

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Jan Kratochvíl**

Fyziologické mechanismy adaptace čiroku na abiotické stresy  
Physiological mechanisms of sorghum adaptation to abiotic stresses

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Hana Konrádová, Ph.D.  
Konzultant práce: doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Praha, 2015

### ***Poděkování***

Chtěl bych poděkovat RNDr. Hance Konrádové, Ph.D. a doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. za jejich cenné rady, trpělivost a čas, který této práci věnovaly. Dále bych rád poděkoval všem členům laboratoře, kteří svými radami pomohli vyřešit různé drobnější problémy. A nakonec samozřejmě děkuji své rodině za veškerou podporu při psaní.

### **Prohlášení:**

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

V Praze, 15. 5. 2015

Podpis

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Významné stresové faktory ovlivňující výnos čiroku .....	2
2.1. Sucho .....	2
2.2. Zasolení .....	7
2.3. Extrémní teploty .....	9
2.3.1. Vysoká teplota .....	9
2.3.2. Nízká teplota .....	10
2.4. Hlinité ionty .....	12
2.5. Kombinovaný stres .....	12
3. Vliv mykorhizy na odolnost čiroku k abiotickému stresu .....	13
4. Způsoby zvýšení odolnosti čiroku k abiotickému stresu .....	14
4.1. Exogenní aplikace různých látek .....	14
4.2. Genetické modifikace čiroku .....	16
5. Závěr .....	17
6. Seznam použité literatury .....	18

## **Abstrakt**

Čirok je zemědělská plodina tradičně využívaná zejména v zemích Afriky a Asie jako potravina, krmivo, zdroj vlákniny a k výrobě energie. Odolnost k působení různých druhů abiotického stresu, zejména sucha, mu získala označení „velbloud mezi plodinami“ a činí ho předmětem zájmu mnoha studií. V dnešní době se uvažuje o zavedení nebo rozšíření pěstování vhodných genotypů čiroku i v dalších částech světa (Severní a Střední Amerika, Evropa). První část této rešerše shrnuje výsledky současných studií zaměřených především na fyziologická přizpůsobení čiroku k suchu, zasolení, extrémním teplotám, přítomnosti hlinitých iontů v půdě a různým kombinacím těchto stresových faktorů. Druhá část práce se věnuje způsobům umožňujícím zmírnit působení stresu na rostliny. Mezi ty patří aplikace různých látek a genetické úpravy organismu.

**Klíčová slova:** *Sorghum bicolor*, sucho, zasolení, extrémní teploty, toxicita hlinitých iontů, mykorrhiza

## **Abstract**

Sorghum is a traditional crop, which has been grown especially in the countries of Africa and Asia. It is used as a food, fodder, source of fiber and energy. Because of its tolerance to various abiotic stresses, especially drought, sorghum is often called „the camel of crops“, and there are a lot of studies trying to clarify the basis of this tolerance. Nowadays, suitable sorghum genotypes are considered as an alternative in other parts of the world (North and Middle America, Europe) or to widen the planting areas. The first part of this thesis summarizes results of current studies aimed on sorghum physiological responses to drought, high salinity, extreme temperatures, aluminium toxicity and the combination of these stresses. The second part explains the ways how to alleviate effect of stresses on the plant. It includes the application of various compounds and genetic modifications.

**Keywords:** *Sorghum bicolor*, drought, salinity, extreme temperatures, aluminium toxicity, mycorrhiza

## Seznam použitých zkratk

ABA	kyselina abscisová
ABRE	ABA responsive element
ACC	kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová
APSIM	The Agricultural Production Systems Simulator
CAT	katalasa
CWI	cell wall invertase
DBE	starch debranching enzyme
GBSS	granule-bound starch synthase
HSP	heat shock protein
LRWC	leaf relative water content
MS	mass spectrometry
PEG	polyethylenglykol
PI	performance index
QTL	quantitative trait locus
ROS	reactive oxygen species
SBE	starch branching enzyme
SOD	superoxiddismutasa
SSS	soluble starch synthase
TMG	trimethylglycin

## 1. Úvod

Čirok [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] je rostlina z čeledi lipnicovitých (Poaceae). Dorůstá až do výšky pěti metrů a většina jeho kultivarů patří mezi jednoleté rostliny. Pochází z Afriky a v roce 2013 byl pátou nejpěstovanější obilninou na světě (FAO, 2015). Pro člověka má široké spektrum využití. Zrnový čirok (Obr. č. 1) je pěstován kvůli škrobu obsaženému v jeho zrnech, která slouží jako potrava pro lidi, krmivo pro domácí zvířata a k výrobě alkoholických nápojů. Cukrový čirok ukládá ve stonku velké množství cukrů. Mízu obsahující tyto cukry je možné extrahovat a použít k výrobě sirupu. Dále se z cukrového čiroku připravují též biopaliva. Z květenství technického (metlového) čiroku jsou získávána vlákna a súdánský čirok (Obr. č. 2) je využíván jako pícnina. Díky rychlému růstu lze čirok pěstovat i k produkci biomasy, která slouží převážně k zisku energie jejím spalováním.

Čirok disponuje C4 metabolismem, a především v teplejších oblastech s nedostatkem závlahy dosahuje vyššího výnosu než další C4 rostliny, například kukuřice nebo cukrová třtina. Díky tomu je v některých zemích Afriky a Asie hlavním zdrojem obživy chudších zemědělců. Se zvyšující se nedostupností vody a zhoršujícími se podmínkami pro pěstování plodin roste potenciál čiroku v produkci potravin a zisku energie i v dalších částech světa.

I přes značnou odolnost čiroku mají ovšem různé stresové faktory výrazný vliv na jeho růst a výnos. Proto je čirok předmětem zájmu vědců i šlechtitelů využívajících jak klasické šlechtění, tak genetické modifikace s cílem vylepšit jeho vlastnosti nebo dodat mu nové. Bohužel pro ně je schopnost odolávat nepříznivým podmínkám výsledkem mnoha komplexních reakcí a přizpůsobení od změn obsahu různých látek v buňce až po ovlivnění růstu celé rostliny. Genom čiroku již osekvenován byl (Paterson *et al.*, 2009), nyní je pro efektivní vývoj nových kultivarů potřeba co nejlépe prozkoumat odpovědi organismu na působení stresu.



