvídá“ množství uhlíku potřebného v noci a podle toho upraví během dne podíl zásobní formy, tedy rozdělování sacharidů (Smith and Stitt, 2007). Například mutanti *A. thaliana* a tabáku se sníženou schopností syntézy škrobu (*pgm*, rostliny deficientní v produkci enzymu fosfoglukomutázy) nejsou schopni přežít zkrácené světelné periody kvůli rychlému vyčerpání sacharidů už se začátkem noci a následkem toho u nich dochází brzy k inhibici růstu (Gibon *et al.*, 2004; Fernie *et al.*, 2020; Liang *et al.*, 2021). Tým Liang *et al.* (2019) se věnoval studiu hybridů kukuřice. Výsledky experimentů ukázaly, že poměr celkového obsahu škrobu k fixovanému uhlíku v listech koreluje s výnosem a konečnou biomasou rostliny.



Obrázek 2: Denní změny v obsahu škrobu v listech *Arabidopsis thaliana* (Col-0). Stáří rostlin v době odběru bylo 5 týdnů. Rostliny byly pěstovány při fotoperiodě 6 hodin světla/18 hodin tmy (levá část obrázku) a 12 hodin světla/12 hodin tmy (pravá část obrázku). FW – čerstvá hmotnost. Převzato a upraveno, Smith and Stitt (2007).

Rostliny musí neustále reagovat na změny podmínek vnějšího prostředí a podle toho upravit rozdělování uhlíku mezi skladování a využití. To se dá demonstrovat pomocí manipulace s délkou fotoperiody, která vede ke změně v rozdělování asimilátů mezi sacharózu a škrob během dne a projeví se to také na rychlosti degradace škrobu během noci. Rychlost syntézy škrobu je nepřímo úměrná délce dne, tím pádem podíl fotoasimilátů vyhrazený pro použití v noci je tím větší, čím delší je noc (Lorenzen and Ewing, 1992; Gibon *et al.*, 2004; Smith and Stitt, 2007; Mugford *et al.*, 2014) (obrázek 2). Výsledky experimentů s *A. thaliana* ukázaly, že rychlost degradace škrobu v noci je v podstatě lineární a vede k téměř úplnému vyčerpání jeho zásob na konci noci (Smith and Stitt, 2007). Se zkracující se světelnou periodou se zpomaluje degradace škrobu přes noc (Mugford *et al.*, 2014). Rostlina tedy musí mít mechanismy, které „měří“ množství škrobu v listu na konci dne,

a které předvídají délku noci tak, aby zajistily stálý přísun uhlíku v noci, a na základě toho upraví rychlost degradace škrobu (Smith and Stitt, 2007).

I když většina detailních dat o rozdělování asimilátů a jejich využití v rámci denního cyklu pochází ze studia modelového druhu *A. thaliana*, podobné mechanismy se na základě nepočetných studií předpokládají i u dalších rostlinných druhů. Například výsledky týmu Mullen and Koller (1988) ukázaly, že u rostliny sóji (*Glycine max*) pěstované při 14hodinové fotoperiodě bylo 60 % fotoasimilátů použito na syntézu škrobu. Pokud byly rostliny pěstovány při 7hodinové fotoperiodě, na syntézu škrobu bylo využito až 90 % asimilovaného uhlíku. Rychlost degradace škrobu byla v noci upravena tak, aby i nadále umožňovala téměř úplné využití zásob škrobu na konci noci. Výsledky tedy potvrdily, že se využití asimilátů na syntézu škrobu během dne a rychlost mobilizace škrobu v noci zvyšují s rostoucí délkou denního světla (Mullen and Koller, 1988). Díky těmto mechanismům rozdělování sacharidů se mohou rostliny přizpůsobit velkému rozsahu délek dne (v případě *A. thaliana*, byly rostliny schopny přizpůsobit vzorec ukládání a mobilizace škrobu až 4hodinové fotoperiodě; Smith and Stitt (2007)). Další z experimentů s *A. thaliana* ukázaly, že při změně fotoperiody z 12 na 8hodinovou došlo k vyčerpání zásob škrobu a zastavení růstu kořenů. Růst byl zastaven i několik hodin po nástupu světlené fáze, což mělo za následek akumulaci sacharidů, protože nově asimilovaný uhlík nebyl využitý pro růst (Gibon *et al.*, 2004). Pokud podmínky krátkého dne (tedy 8 hodin světlo a 16 hodin tma) trvaly několik dní, došlo ke změně v rychlosti syntézy a degradace škrobu a rostlina tak ustavila novou uhlíkovou rovnováhu s nižší rychlostí růstu bez zastavení růstu kořenů (Gibon *et al.*, 2004; Smith and Stitt, 2007). Podobné výsledky byly získány z experimentů s kukuřicí, kde prodloužení temné periody z 9 na 17 hodin tmy vedlo k inhibici růstu kořenů (Brouquisse *et al.*, 1998).

Zdá se, že existují rozdíly v optimalizaci denního obratu škrobu mezi jednotlivými genotypy daného druhu. Výsledky experimentů s 24 genotypy *A. thaliana* ukázaly, že nejrychleji rostoucí genotypy měly tendenci akumulovat méně škrobu a na konci noci měly nižší hladiny škrobu i rozpustných sacharidů. To naznačuje, že rychleji rostoucí genotypy fungují méně konzervativním způsobem, odvádějí o něco větší podíl nově asimilovaného uhlíku do exportu sacharózy a ukládají méně škrobu, který by sloužil jako rezerva (Cross *et al.*, 2006).

K úpravě denní uhlíkové bilance a snížení rychlosti růstu dochází také tehdy, když jsou rostliny vystaveny i méně závažnému snížení dostupnosti uhlíku, například snížené úrovni ozářenosti nebo oxidu uhličitého během dne. Možným vysvětlením je, že náhlé vyčerpání sacharidů („hladovění“) vysílá signály k procesům souvisejícím s růstem a ve velmi krátkém čase se růst zastaví. Opakování takových nepříznivých podmínek nebo dlouhodobé vystavení mírnějším

nedostatku uhlíku spouští úpravy, které optimalizují využití dostupného uhlíku tak, aby se zabránilo hladovění a zastavení růstu. Úpravy zahrnují vyšší rychlost syntézy škrobu během dne, dále úpravu rychlosti mobilizace škrobu přes noc tak, aby byla lineární a došlo téměř ke kompletní spotřebě škrobu syntetizovaného během dne, a také odpovídající snížení rychlosti růstu (Smith and Stitt, 2007).

Na rozdělování sacharidů má kromě délky fotoperiody vliv i denní a noční teplota. V přirozených podmínkách jsou rostliny většinou vystaveny teplým dnům a chladným nocím. Tým van Hoogdalem et al. (2021) se proto věnoval experimentům s *A. thaliana*, které ukázaly, jak se změny mobilizace zásob, pokud se běžné podmínky (teplý den (22 °C) a chladná noc (17 °C), označeno jako +DIF) změny na chladné dny a teplé noci (-DIF; 17 °C ve dne, 22 °C v noci). Listovou růžici *A. thaliana* můžeme rozdělit na dvě části – střední část, kde jsou listy mladé a fungují stále jako sinky, a vnější část tvořenou produkčními listy. Ve střední části došlo při -DIF na konci noci ke snížení hladin sacharózy a k up-regulaci genů hladovění v porovnání s +DIF, což naznačuje, že byl redukován transport sacharózy ze zdroje do sinku. Ve vnější části růžice nebyla hladina sacharózy u -DIF ovlivněna, ale přesto byly indukovány geny hladovění. Bylo to pravděpodobně způsobeno tím, že vysoká hladina sacharózy se nacházela pouze ve floému. V okolních mezofylových buňkách byla hladina sacharózy nízká a došlo tak k indukci genů hladovění. Ve zdrojových listech se přes den akumulovalo více škrobu v porovnání s vnitřní růžicí, a to jak za podmínek +DIF, tak -DIF. V listech vnitřní růžice byla během dne při -DIF mírně navýšena tvorba zásob škrobu, avšak na konci noci nebyly jeho hladiny nijak změněny v porovnání s +DIF. Při -DIF byla tvorba zásob škrobu během dne zpočátku snížena v pletivech vnější listové růžice, ale na začátku noci byla hladina škrobu v těchto pletivech podobná +DIF. Na konci noci byly hladiny škrobu ve vnější listové růžici výrazně redukovány v porovnání s +DIF. To naznačuje zvýšenou rychlost obratu škrobu během teplých nocí za podmínek -DIF (van Hoogdalem et al., 2021).

Zatím nejsou detailně známy mechanismy přizpůsobení fixace a alokace uhlíku v listech důležitých plodin náhlým změnám prostředí. Proto se tým Liang et al. (2021) věnoval kvantifikaci primární fixace a rozdělování uhlíku ve fotosynteticky aktivních listech kukuřice za podmínek prodloužené temné periody. Prodloužení noci mělo za následek snížení růstu rostlin a hladiny chlorofylu v listech, ale nemělo vliv na rychlost výměny CO₂ (měřena byla rychlost čisté fotosyntézy a respirace). V důsledku snížení dostupnosti fotoasimilátů se snížila akumulace škrobu a rozpustných sacharidů v produkčních listech, avšak došlo ke zvýšení množství asimilovaného uhlíku uloženého v produkčních listech. Tyto přechodně uložené zásoby uhlíku byly tvořeny převážně rozpustnými sacharidy a byly určeny především pro potřeby noční respirace. S pokračujícím vystavením rostlin podmínkám prodloužené noci došlo k poklesu absolutního množství uloženého

uhlíku k podílu denního fixovaného uhlíku, který byl ukládán v produkčních listech. To mohlo být způsobeno oslabenou syntézou škrobu. Snížily se také aktivity enzymů ADPG-pyrofosforylázy a syntázy škrobu. Ukázalo se tedy, že škrob i rozpustné sacharidy se podílejí na koordinaci nabídky uhlíku a růstu rostlin při náhlém nedostatku uhlíku, ale také, že mohou být zapojeny různými způsoby. Zatímco poměr škrobu k uhlíku fixovanému ve dne se zvýšil tak, aby byla zachována funkce listové čepele při akutním hladovění, množství i podíl škrobu v produkčních listech se s pokračujícím růstem rostliny snížily, aby byly splněny růstové nároky rostliny.

Existují tedy regulační mechanismy, které koordinují skladování a využívání uhlíku. Centrální roli v tom má pravděpodobně cukerná signalizace. Rostliny odpovídají na změny v dostupnosti uhlíku dvěma způsoby – akutní a aklimační odpovědí. Akutní odpověď se uplatňuje při náhlém nedostatku uhlíku. Druhá odpověď je aklimační, která vyladuje rovnováhu mezi nabídkou a poptávkou, aby optimalizovala kapacitu pro udržitelný růst. Tyto odpovědi se uplatňují během celého denního cyklu a slouží ke koordinaci rozdělování produktů fotosyntézy během dne, utilizaci škrobu v noci a také rychlost růstu (Smith and Stitt, 2007). Práci, která se věnuje stejným charakteristikám a aklimačním mechanismům u druhů produkujících sorbitol se mi nepodařilo nalézt. Není proto zřejmé, jak je celý mechanismus modifikován, pokud má daný rostlinný model k dispozici širší spektrum typů asimilátů, a jaké jsou odlišnosti, jsou-li nějaké, v účasti jednotlivých typů sacharidů při koordinaci spotřeby, skladování a růstu rostlin v denním cyklu u rostlin s různou tolerancí ke stresu. Bylo by proto vhodné se tomuto tématu dále věnovat a doplnit chybějící informace.

3. Materiál a metody

Experimentální část diplomové práce byla realizovaná na Katedře experimentální biologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

3.1 Rostlinný materiál

3.1.1 Výsev semen

Použitý rostlinný materiál byly druhy *Plantago lanceolata* a *P. maritima*. Osivo obou genotypů pocházelo od prověřených semenářských firem, konkrétně *P. lanceolata* od SemenaOnline s. r. o. a *P. maritima* od Rarexoticseeds. Semena byla vyseta do boxů (nebo také nádob) Araponics (od firmy Araponics, www.araponics.com) do výsevních košíčků s 0,8% agarem. Příprava agarů: odvážený agar byl v kádince dobře promíchán s destilovanou vodou a kádinka byla umístěna na 1-2 minuty do mikrovlnné trouby (obsah musí projít varem). Po vychladnutí byly tuhoucím agarem naplněny 10ml stříkačky, pomocí kterých se plnily výsevní košíčky (cca 2,5 ml agarů na jeden košíček; 18 košíčků v každém boxu) a do každého bylo následně umístěno jedno semeno, které bylo volně položeno na povrch agarů. Agar sloužil pouze jako opora pro klíčící semena.

3.1.2 Kultivace

Rostliny byly pěstovány hydroponicky v $\frac{1}{4}$ média dle Hoaglanda (Laštůvka, 1967). Příprava média je popsána v tabulce 1. Jednotlivé zásobní roztoky byly uchovávány v lednici při teplotě 4 až 6 °C. Kultivace rostlin probíhala v nádobách Araponics s 2 litry média, umístěných v kultivační místnosti (od firmy Photon System Instruments) za konstantních podmínek - 16hodinová fotoperioda, teplota 22 °C ve dne a 19 °C v noci, relativní vlhkost vzduchu 60 % a ozáření 100-120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR (fotosynteticky aktivní záření). První týden kultivace byly boxy uzavřené průhledným poklopem, aby se zajistila vysoká vzdušná vlhkost, na začátku druhého týdne byla víka odstraněna.

3.1.3 Kultivační médium

Jednotlivé složky Hoaglandova roztoku byly napipetovány do kanystru s destilovanou vodou podle tabulky 1 na základě požadovaného objemu média (podle počtu boxů Araponics).

Tabulka 1: Návod pro přípravu zásobních roztoků a 1/4 Hoaglandova média (Laštůvka, 1967).

¼ Hoaglandův roztok			
		Zásobní roztok (g·l ⁻¹)	Množství zás. roztoku (ml) pro přípravu 1 l média
Makroprvky	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	295,5	1
	KNO ₃	126,5	1
	KH ₂ PO ₄	34	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	61,4	1
	Každý namíchat zvlášť		
Mikroprvky	Fe citrát	5	0,5
	Mikroelementy II	*	0,5
	*Příprava: 50 ml zásobního roztoku Mikroelementy I + 950 ml destilované vody		
Mikroelementy I			
		Zásobní roztok (g·l ⁻¹)	
H ₃ BO ₃		14,3	
MnCl ₂ ·4H ₂ O		9,06	
ZnSO ₄		1,11	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O		0,38	
CuSO ₄		0,4	

3.1.4 Kultivační doba

Na základě předběžných experimentů byla stanovena délka kultivace pro *P. lanceolata* na 5 týdnů, pro pomaleji rostoucí *P. maritima* na 7 týdnů. Přibližně v polovině kultivační doby byla vyměněna média, v případě *P. lanceolata* proběhla výměna po 3 týdnech, v případě *P. maritima* po 4 týdnech.

3.2 Růstové analýzy

K charakterizaci růstu obou genotypů byly provedeny experimenty sledující změny množství biomasy po dobu 6 týdnů v případě *P. lanceolata* a po dobu 8 týdnů pro *P. maritima*. Každý týden bylo odebráno 8 rostlin od každého genotypu a byla zvážena zvlášť nadzemní část a kořeny. Následně byly jednotlivé části rostlin umístěny na alobalové misky a vysušeny v horkovzdušné sušárně (105 °C, 5 hodin). Poté byla pomocí analytických vah zjištěna hmotnost sušiny. Relativní rychlost růstu (RGR) byla vypočtena ze sušiny celých rostlin (součet suchých hmotností kořenů a prýtu) podle vzorce $RGR = (\ln W_1 - \ln W_2) / (t_2 - t_1)$, kde $\ln W$ je přirozený logaritmus hmotnosti sušiny v čase t . Výpočet dle Hoffmann and Poorter (2002). RGR byla stanovena pro jednotlivé týdny kultivace v rozmezí 3. až 6. týdne u obou genotypů. Byla orientačně zjištěna průměrná hmotnost semen obou genotypů. Tři balíčky semen byly po jednom nasypány do předem zvážených plastových misek a byla zaznamenána hmotnost misek se semeny. Poté byla semena v jednotlivých miskách spočtena a následně byla vypočtena průměrná hmotnost jednoho semene jako podíl hmotnosti semen a jejich počtu na misce.

Růstové charakteristiky byly sledovány také v rámci každého experimentu, kde byly rostliny odebírány pro analýzu obsahu sacharidů. V polovině světelné periody (14:00) bylo sklízeno postupně 6 rostlin od každého genotypu, přičemž odběry byly provedeny vždy co nejrychleji v daný čas (kompletní odběr obou variant v maximálně 30minutovém intervalu) a při odběru byly střídány genotypy. Pomocí žiletky byla oddělena a následně na analytických vahách zvážena zvlášť nadzemní část a kořeny. Získaná data sloužila k detailní charakterizaci rostlin odebíraných pro jiné analýzy.

3.3 Stanovení obsahu sacharidů v listech, kořenech a floému

3.3.1 Příprava vzorků pro analýzu obsahu rozpustných sacharidů a škrobu v listech a kořenech

Odběry vzorků byly prováděny na začátku (v 6:00), uprostřed (ve 14:00) a na konci světelné periody (ve 22:00). Ze 6 rostlin od každého genotypu byl na začátku, uprostřed a na konci světelné periody izolován produkční list (vždy byl vybírán nejdelší na rostlině), mladé listy (listy, které dosahovaly maximálně 40 % délky nejdelšího listu) a kořeny byly odebírány pouze v polovině světlené periody. Listy byly změřeny, zváženy a umístěny do 2ml mikrozkuvek. Mikrozkuvky byly předem očíslovány, zváženy a byla jim propíchnuta víčka. Všechny vzorky byly ihned po odběru umístěny do termonádoby s tekutým dusíkem a následně byly buď dále zpracovány, nebo uloženy v mrazáku při -80 °C.

Dalším krokem zpracování vzorků bylo vysušení v lyofilizátoru (Lyovac GT 2, Finn-Aqua) po dobu min. 12 hodin. Hned po lyofilizaci byly mikrozkušavky zváženy na analytických vahách. Ke každému vzorku bylo následně přidáno 0,5 ml 80% methanolu a obsah mikrozkušavky byl promíchán jehlou. Vzorky s přidáním methanolem byly inkubovány v termobločku (The Cube Dry Bath, Cleaver) při teplotě 75 °C po dobu 15 minut. Poté byly vzorky umístěny do SpeedVacu (Concentrator plus, Eppendorf; program V-AL, 2,5 hodiny při 60 °C a 1,5 hodiny při 45 °C), aby došlo k vakuovému odpaření methanolu. Následně bylo k peletům přidáno odpovídající množství demineralizované vody (Mili Q, Millipore) podle tabulky 2. Aby se docílilo extrakce rozpustných sacharidů, byly mikrozkušavky umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně (35 kHz; Bandelin Sonorex, Maneko) a následně, pro oddělení supernatantu, byly centrifugovány (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) po dobu 10 minut při maximálním výkonu (13200 rpm).

Tabulka 2: Objem miliQ vody přidávaný ke vzorkům na základě jejich suché hmotnosti.

Hmotnost sušiny [mg]	Přídavek miliQ vody [ml]
<10	0,2
10-25	0,3
25-45	0,5
>45	1

Dále byly připraveny 2ml mikrozkušavky s membránovými filtry (centrifugační filtry 0,45 µm Mini Spin Columns, Chromservis.eu) a byly popsány odpovídajícími čísly. Do těchto zkumavek byl do vloženého filtračního nástavce přepipetován supernatant a centrifugací přefiltrován (3 minuty při 8000 rpm). Poté byl použitý filtr odstraněn a mikrozkušavky byly uloženy do mrazáku (-20 °C) a byly tak připraveny k analýze. Pelety zbylé po odstranění supernatantu byly dále použity k analýze obsahu škrobu.

K peletům byl přidán 1 ml ultračisté vody, vzorky byly promíchány jehlou, umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně a následně centrifugovány opět na 15 minut při maximálním výkonu. Poté byl pomocí pipety odstraněn supernatant a celý postup se opakoval (celkem třikrát). K takto promytým peletům bylo přidáno 0,5 ml 0,1M Na-acetátového pufru (pH 4,5; postup přípravy v tabulce 3) a vzorky byly opět promíchány jehlou. Mikrozkušavky byly umístěny do autoklávu (1 cyklus, program na sterilizaci médií – 20 minut při teplotě 121 °C a tlaku 220 kPa). Po vychladnutí vzorků na 4 °C bylo přidáno 100 µl enzymatického roztoku připraveného podle tabulky 4. Vzorky s přidáním enzymatickým roztokem byly inkubovány v termobločku při 40 °C přes noc. Následující den ráno byla zvýšena teplota termobločku na 95 °C a vzorky byly této teplotě vystaveny po dobu 5 minut, byla tím zajištěna inaktivace enzymů. Následovalo odpaření na SpeedVacu do sucha

(program V-AQ, 1,5 hodiny při 60 °C a 1,5 hodiny při 45 °C). Po odpaření se vzorky uložily do exikátoru nebo dále zpracovávaly. Dalším krokem bylo rozpuštění glukózy vzniklé enzymatickým štěpením škrobu v odpovídajícím množství ultračisté vody (opět podle tabulky 2), následovala 15minutová ultrazvuková lázeň a 10minutová centrifugace na maximální výkon. Stejně jako v přípravě vzorků pro analýzu cukrů, byly i tyto vzorky přefiltrovány do nové mikrozkuhavky přes membránový filtr pomocí centrifugace (3 minuty při 8000 rpm). V tomto bodě byly vzorky zamrazeny (v -20 °C) a připraveny k analýze.

Tabulka 3: Postup přípravy 0,1M Na-acetátového pufru.