Obr. č. 1: Pokusné pole zrnového čiroku poblíž Manhattanu. Převzato z <http://www.npr.org/sections/thesalt/2013/10/31/231509864/heat-drought-draw-farmers-back-to-sorghum-the-camel-of-crops>



Obr. č. 2: Súdanský širok. Převzato z <http://www.livingcropmuseum.info/CropDetail/Sorghum%20Sudangrass/Sorghum%20sudangrass%207aug05.JPG>

**Cílem této práce** je shrnout aktuální poznatky o reakcích čiroku na působení vybraných abiotických stresových faktorů.

## **2. Významné stresové faktory ovlivňující výnos čiroku**

### **2. 1. Sucho**

Sucho patří mezi hlavní faktory snižující výnos čiroku. Nedostatek vody u rostlin vyvolává řadu fyziologických, růstových a vývojových změn. Jeden z důvodů nižšího výnosu u rostlin vystavených suchu je snížení aktivity enzymů syntetizujících škrob. Yi *et al.* (2014) sledovali vliv sucha (7 dní bez zálivky během kvetení) na akumulaci škrobu v zrnech a na aktivitu enzymů podílejících se na metabolismu škrobu. Byly pozorovány rozdíly mezi hybridem Tieza 17, který akumuluje vysoké množství škrobu a Liaozu 11, který ho ukládá méně. U všech rostlin vystavených suchu byla zjištěna snížená aktivita rozpustné syntasy škrobu (soluble starch synthase – SSS), syntasy škrobu vázané na částice (granule-bound starch synthase – GBSS), enzymu větvičího škrob (starch branching enzyme – SBE) a enzymu odstraňujícího větvení škrobu (starch debranching enzyme – DBE). Akumulace škrobu (amylosy a amylopektinu) byla suchem

ovlivněna u hybridu Tieza 17 více (snížení obsahu o 21,93 % – 22,5 % vůči kontrole) než u hybridu Liaozha 11 (snížení obsahu o 4,08 % – 8,99 % vůči kontrole) (Yi *et al.*, 2014).

Další reakcí na působení sucha je snížení účinnosti fotosyntézy. To je zčásti následek poškození molekul účastnících se fotosyntézy, a zčásti reakce rostliny, která snížením účinnosti fotochemických reakcí tomuto poškození předchází. Zegada-Lizarazu *et Monti* (2013) provedli studii, ve které zaznamenávali změny ve fotosyntéze u rostlin cukrového čiroku vystavených krátkému (20 dní) nebo dlouhému (40 dní) období sucha 40 nebo 60 dní po výsevu. Byl sledován maximální kvantový výtěžek a výkonnostní index (performance index - PI), do kterého je zahrnuto více vlastností – hustota aktivních reakčních center, využití excitační energie a přeměna excitační energie v elektronový tok. V obou fázích vývoje sucha způsobilo snížení sledovaných veličin, v případě sucha v pozdní fázi vývoje bylo toto snížení dvojnásobné oproti časné vývojové fázi. V časné fázi bylo jako hlavní způsob ochrany vyhodnoceno snížení účinnosti fotosyntetických reakcí. V pozdní fázi bylo zjištěno, že mnoho reakčních center fotosystému II je inaktivováno nebo poškozeno. Zde má dle autorů hlavní podíl na ochraně fotosystému zvýšený obsah kompatibilních solutů. Po obnovení závlivky došlo nezávisle na délce sucha a vývojové fázi rostliny ke kompletnímu obnovení všech funkcí včetně fotosystému II. To by mohla být jedna z vlastností podílejících se na schopnosti čiroku při nedostatku vody zastavit růst a po obnovení závlivky v něm pokračovat, což bylo pozorováno i v tomto experimentu (Zegada-Lizarazu *et Monti*, 2013).

Část přizpůsobení čiroku suchu má základ ve změně genové exprese. Johnson *et al.* (2014) pomocí analýzy microarrays zjistili, že při vystavení rostlin suchu přerušením závlivky došlo ke změně exprese cca 4 % genomu. Většinou to byly geny kódující proteiny známých drah zvyšujících odolnost k suchu – např. vyšší exprese genů s promotory ABRE (ABA responsive element, ABA – kyselina abscisová). Počet genů se změněnou expresí byl podobný jako u experimentu, který provedli Dugas *et al.* (2011), kde byl stres vyvolán pomocí polyethylenglykolu (PEG) 8000. Tato látka vyvolává osmotický stres, a přitom neprochází do buněk a přímo neovlivňuje jejich metabolismus. Výsledky dosažené s použitím PEG se ovšem někdy mohou lišit od výsledků experimentů navozujících stres zrušením závlivky. Způsob navození stresu a doba jeho trvání (v případě PEG 27 hodin, v případě přerušení závlivky několik dní) nejspíš způsobily pozorované rozdíly v genové expresi – shodných genů byla cca jedna třetina. Při použití PEG bylo exprimováno více genů pro enzymy zhášeující volné radikály, zatímco při přerušení závlivky došlo například k vyšší expresi genů indukujících syntézu vosků na povrchu listů (Johnson *et al.*, 2014).

Vyšší exprese byla pozorována také u některých genů kódujících enzymy, které se účastní syntézy osmoticky aktivních látek. Wood *et al.* (1996) zjistili, že u čiroku vystaveného suchu v období před kvetením měla významný podíl na zvýšení osmotického potenciálu v buňkách listů akumulace trimethylglycinu (TMG) a prolinu. Ve své studii se zaměřili na expresi genů *BADH1* a *BADH15*.