Roztoky A a B se připravují odděleně

- Roztok A: 0,2M octan sodný (CH₃COONa) – 200 ml
- Roztok B: 0,2M kyselina chlorovodíková (HCl) – 200 ml

Do roztoku A byl umístěn pH metr a postupně byl přikapáván roztok B až do dosažení pH 4,5 (roztok B se tedy nevyužije celý). Do dalšího použití musí být pufr uchovávan v lednici, nejdéle však 2 až 3 měsíce.

Tabulka 4: Postup přípravy enzymatického roztoku.

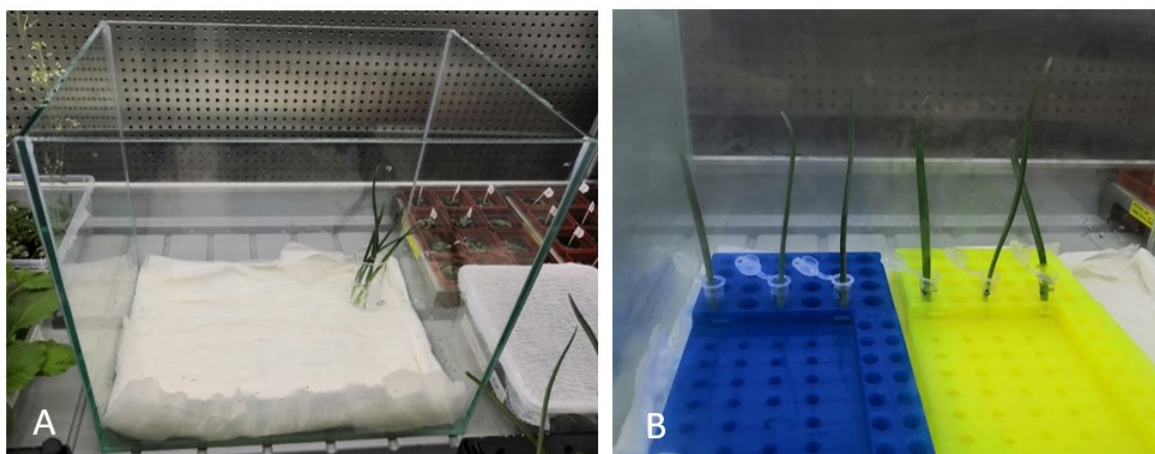
Příprava roztoku na zpracování 24 vzorků: 30 mg amyloglukosidázy a 30 mg α -amylázy rozpustit ve 3 ml 0,1M Na-acetátového pufru (pH 4,5) a pečlivě protřepat.

Roztok je nutné připravit vždy čerstvý, maximálně 1 hodinu před použitím.

3.3.2 Jímání floémových exudátů a jejich příprava pro analýzu obsahu sacharidů

Dalším metodickým přístupem bylo jímání a následná analýza floémových exudátů produkčního listu. V kultivační místnosti bylo připraveno uzavíratelné akvárium s navlhčenou buničinou pro zajištění vysoké vzdušné vlhkosti, stojánek s předem zváženy a očíslovanými mikrozkuhavkami, které byly naplněné 1,8 ml ultračisté vody, a kádinka s cca 25 ml 20mM roztoku K₂EDTA o pokojové teplotě (obrázek 1). Nejprve bylo očíslováno 6 rostlin a následně jim byl pomocí žiletky odebrán nejdelší produkční list, který byl umístěn do kádinky s K₂EDTA do akvária. Inkubace v K₂EDTA byla zahájena vždy ve 12:30, trvala 1 hodinu a sloužila k omytí řezné plochy a zabránění depozice kalózy v místě řezu. Po 1 hodině byly listy přeneseny do mikrozkuhovek označených odpovídajícími čísly,

kde po dobu 4 hodin probíhalo samotné jímání exudátů. Celý tento proces probíhal v uzavřeném akváriu, aby byla zajištěna vysoká vzdušná vlhkost a listy tak co nejméně transpirovaly. Po ukončení jímání exudátů byly mikroskopické uzavřeny, zváženy a umístěny do mrazáku (-20 °C). Listy po exudaci byly také zváženy a naskenovány (skener EPSON Perfection V800 Photo), aby u nich mohla být následně zjištěna listová plocha (v programu ImageJ/Fiji). Mikroskopické s najímanými exudáty byly umístěny do SpeedVacu (program V-AQ, 3 hodiny při 60 °C a 2,5 hodiny při 45 °C; nutné nechat otevřená víčka), aby došlo k odpaření vody. Poté bylo přidáno 20 µl ultračisté vody a vzorky byly připraveny k analýze.



Obrázek 3: Jímání floémových exudátů v akváriu v kultivační místnosti. A – inkubace listů v roztoku K2EDTA; B – jímání exudátů produkčních listů.

3.4 Analýza obsahu sacharidů

Analýza obsahu a spektra sacharidů byla provedena pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC) s refraktometrickou detekcí. Parametry měřícího systému byly: mobilní fáze - MilliQ H₂O; průtoková rychlost 0,5 ml·min⁻¹; teplota kolony 80 °C; objem injikovaného vzorku 50 µl (v případě exudátů 10 µl); předkolona Shodex Ca²⁺ (SC-G) a kolona Shodex Ca²⁺ (SC1011) (analýza rozpustných sacharidů v pletivech), případně předkolona Shodex Pb²⁺ (SP-G) a kolona Shodex Pb²⁺ (SP0810) (analýza exudátů a škrobu po enzymatickém štěpení); isokratická pumpa SISW HPI-300 nebo Delta Chrom SDS 030; refraktometrická detekce (detektor Shodex RI-71). Sacharidy byly identifikovány a kvantifikovány na základě porovnání retenčních časů a plochy píku s odpovídajícími standardy (koncentrace 1 mg·ml⁻¹; Sigma-Aldrich) v počítačovém programu CLARITY (DataApex).

3.5 Měření rychlosti čisté fotosyntézy, rychlosti transpirace a vodivosti průduchů

Rychlost čisté fotosyntézy (P_N) byla měřena pomocí gazometrického systému Licor (LI-6400 XT Portable Photosynthesis System, LI-COR). Měření probíhalo v rozmezí 9:00 až maximálně 14:00, tedy v první polovině světelné periody. Přístroj byl sestaven podle návodu (<https://www.licor.com/documents/vtlnaiycs2izvrscnu1>) s pomocí kterého byl také připraven systém pro měření a zkontrolovány všechny funkce.

K měření byl využit nejdelší produkční list, jehož střední část byla uzavřena do listové komory přístroje. Před zapnutím programu byla nastavena teplota listové komory na 22 °C, průtok vzduchu na 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ a koncentrace CO_2 v listové komoře na 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Poté bylo spuštěno měření pomocí programu TimedLamp2. Během prvních 10 minut probíhalo měření za tmy, aby se list aklimatizoval, po 10 minutách se ozáření nastavila na 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a poté každých 5 minut zvyšovala o dalších 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Během posledních 5 minut byl list vystaven ozáření 900 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR. Po celou dobu měření byla monitorována relativní vlhkost vzduchu, aby dlouhodobě neklesla pod 50 %. To bylo zajištěno vložením nádoby s volnou vodní hladinou do cesty přívodu vzduchu do přístroje. Hodnoty P_N byly zaznamenávány každou minutu. Vzhledem k časové náročnosti byla během jednoho dne změřena rychlost čisté fotosyntézy u 6 až 7 rostlin, přičemž docházelo ke střídání genotypů, aby byly oba genotypy měřeny za podobných podmínek.

Velikost měřené oblasti listové komory byla 2x3 cm a také v programu byla přednastavena velikost měřené listové plochy na 6 cm^2 . Pokud list vyplnil celou komoru, bylo ponecháno původní nastavení. Pokud byl ale list menší (zejména v případě *P. maritima*), musela být velikost listové plochy následně vypočtena a v souboru s výstupy měření manuálně upravena dle skutečnosti. Po ukončení programu byla u každého listu vyříznuta pomocí žiletky měřená část a u získaného segmentu byly změřeny délky stran pro výpočet plochy, segment byl zvážen a umístěn do sušárny (105 °C po dobu 5 hodin) pro získání hmotnosti sušiny daného segmentu. Vzhledem k rozdílné struktuře listů *P. lanceolata* a *P. maritima* byla stanovena specifická listová plocha (SLA) vztažená jak na čerstvou hmotnost (SLAFW), tak na sušinu (SLADW) segmentů listů. Vypočtena byla jako podíl plochy segmentu listu a jeho čerstvé, popřípadě suché hmotnosti.

3.6 Anatomicko-histochemická analýza

Pro anatomickou analýzu sloužící k ověření přítomnosti endodermis v listech jitrocele a sledování jejího vývoje bylo od každého genotypu odebráno 6 celých nadzemních částí rostlin a kořenové systémy ze 2 rostlin. Stáří rostlin bylo 5 (*P. maritima*) a 7 týdnů (*P. lanceolata*). Jednotlivé nadzemní části a kořenové systémy byly umístěny do 50ml uzavíratelných plastových zkumavek naplněných 4% formaldehydem a byly uchovávány do zpracování (maximálně 1 měsíc) při 4 °C.

Celkem byli využiti 3 jedinci od každého genotypu – z každého byl odebrán a následně změřen nejdelší produkční list, mladý list a primární kořen (u *P. lanceolata* těžko odlišitelný, proto byl zvolen nejdelší kořen). Části rostlin byly nejprve přeneseny ze zkumavek do velké Petriho misky s vodou, aby došlo k oplachu fixáže. Následně byly připraveny jednotlivé segmenty - v případě produkčního listu byly řezy provedeny ve čtvrtině a polovině délky (od báze), u mladého listu pouze v polovině a u kořene ve čtvrtině, polovině a ¼ délky (od báze). Tyto segmenty byly umístěny do bezové duše a upevněny do ručního mikrotomu. Tloušťka řezu byla nastavena na 100 µm a objekt byl řezán pomocí botanické břitvy. Řezy byly shromažďovány do jamek s vodou, následně byly přemístěny do kapky 65% glycerolu na podložní sklíčko a přikryté krycím sklíčkem. Díky autofluorescenci (excitace UV) bylo možné pozorovat endodermis u obou druhů jitrocele i na nebarvených řezech.

S cílem ověřit přítomnost a charakter apoplastické bariéry a přítomnost škrobových zrn byly řezy z jednotlivých segmentů nasbírány do barvicích košíčků a byla využita tato histochemická barvení:

- Berberin hemisulfát (0,1 % w/v aq.) – detekce ligninu; barvení 1 hodinu (Brundrett *et al.*, 1988) + 10 minut dobarvení genciánovou violetí (0,05 % w/v aq.) kvůli potlačení autofluorescence a přebarvení nespecifické vazby berberinu v nemodifikovaných buněčných stěnách; pozorování ve fluorescenčním mikroskopu při excitaci UV
- Sudanová červeň (Sudan Red 7B; 0,01 % w/v) – detekce suberinu; barvení 1 hodinu (Brundrett *et al.*, 1991); pozorování ve světlém poli
- Fluorol Yellow 088 (0,01 % w/v) – detekce suberinu; barvení 1 hodinu (Brundrett *et al.*, 1991); pozorování ve fluorescenčním mikroskopu při excitaci UV
- Lugolův roztok – detekce škrobových zrn v pochvě svazku cévního; barvení cca 5 vteřin (Němec, 1962); pozorování ve světlém poli

Po barvení byly košíčky opláchnuty destilovanou vodou (v případě Sudanové červeně a Fluorol Yellow nejprve 0,5% w/v SDS (sodiumdodecylsulfát) a poté destilovanou vodou) a řezy byly následně umístěny na podložní sklíčko s 65% glycerolem, přikryty krycím sklíčkem a pozorovány mikroskopem Olympus BX51 ve světlém poli nebo jako fluorescence při excitaci UV zářením (s filtrem UV Olympus U-MWU). Snímky byly pořízeny digitální kamerou Apogee U4000.

Výsledky anatomické analýzy byly hodnoceny semikvantitativně. Byly rozlišovány tři kategorie velikostí cévních svazků (CS) podle počtu buněk pochvy cévního svazku na řezu:

- L – velké CS, počet buněk tvořících pochvu CS vyšší nebo roven 17
- M – středně velké, počet buněk 8 až 16
- S – malé, počet buněk nižší nebo roven 7

Z každé sady řezů bylo pozorováno 10 až 15 cévních svazků, které byly zařazeny do jedné z kategorií a byla sledována přítomnost endodermis s vytvořenými Casparyho proužky, popřípadě tečkami. Semikvantitativní analýza byla provedena u produkčních a mladých listů, v případě kořenů byla pouze ověřena přítomnost endodermis s Casparyho proužky/tečkami.

V experimentu 6 byly na začátku a na konci světelné periody odebrány 2 rostliny od každého genotypu a byl z nich izolován nejdelší produkční a mladý list. Postup zhotovení řezů a přípravy preparátů byl stejný jako ten popsáný na začátku této kapitoly, jen s tím rozdílem, že řezy byly prováděny pouze v polovině délky listů. Řezy byly v tomto případě barveny Lugolovým roztokem, aby došlo k vizualizaci škrobových zrn. Pro kontrolu byly zhotoveny i nebarvené řezy. Byla sledována přítomnost škrobu v pochvách největších cévních svazků listů (velikost L) přítomnost asimilačního škrobu v chloroplastech a změny v množství škrobu během noci.

3.7 Zpracování dat

Grafy a tabulky byly vytvořeny v programu Microsoft Office Excel 365, který byl také využitý k vypočtení průměrů a směrodatných odchylek u jednotlivých experimentů. Krabicové (boxplot) grafy byly vytvořeny pomocí webové aplikace BoxPlotR (<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>). Data byla statisticky vyhodnocena v programu NCSS 9 Statistical Software (2013; NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA; ncss.com/software/ncss). Pro porovnání experimentálních výsledků byl při normálním rozdělení dat použitý párový Equal Variance T-Test. Pokud data nebyla rozdělena normálně, byl ke zhodnocení použitý Mann-Whitney Test. Srovnání byla provedena na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4. Přehled experimentů

Ve všech experimentech bylo pracováno s rostlinami *P. lanceolata* a *P. maritima*, které byly pěstovány ze semen v nádobách Araponics s Hoaglandovým roztokem. Kromě experimentu 5 bylo stáří rostlin v době oděru vždy 5 (*P. lanceolata*) a 7 (*P. maritima*) týdnů. Stejně tak byla pro všechny experimenty společná doba výměny média - v polovině kultivační doby (3 týdny pro *P. lanceolata* a 4 týdny pro *P. maritima*).

Experiment 1

- Odběr 24 rostlin od každého genotypu na zpracování vzorků pro jednotlivé analýzy:
 - 6 rostlin na analýzu obsahu sacharidů
 - 6 rostlin na jímání exudátů floému
 - 12 rostlin na denní/noční dynamiky škrobu (odběry na konci dne a na konci noci)
 - 18 rostlin na růstovou analýzu (rostliny z analýzy cukrů a škrobu)
- Celkem 186 vzorků

Experiment 2

- Odběr 28 rostlin od každého genotypu na zpracování vzorků pro jednotlivé analýzy:
 - 6 rostlin na analýzu obsahu sacharidů
 - 6 rostlin na jímání exudátů floému
 - 12 rostlin na denní/noční dynamiky škrobu (odběry na konci dne a na konci noci)
 - 18 rostlin na růstovou analýzu (využity rostliny z analýzy cukrů a škrobu)
 - 4 rostliny na měření fotosyntézy
- Celkem 178 vzorků

Experiment 3

- Odběr 28 rostlin od každého genotypu na zpracování vzorků pro jednotlivé analýzy:
 - 6 rostlin na jímání exudátů
 - 12 (*P. lanceolata*) a 13 (*P. maritima*) rostlin na měření fotosyntézy
 - Nadzemní části a kořenové systémy z rostlin na jímání exudátů floému byly odebrány na anatomicko-histochemickou analýzu a byly odebrány také produkční listy ze zbylých (jinak nevyužitých) rostlin
- Celkem 53 vzorků

Experimenty 4 a 5

- Délka kultivace - 7 týdnů (*P. lanceolata*) a 9 týdnů (*P. maritima*)
- Výměna média po 3 a 6 týdnech pro *P. lanceolata* a 4 a 8 týdnech pro *P. maritima*
- Každý týden odběr 8 rostlin od každého genotypu na růstové analýzy
- 6 rostlin od každého genotypu na jímání exudátů floému a 11 rostlin na měření rychlosti fotosyntézy (*P. lanceolata* 5 týdnů staré a *P. maritima* 7 týdnů staré)
- Celkem 162 vzorků

Experiment 6

- Odběr 2 rostlin od každého genotypu pro anatomickou analýzu:
 - Ze 2 rostlin odběr nejdelšího produkčního a mladého listu na anatomicko-histochemickou analýzu (ověření přítomnosti škrobu v pochvách cévních svazků)

5. Výsledky

5.1 Optimalizace délky kultivační doby

Pro experimentální práci byly zvoleny dva druhy jitrocele, glykofytní *Plantago lanceolata* a halofytní *P. maritima*. Rostliny byly pěstovány v kultivační místnosti v nádobách Araponics s ¼ médiem dle Hoaglanda (Laštůvka, 1967). Klíčení semen i následný růst rostlin byl bezproblémový. Semena obou genotypů začala klíčit velmi rychle, už po 4 dnech bylo možné pozorovat prorůstání děložních lístků. Druh *P. lanceolata* rostl rychleji, než *P. maritima*, proto bylo nutné optimalizovat délku kultivační doby - v případě *P. lanceolata* byla stanovena na 5 týdnů, pro *P. maritima* na 7 týdnů (obrázek 4). Délka kultivace byla stanovena tak, aby byly rostliny v době odběru plně vyvinuté a poskytly dostatek biomasy pro zamýšlené analýzy, ale zároveň aby nezačaly kvést. Ze všech kultivovaných rostlin (cca 150 od každého druhu) jsem pozorovala pouze u dvou rostlin *P. maritima* tvorbu základů květních struktur – tyto rostliny nebyly pro žádnou z analýz použity. Jako produkční list (zdrojový) byl pro analýzy zvolen nejdelší list na rostlině v době odběru a jako mladé listy (sinkové) ty nejmladší listy z růžice, které dosahovaly méně než 40 % délky nejdelšího listu. Přestože byla délka kultivační doby určena tak, aby byly rostliny v době odběru podobně velké, byly poměrně variabilní v rámci jednoho genotypu i v porovnání s druhým.



Obrázek 4: Velikost rostlin v době odběru. A – *P. lanceolata*, stáří 5 týdnů; B – *P. maritima*, stáří 7 týdnů; C – rostliny v nádobách Araponics v kultivační místnosti, vlevo *P. lanceolata*, stáří 5 týdnů, vpravo *P. maritima*, stáří 7 týdnů.

5.2 Růstové analýzy

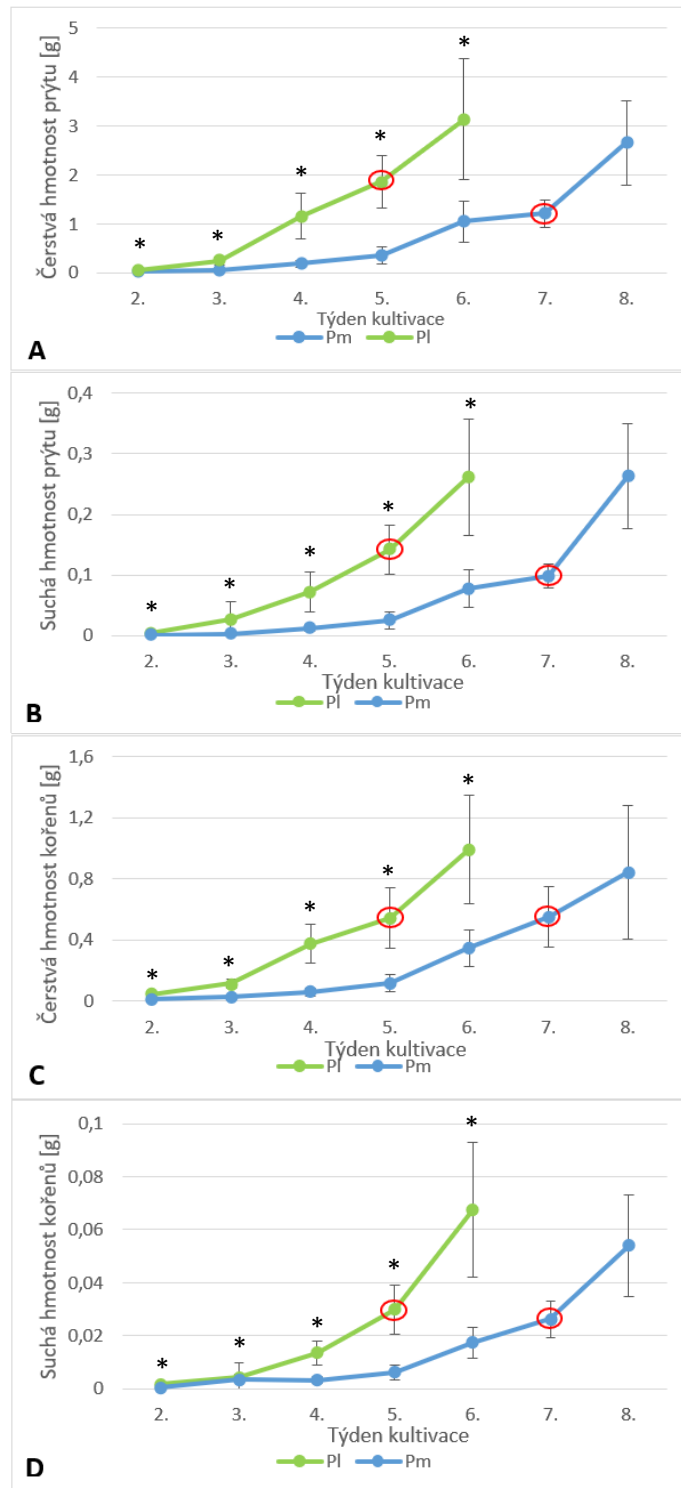
Z předběžných optimalizačních výsledků bylo zřejmé, že oba genotypy rostou různě rychle. Pro sledování rychlosti růstu byly rostliny odebírány od druhého týdne vývoje v týdenních intervalech v průběhu doby o týden delší než stanovená kultivační doba pro jednotlivé genotypy. Všechny části rostlin *P. lanceolata* měly vždy vyšší suchou i čerstvou hmotnost než *P. maritima* (obrázek 5). Ve všech týdnech odběru, kde je možné srovnání (týdny 2 až 6) jsou statisticky průkazné rozdíly mezi genotypy (obrázek 5). V týdnech, kdy probíhaly odběry rostlin pro analýzy sacharidů a měření fotosyntézy (červeně označené body), byly hmotnosti všech částí rostlin podobné, což potvrzuje vhodně zvolenou délku kultivační doby pro oba genotypy. Dále byla orientačně zjištěna průměrná hmotnost jednoho semene u obou genotypů (tabulka 5) a relativní rychlost růstu rostlin (RGR; tabulka 6), tedy přírůstek sušiny za jednotku času vztažený na počáteční biomasu v průběhu kultivace. RGR rostlin *P. maritima* byla nižší v intervalu 3. až 5. týdne, ale v 6. týdnu kultivace byla RGR vyšší než u *P. lanceolata* (tabulka 6).