Předpokládá se, že tyto geny kódují betainaldehyddehydrogenasu, která se účastní syntézy trimethylglycinu (Weigel *et al.*, 1986). V listech rostlin vystavených suchu byl zjištěn zvýšený obsah mRNA těchto genů, což pozitivně korelovalo s vyšším obsahem TMG. Autoři předpokládají, že vyšší obsah TMG v listech je způsoben převážně jeho syntézou, ale nedá se vyloučit ani transport z jiných orgánů (Wood *et al.*, 1996). Su *et al.* (2011) provedli studii, ve které se zaměřili na geny *SbP5CS1* a *SbP5CS2*. Ty kódují  $\delta$ -1-pyrrolin-5-karboxylátsyntetasu, která se účastní syntézy prolinu (Hu *et al.*, 1992). *SbP5CS1* se nachází na chromozómu 3 a *SbP5CS2* na chromozómu 9. Analýza promotorů odhalila u obou genů přítomnost několika míst spouštějících expresi v odpovědi na různé stresové faktory. Po vystavení desetidenních semenáčů suchu došlo ke zvýšení obsahu transkriptu obou genů, čemuž odpovídalo zvýšení obsahu prolinu (Su *et al.*, 2011). Wood *et al.* (1996) předpokládají, že kromě syntézy může být jeho vyšší obsah způsoben též snížením degradace nebo snížením jeho využití v proteosyntéze. *SbP5CS2* byl exprimován rovnoměrně ve všech pletivech, zatímco *SbP5CS1* především v plně vyvinutých vegetativních a generativních orgánech. Z toho autoři usuzují, že *SbP5CS2* má úlohu v syntéze prolinu za normálních podmínek a *SbP5CS1* se účastní hlavně odpovědi na stres. S tím souvisí i další předpoklad, a to že tyto dva geny pravděpodobně nejsou redundantní (Su *et al.*, 2011).

V reakci na suchu dochází k rozsáhlé změně metabolismu rostliny. Pavli *et al.* (2013) provedli metabolickou studii, ve které použili k simulaci působení sucha PEG 6000. Rostliny cukrového čiroku byly po vyklíčení vystaveny sedmidennímu působení PEG 6000 ve dvou koncentracích (2,5% a 5% PEG). Změny v obsahu metabolitů byly různé v kořenech a listech. Ve většině případů byla změna obsahu látek přímo úměrná míře stresu. U několika výjimek (alanin, lysin, ornithin, serin, threonin, citrát) byl ovšem při použití 2,5% PEG zaznamenán vyšší nárůst obsahu látky vůči kontrole než při použití 5% PEG. K největším změnám v listech došlo u sacharidů – následkem sucha se zvýšil obsah glukosy, lyxosy, trehalosy, rafinosy, fruktosy a sacharosy. Naopak obsah talosy byl nižší. Z cukerných alkoholů došlo ke zvýšení obsahu sorbitolu, threitolu a myo-inositolu (Pavli *et al.*, 2013). Pozorovaná akumulace cukerných alkoholů je v souladu se zjištěními předchozích studií, které předpokládají jejich roli v reakci na osmotický stres (Patonnier *et al.*, 1999; Rizhsky *et al.*, 2004). Dále se zvýšil obsah některých aminokyselin a malátu. V kořenech došlo ke zvýšení obsahu lyxosy a trehalosy. Soforosa byla pozorována pouze v kořenech kontrolních rostlin. Došlo ke snížení hladiny glukosa-6-fosfátu (Pavli *et al.*, 2013), což má vliv na syntézu trehalosy (Rontein *et al.*, 2002;). Dále v kořenech došlo ke snížení obsahu malátu a zvýšení obsahu manitolu a sorbitolu. Dále se zvýšila hladina některých aminokyselin, zejména alaninu, glycinu, glutamátu, ornithinu, lysinu, serinu a threoninu a snížila hladina methioninu a cysteinu. U sledovaných rostlin nedošlo ke zvýšení obsahu prolinu v kořenech ani listech (Pavli *et al.*, 2013). To Pavli *et al.* (2013) považují za zajímavé zjištění, protože prolin je jedna z nejčastěji syntetizovaných osmoticky aktivních látek u různých rostlin při osmotickém stresu (Ali *et al.*, 1999; Evers *et al.*, 2010; Kocheva *et al.*, 2014). Výsledky Pavli *et*

*al.* (2013) jsou ovšem v kontrastu i se zjištěními studií provedených na samotném čiroku, kde bylo pozorováno zvýšení hladiny prolinu při vystavení suchu (Ibrahim *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2011), a dokonce i při vyvolání osmotického stresu pomocí PEG 6000 (Yin *et al.*, 2014). Tento rozdíl ve výsledcích byl nejspíš způsoben různým experimentálním designem jednotlivých studií. Co se týče dalších metabolitů, v listech i kořenech se zvýšila hladina citrátu, glykolátu, glukonátu a sukcinátu. Dále došlo k vyčerpání putrescinu (Pavli *et al.*, 2013), což stojí za povšimnutí, protože též patří mezi látky často syntetizované rostlinami při odpovědi na působení různých stresových faktorů. (Flores *et al.*, 1984; Rácz *et al.*, 1996). Zvýšení obsahu některých aminokyselin během působení stresu bylo dle autorů způsobeno buď snížením proteosyntézy, nebo vyšší degradací proteinů, případně díky působení obou vlivů (Pavli *et al.*, 2013).

Komplexní soubor reakcí na stres vyvolává kyselina abscisová (ABA). Mimo jiné kontroluje otevírání a zavírání průduchů, zajišťuje ochranu struktury membrán pomocí zvýšení exprese termostabilních a hydrofilních proteinů, indukuje dormanci pupenů a semen při nepříznivých podmínkách a má vliv i na tvorbu laterálních kořenů. Důležitou skupinou proteinů, jejichž syntézu ABA vyvolává, jsou LEA proteiny (late embryogenesis abundant) skupiny 3. Mají roli v ochraně buněk při různých stresových situacích. Dalal *et al.* (2012) provedli analýzu genomu čiroku pomocí metody BLAST a identifikovali 4 geny kódující tyto proteiny. Poté byla provedena analýza míry exprese těchto genů v semenech při zrání a zralosti a ve vegetativních pletivech při vystavení různým abiotickým stresovým faktorům. Geny *SbLEA3A-1* a *SbLEA3A-2* byly exprimovány v časně fázi vývoje semen a ve zralých semenech se jejich exprese výrazně zvýšila. Geny *SbLEA3B-1* a *SbLEA3B-2* byly exprimovány pouze ve zralých semenech. Působení ABA i sucho vyvolaly zvýšení exprese všech *SbLEA3* genů. Na rozdíl od ostatních genů, jejichž expresi ovlivnily i další stresové faktory (PEG, zasolení), expresi *SbLEA3B-2* zvýšila pouze aplikace ABA nebo působení sucha. Z toho autoři usuzují, že by tento gen mohl mít specifickou roli v reakci na nedostatek vody (Dalal *et al.*, 2012).

Změnami v samotné dráze signalizace ABA se zabývaly Dalal *et al.* (2014), které provedly studii zaměřenou na geny kódující komponenty signální dráhy ABA a jejich regulaci. Jeden z mechanismů signální transdukce ABA zahrnuje tři klíčové komponenty – jaderný receptor PYR/PYL/RCAR, fosfatasy PP2C rodiny A, a kinasy SnRK2 třídy III. Analýza genomu čiroku *in silico* odhalila 8 PYL ABA receptorů, 9 PP2C rodiny A, a 3 SnRK2 třídy III. Vliv sucha na expresi genů pro signální komponenty byl sledován u semenáčků čiroku. V listech byla zjištěna snížená exprese všech genů rodiny *SbPYL* kromě *SbPYL1* a *SbPYL7*, jejichž exprese byla výrazně zvýšena. V kořenech byla exprese všech genů rodiny *SbPYL* za sucha snížena. Z devíti *SbPP2C* odhalených analýzou genomu bylo vybráno 6, u kterých byly dále sledovány změny v jejich expresi při vystavení stresu. U všech těchto genů bylo pozorováno zvýšení exprese v listech, zatímco v kořenech došlo u poloviny ke zvýšení exprese, u dvou ke snížení a exprese jednoho genu zůstala neovlivněna. Geny pro kinasy

SnRK2 třídy III měly za sucha buď sníženou expresi, nebo se jejich exprese nezměnila. Pro vývoj kultivarů odolnějších ke stresu bude potřeba provést další studie jednak k získání detailních informací o těchto genech, a jednak pro pochopení celého komplexu signalizace ABA (Dalal *et Inupakutika*, 2014).

V rámci hospodaření s vodou dokáže čirok provádět úpravy i na úrovni celého těla rostliny. V případě vystavení působení sucha v období po kvetení mají výrazně vyšší výnos rostliny, které nepodléhají senescenci vyvolané suchem a dokáží udržovat zelené listy a stonky. Tyto rostliny mají též vyšší hmotnost zrn a jsou odolnější k poléhání (Borrel *et al.*, 2014). Xu *et al.* (1999) provedli experiment, ve kterém potvrdili přímou souvislost mezi vizuálně hodnocenou „stálezeleností“ (v originále stay green) a obsahem chlorofylů v listech. „Stálezelené“ rostliny v tomto experimentu také udržovaly v mladých listech výrazně vyšší relativní obsah vody než rostliny podléhající senescenci vyvolané suchem (Xu *et al.*, 1999). Na chromozómech byla určena řada míst, které kódují geny s vlivem na hospodaření s vodou, a tím i na „stálezelenost“. Patří mezi ně lokusy *Stg1*, *Stg2*, *Stg3* a *Stg4*. Expresí genů z těchto úseků ovlivňuje dle autorů růst v závislosti na zápoji rostlin. Bylo zjištěno, že v prostředích s malou hustotou rostlin způsobují snížení počtu odnoží a zvýšení plochy spodních listů. V prostředích s velkou hustotou rostlin způsobují zmenšení plochy horních listů. V některých případech též snižují počet listů na stonku. Dále byl pozorován vliv na růst kořenů, stavbu listů a transpiraci na úrovni listu – ovlivnění hustoty průduchů. Všechny tyto vlastnosti umožnily snížit spotřebu vody před kvetením, a díky tomu rostliny netrpěly suchem během zrání semen a vydržely déle zelené (Borrel *et al.*, 2014). Hammer (2006) provedl simulační studii, ve které zjistil, že pokud je část závlahy přesunuta do období po kvetení, výnos je podstatně vyšší. K této studii využil simulační software APSIM – The Agricultural Production Systems Simulator.

Je důležité si uvědomit, že reakce na sucho se liší v závislosti na stáří rostliny. Sankarapandian *et al.* (2012) sledovali změny v různých morfologických a fyziologických vlastnostech u rostlin čiroku vystavených působení sucha ve třech růstových fázích (první růstová fáze – od vyklíčení po zahájení tvorby klásků, druhá růstová fáze – od zahájení tvorby klásků do kvetení, třetí růstová fáze – od kvetení až po dozrání semen). Hodnoceny byly tyto fyziologické parametry: výška rostliny, počet a délka kořenů, relativní obsah vody v listech (LRWC – leaf relative water content), obsah chlorofylů a vodivost průduchů. Dále byla sledována korelace těchto parametrů s výnosem zrna a celkovou biomasou stonku. Výnos nejvíce ovlivnilo působení sucha v druhé fázi, poté v první a nejméně ve třetí (Sankarapandian *et al.*, 2012). Jedním z důvodů může být to, že při vystavení suchu v první fázi mají rostliny dost času na zotavení. Ve třetí fázi má již rostlina nashromážděno ve stonku velké množství cukrů, díky jejichž mobilizaci a transportu dokáže podobně jako další trávy v případě zhoršených podmínek pokračovat ve vývoji semen (Slewinski, 2012). Také se ukázalo, že v každé vývojové fázi mají různé fyziologické parametry rostlin rozdílný vliv na výnos. V první fázi byla zjištěna pozitivní korelace výnosu s obsahem chlorofylů. V druhé fázi výnos pozitivně koreloval s počtem kořenů,