Tabulka 5: Orientační průměrná hmotnost jednoho semene dvou druhů jitrocele. Pl – *Plantago lanceolata*, Pm – *Plantago maritima*.

	Průměrná hmotnost jednoho semene [mg]
Pl	1,7
Pm	0,6

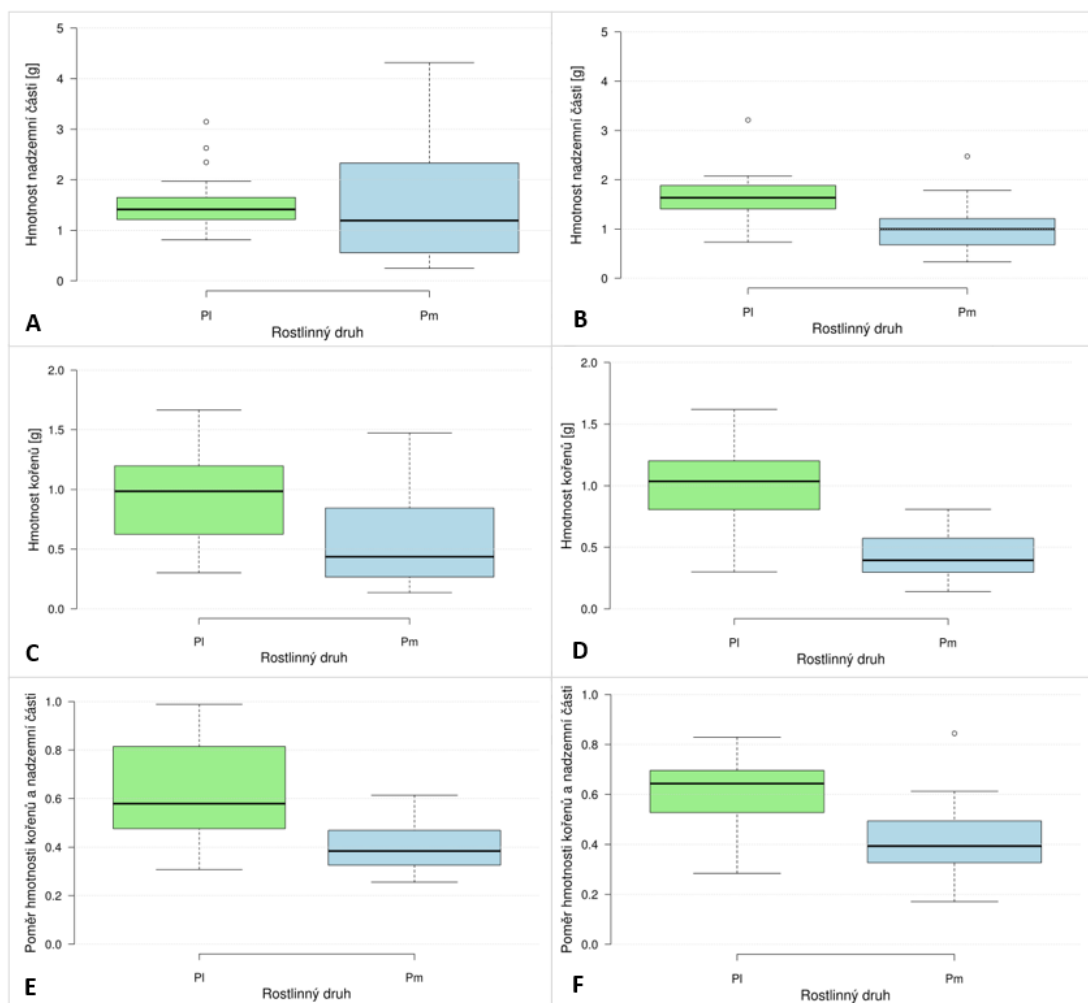
Tabulka 6: Relativní rychlost růstu (RGR) dvou druhů rostlin jitrocele během kultivace [$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{týden}^{-1}$]. Experiment 5. Pl – *Plantago lanceolata*, Pm – *Plantago maritima*; hydroponická kultivace. n = 8

	3. týden	4. týden	5. týden	6. týden
Pl	1,7493	1,0291	0,7025	0,6535
Pm	1,5771	0,8434	0,7294	1,1142



Obrázek 5: Hmotnost jednotlivých částí rostlin v průběhu kultivace dvou druhů jitrocele - čerstvá (A) a suchá (B) hmotnost nadzemní části a čerstvá (C) a suchá (D) hmotnost kořenů. Experiment 5; PI – *Plantago lanceolata*, Pm – *Plantago maritima*. Hydroponická kultivace. Červeně označené body v grafech znázorňují týden odběru rostlin pro další analýzy. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky, $n = 7-8$. Signifikance rozdílů byla hodnocena standartním t-testem (při normálním rozdělení dat) nebo Mann-Whitney testem (pokud rozdělení dat nebylo normální). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami; $\alpha = 0,05$.

U dalších dvou opakování (experiment 1 a 2) byla provedena doplňková růstová analýza rostlin v době jejich odběru pro experimenty zaměřené na sacharidovou bilanci. Z výsledků (obrázek 6A, C a 6B, D) je zřejmé, že rostliny *P. lanceolata* měly větší biomasu kořenů i prýtu než *P. maritima*. Stejně tak je to patrné i z fotografií (obrázek 4). Průměrná čerstvá hmotnost kořenů *P. lanceolata* byla okolo 1 g, zatímco kořeny *P. maritima* vážily průměrně 0,4-0,5 g. Mezi kořenovými systémy byly i makroskopické rozdíly – *P. lanceolata* měla delší kořeny, bohatěji větvené a nebylo možné odlišit primární kořen. Oproti tomu *P. maritima* měla kořeny kratší, ale s dobře odlišitelným křivým primárním kořenem. Všechny rozdíly v hmotnostech nadzemních částí a kořenů jsou statisticky průkazné, kromě hmotnosti nadzemní části v experimentu 1, kde ale pozorujeme stejný trend. Zatímco čerstvá hmotnost kořenů *P. lanceolata* byla v obou opakováních statisticky významně vyšší než kořenů *P. maritima*, rozdíl v čerstvé hmotnosti nadzemní části byl nižší (v experimentu 1 (obrázek 6A, C, E) nebyl statisticky průkazný, v experimentu 2 (obrázek 6B, D, E) ano). Poměr hmotností kořenů a nadzemní části byl v obou opakováních průkazně vyšší u *P. lanceolata*, což znamená, že tyto rostliny investují více do kořenového systému, než rostliny *P. maritima*.



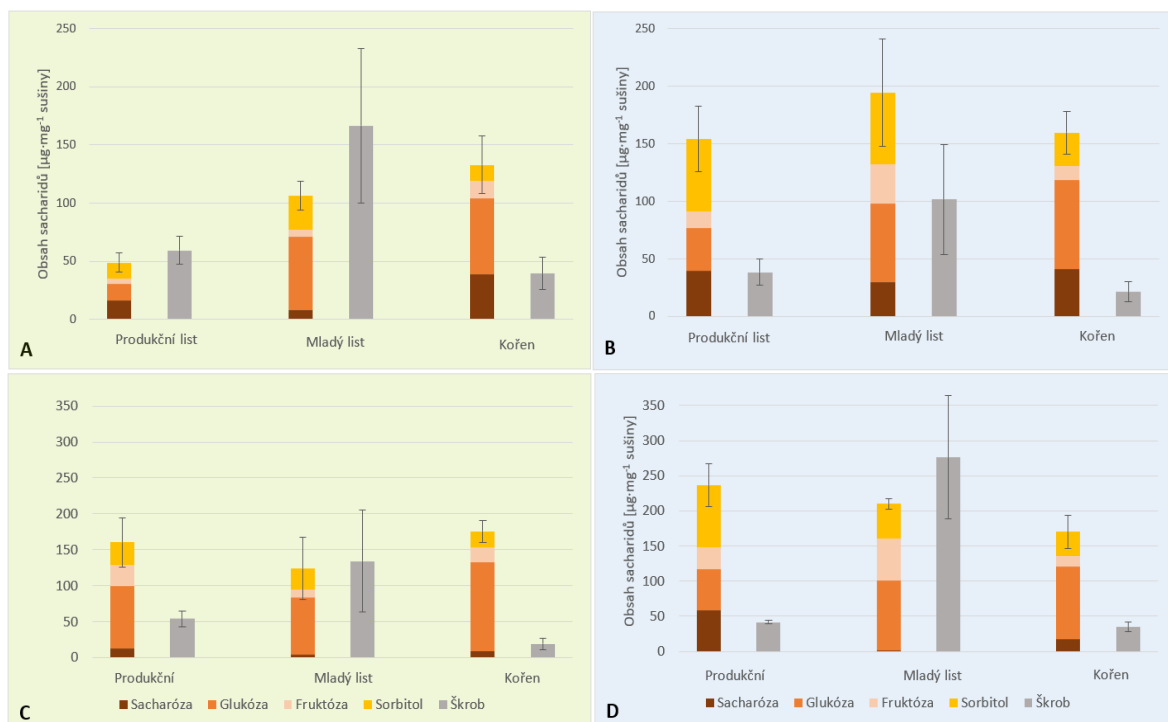
Legenda k obrázku 6 je na následující straně.

Obrázek 6: Růstová analýza dvou druhů jitrocele – čerstvá hmotnost prýtu (A, B), kořenů (C, D) a poměr čerstvé hmotnosti kořenů a prýtu (E, F). A, C, E: Experiment 1; B, D, F: Experiment 2; Pl – *Plantago lanceolata*, Pm – *Plantago maritima*. Hydroponická kultivace, odběr rostlin po 5 (*P. lanceolata*) a 7 (*P. maritima*) týdnech kultivace. Úsečka v grafu značí medián. Odlehlé hodnoty představují body nad chybovými úsečkami. Chybové úsečky znázorňují mezikvartilové rozpětí, n = 18. Signifikance rozdílů byla hodnocena standartním t-testem (při normálním rozdělení dat) nebo Mann-Whitney testem (pokud rozdělení dat nebylo normální). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami; $\alpha = 0,05$.

5.3 Stanovení obsahu sacharidů v listech, kořenech a v exudátech floému

5.3.1 Obsah rozpustných sacharidů a škrobu v listech a kořenech

Pomocí HPLC byl sledován obsah a spektrum sacharidů ve vybraných orgánech – v produkčních a mladých listech a kořenech (obrázek 7). Rostliny byly odebírány v polovině světelné periody (14:00). V produkčních a mladých listech měly rostliny *P. maritima* vyšší obsah rozpustných sacharidů než *P. lanceolata* a rozdíly mezi genotypy byly statisticky průkazné (tabulka 7). V obou experimentech byly hladiny rozpustných sacharidů v kořenech u obou genotypů srovnatelné. V experimentu 1 byl v produkčních listech *P. lanceolata* vyšší obsah škrobu než u *P. maritima*, v experimentu 2 byl pozorovatelný stejný trend, i když rozdíl nebyl statisticky průkazný. V mladých listech a kořenech byl obsah škrobu v prvním experimentu vyšší u *P. lanceolata*, ale v experimentu 2 u *P. maritima*. U obou genotypů byl v porovnání s produkčními a mladými listy obsah škrobu v kořenech nižší, a to v obou experimentech. Podíl sorbitolu k celkovým rozpustným sacharidům v produkčních listech a kořenech byl signifikantně vyšší u *P. maritima* než u *P. lanceolata* a pohyboval se v rozmezí 18 až 41 % (pro *P. lanceolata* to bylo 13 až 28 %). V případě mladých listů byla pozorována stejná tendence.



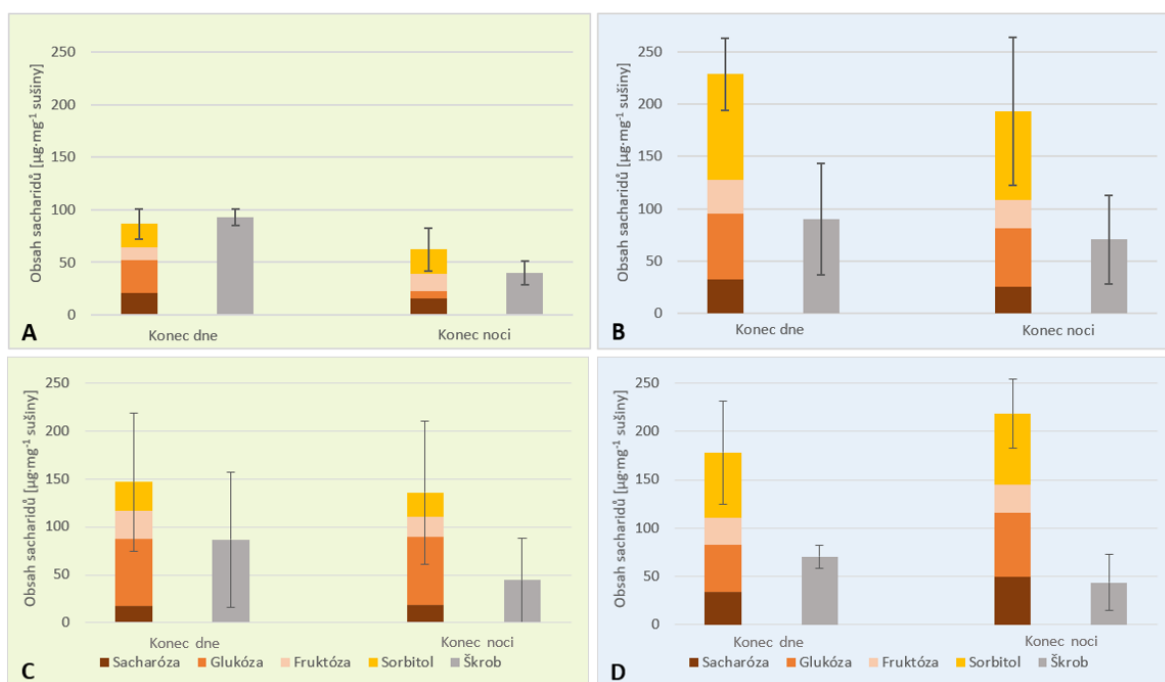
Obrazek 7: Obsah rozpustných sacharidů a škrobu v jednotlivých částech rostliny u dvou druhů jitrocele – *P. lanceolata* (A, C) a *P. maritima* (B, D). A, B - Experiment 1; C, D – Experiment 2. Produkční list – nejdelší na rostlině, mladý list (menší než 40 % délky nejdelšího produkčního listu). Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, v případě rozpustných sacharidů pro jejich sumu. Hydroponická kultivace, odběr rostlin po 5 (*P. lanceolata*) a 7 (*P. maritima*) týdnech. Škrob byl stanoven jako množství glukózy po enzymatickém štěpení. $n = 6$, resp. $n = 4$ pro mladý list *P. maritima* v experimentu 2 (D). Statistické hodnocení rozdílů mezi genotypy viz tabulka 7.

Tabulka 7: Výsledky statistického hodnocení signifikance rozdílů v obsahu sacharidů mezi *P. lanceolata* a *P. maritima* v jednotlivých částech rostliny. Signifikance rozdílů byla hodnocena standartním t-testem (při normálním rozdělení dat) nebo Mann-Whitney testem (pokud rozdělení dat nebylo normální). Statisticky významné rozdílů jsou označeny hvězdičkami, ns – nesignifikantní rozdíl; $\alpha = 0,05$.

	Produkční list		Mladý list		Kořen	
	Rozp. sach.	Škrob	Rozp. sach.	Škrob	Rozp. sach.	Škrob
Experiment 1	*	*	*	*	ns	*
Experiment 2	*	ns	*	*	ns	*

5.3.2 Obsah rozpustných sacharidů a škrobu na začátku a na konci světelné periody

Pro charakterizaci stavu zásob po temné periodě byly odebrány nejdelší produkční listy rostlin *P. lanceolata* a *P. maritima* na konci světelné periody (22:00) a na konci noci (6:00) a byla provedena analýza obsahu a spektra sacharidů pomocí HPLC (obrázek 8). Pro sacharidovou bilanci na konci dne i na konci noci se pro daný materiál zdá charakteristické, že produkční listy obsahovaly více rozpustných sacharidů než škrobu. Výjimkou z toho byly rostliny *P. lanceolata* v experimentu 1 (obrázek 8A), u kterých byl na konci dne zjištěn mírně vyšší obsah škrobu než rozpustných sacharidů. Z dat vyplývá, že v experimentu 1 obsahovaly rostliny *P. maritima* na konci dne více rozpustných sacharidů než *P. lanceolata*, v experimentu 2 byl pozorován trend stejným směrem, ale rozdíl nebyl statisticky průkazný (obrázek 8C, tabulka 8). V případě škrobu byla tendence opačná – vyšší obsah škrobu byl na konci dne nalezen u *P. lanceolata*, avšak tento rozdíl nebyl statisticky průkazný. V prvním experimentu na konci noci obsahovaly rostliny *P. lanceolata* méně rozpustných sacharidů než *P. maritima*, v experimentu 2 bylo možné pozorovat stejný trend, rozdíl ale nebyl statisticky významný. Obsah škrobu byl na konci noci v experimentu 1 vyšší u *P. maritima*, v experimentu 2 u *P. lanceolata*, tyto rozdíly nebyly statisticky průkazné. U obou genotypů docházelo během temné periody k trendu poklesu obsahu rozpustných sacharidů, ale bez statisticky významného rozdílu (tabulka 9). Jedinou výjimkou byly rostliny *P. maritima* v experimentu 2 (obrázek 8D), u kterých došlo k mírnému zvýšení obsahu rozpustných sacharidů, avšak také bez statisticky průkazného rozdílu. Během temné periody došlo k poklesu hladiny škrobu u obou genotypů, kdy rostlinám *P. maritima* na konci noci zbývalo 60-80 % zásob škrobu, zatímco *P. lanceolata* pouze 40-50 % (v případě *P. lanceolata*, statisticky průkazný rozdíl v obou experimentech). Z grafů je také zřejmé, že na konci dne i na konci noci obsahovaly rostliny *P. maritima* více sorbitolu, než *P. lanceolata*. Pro znázornění 24hodinové dynamiky obsahu rozpustných sacharidů a škrobu byl vytvořen graf shrnující dynamiku obsahu sacharidů v produkčním listu - obrázek S1 (v příloze).



Obrázek 8: Obsah rozpustných sacharidů a škrobu v produkčním listu na konci dne (22:00) a na konci noci (6:00) u dvou druhů jitrocele – *P. lanceolata* (A, C) a *P. maritima* (B, D). A, B - Experiment 1; C, D – Experiment 2. Produkční list – nejdelší na rostlině. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchytky, v případě rozpustných sacharidů pro jejich sumu. Hydroponická kultivace, odběr rostlin po 5 (*P. lanceolata*) a 7 (*P. maritima*) týdnech. Škrob byl stanoven jako množství glukózy po enzymatickém štěpení. n = 6. Statistické hodnocení signifikance rozdílů mezi genotypy viz tabulky 8 a 9.

Tabulka 8: Výsledky statistického hodnocení signifikance rozdílů v obsahu sacharidů na konci dne a na konci noci mezi *P. lanceolata* (Pl) a *P. maritima* (Pm). Signifikance rozdílů byla hodnocena standartním t-testem (při normálním rozdělení dat) nebo Mann-Whitney testem (pokud rozdělení dat nebylo normální). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami, ns – nesignifikantní rozdíl; $\alpha = 0,05$.

	Konec dne		Konec noci	
	Rozp. sach.	Škrob	Rozp. sach.	Škrob
<u>Liší se Pl a Pm?</u>				
Experiment 1	*	ns	*	ns
Experiment 2	ns	ns	ns	ns

Tabulka 9: Výsledky statistického hodnocení signifikance rozdílů v obsahu sacharidů mezi koncem dne (KD) a koncem noci (KN) u sledovaných druhů *P. lanceolata* (Pl) a *P. maritima* (Pm). Signifikance rozdílů byla hodnocena standartním t-testem (při normálním rozdělení dat) nebo Mann-Whitney testem (pokud rozdělení dat nebylo normální). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami, ns – nesignifikantní rozdíl; $\alpha = 0,05$.

	Pl		Pm	
	Rozp. sach.	Škrob	Rozp. sach.	Škrob
<u>Liší se KD a KN?</u>				
Experiment 1	ns	*	ns	ns
Experiment 2	ns	*	ns	ns

5.3.3 Obsah rozpustných sacharidů ve floémových exudátech

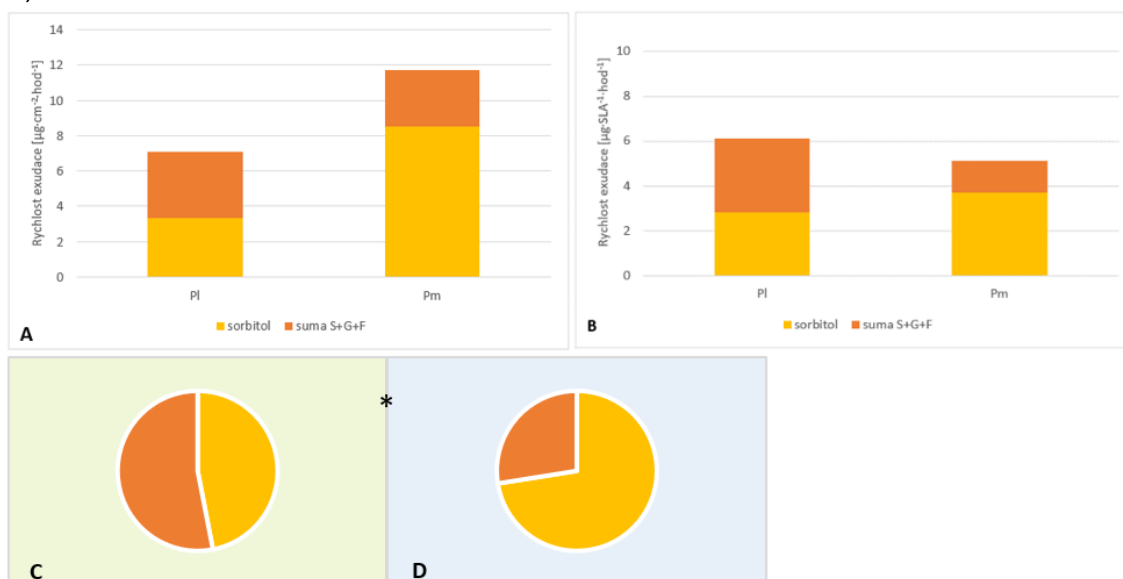
Dále byla provedena analýza obsahu a spektra rozpustných sacharidů v exudátech produkčního listu a byla vypočtena rychlost exudace, která byla vztažena na listovou plochu (obrázky 9A – 11A). Celkem byla provedena tři opakování tohoto experimentu. Výsledky byly poté přepočteny na specifickou listovou plochu (SLA), aby se zohlednila odlišná struktura listů rostlin *P. lanceolata* a *P. maritima* (obrázky 9B – 11B). V exudátech bylo kromě sorbitolu, sacharózy a glukózy nalezeno také malé množství fruktózy. Protože přítomnost fruktózy v exudátu může znamenat částečné štěpení sacharózy kyselými invertázami a toto rozdělení by tedy mohlo být artefaktem, data jsou prezentována jako součet sacharózy, glukózy a fruktózy. V případě rychlosti exudace vztažené na listovou plochu byla rychlost vždy vyšší u *P. maritima*, ale pouze ve druhém experimentu byl mezi genotypy potvrzen statisticky průkazný rozdíl. Po přepočtu na SLA se rychlosti vyrovnaly a ve dvou experimentech (1 a 3) byla rychlost exudace dokonce mírně vyšší u *P. lanceolata*, avšak ani v jednom z experimentů nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Výsledky analýzy exudátů produkčních listů ukázaly, že podíl sorbitolu ku ostatním sacharidům detekovaným v exudátu (sacharóza, glukóza, fruktóza) byl vyšší u *P. maritima* (59 až 72 %). U *P. lanceolata* v exudátech převažovaly ostatní rozpustné sacharidy, podíl sorbitolu činil 34 až 48 %. Ve všech experimentech byly v podílech sacharidů statisticky průkazné rozdíly (obrázky 9C, D – 11C, D).



Obrázek 9: Exudace z produkčního listu u dvou druhů jitrocele. Experiment 1. Rychlost exudace vztažená na listovou plochu (A) a specifickou listovou plochu (B), PI – *Plantago lanceolata*, Pm – *Plantago maritima*, Suma S+G+F – součet obsahu sacharózy, fruktózy a glukózy. Hydroponická kultivace, jímání exudátů nejdelšího produkčního listu u 5 (*P. lanceolata*) a 7 (*P. maritima*) týdnů starých rostlin, zahájení přibližně v polovině světelné periody (13:30), délka trvání 4 hodiny. Výšečové grafy - podíl sorbitolu ku ostatním sacharidům v exudátu u *P. lanceolata* (C) a *P. maritima* (D); n = 6. Signifikance rozdílů byla hodnocena standartním t-testem (při normálním rozdělení dat) nebo Mann-Whitney testem (pokud rozdělení dat nebylo normální). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami; $\alpha = 0,05$.



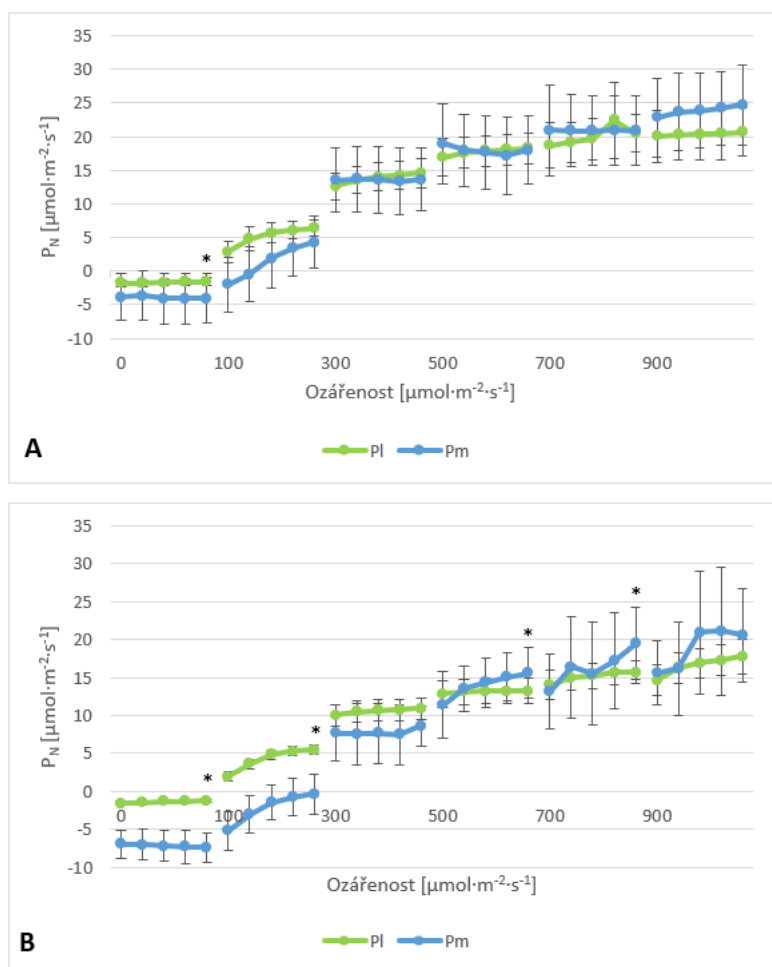
Obrázek 10: Exudace z produkčního listu u dvou druhů jitrocele. Experiment 2. Rychlost exudace vztahovaná na listovou plochu (A) a specifickou listovou plochu (B), PI – *Plantago lanceolata*, Pm – *Plantago maritima*, Suma S+G+F – součet obsahu sacharózy, fruktózy a glukózy. Hydroponická kultivace, jímání exudátů nejdelšího produkčního listu u 5 (*P. lanceolata*) a 7 (*P. maritima*) týdnů starých rostlin, zahájení ve 13:30, délka trvání 4 hodiny. Výšečové grafy - podíl sorbitolu ku ostatním sacharidům v exudátu u *P. lanceolata* (C) a *P. maritima* (D); n = 6. Signifikance rozdílů byla hodnocena standartním t-testem (při normálním rozdělení dat) nebo Mann-Whitney testem (pokud rozdělení dat nebylo normální). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami; $\alpha = 0,05$.



Obrázek 11: Exudace z produkčního listu u dvou druhů jitrocele. Experiment 3. Rychlost exudace vztahovaná na listovou plochu (A) a specifickou listovou plochu (B), PI – *Plantago lanceolata*, Pm – *Plantago maritima*, Suma S+G+F – součet obsahu sacharózy, fruktózy a glukózy. Hydroponická kultivace, jímání exudátů nejdelšího produkčního listu u 5 (*P. lanceolata*) a 7 (*P. maritima*) týdnů starých rostlin, zahájení ve 13:30, délka trvání 4 hodiny. Výšečové grafy - podíl sorbitolu ku ostatním sacharidům v exudátu u *P. lanceolata* (C) a *P. maritima* (D); n = 6. Signifikance rozdílů byla hodnocena standartním t-testem (při normálním rozdělení dat) nebo Mann-Whitney testem (pokud rozdělení dat nebylo normální). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami; $\alpha = 0,05$.

5.4 Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy (P_N)

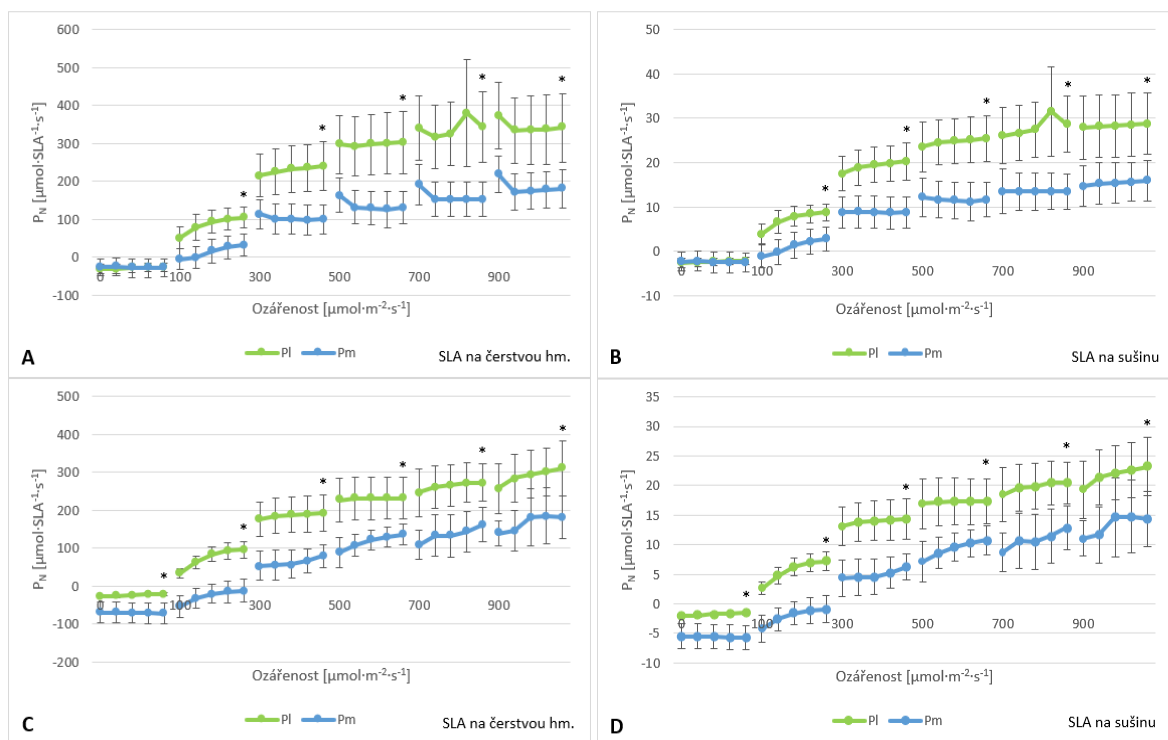
U rostlin po 5 (*P. lanceolata*) a 7 (*P. maritima*) týdnech kultivace byla měřena rychlost čisté fotosyntézy, která byla vyjádřena pomocí množství asimilovaného oxidu uhličitého ($\mu\text{mol CO}_2$) na jednotku plochy listu (m^2) za jednotku času (s) (obrázek 12). P_N byla následně přepočtena na specifickou listovou plochu (SLA) vztaženou na čerstvou a suchou hmotnost (obrázek 13). Statistické vyhodnocení bylo provedeno u posledních bodů měření při jednotlivých ozářeních a statisticky průkazný rozdíl mezi genotypy byl označen hvězdičkou. V případě rychlosti čisté fotosyntézy (obrázek 12) se rychlosti pohybovaly v rozmezí -7 až $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Ve tmě byla rychlost vyšší u *P. lanceolata*, za nízké ozáření (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) v experimentu 3 (obrázek 12B) také, v experimentu 3 byl pouze pozorován stejný trend. Při hodnotě ozáření 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se v experimentu 4 začaly rychlosti obou genotypů vyrovnávat a při vyšších ozářeních byla rychlost vyšší u *P. maritima*. V experimentu 3 byly hodnoty P_N vyrovnány po celou dobu měření, pouze při nejvyšší hodnotě ozáření byl pozorován trend vyšší rychlosti u *P. maritima*.



Legenda k obrázku 12 je na následující straně.

Obrázek 12: Rychlost čisté fotosyntézy (P_N) dvou druhů jitrocele. A - Experiment 3; B - Experiment 4; Pl – *Plantago lanceolata*, Pm – *Plantago maritima*. Hydroponická kultivace, rostliny po 5 (*P. lanceolata*) a 7 (*P. maritima*) týdnech kultivace, měření v rozmezí 9:00 až 14:00 hodin. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; $n = 11-12$ (*P. lanceolata*), resp. $n = 11-13$ (*P. maritima*). Signifikance rozdílů byla hodnocena standartním t-testem (při normálním rozdělení dat) nebo Mann-Whitney testem (pokud rozdělení dat nebylo normální). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami; $\alpha = 0,05$.

U P_N přepočtené na SLA vztaženou ať už na čerstvou (obrázek 13A, C) nebo suchou (obrázek 13B, D) hmotnost, byla v experimentu 4 od počátku měření vyšší rychlost u *P. lanceolata*. V experimentu 3 byly rychlosti při vypnutém zdroji světla vyrovnány a od $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ byla rychlost v obou případech vyšší u *P. lanceolata*. Spolu s rychlostí fotosyntézy byla sledována i rychlost transpirace vztažená na listovou plochu a na SLA vyjádřenou na čerstvou a suchou hmotnost (obrázek S2 v příloze).



Obrázek 13: Rychlost čisté fotosyntézy (P_N) vztažená na SLA na čerstvou (A, C) a suchou (B, D) hmotnost dvou druhů jitrocele. A, B - Experiment 3; C, D - Experiment 4; Pl – *Plantago lanceolata*, Pm – *Plantago maritima*. Hydroponická kultivace, rostliny po 5 (*P. lanceolata*) a 7 (*P. maritima*) týdnech kultivace, měření v rozmezí 9:00 až 14:00 hodin. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; $n = 11-12$ (*P. lanceolata*), resp. $n = 11-13$ (*P. maritima*). Signifikance rozdílů byla hodnocena standartním t-testem (při normálním rozdělení dat) nebo Mann-Whitney testem (pokud rozdělení dat nebylo normální). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami; $\alpha = 0,05$.

5.5 Anatomicko-histochemická analýza listů a kořenů

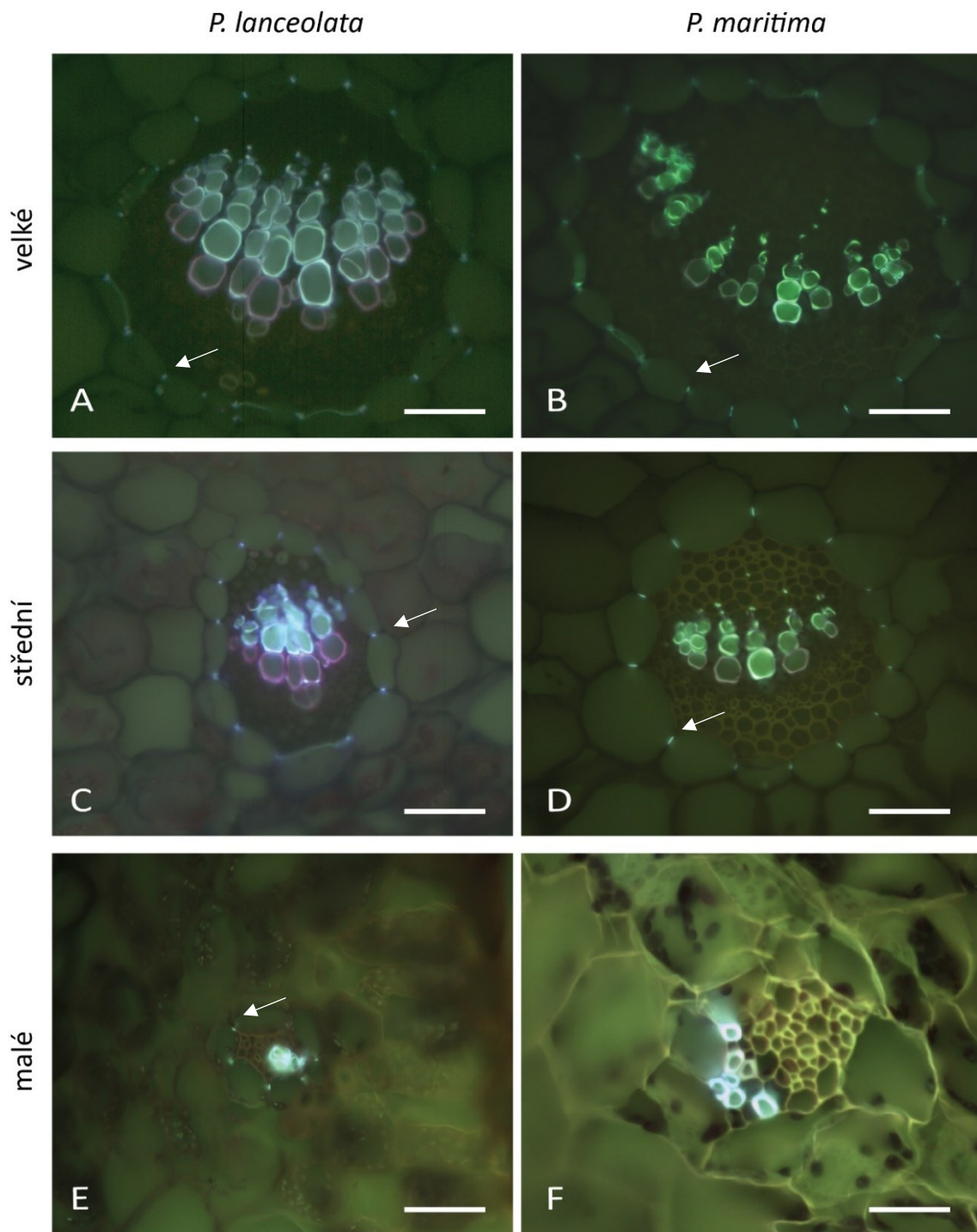
Pro anatomickou analýzu listů a kořenů k ověření přítomnosti endodermis byly využity rostliny z experimentu 3, kterým byl odstraněn nejdelší produkční list na jímání exudátů floému. Dále byly odebrány nejdelší produkční listy a mladé listy ze dvou rostlin od každého genotypu v experimentu 6. V případě produkčních a mladých listů byly výsledky pozorování zpracovány semikvantitavně (tabulka 10), u kořenů byla pouze ověřena přítomnost endodermis s Casparyho proužky, popřípadě tečkami. Produkční listy byly řezány v polovině a čtvrtině délky (od báze), mladé listy jen v polovině.

Tabulka 10: Přítomnost, případně počet cévních svazků s vytvořenými Casparyho proužky v produkčních a mladých listech dvou druhů jitrocele. Experiment 3. PI – *Plantago lanceolata*, Pm – *Plantago maritima*. Od každého druhu a pro oba typy listů byly prováděny řezy ze dvou jedinců. S – malé cévní svazky (CS); M – střední CS; L – velké CS (podrobnější popis rozdělení v kapitole Materiály a metody.