LRWC, obsahem chlorofylů a negativně s vodivostí průduchů. Ve třetí fázi byla zjištěna pozitivní korelace s LRWC a negativní korelace s vodivostí průduchů. V první i druhé fázi množství biomasy stonku pozitivně korelovalo s výškou rostliny a obsahem chlorofylů a negativně s vodivostí průduchů (Sankarapandian *et al.*, 2012). Podobnou studii jako Sankarapandian *et al.* (2012) provedli Mutava *et al.* (2011), kteří sledovali 300 různých genotypů čiroku s cílem vyhodnotit fenologické a fyziologické vlastnosti související s tolerancí k suchu a s výnosem rostlin. Celkově byla zjištěna negativní korelace mezi výškou rostliny a výnosem. Rostliny se lišily v hospodaření s vodou. Část rostlin udržovala nižší teplotu v zápoji za cenu vyšší spotřeby vody a druhá část rostlin dokázala snášet vyšší teplotu listů (způsobenou snížením transpirace) bez poklesu výnosu (Mutava *et al.*, 2011).

## 2.2. Zasolení

Další překážkou pro rostlinnou produkci je zasolení půdy, které významně ovlivňuje růst pěstovaných rostlin. Často je problémem společně s nedostatkem vody, obzvláště pokud je aplikován nesprávný způsob závlivy. Zasolení rostliny nepříznivě ovlivňuje jednak vyvoláním osmotického stresu, a jednak tím, že narušuje iontovou rovnováhu v buňkách a způsobuje hromadění iontů v koncentracích, které jsou pro rostlinu škodlivé (Tester *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2013). V experimentu provedeném Zhao *et al.* (2014) bylo zjištěno, že vyšší koncentrace  $\text{Na}^+$  (200 mM nebo 300 mM) snižuje rychlost klíčení semen čiroku, počet vyklíčených semen, počet přeživších semenáčů, vzrůst a produkci sušiny. Je možné, že snížení rychlosti klíčení je přizpůsobení, které umožňuje semenům vyklíčit až po odeznění nepříznivých podmínek (Ungar, 1996).

Při zasolení se rostliny snaží udržet stálý příjem vody zvýšením osmotického potenciálu buněk. Jednou skupinou látek, které k tomu využívají, jsou cukry. Gill *et al.* (2003) zjistili, že v embryích semen čiroku klíčících na zasoleném médiu (410 mM NaCl) došlo k výraznému zvýšení obsahu cukrů oproti embryím semen na médiu bez soli. K největší změně došlo u fruktosy, které embrya obsahovala ze všech cukrů nejvíce, a u glukosy. Zvýšení obsahu sacharosy nebylo již tak výrazné (Gill *et al.*, 2003). Yin *et al.* (2013) ve svém experimentu vystavili sedmnáctidenní rostliny čiroku působení 100 mM NaCl po dobu sedm dní a po 1, 3 a 7 dnech sledovali změny obsahu cukrů oproti kontrolním rostlinám. Po jednom dni došlo ke zvýšení obsahu sacharosy na více než dvojnásobek oproti kontrole, což bylo pozorováno i po třech dnech působení NaCl. Po sedmi dnech byla hladina sacharosy oproti kontrole stále vyšší, a navíc došlo též k výraznějšímu zvýšení hladiny glukosy (Yin *et al.*, 2013). Z výsledků těchto studií vyplývá, že i u čiroku se cukry účastní odpovědi na zasolení, a že zvýšení jejich hladiny se liší u rozdílných vývojových stádií a při vystavení různé úrovni zasolení.

Reakce na zasolení je možné pozorovat též na úrovni proteosyntézy. Ngara *et al.* (2012) provedli proteomickou studii na cukrovém čiroku (kultivar MN1618), ve které byly semenáče po vyklíčení pěstovány 14 dní na médiu se 100 mM NaCl. K separaci, vizualizaci a identifikaci proteinů v listech semenáčů byla použita 2D PAGE a hmotnostní spektrometrie (MS – mass spectrometry). U 118 proteinů byla pozorována významná změna v jejich obsahu vůči kontrole. Z toho bylo vybráno 79 proteinů k analýze pomocí MS. 17 z těchto proteinů bylo detekováno pouze u rostlin na médiu s NaCl. Pro 55 ze 79 zkoumaných proteinů byla nalezena shoda s položkami v sekvenční databázi (NCBI) – z toho 22 proteinů byly hypotetické proteiny pro čirok (Ngara *et al.*, 2012). Jedná se o proteiny odvozené ze sekvence nukleových kyselin, jejichž existence zatím nebyla potvrzena v žádném experimentu (Lubec *et al.*, 2005). Ve zbývajících 33 skvrnách na gelu bylo díky výskytu isoformem identifikováno pouze 19 unikátních proteinů. 28 identifikovaných proteinů, u kterých došlo ke změně obsahu, mělo nějakou roli spojenou se získáním energie - např. Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasa-oxygenasa), u kterého došlo ke zvýšení hladiny, sedoheptulosabisfosfatasa (snížení hladiny), fosforibulokinasa (snížení hladiny) (Ngara *et al.*, 2012). Ve studii, kterou provedli Swami *et al.* (2011) se ovšem hladina Rubisca při zasolení nezměnila. To mohla způsobit odlišná odpověď kultivaru (genotyp csv-17) použitého v této studii nebo odlišná doba vystavení zasolení a koncentrace soli (96 hodin, 200 mM NaCl). Vyšší obsah Rubisca může znamenat vyšší potřebu fixace CO<sub>2</sub> a vyšší nároky na energii při zasolení. Naopak u proteinů účastnících se regenerační fáze Calvinova cyklu (sedoheptulosabisfosfatasa, fosforibulokinasa) byl zjištěn nižší obsah při zasolení. Z toho autoři usuzují, že zasolení může mít odlišný vliv na různé proteiny účastnící se té samé metabolické dráhy. Dále bylo identifikováno šest podjednotek ATP-syntasy (u 4 se obsah zvýšil a u 2 snížil). Další identifikované proteiny patřily ke skupině mající roli v odpovědi rostliny na sekundární stres – např. došlo ke zvýšení obsahu glutathion-S-transferasy a askorbátperoxidasy. Také se zvýšil obsah proteinů účastnících se proteosyntézy. To dle autorů umožňuje udržovat stálou hladinu proteinů, protože při zasolení dochází k jejich zvýšené degradaci. Dále byla zjištěna změna obsahu u několika proteinů účastnících se primárního metabolismu a signální transdukce (Ngara *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2014) zjistili, že mezi další proteiny účastnící se odpovědi na zasolení patří sodno-draselný transportér s vysokou afinitou k K<sup>+</sup>. Tento přenašeč kódovaný genem *SbHKT1;4* selektivně přijímá K<sup>+</sup> při vysoké koncentraci Na<sup>+</sup> v půdě. Autoři zjistili, že u rostlin tolerantních k zasolení byl při vyšší koncentraci Na<sup>+</sup> v půdě *SbHKT1;4* exprimován více než u rostlin citlivých. U tolerantních rostlin byl zjištěn příznivější poměr Na<sup>+</sup> a K<sup>+</sup> v buňkách, což pozitivně korelovalo s lepším růstem těchto rostlin. Z výsledků vyplývá, že čirok při zasolení udržuje správný poměr Na<sup>+</sup> a K<sup>+</sup> pomocí akumulace velkého množství K<sup>+</sup> (Wang *et al.*, 2014). Podobně jako sucho, i zasolení vyvolalo změnu exprese genů kódujících LEA proteiny. Konkrétně došlo ke zvýšení exprese genů *SbLEA3A-1* a *SbLEA3B-1* (Dalal *et al.*, 2012).