		Produkční list				Mladý list	
		Báze listu		Střed listu		Střed listu	
		Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne
PI	S	16	---	1	9	---	6
	M	6	---	2	---	---	5
	L	8	---	5	---	---	3
Pm	S	---	17	---	19	---	15
	M	7	4	5	8	---	8
	L	8	---	6	---	---	4

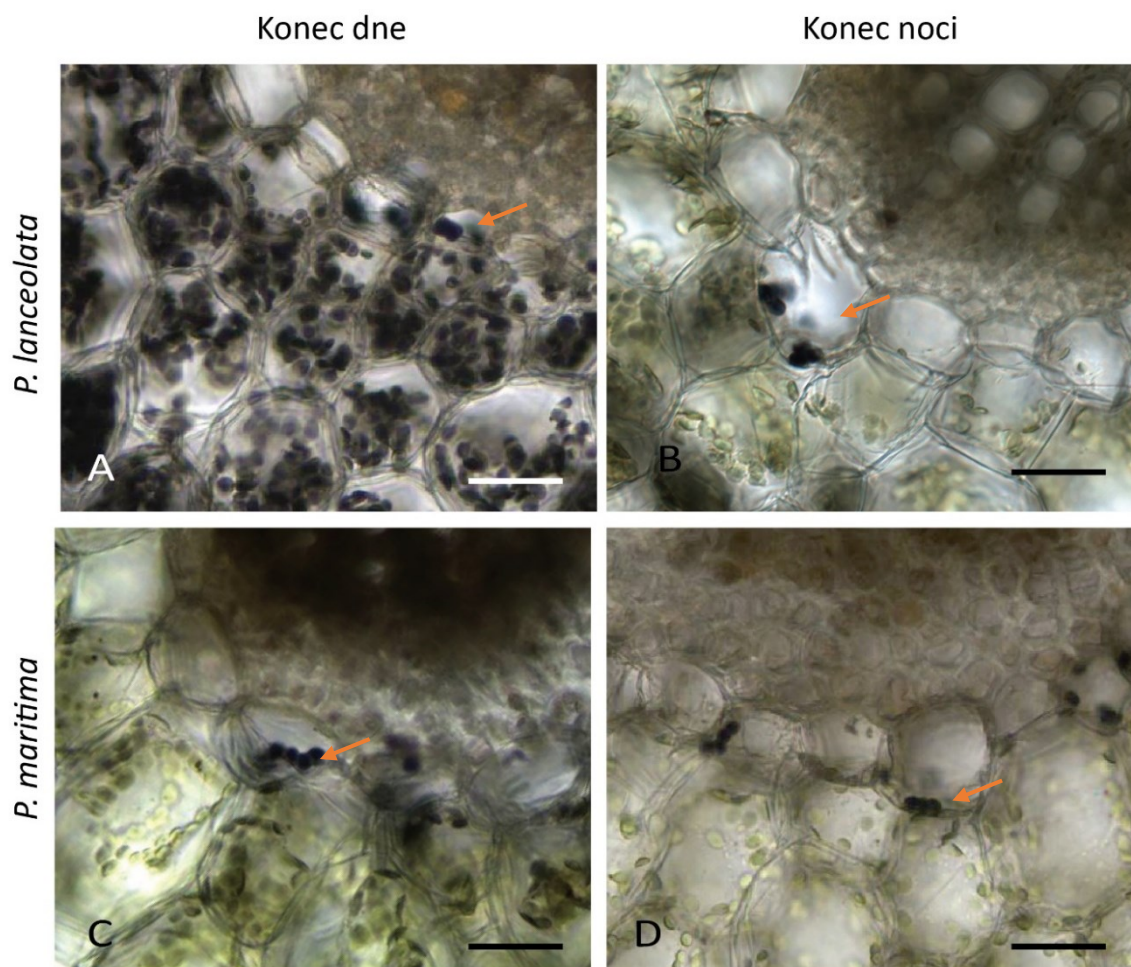
Z každé sady řezů bylo pozorováno co největší množství cévních svazků (CS), avšak kvůli horší kvalitě řezů (například na okrajích řezných ploch) nebylo možné zahrnout do vyhodnocení všechny. Všechny CS, které byly pozorovány a bylo možné je zařadit do jedné z kategorií, jsou zaznamenány v tabulce 10. Následující fotografie jsou především ilustrační a reprezentují nejčastější situace u daných typů řezů. V endodermis všech CS na bázi produkčního listu *P. lanceolata* (obrázek 14A, C, E) bylo možné pozorovat Casparyho proužky, v některých případech cévních svazků kategorie S byly vytvořeny pouze tečky. V endodermis největších CS *P. maritima* (obrázek 14B) se nacházely Casparyho proužky ve všech případech, u středně velkých CS v 64 % v podobě teček a u nejmenších CS nebyly pozorovány žádné Casparyho proužky ani tečky. Ve střední části produkčního listu *P. lanceolata* se nacházely Casparyho proužky v podobě teček u CS velikosti S, kde byly vytvořeny pouze v 10 % případů, a velikosti M (přítomny u všech, také v podobě teček), u všech velikosti L byly pozorovány opět proužky. U *P. maritima* se ve střední části listu nacházely tečky, a to pouze u CS kategorií M (vytvořené u 38 % pozorovaných CS) a L (u všech),

nejmenší cévní svazky je neměly vytvořené vůbec. V případě mladých listů nebylo možné pozorovat Casparyho proužky ani tečky u žádné z kategorií CS ani u jednoho genotypu.

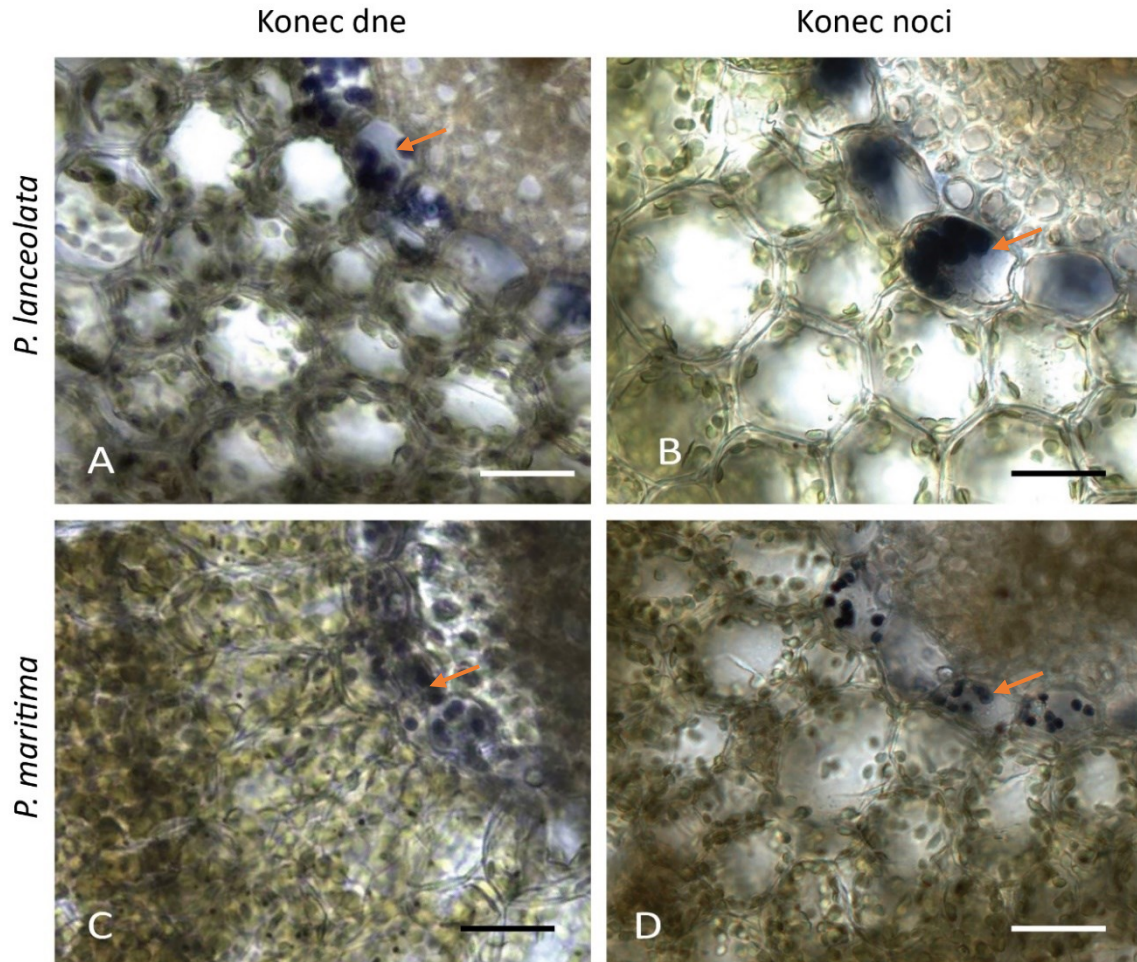


Obrázek 14: Přítomnost endodermis s Casparyho proužky okolo cévních svazků produkčních listů dvou druhů jitrocele. Experiment 6. A, C, E – *Plantago lanceolata*; B, D, F – *Plantago maritima*. A, B – velké cévní svazky (CS; velikost L); C, D – střední CS (vel. M); malé CS (vel. S). Barveno berberinem, zvýrazněny jsou lignifikované struktury – endodermis s Casparyho proužky (označena bílou šipkou) a xylémové elementy. Excitace UV; měřítko: 50 μ m.

V dalším experimentu věnujícím se anatomické struktuře listu byly řezy barveny Lugolovým roztokem pro vizualizaci škrobu. Sledována byla přítomnost škrobu v pochvách cévních svazků a chloroplastech a změny v jeho množství v průběhu denního cyklu. Řezy byly zhotoveny ze středních částí produkčních (obrázek 15) a mladých listů (obrázek 16). U obou druhů jitrocele byl histochemicky detekovaný škrob lokalizován v chloroplastech fotosynteticky aktivních buněk a ve formě škrobových zrn také v buňkách pochev cévních svazků. I když bylo možné pozorovat při srovnání situace mezi koncem dne a koncem noci mírné snížení histochemicky detekovatelného škrobu v obou typech buněk, na konci noci byl jeho obsah stále poměrně vysoký. U *P. maritima* se škrob v pochvách CS akumuloval nerovnoměrně, vyšší akumulaci vykazovaly buňky umístěné blíže ke svrchní straně listu. U mladých listů byly rozdíly v obsahu škrobu mezi koncem dne a koncem noci větší než u produkčních listů. V mladých listech zůstalo na konci noci zachováno více škrobu, ale byly zjištěny rozdíly mezi genotypy. U *P. lanceolata* byl škrob přítomen především v pochvách CS, naopak u *P. maritima* ho bylo více v chloroplastech.

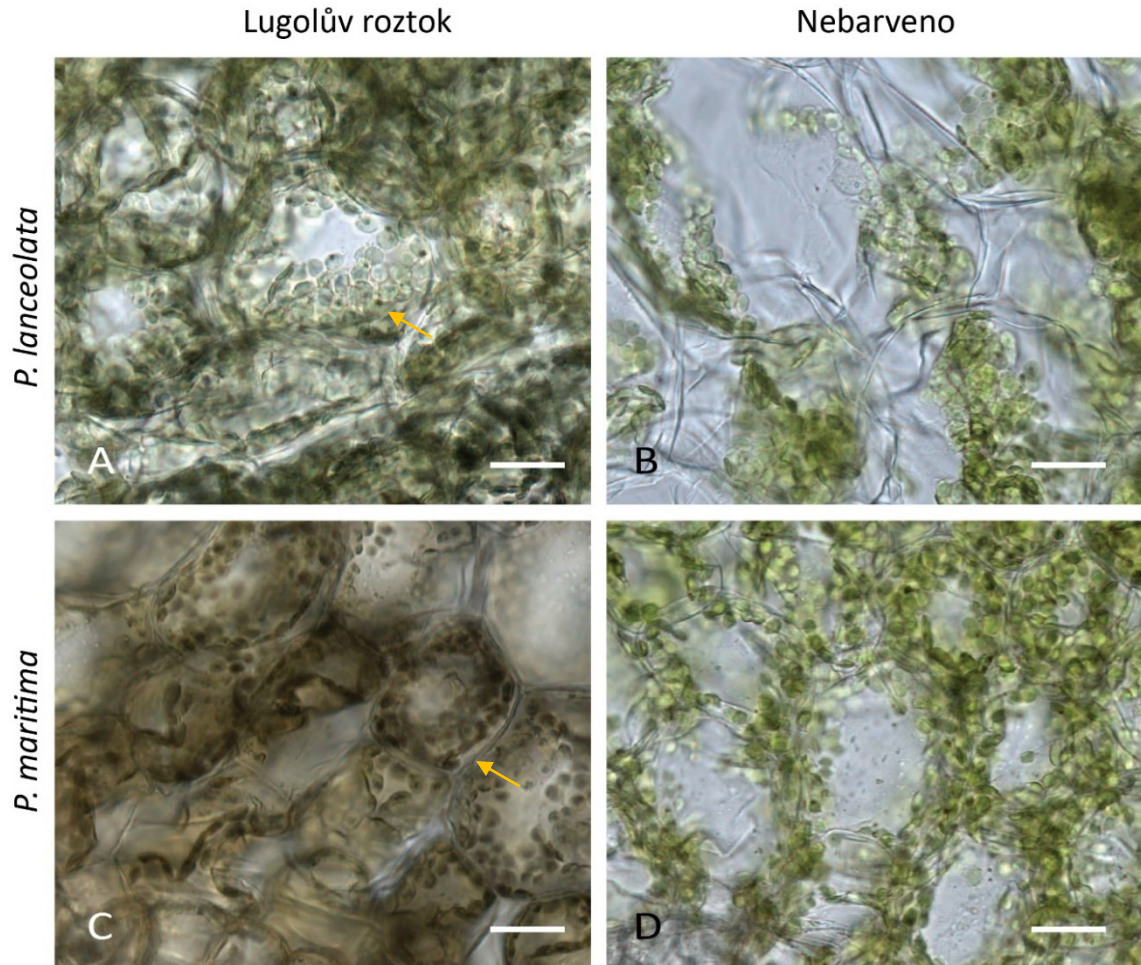


Obrázek 15: Obsah škrobu v pochvách cévních svazků a chlorenchymu produkčních listů dvou druhů jitrocele. Experiment 6. A, B – *Plantago lanceolata*; C, D – *Plantago maritima*. A, C – konce dne; B, D – konce noci. Oranžovými šipkami je označena pochva cévního svazku se škrobovými zrny (modrošedé až černé zbarvení). Barveno Lugolovým roztokem; pozorováno ve světlém poli; měřítko: 50 μ m.



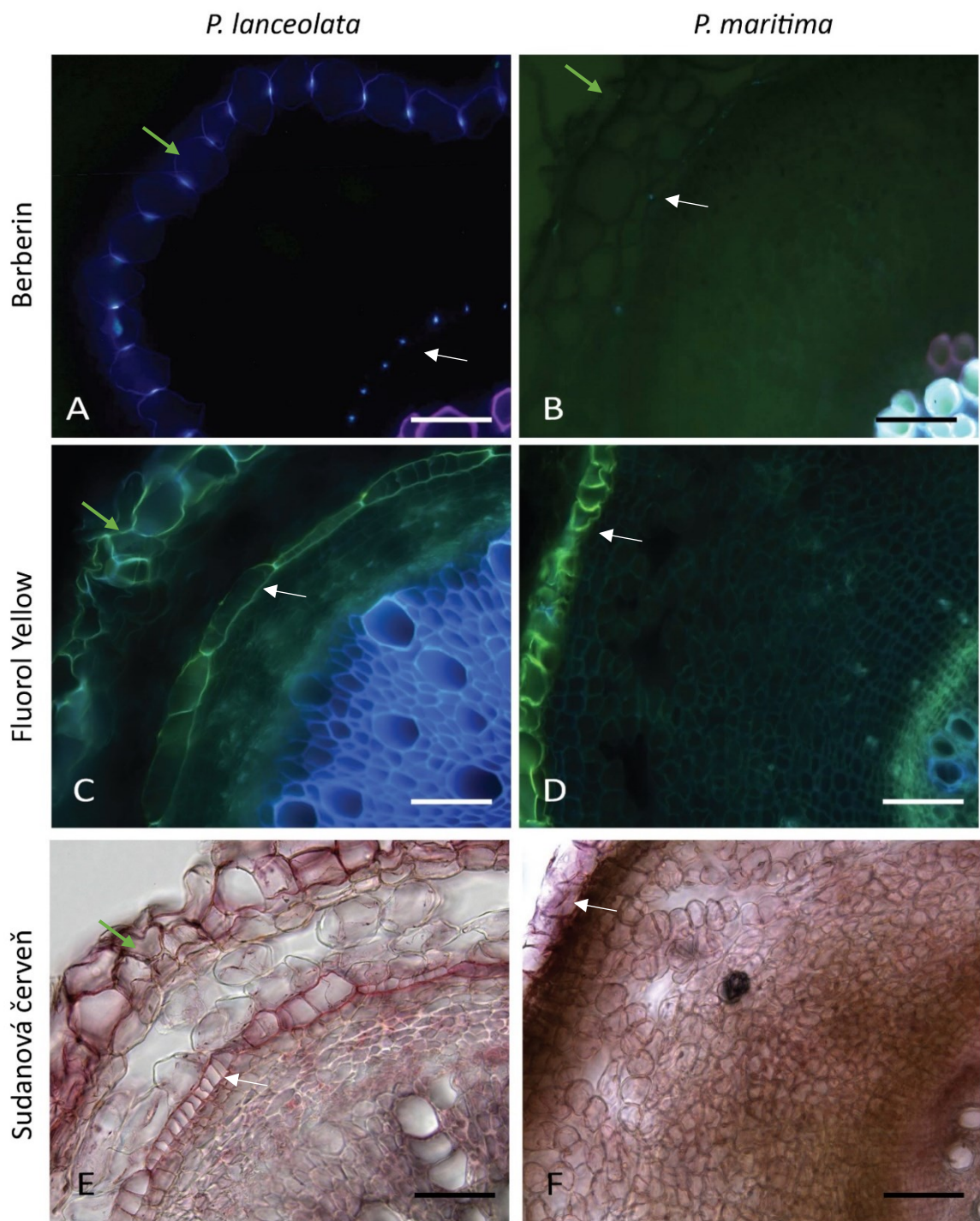
Obrázek 16: Obsah škrobu v pochvách cévních svazků a chlorenchymu mladých listů dvou druhů jitrocele. Experiment 6. A, B – *Plantago lanceolata*; C, D – *Plantago maritima*. A, C – konce dne; B, D – konce noci. Oranžovými šipkami je označena pochva cévního svazku se škrobovými zrny (modrošedé až černé zbarvení). Barveno Lugolovým roztokem; pozorováno ve světlém poli; měřítko: 50 μ m.

Následující fotografie (obrázek 17) znázorňují obsah škrobu v chloroplastech na konci noci. Barvení bylo provedeno opět Lugolovým roztokem a pro porovnání jsou zde přiloženy i fotografie nebarvených řezů (obrázek 17B, D). Je zřejmé, že rostliny obou genotypů si v produkčních listech ponechávají v chloroplastech určité množství škrobu i na konci noci.



Obrázek 17: Obsah škrobu v chlorchymu produkčních listů na konci noci u dvou druhů jitrocele. Experiment 6. A, B – *Plantago lanceolata*; C, D – *Plantago maritima*. A, C – barveno Lugolovým roztokem; B, D – nebarveno. Žlutými šipkami označen asimilační škrob v chloroplastech. Pozorováno ve světlém poli; měřítko: 50 μm .

Poslední série fotografií (obrázek 18) ukazuje příklady typů barvení, které byly použity v průběhu této práce pro vizualizaci endodermis s Casparyho proužky a suberinových lamel v kořenech. Suberinové lamely však nebyly v tomto typu rostlinného materiálu vytvořeny, proto nebyly fotografie zahrnuty do vyhodnocení. Všechny řezy byly provedeny v $\frac{1}{4}$ délky kořenů (od báze). Z fotografií je patrné, že se kořeny obou genotypů liší. Rostliny *P. lanceolata* měly okolo středního válce vytvořenou endodermis s Casparyho proužky, poté primární kůru a na periferii exodermis, také s vytvořenými Casparyho proužky. S radiálním růstem kořene však začala exodermis desintegrovat a v některých případech rostlin *P. maritima* ji už nebylo možné pozorovat (obrázek 18D, F). Rostliny *P. maritima* měly velmi tenkou primární kůru a endodermis s Casparyho proužky se nacházela na periferii kořene.



Obrázek 18: Ukázka typů barvení využitých při anatomických analýzách. Experiment 6. A, C, E – *Plantago lanceolata*; B, D, F – *Plantago maritima*. A-F – řezy provedené v ¼ délky kořenů (od báze). Barvení: berberin (A, B) pro detekci ligninu, Fluorol Yellow (C, D) a Sudanová červeň (E, F) pro detekci suberinu. Excitace UV (A-D) a pozorování ve světlém poli (E, F). Bílou šipkou je označena endodermis s Casparyho proužky a zelenou šipkou exodermis s Casparyho proužky. Měřítko: 50 μ m.

6. Diskuse

Rostliny disponují různými mechanismy, které jsou indukované, když je rostlina vystavena stresu, a které pomáhají dopady stresu zmírnit. Dá se ovšem také předpokládat, že druhy, které jsou odolné, se od citlivých liší i v době, kdy na ně žádný stres nepůsobí. Tyto druhy tedy mají jakousi vrozenou úroveň ochrany, která je ovšem nákladná a rostliny musí řešit tzv. trade-offs mezi růstem a ochranou (Monson *et al.*, 2022). Ve změnách alokace zdrojů mezi růstem a ochranou byly zjištěny rozdíly i mezi ekotypy téhož druhu (Bertić *et al.*, 2021). Tato odlišnost může pomoci např. rychlejšímu nastartování obranných mechanismů, když stres udeří. V diplomové práci jsem využila srovnání dvou druhů jitrocele, glykofytního *Plantago lanceolata* (Königshofer, 1983) a halofytního *Plantago maritima* (Erdei and Kuiper, 1979). Halofytní zástupce je adaptovaný na prostředí s vyšší koncentrací solí v půdě, a těmto podmínkám má také přizpůsobený metabolismus. Zasolení způsobuje, vedle toxicity iontů, omezení dostupnosti vody pro rostliny, což je častý dopad i jiných abiotických stresů, například chladu anebo sucha. Řada studií prokázala odolnost *P. maritima* k zasolení, avšak toleranci k suchu u dospělých rostlin se žádná práce nevěnovala. Jedinou nalezenou zmínkou je vysoká citlivost semenáčů *P. maritima* k suchu, kdy 48hodinové vystavení suchu přežily pouze 2 až 4 % mladých semenáčů (stáří 2-3 dny) a ze starších (stáří 7-9 dní) žádný (Jerling, 1981).

K experimentům v této diplomové práci jsem využila celistvé rostliny pěstované hydroponicky, v nádobách Araponics s ¼ Hoaglandovým roztokem (Laštůvka, 1967). Způsob kultivace se osvědčil, rostliny byly v době odběru pro jednotlivé analýzy robustní, s dobře vyvinutými nadzemními částmi i kořenovými systémy a nejevily žádné známky senescence ani narušení růstu např. infekcí či hmyzem. Pozornost byla zaměřena na hledání vybraných metabolických a strukturních rozdílů mezi oběma druhy souvisejících s distribucí a alokací sacharidů po rostlině, protože předpokládáme, že by tyto rozdíly mezi genotypy mohly představovat základ pro jejich odlišnou toleranci k solenému stresu. Rostliny musí neustále upravovat rozdělování asimilátů mezi jednotlivé pooly (metabolický, transportní a skladovací). Dále dynamicky modulují rozdělování mezi jednotlivé typy sacharidů, a také přidělování asimilátů orgánům a pletivům. Modulací těchto procesů jsou rostliny schopny zásobovat podle potřeby konkrétní sinky, nebo například vyčlenit větší podíl asimilátů pro syntézu zásobních látek v reakci na podmínky prostředí. Pokud dojde ke zpomalení, nebo zastavení růstu, nejsou asimiláty spotřebovávány k růstu, začnou se hromadit a mohou sloužit například k syntéze škrobu (Chiou and Bush, 1998). Stejně tak rostlina může využít větší podíl asimilátů k syntéze škrobu s diurnální dynamikou, který bude sloužit jako zdroj uhlíku a energie pro růst přes noc (Gibon *et al.*, 2004; Smith and Stitt, 2007). Dalším mechanismem je posílení transportu asimilátů z produkčních listů například do kořenů.

Hromaděním osmoticky aktivních látek se v kořenech snížil osmotický potenciál a rostlina tak může snadněji získávat vodu z prostředí (Pelleschi *et al.*, 1997). Abych mohla porovnat výše zmíněné procesy a charakteristiky mezi studovanými druhy jitrocele, stanovila jsem u obou genotypů růstové parametry, rychlost růstu, rychlost čisté fotosyntézy a pomocí HPLC obsahy a spektra sacharidů v rostlinách.

Před začátkem prvních experimentů bylo nutné otestovat vhodnost hydroponické kultivace pro studované druhy rostlin. Zvolený způsob se osvědčil, avšak ukázalo se, že rostliny *P. lanceolata* rostly rychleji než *P. maritima*. Musela jsem proto optimalizovat délku kultivační doby, aby byly rostliny v době odběru pro jednotlivé analýzy podobně velké. Rozdílné rychlosti růstu byly na první pohled zřejmé, a byly potvrzeny i pomocí stanovení absolutních hodnot suchých a čerstvých hmotností prýtů a kořenů, kdy jsem ve všech bodech měření zjistila vyšší hmotnosti u rostlin *P. lanceolata*. Pro detailnější charakterizaci rozdílných rychlostí růstu jsem stanovila relativních růstové rychlosti (tabulka 6). Ukázalo se, že druh *P. lanceolata* sice zpočátku rostl rychleji než *P. maritima*, ale postupně se rychlost růstu snížila. Rostliny *P. maritima* naopak zpočátku rostly pomaleji, poté se rychlost zvýšila a v posledním týdnu měření překonaly rychlost růstu rostlin *P. lanceolata*, avšak ani po 7 týdnech kultivace nepřekonal velikostí druh *P. lanceolata*.

Pro hodnocení výsledků některých analýz bylo nutné vzít v úvahu, že rostliny *P. lanceolata* a *P. maritima* měly odlišnou stavbu listů. Listy *P. lanceolata* měly větší plochu listové čepele a byly tenké, listy *P. maritima* byly sukulentního charakteru s menší listovou plochou (viz též Flanagan and Jefferies, 1988). Rostliny *P. maritima* mají velkou fenotypovou plasticitu listů (podle způsobu kultivace/stanoviště; nepublikovaná data našeho týmu), takže jsem předem nemohla předpokládat tak velký rozdíl ve stavbě listů studovaných druhů. To mělo význam pro interpretaci výsledků této práce, a proto jsem sledovala a zohledňovala i specifickou listovou plochu (SLA). SLA je plocha listu vyjádřená na jednotku jeho hmotnosti (obvykle suché). Listy s vyšší SLA (tenčí listy) jsou schopné efektivněji využívat malé množství rozptýleného záření dopadajícího na rostlinu (Sefton *et al.*, 2002; Burns, 2004). Listy s nižší SLA (tlustější listy) využívají efektivněji vysokou ozářenost a jsou více tolerantní k deficitu vody a živin díky silnější vrstvě kutikuly a vyšší životnosti listů (Wright *et al.*, 2002; Burns, 2004). Velikost SLA má důležitou roli v adaptaci rostlin k podmínkám prostředí. Listy s vysokou SLA mají vyšší relativní rychlost růstu (RGR), ale pouze za podmínek dostatečného zásobení vodou a živinami. Výsledky studie na 6 druzích vřesů ukázaly, že distribuce rostlin na vřesovišti často korelovala s hodnotami jejich SLA – druhy s nižší SLA se nacházely blíže ke středu bažiny, zatímco druhy s vyšší SLA byly hojnější v zástínu lesa (Burns, 2004). Z výsledků studie na dvou genotypech *P. major* (poddruhy *major* a *pleiosperma*), které se lišily relativní rychlostí růstu (RGR) vyplývá, že větší specifická listová plocha souvisí s vyšší RGR. Poměr suché a čerstvé

hmotnosti listů byl vyšší při vyšší SLA. Nižší RGR je pravděpodobně způsobena změnou alokace sacharidů, která je částečně kompenzována vyšší rychlostí fotosyntézy (Dijkstra and Lambers, 1989). Tomu však neodpovídají výsledky měření rychlosti čisté fotosyntézy v jednom ze dvou experimentů této práce, kdy se ukázalo, že rychlost fotosyntézy byla u *P. lanceolata* i *P. maritima* srovnatelná. Z diskutované práce (Dijkstra and Lambers, 1989) také vyplývá, že rostliny s nižší RGR investovaly více sacharidů do nadzemní části i kořenů, které obsahovaly více sušiny než kořeny rostlin s vyšší RGR, a že RGR klesá s rostoucím stářím a velikostí rostliny (Dijkstra and Lambers, 1989; Paine *et al.*, 2012). Genotypy *P. major* se také lišily velikostí a počtem semen – větší semena produkoval genotyp s nižší RGR (Kuiper, 1983; Dijkstra and Lambers, 1989). Podle těchto výsledků by měly mít větší semena pomaleji rostoucí rostliny *P. maritima*. Dále jsem proto stanovila průměrnou hmotnost jednoho semene u studovaných genotypů a ukázalo se, že semena *P. lanceolata* vážila průměrně o 65 % více než semena *P. maritima*. Větší zásobou v semenech by se dala vysvětlit vyšší rychlost růstu *P. lanceolata* v první části kultivačního intervalu. Je tedy možné, že větší zásoby v semenech využily rostliny *P. lanceolata* k rychlejšímu počátečnímu růstu, který se ale po jejich vyčerpání zpomalil (jak je popsáno výše). Vzhledem k tomu, že jsem nesledovala změny, ke kterým dochází v generativní fázi, není vyloučené pozdější snížení RGR u *P. lanceolata* na úkor plnění semen, podobně jako to bylo popsáno v práci Dijkstra and Lambers (1989). Měření rychlosti čisté fotosyntézy prokázalo, že oba genotypy fotosyntetizovaly na jednotku plochy listu stejně efektivně, avšak po přepočtu na SLA byla rychlost vyšší u *P. lanceolata*. Mohlo by to být díky efektivnějšímu využití rozptýleného záření díky vyšší SLA u *P. lanceolata*, jak bylo zmíněno výše.

Dále jsem se věnovala rozdílům v přidělování sacharidů jednotlivým orgánům, ale obecně také vztahům mezi zdrojem a sinkem. Jako materiál pro charakterizaci zdroje jsem zvolila produkční list (vždy byl vybrán ten nejdelší na rostlině) a sledovány byly i dva typy sinkových orgánů, kořenový systém a mladý list, jehož délka nepřesahovala 40 % délky nejdelšího produkčního listu rostliny. Toto číslo vychází z práce týmu Fellows and Geiger (1974), ve které na základě experimentů s listy řepy obecné (*Beta vulgaris*) stanovili maximální délku mladých listů tak, kdy ještě nebyly zdrojovými orgány, tedy neexportovaly asimiláty. Listy, které byly větší už procházely přeměnou na zdrojový orgán a byl zahájen export asimilátů z těchto listů (Fellows and Geiger, 1974). Předpokládá se ale, že u většiny rostlin nastává přechod od sinkového ke zdrojovému charakteru listu při vyšší listové expanzi.

V dalším typu experimentu jsem sledovala a porovnávala přidělování sacharidů jednotlivým orgánům - produkčním a mladým listům a kořenům. Pozornost byla zaměřena na sacharózu, glukózu, fruktózu a cukerný alkohol sorbitol, a také na hladinu škrobu v jednotlivých orgánech. Oba genotypy měly srovnatelnou rychlost fotosyntézy, přesto bylo pozorováno navýšení celkového

množství rozpustných sacharidů v listech *P. maritima* oproti *P. lanceolata*. To naznačuje, že druh *P. maritima* méně podporoval růst listů, jejich metabolismus a případně omezil odvádění sacharidů do jiných částí rostliny. Naopak nižší hladiny rozpustných sacharidů v produkčních listech rostlin *P. lanceolata* naznačují účinnější odvádění fotoasimilátů floémem do sinkových pletiv. Množství rozpustných sacharidů v kořenech bylo srovnatelné u obou genotypů. V případě škrobu byly vyšší hladiny v produkčních listech pozorovány u *P. lanceolata*. V mladých listech a kořenech byl v prvním opakování experimentu obsah škrobu vyšší u *P. lanceolata*, ve druhém opakování u *P. maritima*. Mladé listy obou genotypů obsahovaly více škrobu než ostatní orgány. Vysoké hladiny rozpustných sacharidů v mladých listech mohou být dané tím, že mladé listy jakožto sinkové orgány rychle rostou a spotřebují velké množství asimilátů, a také lze uvažovat i o jejich potřebě pro udržení vyššího turgoru nezbytného pro expanzi buněk. V případě, že v nich rostlina udržuje vyšší množství rozpustných sacharidů, nemusí mladé listy „čekat“ na mobilizované zásoby a mohou udržovat kontinuální růst i v případě výkyvů podmínek.

V mezofylových buňkách *P. major* byl zjištěn vyšší poměr sorbitolu ku sacharóze (Pommerrenig *et al.*, 2007). Ke stejným výsledkům jsem došla i pro produkční a mladé listy studovaných genotypů *P. lanceolata* a *P. maritima* (kromě výsledků jednoho opakování experimentu, kde byla u produkčních listů *P. lanceolata* vyšší hladina sacharózy). V kořenech byla ve druhém opakování experimentu situace stejná jako pro listy, tedy větší obsah sorbitolu než sacharózy, ale v prvním opakování jsem naměřila vyšší hladiny sacharózy u obou genotypů. Druh *P. lanceolata* měl vytvořený hlavní kořen, avšak morfologická stavba jeho kořenového systému připomínala spíše systém homorhizní, a to kvůli velkému počtu adventivních kořenů (Cranston *et al.*, 2016). Oproti tomu druh *P. maritima* měl výrazný hlavní kořen a menší počet adventivních. U rostlin *P. lanceolata* jsem zjistila vyšší podíl biomasy kořenů ku biomase prýtu, což ukazuje na to, že tyto rostliny investovaly větší podíl asimilátů do rozvoje kořenového systému. Tuto domněnku potvrzuje i analýza obsahu rozpustných sacharidů v jednotlivých orgánech, kdy měly rostliny *P. lanceolata* v produkčních listech nižší obsah rozpustných sacharidů než *P. maritima*. Druh *P. lanceolata* transportoval fotoasimiláty do kořenů a v produkčních listech si udržoval jejich nižší hladiny. Nízké hladiny rozpustných sacharidů v produkčních listech mají pozitivní roli v aktivaci fotosyntézy (Chiou and Bush, 1998), ale na druhou stranu jsou potom rostliny méně připraveny na rychlou reakci v případě vystavení osmotickému stresu (Bohnert *et al.*, 1995).

Protože jsou rostliny rodu *Plantago* významnými producenty cukerného alkoholu sorbitolu (Bieleski, 1982), porovnávala jsem také jeho hladinu v jednotlivých orgánech. Nejvyšší obsah sorbitolu jsem pozorovala v produkčních listech obou druhů, avšak u rostlin *P. maritima* jsem naměřila vyšší obsah sorbitolu v porovnání s *P. lanceolata*. Rostliny *P. maritima* také obsahovaly

vyšší podíl sorbitolu ku ostatním rozpustným sacharidům než *P. lanceolata*. Oba genotypy si udržovaly stabilní hladiny sorbitolu v průběhu celého denního cyklu. Sorbitol má významnou roli při stresu, což bylo potvrzeno výsledky řady experimentů. Relativně vysoké hladiny sorbitolu byly u halofytních i glykofytních druhů jitrocelů naměřeny i za kontrolních, nestresových podmínek. Avšak pouze u halofytů došlo při vystavení zasolení k výraznému nárůstu obsahu sorbitolu (Al Hassan *et al.*, 2016). Zvýšené hladiny sorbitolu byly za podmínek zasolení nalezeny v prýtu i kořenech u halofytních rostlin *P. maritima* a *P. coronopus* (Ahmad *et al.*, 1979; Koyro, 2006). Všechny tyto výsledky se týkají pouze stresu zasolení. Narazila jsem pouze na jednu studii popisující vyšší hladiny sorbitolu u glykofytního druhu *P. lanceolata* v reakci na stres suchem (Orians *et al.*, 2019), avšak o reakci halofytních zástupců na tento typ stresu jsem našla žádné informace.

Předchozí experimenty provedené v naší laboratoři potvrdily, že je možné jímat exudáty floému z produkčních listů, a tedy jsem optimalizovala metodický přístup pro jitrocel. Domnívali jsme se, že by to mohlo doplnit obrázek o distribuci sacharidů, proto byla analýza obsahu sacharidů ve floémových exudátech zařazena i do této diplomové práce. Analýza obsahu sacharidů v exudátech floému sledovaných druhů jitrocele prokázala přítomnost fruktózy. V exudátech floému *P. major* však byla fruktóza zastoupena jen ve velmi malém množství, glukóza naopak tvořila významnou složku exudátů tohoto druhu (Pommerrenig *et al.*, 2007). Je možné, že za její zvýšenou hladinou zjištěnou při mých měřeních oproti výsledkům Pommerrenig *et al.* (2007) stojí štěpení sacharózy stěnovými kyselými invertázami. Výsledky jsou proto prezentovány jako podíl sorbitolu ku součtu sacharózy, glukózy a fruktózy. Druh *P. maritima* obsahoval v exudátech floému větší podíl sorbitolu ku ostatním sacharidům než *P. lanceolata*. Vyšší hladina sorbitolu u halofytního druhu by mohla znamenat jeho připravenost na setkání se se stresem, kdy při vystavení stresu není nutné výrazné navýšení obsahu sorbitolu, ale odpověď na stresové podmínky je založená na změnách v jeho lokalizaci (Al Hassan *et al.*, 2016). Byla vypočtena rychlost exudace a ukázalo se, že rostliny *P. maritima* exudovaly rychleji. Protože mají listy *P. lanceolata* a *P. maritima* odlišnou strukturu listů, byla rychlost exudace přepočtena na specifickou listovou plochu a v tomto případě se rychlosti vyrovnaly.

Více sacharózy než sorbitolu, tedy opačný poměr, než byl výše popsán pro produkční a mladé listy, byl zjištěn v exudátech floému, u kontrolních nestresovaných rostlin *P. major* bylo v exudátech floému výrazně vyšší množství sacharózy než sorbitolu. Po vystavení rostlin zasolení (400 mM NaCl) v jednom z experimentů týmu Pommerrenig *et al.* (2007) došlo k redukci množství exudátu a také ke změně poměru sorbitolu a sacharózy, kdy se rozdíl mezi jejich hladinami zmenšil. To podporuje předpoklad zvýšeného nakládání sorbitolu do floému při stresu zasolení (Pommerrenig *et al.*, 2007). Jak bylo zmíněno na začátku této kapitoly, má data byla hodnocena

jako podíl sorbitolu ku součtu ostatních přítomných rozpustných sacharidů. Přesto poměr sorbitolu popsáný v práci (Pommerrenig *et al.*, 2007) odpovídal poměru zjištěnému u glykofytního zástupce *P. lanceolata*, i když rozdíl nebyl tak výrazný jako u kontrolních rostlin *P. major*. Naopak u halofytního druhu *P. maritima* byl podíl sorbitolu ve všech opakováních experimentu vyšší než v případě *P. lanceolata*, a také vyšší než poměr sorbitolu zjištěný u *P. major* jak za kontrolních podmínek, tak po vystavení zasolení.

6.1 Denní dynamika obsahu sacharidů v listech

Růst rostlin je poháněn fotosyntetickou asimilací uhlíku, která ovšem probíhá jen za světla a denní střídání světla a tmy vede k velkým změnám v rovnováze uhlíku v rostlině. To je vyváženo akumulací části fotoasimilátů ve dne ve formě škrobu, který se následně mobilizuje v noci (Gibon *et al.*, 2004). Dále jsem se proto zajímala, jak studované druhy jitrocele budují zásoby na pokrytí požadavků během noci, a jaké množství z těchto zásob na konci noci zůstane zachováno. Ke znázornění denní dynamiky hospodaření se sacharidy jsem analyzovala obsah a spektrum rozpustných sacharidů a škrobu na konci dne a na konci noci. Genotypy se mezi sebou lišily v rychlostech, kdy druh *P. lanceolata* rostl rychleji než *P. maritima* (viz kapitola 5.2). To se projevilo také na hladinách sacharidů v průběhu denního cyklu. Druhy se lišily množstvím akumulovaného škrobu přes den a také rychlostí jeho degradace v noci. Zjistila jsem, že oba genotypy obsahovaly na konci dne více rozpustných sacharidů a škrobu než na konci noci. Obecně jsem pozorovala tendenci vyššího obsahu rozpustných sacharidů u *P. maritima* než u *P. lanceolata*. V případě škrobu trend opačný, kdy na konci dne i na konci noci obsahovaly rostliny *P. lanceolata* vyšší hladiny škrobu než *P. maritima*. Výjimkou byla situace na konci noci ve druhém opakování experimentu, kdy měly mírně vyšší obsah škrobu rostliny *P. maritima*.

Literární data ukazují, že se různé genotypy *Arabidopsis thaliana* (rychleji a pomaleji rostoucí) lišily v rozsahu vyčerpání škrobu během normálního denního cyklu (Cross *et al.*, 2006). Rozdělení asimilátů mezi syntézu škrobu a sacharózy je konstantní během dne a je kontrolováno tak, aby vyhovovalo podmínkám prostředí, zejména délce dne/délce noci (Gibon *et al.*, 2004). Čerstvá hmotnost listových růžic se mezi genotypy výrazně lišila a nekorelovala s hladinami sacharidů na konci dne, ale byla negativně ovlivněna množstvím škrobu na konci noci – rychleji rostoucí genotypy s většimi růžicemi měly mírně nižší obsah škrobu na konci dne a výrazně nižší na konci noci než pomaleji rostoucí genotypy s menšími růžicemi. To podporuje hypotézu, že rychleji rostoucí genotypy jsou méně „konzervativní“ než pomaleji rostoucí a udržují si nižší hladiny zásoby sacharidů v podobě škrobu, aby se vypořádaly s nečekanými měnicími se podmínkami (Cross *et al.*,

2006). Tomu odpovídají výsledky této diplomové práce. Oba genotypy si na konci noci ponechávaly určité zásoby škrobu, avšak u rychleji rostoucích rostlin *P. lanceolata* jsem pozorovala výraznější snížení obsahu škrobu v průběhu temné periody než v případě pomaleji rostoucích *P. maritima*. Výsledky několika studií prokázaly, že výrazné prodloužení noci vedlo ke kompletnímu vyčerpání škrobu a spustilo výrazné změny v metabolismu a genové expresi, včetně inhibice růstu, který nebyl obnoven ihned po ozáření rostlin (Gibon *et al.*, 2004; Cross *et al.*, 2006). Po konci prodloužené noci musí rostliny upravit rozdělování asimilátů tak, aby se větší podíl fotoasimilátů akumuloval ve formě škrobu a došlo k obnově vyčerpaných zásob. To umožňuje pokračovat v mobilizaci škrobu a udržování hladin cukrů i během následující temné periody (Gibon *et al.*, 2004). Z toho vyplývá, že si sice rostliny *P. maritima* udržují větší nevyužité zásoby škrobu než *P. lanceolata*, a tedy rostou pomaleji, ale také by to mohlo znamenat jejich připravenost na setkání se se stresem. Ani po prodloužení temné periody nebo působení jiného stresu by nemuselo u rostlin *P. maritima* dojít ke kompletnímu vyčerpání zásob škrobu a tím pádem by nebylo nutné zastavení růstu. Naopak u rostlin *P. lanceolata* by pravděpodobně došlo k vyčerpání uložených zásob ještě před koncem noci a výsledkem by bylo omezení, nebo zastavení růstu, a mělo by to v konečném důsledku vliv na jejich konkurenceschopnost.