## 2.3. Extrémní teploty

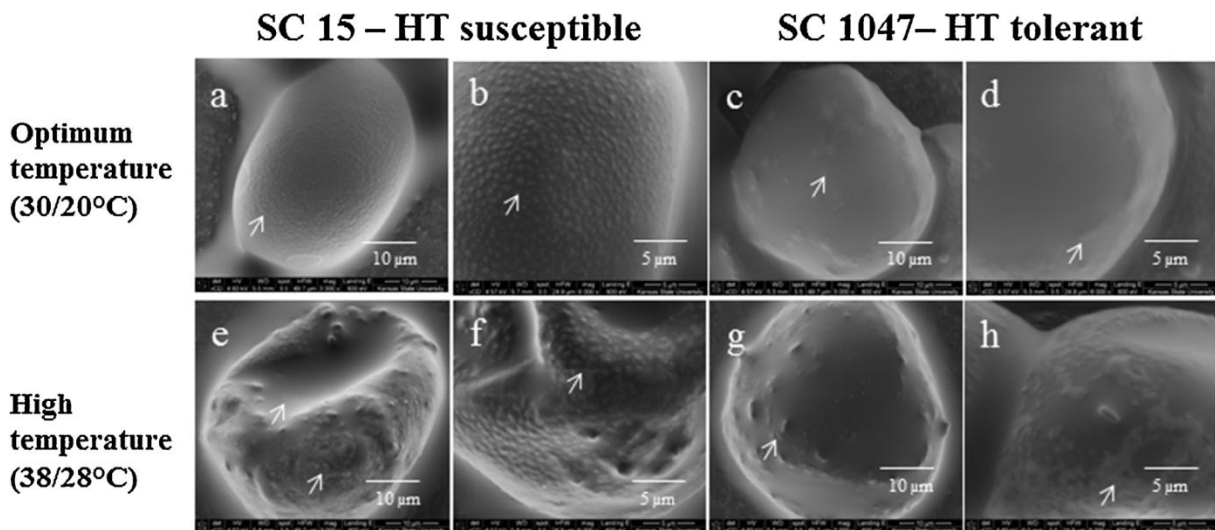
### 2.3.1. Vysoká teplota

Vzhledem k jeho geografickému původu, čiroku vyhovují vyšší teploty, ideální pro jeho růst je rozmezí 26 – 34 °C (Maiti, 1996; cit. v Prasad *et al.*, 2006). Extrémně vysoké teploty mají ovšem obzvláště v období vývoje reprodukčních orgánů negativní vliv na výnos čiroku. Poškození vyvolaná vysokou teplotou ve své studii sledovali Djanaguiraman *et al.* (2014). Kultivary čiroku ve fázi před kvetením vystavili působení vyšší teploty (maximální teplota ve dne 38 °C a minimální teplota 28 °C v noci) po dobu deseti dnů. Kontrolní rostliny byly pěstovány při nižší teplotě (maximální teplota ve dne 30 °C a minimální teplota 20 °C v noci). Po sedmi dnech po ukončení působení vyšší teploty byly sledovány jednak změny v listech související s fotosyntézou, a jednak stav pylových zrn a semen. U rostlin vystavených vyšší teplotě bylo pozorováno snížení obsahu chlorofylů – u všech kultivarů v podobné míře. Dále došlo ke snížení kvantového výtěžku fotosystému II a snížení rychlosti transportu elektronů přes membránu tylakoidů. Naopak se zvýšila nefotochemická disipace energie (Djanaguiraman *et al.*, 2014).