Přítomnost asimilačního škrobu v chloroplastech fotosynteticky aktivních buněk a škrobových zrn v pochvách cévních svazků obou genotypů jsem potvrdila histochemickou analýzou produkčních a mladých listů. Škrob jsem v těchto buňkách pozorovala ve vzorcích odebraných na konci dne i na konci noci. Odpovídá to předpokladu, že se rostliny snaží nejvíce chránit nejmladší části, případně je zajistit tak, aby i při výskytu limitace přísunu asimilátů mohl být zajištěn jejich další vývoj a funkce. To podporují výsledky studie na *A. thaliana*, kdy v mladších částech listové růžice nedošlo při změně vnějších podmínek k vyčerpání škrobu přes noc. Oproti tomu ve vnější listové růžici, tedy zdrojových listech, se obrat škrobu zrychlil a na konci noci byly jeho hladiny téměř vyčerpány (van Hoogdalem *et al.*, 2021). Z mého pozorování jsem však ověřila pouze přítomnost škrobu v daných buňkách produkčních a mladých listů, ale nikoliv jeho množství. K porovnání rychlosti obratu škrobu mezi zdrojovými a sinkovými pletivy by tak bylo nutné doplnit analýzu obsahu škrobu na konci dne a na konci noci také v mladých listech.

Skladování zásob slouží jako pojistka pro rostliny, protože poskytuje uhlík pro předvídatelné i nepředvídatelné změny v jeho dostupnosti (např. abiotické stresy, nebo změna délky noci), vytvoření zásob je ale na úkor investice sacharidů do jiných procesů, zejména růstu. Hlavní funkcí škrobu je skladování a rozpustné sacharidy slouží jako substráty pro respiraci a další metabolické funkce. Avšak protože je škrob zdrojem právě rozpustných sacharidů, které jsou využívány opět k syntéze škrobu, bývá součet těchto dvou poolů využíván k vyjádření míry skladování i když v

daném okamžiku je pouze zlomek z tohoto množství sacharidů skladováno dlouhodobě (Hartmann and Trumbore, 2016; Blumstein *et al.*, 2022). Předpokládá se, že ke kompromisům mezi růstem a obranou dochází u rostlin kvůli omezením zdrojů, která vyžadují upřednostnění růstu nebo obrany v závislosti na vnějších a vnitřních faktorech. Tyto tzv. trade-offs mají důsledky pro zemědělské i přírodní ekosystémy, protože oba procesy jsou životně důležité pro přežití rostlin a v konečném důsledku i pro celkové fitness rostlin a jejich reprodukci.

6.2 Přítomnost endodermis v listech

Jitrocele jsou jedním z mála rodů rostlin, u kterých se v listech (řapíku i čepeli) vyskytuje endodermis s Casparyho proužky okolo cévních svazků (Trapp, 1933). Chtěla jsem tedy ověřit přítomnost endodermis v listech studovaných druhů jitrocele a případně zjistit, jestli by tato struktura mohla mít nějaký vliv na transportní procesy, kterým se ve své práci věnuji.

Endodermis je specializovaná vrstva buněk běžně přítomná v primární kůře kořene, která se nachází okolo středního válce. Plně vyvinutá endodermis má Casparyho proužky, což je vrstva suberinu a ligninu, která obklopuje buněčné stěny jednotlivých buněk. Tato struktura díky tomu tvoří apoplastickou bariéru a veškerá voda, a v ní rozpuštěné látky tak musí vstoupit do symplastu. Na této úrovni je rostlina schopná kontrolovat, jaké látky přijímá (Lersten, 1997). Poměrně vzácně se může endodermis vyskytovat i v nadzemních orgánech cévnatých rostlin. Pokud jsou Casparyho proužky vytvořeny, výrazně se snižuje apoplastická vodivost napříč pochvou cévních svazků, a ta se tak stává analogickou ke kořenové endodermis (Mertz and Brutnell, 2014). Exprese podobných genů během vývoje pochev cévních svazků a kořenové endodermis naznačuje funkční podobnosti (Slewinski *et al.*, 2012). Všechny čeledě krytosemenných rostlin, které mají endodermis v nadzemní části, jsou téměř výhradně bylinné druhy (Lersten, 1997). V jednom z experimentů jsem proto sledovala přítomnost endodermis s Casparyho proužky okolo cévních svazků (CS) produkčních a mladých listů dvou studovaných druhů jitrocele. Na bázi produkčních listů *P. lanceolata* byla endodermis s Casparyho proužky vytvořena u všech velikostí cévních svazků a ve střední části u všech kromě nejmenších. U *P. maritima* nebyla endodermis s Casparyho proužky přítomná v žádné pozici na listu u nejmenších CS. V mladých (sinkových) listech *P. lanceolata* ani *P. maritima* nebylo možné pozorovat endodermis s Casparyho proužky. Trapp (1933) studoval listovou endodermis u rostlin čeledi Plantaginaceae, konkrétně u pobřežnice velkokvěté (*Littorella lacustris*) a osmi druhů jitrocele včetně *P. lanceolata* a *P. maritima*. Vytvořil sady ručních řezů z bazální, střední a apikální části produkčních a mladých listů. Všechny pozorované druhy jitrocele mělo na bázi a ve střední části produkčních listů endodermis s Casparyho proužky okolo všech žilek, dokonce i okolo těch

nejmenších. Směrem od apexu k bázi listu pozoroval zvyšující se diferenciaci. V apikální části produkčních listů a ve všech částech mladých listů byla endodermis s Casparyho proužky okolo hlavní žilky neúplná a okolo vedlejších žilek nebyla vytvořena vůbec (Trapp, 1933). Rozdíly oproti výsledkům této diplomové práce mohou být způsobeny tím, že rostliny pro anatomickou analýzu uvedené v práci Trapp (1933) byly sbírány v různých sezónách, na různých místech, rostly za jiných podmínek a neshodovalo se ani stáří rostlin. Dalo by se tedy uvažovat, že přítomnost endodermis s Casparyho proužky v mladých listech nemá význam pro import sacharidů, protože mladé listy ještě neexportují, ale asimiláty a vodu přijímají.

V rámci anatomicko-histochemické analýzy byla ověřena přítomnost endodermis také v kořenech dvou studovaných druhů jitrocelů. Kromě endodermis byla vytvořena u *P. lanceolata* i *P. major* také exodermis a uspořádání jednotlivých vrstev kořene se mezi druhy lišilo. Kořeny *P. lanceolata* byly uspořádány tak, jak se očekávalo, tedy endodermis s Casparyho proužky byla vytvořena na vnější straně středního válce, následovala primární kůra a na periferii kořene byla vytvořena exodermis. Vrstva buněk exodermis nebyla uspořádána tak pravidelně jako endodermis, ale Casparyho proužky byly vytvořeny. Kořen *P. maritima* se lišil. To, co se na první pohled zdálo jako exodermis v periferní části kořene, byla ve skutečnosti endodermis s vytvořenými Casparyho proužky. Vrstvy primární kůry a exodermis byly pozorovatelné jen u některých řezů.

Seago (2020) se domnívá, že zatímco endodermis ve stonku byla charakteristickým znakem vodních nebo mokřadních rostlin odvozených od suchozemských předků, přítomnost stonkové endodermis u bazálních rostlin některých hlavních linií krytosemenných rostlin naznačuje, že mohla být přítomna už na počátku evoluce krytosemenných rostlin (Seago, 2020). Ačkoliv mají buňky endodermis nepropustné radiální a transverzální buněčné stěny, a mohly by tedy bránit vstupu látek (například při zasolení) do středního válce, nebyla tato role prokázána. Stejně tak se spekulovalo o funkci endodermis jako bariéry proti úniku látek z cévních svazků (to bylo prokázáno pouze pro některé nahosemenné rostliny (Soar, 1922)), případně jako podpory transpiračního proudu u vodních rostlin (Trapp, 1933), ale ani tyto role endodermis nebyly potvrzeny. Jedním z možných vysvětlení přítomnosti endodermis v listech je, že se jedná o atavismus, který pokud nenarušuje žádné funkce, může být orgánem tolerovaný (Lersten, 1997). Trapp (1933) se například přikláněl k názoru, že endodermis v listech mohla být původně znakem společným pro všechny halofyty se sukulentními listy. To podporoval i nález endodermis v listech *P. maritima*. Už z jeho experimentů s dalšími druhy rostlin ale vyplynulo, že výskyt endodermis není spojen jen s tímto typem listů. Dalším z možných vysvětlení by bylo, že endodermis s Casparyho proužky v nadzemích částech rostlin slouží jako bariéra proti unikání látek z formujících se cévních svazků. To ale opět vyvrací výsledky studie Trapp (1933), který zjistil, že Casparyho proužky nevznikají konstantně proti

xylémovému nebo floémovému pólu, ale často se vyskytují v takové poloze, že je nelze odvodit ani od jednoho z nich. U nahosemenných rostlin slouží endodermis okolo cévního svazku listu jako hlavní apoplastická bariéra a hraje důležitou roli v rezistenci rostlin k suchu tím, že omezuje tok vody z xylému do okolních pletiv listu (Soar, 1922) a mrazu, protože mechanicky zabraňuje šíření tvořícího se ledu z mezofylu (Kaku, 1971). Přítomnost endodermis a Casparyho proužků je jednou z hlavních nevyřešených otázek ve stavbě nadzemních částí rostlin. Nelze je s jistotou považovat za znak celé čeledě rostlin a jejich význam dosud není na základě dostupné literatury vysvětlen.

Analýza dvou genotypů rostlin z rodu *Plantago* (glykofytní *P. lanceolata* a halofytní *P. maritima*) podpořila myšlenku, že odolné genotypy mají nejenom schopnost odstartovat změny ve svém metabolismu tak, aby se ochránily v reakci na působící stres, ale také vykazují již za normálních podmínek, před působením stresu, jisté charakteristiky sacharidové bilance, které jim pomáhají se stresem bojovat již v okamžiku, kdy začne stres působit (jistá forma předpřipravenosti). Činí tak pravděpodobně těmito mechanismy: zvýšený absolutní obsah rozpustných sacharidů i podíl sorbitolu v nadzemních částech, vyšší zásoby škrobu na konci noci, vyšší hladiny sacharidů v mladých listech, což je ale za cenu menší růstové rychlosti a nejspíše i menší vybaveností semen, která mají v důsledku obtížnější start do života.

7. Závěry

- K pěstování dvou druhů jitrocele se osvědčila hydroponická kultivace v nádobách Araponics, růst byl bezproblémový, rostliny byly velké a vhodné k odběru pro jednotlivé analýzy.
- Druhy se lišily rychlostí růstu, bylo proto nutné optimalizovat délku kultivační doby pro jednotlivé genotypy. Pro *P. lanceolata* byla délka kultivace stanovena na 5 týdnů, pro *P. maritima* na 7 týdnů.
- Rostliny *P. lanceolata* měly vyšší poměr hmotnosti kořenů k hmotnosti prýtu než *P. maritima*. Druhy se lišily strukturou kořenového systému a listů. Aby se zohlednily odlišnosti ve struktuře listů, byla vypočtena specifická listová plocha.
- Rychlost čisté fotosyntézy vyjádřená na listovou plochu byla u obou druhů srovnatelná. Pokud byla k vyjádření rychlosti čisté fotosyntézy využita specifická listová plocha, rychlost byla vyšší u *P. lanceolata*.
- Druh *P. maritima* obsahoval vyšší hladiny rozpustných sacharidů v produkčních a mladých listech než *P. lanceolata*. V případě kořenů byly výsledky srovnatelné.
- U obou genotypů byl nižší obsah škrobu v kořenech v porovnání s produkčními a mladými listy. Druhy se lišily množstvím škrobu, který zůstal zachován po temné periodě – *P. maritima* si uchovávala větší zásoby než *P. lanceolata*. To je v souladu s hypotézou odlišného rozdělování sacharidů mezi jednotlivé pooly v rámci produkčního listu mezi dvěma sledovanými genotypy.
- Obsah sorbitolu byl v produkčních listech, mladých listech i kořenech odebíraných v polovině světlené periody vyšší u *P. maritima* než u *P. lanceolata*. Situace byla stejná u produkčních listů odebíraných na začátku a na konci dne.
- Rostliny *P. lanceolata* obsahovaly méně sorbitolu než ostatních rozpustných sacharidů (sacharózy, glukózy a fruktózy) ve floémových exudátech. V případě rostlin *P. maritima* byl v exudátech floému zjištěn vyšší podíl sorbitolu (až 72 %) z celkového obsahu rozpustných sacharidů.
- Rychlost exudace floému byla vyšší u *P. maritima*, druhy se tedy lišily rychlostí/účinností transportu na dlouhou vzdálenost. Po přepočtu na specifickou listovou plochu se hodnoty vyrovnaly.
- V produkčních listech obou druhů jitrocele byla zjištěna přítomnost endodermis s Casparyho proužky. U rostlin *P. maritima* byl její vývoj opožděn v porovnání s *P. lanceolata* a endodermis nebyla nalezena v mladých listech ani u jednoho ze sledovaných druhů.

8. Seznam použité literatury

Ahmad, I, Larher, F, and Stewart, GR (1979). Sorbitol, a Copmatible Osmotic Solute in *Plantago maritima*. *New Phytol* 82, 671–678.

Ainsworth, EA, and Bush, DR (2011). Carbohydrate export from the leaf: A highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiol* 155, 64–69.

Barratt, DHP, Derbyshire, P, Findlay, K, Pike, M, Wellner, N, Lunn, J, Feil, R, Simpson, C, Maule, AJ, and Smith, AM (2009). Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 13124–13129.

Bartels, D, and Sunkar, R (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 24, 23–58.

Barth, I, Meyer, S, and Sauer, N (2003). PmSUC3: Characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *plantago major*. *Plant Cell* 15, 1375–1385.

Bertić, M, Schroeder, H, Kersten, B, Fladung, M, Orgel, F, Buegger, F, Schnitzler, JP, and Ghirardo, A (2021). European oak chemical diversity – from ecotypes to herbivore resistance. *New Phytol* 232, 818–834.

Bieleski, RL (1982). Sugar Alcohols. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer, Berlin, Heidelberg, 159–192.

Bläsing, OE, Gibon, Y, Günther, M, Höhne, M, Morcuende, R, Osuna, D, Thimm, O, Usadel, B, Scheible, WR, and Stitt, M (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 3257–3281.

Blumstein, M, Sala, A, Weston, DJ, Holbrook, NM, and Hopkins, R (2022). Plant carbohydrate storage: intra- and inter-specific trade-offs reveal a major life history trait. *New Phytol*.

Bohnert, HJ, and Jensen, RG (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol* 14, 89–97.

Bohnert, HJ, Nelson, DE, and Jensen, RG (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099–1111.

Braun, DM, Wang, L, and Ruan, YL (2014). Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *J Exp Bot* 65, 1713–1735.

Briens, M, and Larher, F (1983). Sorbitol Accumulation in Plantaginaceae; Further Evidence for a Function in Stress Tolerance. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie* 110, 447–458.

Brouquisse, R, Gaudillère, JP, and Raymond, P (1998). Induction of a carbon-starvation-related proteolysis in whole maize plants submitted to light/dark cycles and to extended darkness. *Plant Physiol* 117, 1281–1291.

Brown, PH, and Hu, H (1996). Phloem mobility of boron is species dependent: Evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species. *Ann Bot* 77, 497–506.

Brundrett, MC, Enstone, DE, and Peterson, CA (1988). A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma* 146, 133–142.

- Brundrett, MC, Kendrick, B, and Peterson, CA (1991). Efficient lipid staining in plant material with Sudan red 7b or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotech Histochem* 66, 111–116.
- Burns, KC (2004). Patterns in specific leaf area and the structure of a temperate heath community. *Divers Distrib* 10, 105–112.
- Chen, LQ, Qu, XQ, Hou, BH, Sosso, D, Osorio, S, Fernie, AR, and Frommer, WB (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* (80-) 335, 207–211.
- Chiou, TJ, and Bush, DR (1998). Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4784–4788.
- Clifford, SC, Arhdt, SK, Corlett, JE, Joshi, S, Sankhla, N, Popp, M, and Jones, HG (1998). The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *J Exp Bot* 49, 967–977.
- Conde, A, Silva, P, Agasse, A, Conde, C, and Gerós, H (2011). Mannitol transport and mannitol dehydrogenase activities are coordinated in *Olea Europaea* under salt and osmotic stresses. *Plant Cell Physiol* 52, 1766–1775.
- Cranston, LM, Kenyon, PR, Morris, ST, Lopez-Villalobos, N, and Kemp, PD (2016). Morphological and Physiological Responses of Plantain (*Plantago lanceolata*) and Chicory (*Cichorium intybus*) to Water Stress and Defoliation Frequency. *J Agron Crop Sci* 202, 13–24.
- Cross, JM, Von Korff, M, Altmann, T, Bartzetko, L, Sulpice, R, Gibon, Y, Palacios, N, and Stitt, M (2006). Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiol* 142, 1574–1588.
- Dijkstra, P, and Lambers, H (1989). A Physiological Analysis of Genetic Variation in Relative Growth Rate within *Plantago major* L. *Funct Ecol* 3, 577–587.
- Eom, JS, Chen, LQ, Sosso, D, Julius, BT, Lin, IW, Qu, XQ, Braun, DM, and Frommer, WB (2015). SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Curr Opin Plant Biol* 25, 53–62.
- Erdei, L, and Kuiper, PJC (1979). The Effect of Salinity on Growth, Cation Content, Na⁺-Uptake and Translocation in Salt-Sensitive and Salt-Tolerant *Plantago* Species. *Physiol Plant* 47, 95–99.
- Fellows, RJ, and Geiger, DR (1974). Structural and Physiological Changes in Sugar Beet Leaves during Sink to Source Conversion. *Plant Physiol* 54, 877–885.
- Fernie, AR et al. (2020). Synchronization of developmental, molecular and metabolic aspects of source–sink interactions. *Nat Plants* 6, 55–66.
- Flanagan, LB, and Jefferies, RL (1988). Stomatal limitation of photosynthesis and reduced growth of the halophyte, *Plantago maritima* L., at high salinity. *Plant Cell Environ* 11, 239–245.
- Flowers, TJ, Hajibagheri, MA, and Clipson, NJW (1986). Halophytes. *Q Rev Biol* 61, 313–337.
- Flowers, TJ, Troke, PF, and Yeo, AR (1977). The Mechanism of Salt Tolerance in Halophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 28, 89–121.
- Fons, F, Gargadennec, A, Gueiffier, A, Roussel, JL, and Andary, C (1998). Effects of cinnamic acid on polyphenol production in *Plantago lanceolata*. *Phytochemistry* 49, 697–702.

Gahrtz, M, Schmelzer, E, Stolz, J, and Sauer, N (1996). Expression of the PmsUC1 sucrose carrier gene from *Plantago major* L. is induced. *Plant J* 9, 93–100.

Gahrtz, M, Stolz, J, and Sauer, N (1994). A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. *Plant J* 6, 697–706.

Gibon, Y, Bläsing, OE, Palacios-Rojas, N, Pankovic, D, Hendriks, JHM, Fisahn, J, Höhne, M, Günther, M, and Stitt, M (2004). Adjustment of diurnal starch turnover to short days: Depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following. *Plant J* 39, 847–862.

Gil, R, Lull, C, Boscaiu, M, Bautista, I, Lidón, A, and Vicente, O (2011). Soluble carbohydrates as osmolytes in several halophytes from a mediterranean salt marsh. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca* 39, 9–17.

Giri, J (2011). Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav* 6, 1746–1751.

Gonçalves, S, and Romano, A (2016). The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae). *Ind Crops Prod* 83, 213–226.

Hartmann, H, and Trumbore, S (2016). Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees - from what we can measure to what we want to know. *New Phytol* 211, 386–403.

Al Hassan, M, Pacurar, A, López-Gresa, MP, Donat-Torres, MP, Llinares, J V., Boscaiu, M, and Vicente, O (2016). Effects of salt stress on three ecologically distinct *plantago* species. *PLoS One* 11, 1–21.

Hediye Sekmen, A, Türkan, I, and Takio, S (2007). Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*. *Physiol Plant* 131, 399–411.

Hedrich, R, Sauer, N, and Neuhaus, HE (2015). Sugar transport across the plant vacuolar membrane: Nature and regulation of carrier proteins. *Curr Opin Plant Biol* 25, 63–70.

Herbers, K, and Sonnewald, U (1998). Molecular determinants of sink strength. *Curr Opin Plant Biol* 1, 207–216.

Hoffmann, WA, and Poorter, H (2002). Avoiding bias in calculations of relative growth rate. *Ann Bot* 90, 37–42.

van Hoogdalem, M, Shapulatov, U, Sergeeva, L, Busscher-Lange, J, Schreuder, M, Jamar, D, and van der Krol, AR (2021). A temperature regime that disrupts clock-controlled starch mobilization induces transient carbohydrate starvation, resulting in compact growth. *J Exp Bot* 72, 7514–7530.

Hummel, I et al. (2010). Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: An integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiol* 154, 357–372.

ITPS, FAO (2015). Status of the world's soil resources (SWSR)—Main report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils 650.

Jerling, L (1981). Effects of Microtopography on the Summer Survival of *Plantago Maritima* Seedlings. *Ecography (Cop)* 4, 120–126.