Ke snížení obsahu chlorofylů došlo též u rostlin vystavených teplotě 40 °C po dobu 6 hodin ve studii, kterou provedli Gosavi *et al.* (2014). V této studii byly použity kultivary čiroku tolerantní i citlivé k suchu, a též genotypy divokého čiroku. Nejvyšší úbytek chlorofylů byl zjištěn u citlivých kultivarů, nižší u divokých genotypů a nejnižší u tolerantních kultivarů. Dále byl u rostlin vystavených vyšší teplotě zjištěn vyšší obsah prolinu a vyšší aktivita  $\delta$ -1-pyrrolin-5-karboxylátsyntetasy (Gosavi *et al.*, 2014). Ta se účastní prvních dvou kroků syntézy prolinu (Hu *et al.*, 1992). Nejvyšší obsah prolinu a nejvyšší aktivita  $\delta$ -1-pyrrolin-5-karboxylátsyntetasy byly zjištěny u tolerantních kultivarů a nejnižší u citlivých. Také došlo ke změnám v obsahu transkriptů pro enzymy zhášeující reaktivní formy kyslíku. U všech rostlin vystavených vyšší teplotě se zvýšila aktivita peroxidasy, superoxidodismutasy (SOD) a katalasy (CAT). Dále došlo k syntéze neobvyklých typů HSP (heat shock protein) – 19 u tolerantních, 8 u divokých a 6 u citlivých (Gosavi *et al.*, 2014). Na rozdíl od sucha a zasolení vysoká ani nízká teplota nezpůsobily žádné změny v expresi genů pro LEA proteiny skupiny 3. Z toho autoři usuzují, že se tyto proteiny nejspíš neúčastní reakce na nepříznivé teploty (Dalal *et al.*, 2012). Ve srovnání s působením sucha vyvolala vysoká teplota výraznější změnu exprese, a to přibližně 18 % genomu, což autoři připisují náhlosti a závažnosti jejího působení (Johnson *et al.*, 2014).

Při vystavení vysokým teplotám má značný vliv na výnos snížení klíčivosti pylu, které vede k nižšímu množství produkovaných semen. Djanaguiraman *et al.* (2014) pozorovali u rostlin vystavených vyšší teplotě hrubší povrch pylových zrn než při normálních teplotách (viz Obr. č. 3). To bylo možná způsobeno poškozením buněk tapeta, ze kterého se vyvíjí exina (Djanaguiraman *et al.*, 2014). Jain *et al.* (2007) zjistili, že u vyvíjejících se mikrospor rostlin čiroku dlouhodobě vystavených vyšší teplotě (36 °C ve dne, 26 °C v noci) byl podstatně snížen obsah škrobu oproti mikrosporám

kontrolních rostlin vyvíjejících se při 30 °C ve dne a 20 °C v noci. Jako hlavní důvod snížení obsahu škrobu v pylových zrnech rostlin vystavených vyšší teplotě autoři vyhodnotili snížení aktivity invertasy vázané na buněčnou stěnu (CWI – cell wall invertase), ke kterému došlo v tapetu i buňkách mikrospor. Dle autorů má tato invertasa klíčovou roli v řízení transportu sacharosy z buněk tapeta do apoplastu okolo mikrospor, ve kterých jsou její štěpné produkty využívány jako zdroj uhlíku pro syntézu škrobu. Též bylo zjištěno snížení obsahu transkriptu genu *SbIncw1*, který tuto invertasu kóduje. To bylo provázáno snížením obsahu transkriptu genu *MST1* (kóduje přenašeč pro monosacharidy) a *Mha1* (kóduje H<sup>+</sup> ATPasu na cytoplazmatické membráně), což vede k ještě nižší schopnosti příjmu látek z apoplastu. U mikrospor rostlin vystavených vyšší teplotě byl též pozorován nižší obsah transkriptů pro geny kódující proteiny, které se účastní syntézy škrobu (Jain *et al.*, 2007).



Obr. č. 3: Snímky povrchu pylových zrn zrajících při různé teplotě pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem. Na obrázcích a, b jsou vidět pylová zrna kultivaru citlivého k působení vyšší teploty zrající při optimální teplotě a na obrázcích e, f při zvýšené teplotě. Obrázky c, d znázorňují pylová zrna kultivaru odolného k působení vyšší teploty zrající při optimální teplotě a obrázky g, h při zvýšené teplotě. Šipky ukazují na povrch pylových zrn vyvíjejících se při optimální teplotě a na jeho narušení při zvýšené teplotě. Převzato z Djanaguiraman *et al.* (2014).

### 2.3.2. Nízká teplota

Limitujícím faktorem pro pěstování čiroku v mírném pásu je nízká teplota. S tímto problémem se potýkají především v USA, které patří mezi nejvýznamnější producenty čiroku. Proto je zde kladen velký důraz na vyšlechtění kultivarů, které by byly schopné růst brzy na jaře a mohly využít dostatek závlahy, která se v tomto období vyskytuje. Optimální rozmezí pro klíčení semen zrnového čiroku se nachází mezi 21 – 35 °C (Maiti, 1996; cit. v Prasad *et al.*, 2006), kritická teplota leží okolo 10 °C. Ve studii provedené Razmi *et al.* (2013) bylo při teplotách nižších než 15 °C ve dne a 10 °C v noci