- Kaku, S (1971). A possible role of the endodermis as a barrier for ice propagation in the freezing of pine needles. *Plant Cell Physiol* 12, 941–948.
- Keller, I, Rodrigues, CM, Neuhaus, HE, and Pommerrenig, B (2021). Improved resource allocation and stabilization of yield under abiotic stress. *J Plant Physiol* 257, 153336.
- Königshofer, H (1983). Changes in ion composition and hexitol content of different *Plantago* species under the influence of salt stress. *Plant Soil* 72, 289–296.
- Koyro, HW (2006). Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). *Environ Exp Bot* 56, 136–146.
- Kuiper, D (1983). Genetic differentiation in *Plantago major*: Growth and root respiration and their role in phenotypic adaptation. *Physiol Plant* 57, 222–230.
- Kuiper, PJC, and Bos, M (1992). *Plantago: A Multidisciplinary Study*.
- Landouar-Arsivaud, L, Juchaux-Cachau, M, Jeauffre, J, Biolley, JP, Maurousset, L, and Lemoine, R (2011). The promoters of 3 celery salt-induced phloem-specific genes as new tools for monitoring salt stress responses. *Plant Physiol Biochem* 49, 2–8.
- Laštůvka Z (1967). Metoda vodních kultur vyšších rostlin. In Minár J: Univerzita J. E. Purkyne v Brne, Brno 83.
- Lemoine, R et al. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front Plant Sci* 4, 1–21.
- Lersten, NR (1997). Occurrence of Endodermis with a Casparian Strip in Stem and Leaf. *Bot Rev* 63, 265–272.
- Liang, X gui, Shen, S, Gao, Z, Zhang, L, Zhao, X, and Zhou, S li (2021). Variation of carbon partitioning in newly expanded maize leaves and plant adaptive growth under extended darkness. *J Integr Agric* 20, 2360–2371.
- Liang, XG, Gao, Z, Zhang, L, Shen, S, Zhao, X, Liu, YP, Zhou, LL, Paul, MJ, and Zhou, SL (2019). Seasonal and diurnal patterns of non-structural carbohydrates in source and sink tissues in field maize. *BMC Plant Biol* 19, 1–11.
- Lichthardt, C, Chen, TW, Stahl, A, and Stützel, H (2020). Co-Evolution of Sink and Source in the Recent Breeding History of Winter Wheat in Germany. *Front Plant Sci* 10, 1–15.
- Loescher, WH, Marlow, GC, and Kennedy, RA (1982). Sorbitol Metabolism and Sink-Source Interconversions in Developing Apple Leaves. *Plant Physiol* 70, 335–339.
- López-Salmerón, V, Cho, H, Tonn, N, and Greb, T (2019). The Phloem as a Mediator of Plant Growth Plasticity. *Curr Biol* 29, R173–R181.
- Lorenzen, JH, and Ewing, EE (1992). Starch Accumulation in Leaves of Potato (*Solanum tuberosum* L.) during the First 18 Days of Photoperiod Treatment. *Ann Bot* 69, 481–485.
- Ltaeif, HB, Sakhraoui, A, González-Orenga, S, Landa Faz, A, Boscaiu, M, Vicente, O, and Rouz, S (2021). Responses to salinity in four plantago species from Tunisia. *Plants* 10.
- Mertz, RA, and Brutnell, TP (2014). Bundle sheath suberization in grass leaves: Multiple barriers to characterization. *J Exp Bot* 65, 3371–3380.

- Moing, A, Carbonne, F, Rashad, MH, and Gaudillère, JP (1992). Carbon fluxes in mature peach leaves. *Plant Physiol* 100, 1878–1884.
- Monson, RK, Trowbridge, AM, Lindroth, RL, and Lerda, MT (2022). Coordinated resource allocation to plant growth–defense tradeoffs. *New Phytol* 233, 1051–1066.
- Moore, B, Zhou, L, Rolland, F, Hall, Q, Cheng, WH, Liu, YX, Hwang, I, Jones, T, and Sheen, J (2003). Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* (80-) 300, 332–336.
- Mugford, ST et al. (2014). Regulatory properties of ADP glucose pyrophosphorylase are required for adjustment of leaf starch synthesis in different photoperiods. *Plant Physiol* 166, 1733–1747.
- Mullen, JA, and Koller, HR (1988). Daytime and Nighttime Carbon Balance and Assimilate Export in Soybean Leaves at Different Photon Flux Densities. *Plant Physiol* 86, 880–884.
- Nadwodnik, J, and Lohaus, G (2008). Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* 227, 1079–1089.
- Negm, F, and Loescher, W (1981). Characterization and Partial Purification of Aldose-6-phosphate Reductase (Alditol-6-Phosphate: NADP 1-Oxidoreductase) from Apple Leaves. *Plant Physiol* 67, 139–142.
- Němec, B (1962). *Botanická mikrotechnika*. Nakl. ČSAV, Praha, 482.
- Noiraud, N, Maurousset, L, and Lemoine, R (2001). Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiol Biochem* 39, 717–728.
- Oloumi, MM, Vosough, D, Derakhshanfar, A, and Nematollahi, MH (2011). The Healing Potential of *Plantago lanceolata* Ointment on Collagenase-Induced Tendinitis in Burros (*Equus asinus*). *J Equine Vet Sci* 31, 470–474.
- Ondrasek, G, Rengel, Z, and Veres, S (2011). *Soil Salinisation and Salt Stress in Crop Production*.
- Orians, CM, Schweiger, R, Dukes, JS, Scott, ER, and Müller, C (2019). Combined impacts of prolonged drought and warming on plant size and foliar chemistry. *Ann Bot* 124, 41–52.
- Paine, CET, Marthews, TR, Vogt, DR, Purves, D, Rees, M, Hector, A, and Turnbull, LA (2012). How to fit nonlinear plant growth models and calculate growth rates: An update for ecologists. *Methods Ecol Evol* 3, 245–256.
- Pate, JS, and Gunning, BES (1969). Vascular transfer cells in Angiosperm leaves A taxonomic and morphological survey. *Protoplasma* 68, 135–156.
- Patrick, JW (1997). PHLOEM UNLOADING: Sieve Element Unloading and Post-Sieve Element Transport. *Annu Rev Plant Biol* 48, 191–222.
- Pelleschi, S, Rocher, JP, and Prioul, JL (1997). Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant, Cell Environ* 20, 493–503.
- Pharr, DM, Stoop, JMH, Feusi, MES, Williamson, JD, Massel, MO, and Conkling, MA (1995). The Dual Role of Mannitol as Osmoprotectant and Photoassimilate in Celery. *HortScience* 30, 1182–1188.
- Pleyerová, I, Hamet, J, Konrádová, H, and Lipavská, H (2022). Versatile roles of sorbitol in higher plants: luxury resource, effective defender or something else? *Planta* 256, 1–27.

- Pommerrenig, B, Eggert, K, and Bienert, GP (2019). Boron Deficiency Effects on Sugar, Ionome, and Phytohormone Profiles of Vascular and Non-Vascular Leaf Tissues of Common Plantain (*Plantago major* L.). *Int J Mol Sci* 20, 3882.
- Pommerrenig, B, Ludewig, F, Cvetkovic, J, Trentmann, O, Klemens, PAW, and Neuhaus, HE (2018). In concert: Orchestrated changes in carbohydrate homeostasis are critical for plant abiotic stress tolerance. *Plant Cell Physiol* 59, 1290–1299.
- Pommerrenig, B, Müdsam, C, Kischka, D, and Ekkehard Neuhaus, H (2020). Treat and trick: Common regulation and manipulation of sugar transporters during sink establishment by the plant and the pathogen. *J Exp Bot* 71, 3930–3940.
- Pommerrenig, B, Papini-Terzi, FS, and Sauer, N (2007). Differential Regulation of Sorbitol and Sucrose Loading into the Phloem of *Plantago major* in Response to Salt Stress. *Plant Physiol* 144, 1029–1038.
- Ramsperger-Gleixner, M, Geiger, D, Hedrich, R, and Sauer, N (2004). Differential Expression of Sucrose Transporter and Polyol Transporter Genes during Maturation of Common Plantain Companion Cells. *Plant Physiol* 134, 147–160.
- Reidel, EJ, Rennie, EA, Amiard, V, Cheng, L, and Turgeon, R (2009). Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiol* 149, 1601–1608.
- Rennie, EA, and Turgeon, R (2009). A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 14162–14167.
- Riesmeier, JW, Willmitzer, L, and Frommer, WB (1994). Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J* 13, 1–7.
- Rodrigues, CM et al. (2020). Vernalization alters sink and source identities and reverses phloem translocation from taproots to shoots in sugar beet. *Plant Cell* 32, 3206–3223.
- Ruan, YL (2014). Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu Rev Plant Biol* 65, 33–67.
- Rubinigg, M, Posthumus, F, Ferschke, M, Elzenga, JTM, and Stulen, I (2003). Effects of NaCl salinity on ¹⁵N-nitrate fluxes and specific root length in the halophyte *Plantago maritima* L. *Plant Soil* 250, 201–213.
- Rufty, TW, and Huber, SC (1983). Changes in Starch Formation and Activities of Sucrose Phosphate Synthase and Cytoplasmic Fructose-1,6-bisphosphatase in Response to Source-Sink Alterations. *Plant Physiol* 72, 474–480.
- Sahab, S, Suhani, I, Srivastava, V, Chauhan, PS, Singh, RP, and Prasad, V (2021). Potential risk assessment of soil salinity to agroecosystem sustainability: Current status and management strategies. *Sci Total Environ* 764, 144–164.
- Samuelsen, AB (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J Ethnopharmacol* 71, 1–21.
- Sauer, N (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett* 581, 2309–2317.
- Schneider, S et al. (2012). Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biol* 14, 325–336.

- Seago, JL (2020). Revisiting the occurrence and evidence of endodermis in angiosperm shoots. *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 273, 151709.
- Sefton, CA, Montagu, KD, Atwell, BJ, and Conroy, JP (2002). Anatomical variation in juvenile eucalypt leaves accounts for differences in specific leaf area and CO₂ assimilation rates. *Aust J Bot* 50, 301–310.
- Sharma, A, Shahzad, B, Kumar, V, Kohli, SK, Sidhu, GPS, Bali, AS, Handa, N, Kapoor, D, Bhardwaj, R, and Zheng, B (2019). Phytohormones Regulate Accumulation of Osmolytes Under Abiotic Stress. *Biomolecules* 9, 285.
- Sheehy Skeffington, MJ, and Jeffrey, DW (1988). Response of *Armeria maritima* (Mill.) Willd. and *Plantago maritima* L. from an Irish salt marsh to nitrogen and salinity. *New Phytol* 110, 399–408.
- Slewinski, TL (2011). Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: A physiological perspective. *Mol Plant* 4, 641–662.
- Slewinski, TL, Anderson, AA, Zhang, C, and Turgeon, R (2012). Scarecrow plays a role in establishing Kranz anatomy in maize leaves. *Plant Cell Physiol* 53, 2030–2037.
- Smekens, MJ, and Van Tienderen, PH (2001). Genetic variation and plasticity of *Plantago coronopus* under saline conditions. *Acta Oecologica* 22, 187–200.
- Smirnoff, N, and Cumbes, QJ (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28, 1057–1060.
- Smith, AM, and Stitt, M (2007). Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell Environ* 30, 1126–1149.
- Soar, I (1922). The Structure and Function of the Endodermis in the Leaves of the Abietineae. *New Phytol* 21, 269–292.
- Stitt, M, and Zeeman, SC (2012). Starch turnover: Pathways, regulation and role in growth. *Curr Opin Plant Biol* 15, 282–292.
- Stoop, JMH, Williamson, JD, and Pharr, DM (1996). Mannitol metabolism in plants: A method for coping with stress. *Trends Plant Sci* 1, 139–144.
- Tiessen, A, and Padilla-Chacon, D (2013). Subcellular compartmentation of sugar signaling: Links among carbon cellular status, route of sucrolysis, sink-source allocation, and metabolic partitioning. *Front Plant Sci* 3, 1–6.
- Trapp, G (1933). A Study of the Foliar Endodermis in the Plantaginaceae. *Earth Environ Sci Trans R Soc Edinburgh* 57, 523–546.
- Turgeon, R (2010). The role of phloem loading reconsidered. *Plant Physiol* 152, 1817–1823.
- Vaughn, MW, Harrington, GN, and Bush, DR (2002). Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10876–10880.
- Vernon, DM, Tarczynski, MC, Jensen, RG, and Bohnert, HJ (1993). Cyclitol production in transgenic tobacco. *Plant J* 4, 199–205.
- Vicente, O, Boscaiu, M, Naranjo, MÁ, Estrelles, E, Bellés, JM, and Soriano, P (2004). Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). *J Arid Environ* 58, 463–481.

Viola, R, Roberts, AG, Haupt, S, Gazzani, S, Hancock, RD, Marmiroli, N, Machray, GC, and Oparka, KJ (2001). Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* 13, 385–398.

Wardlaw, IF (1990). Tansley Review No. 27 The control of carbon partitioning in plants. *New Phytol* 116, 341–381.

Weschke, W, Panitz, R, Gubatz, S, Wang, Q, Radchuk, R, Weber, H, and Wobus, U (2003). The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J* 33, 395–411.

Williamson, JD, Jennings, DB, Guo, WW, Pharr, DM, and Ehrenshaft, M (2002). Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: Polyols - Multifunctional plant protection? *J Am Soc Hortic Sci* 127, 467–473.

Wright, IJ, Westoby, M, and Reich, PB (2002). Convergence towards higher leaf mass per area in dry and nutrient-poor habitats has different consequences for leaf life span. *J Ecol* 90, 534–543.

Xu, SM, Brill, E, Llewellyn, DJ, Furbank, RT, and Ruan, YL (2012). Overexpression of a potato sucrose Synthase gene in cotton accelerates leaf expansion, reduces seed abortion, and enhances fiber production. *Mol Plant* 5, 430–441.

Yamaki, S (1980). A sorbitol oxidase that converts sorbitol to glucose in apple leaf. *Plant Cell Physiol* 21, 591–599.

Zhang, H ping, Wu, J you, Tao, S tian, Wu, T, Qi, K jie, Zhang, S jun, Wang, J zhong, Huang, W jiang, Wu, J, and Zhang, S ling (2014). Evidence for Apoplasmic Phloem Unloading in Pear Fruit. *Plant Mol Biol Report* 32, 931–939.

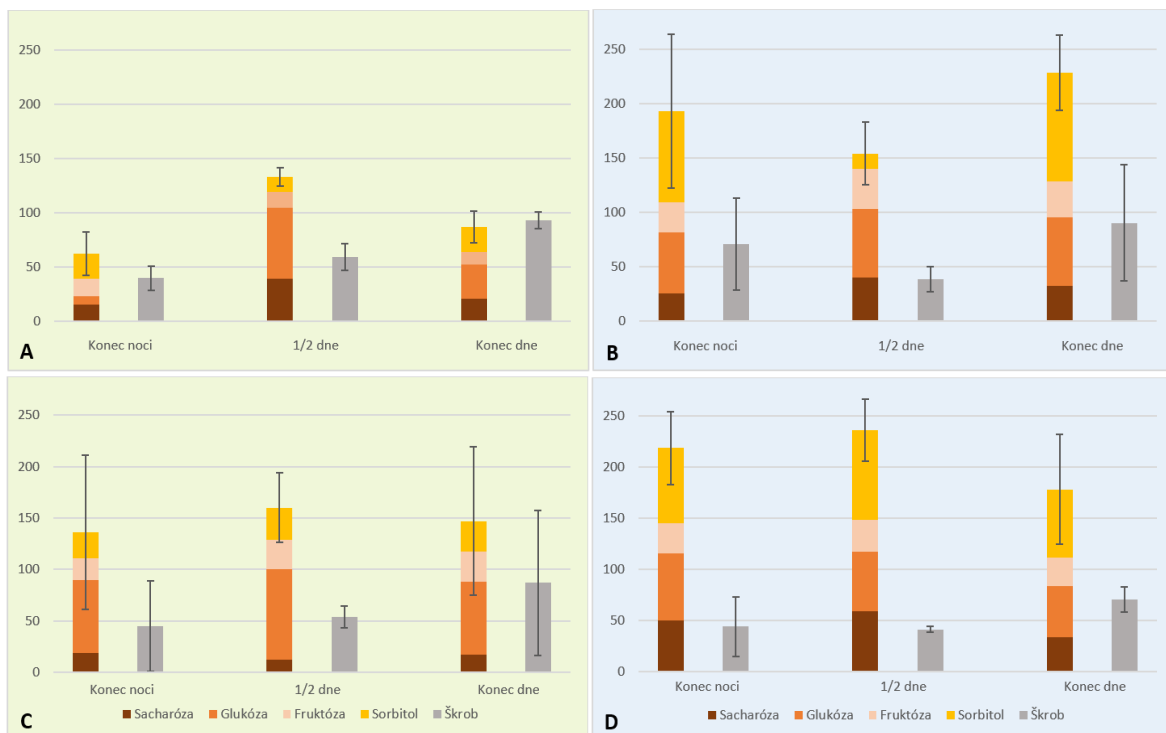
Zhou, R, Cheng, L, and Wayne, R (2003). Purification and characterization of sorbitol-6-phosphate phosphatase from apple leaves. *Plant Sci* 165, 227–232.

Citované internetové zdroje

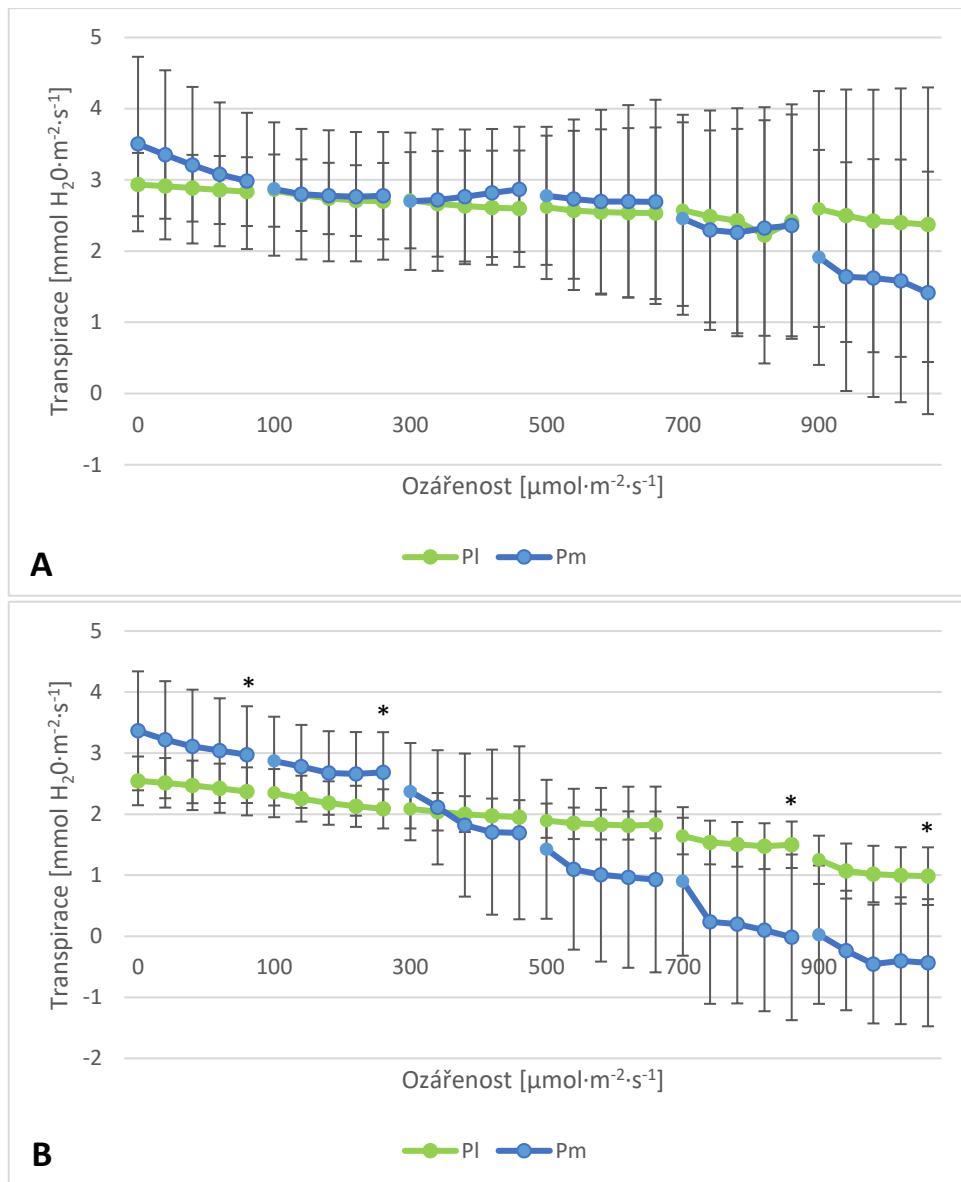
PLANTAGO MARITIMA L. – jitrocel přímořský / skorocel přímorský | BOTANY.cz. *BOTANY.cz - Zajímavosti ze světa rostlin* [online]. Copyright © 2022 BOTANY.cz [cit. 06.06.2022]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/plantago-maritima/>

PLANTAGO LANCEOLATA L. – jitrocel kopinatý / skorocel kopijovitý | BOTANY.cz. *BOTANY.cz - Zajímavosti ze světa rostlin* [online]. Copyright © 2022 BOTANY.cz [cit. 06.06.2022]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/plantago-lanceolata/>

9. Příloha



Obrázek S1: 24hodinová dynamika obsahu sacharidů v produkčním listu u dvou druhů jitrocele – *P. lanceolata* (A, C) a *P. maritima* (B, D). A, B - Experiment 1; C, D – Experiment 2. Produkční list – nejdelší na rostlině. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, v případě rozpustných sacharidů pro jejich sumu. Hydroponická kultivace, odběr rostlin po 5 (*P. lanceolata*) a 7 (*P. maritima*) týdnech. Škrob byl stanoven jako množství glukózy po enzymatickém štěpení. n = 6.



Obrázek S2: Rychlost transpirace dvou druhů jitrocele. A: Experiment 3; B: Experiment 4; PI – *Plantago lanceolata*, Pm – *Plantago maritima*. Hydroponická kultivace, rostliny po 5 (*P. lanceolata*) a 7 (*P. maritima*) týdnech kultivace, měření v rozmezí 9:00 až 14:00 hodin. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky; n = 11-12 (*P. lanceolata*), resp. n = 11-13 (*P. maritima*). Signifikance rozdílů byla hodnocena standartním t-testem (při normálním rozdělení dat) nebo Mann-Whitney testem (pokud rozdělení dat nebylo normální). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami; $\alpha = 0,05$.