pozorováno snížení počtu vyklíčených semen, rychlosti klíčení, délky kořene i stonku a množství vyprodukované sušiny kořene i stonku oproti rostlinám pěstovaným při vyšších teplotách (Razmi *et al.*, 2013). Dalším z důsledků působení chladu je snížení obsahu chlorofylů v listech (Bekele *et al.*, 2014; Maulana *et Tesso*, 2013). U rostlin vystavených chladu byl též zjištěn vyšší poměr délky kořene vůči délce stonku, což indikuje zhoršené hospodaření s vodou (Razmi *et al.*, 2013). To potvrzuje i viditelné vadnutí semenáčů pozorované ve studii, kterou provedli Bekele *et al.* (2014). V této rozsáhlé studii srovnávající data z experimentů provedených v kontrolovaných i polních podmínkách se autoři zaměřili na identifikaci vlastností souvisejících s tolerancí k chladu a na odhalení oblastí na chromozómech s geny, které jsou za tuto toleranci odpovědné. Největší vliv na přežití semenáčů vystavených chladu měla již zmíněná stavba kořenového systému a schopnost vzházení rostlin. Bylo zjištěno, že u rostlin vystavených chladu od začátku klíčení dochází k rozsáhlejším změnám v metabolismu umožňujícím přizpůsobení než u rostlin, které jsou vystaveny chladu až poté, co vyrostou nad úroveň substrátu. Největší citlivost k chladu byla pozorována 4 – 5 dní po vzejití. Oblasti ovlivňující odolnost k chladu byly identifikovány na 1., 2., 3., 6., 8., a 10. chromozómu. V těchto oblastech byly identifikovány geny pro enzymy účastnící se metabolismu auxinu, cytokininu a ABA. Autoři se domnívají, že změny v hladinách těchto hormonů mají roli v reakci na působení chladu. Zajímavé je zjištění, že lokalizace QTL (quantitative trait locus) na 3. chromozómu odpovídá umístění *Stg2*, kde se nachází geny s vlivem na „stálezelenost“ rostlin popisovanou výše. To by mohlo umožnit vyšlechtění rostlin odolných vůči širšímu spektru abiotických stresových faktorů. U několika hodnocených parametrů, obzvláště u vývoje kořenů a přežití semenáčů byla zjištěna silná dědičnost a korelace mezi genotypem a fenotypem, což je další slibné zjištění pro vývoj odolných kultivarů (Bekele *et al.*, 2014). Na výnos čiroku má vliv též vývojová fáze, ve které jsou rostliny chladu vystaveny. Maulana *et Tesso* (2013) provedli experiment, ve kterém použili dvě skupiny rostlin. První skupinu vystavili tři dny po vyklíčení desetidennímu období snížené teploty na 15 °C ve dne a 13 °C v noci, a po ukončení působení stresu pěstovali rostliny při stejných teplotách jako kontrolu až do dozrání semen. Druhá skupina rostlin byla vystavena shodnému desetidennímu působení chladu, ale v období kvetení. Kontrolní rostliny byly pěstovány při teplotě 25 °C ve dne a 23 °C v noci. Chlad u semenáčů snížil rychlost růstu a oddálil nástup kvetení a zrání semen. Výsledná výška rostliny a výnos ovšem ovlivněny nebyly. Autoři se domnívají, že u třídních semenáčů ještě nejsou nastartovány procesy související s výnosem rostliny, a proto nedošlo k jeho ovlivnění. V případě nižší teploty v období kvetení došlo u rostlin k oddálení zrání semen a výraznému snížení výnosu. Následky působení stresu (např. snížený obsah chlorofylů) byly patrné delší dobu po jeho ukončení. Z výsledků pozorování autoři usuzují, že semenáče mají schopnost rychleji se zotavit po krátkém období chladu než dospělé rostliny (Maulana *et Tesso*, 2013). Při tomto srovnání je ovšem nutné si uvědomit, že semenáče mají mnohem delší dobu k zotavení než rostliny v období kvetení. Významnou roli zde hraje též fakt, že vyvíjející se generativní orgány jsou obzvláště citlivé k působení různých druhů stresu.



## 2.4. Hlinité ionty

Značná část půdy vhodné k pěstování plodin má hodnoty pH nižší než neutrální. V takovémto prostředí dochází k uvolňování hlinitých iontů ( $\text{Al}^{3+}$ ), které negativně ovlivňují růst plodin včetně čiroku. Too *et al.* (2014) provedli studii, ve které sledovali vliv  $\text{Al}^{3+}$  na růst kořenů semenáčů čiroku, poškození buněčné membrány a akumulaci kalosy v kořenech. Byly použity kultivary citlivé i odolné k působení  $\text{Al}^{3+}$ . Rostliny byly vystaveny působení  $\text{Al}^{3+}$  v koncentracích 27  $\mu\text{M}$  a 39  $\mu\text{M}$  a výsledky byly sledovány po 24, 48 a 120 hodinách působení. U rostlin citlivých k  $\text{Al}^{3+}$  bylo pozorováno významné snížení růstu kořene, obzvláště po delším působení (48, 120 hodin). U odolných rostlin toto snížení pozorováno nebylo. Hlinité ionty se ukládaly v kořenové špičce a prodlužovací zóně kořene, nejvíce cca 1 – 2 mm od špičky kořene (Too *et al.*, 2014). V těchto místech též docházelo k největší tvorbě ROS (reactive oxygen species) a byla zde zjištěna největší exprese genu *SbMATE*. Ten kóduje přenašeč, který transportuje ven z kořene citrát a je mu přisuzován významný vliv na toleranci čiroku k  $\text{Al}^{3+}$  (Sivaguru *et al.*, 2013). U odolných rostlin bylo pozorováno ukládání menšího množství  $\text{Al}^{3+}$  než u citlivých, což je dle autorů způsobeno mimo jiné přítomností mechanismu umožňujícího vylučování  $\text{Al}^{3+}$  z buněk. Všechny kultivary akumulovaly v prvních 24 hodinách kalosu, ale u kultivarů odolných k působení  $\text{Al}^{3+}$  se poté začal obsah kalosy snižovat a po 120 hodinách již téměř nebyla detekovatelná. Naopak u rostlin citlivých k působení  $\text{Al}^{3+}$  se obsah kalosy dále postupně zvyšoval (Too *et al.*, 2014). Akumulace kalosy nejspíš snižuje růst kořenů díky uzavření plasmodesmů a tedy blokování transportu látek mezi buňkami (Sivaguru *et al.*, 2000). Leiser *et al.* (2014) provedli studii, ve které se zaměřili na oblast v okolí genu *SbMATE*, který se nachází na 3. chromozómu. Byla zjištěna vazba mezi výskytem genů v této oblasti a výnosem čiroku, obzvláště při nedostatku fosforu (P), který výnos též výrazně snižuje. Z výsledků studie vyplývá, že *SbMATE* má možná pleiotropní účinky a podílí se jak na toleranci k  $\text{Al}^{3+}$ , tak odolnosti k nedostatku P. V okolí *SbMATE* byla prokázána silná genová vazba, což znamená, že na odpovědi na nedostatek P se nejspíš podílejí i okolní geny. Na toleranci k nízkému obsahu P se pravděpodobně podílejí i geny na dalších chromozómech (Leiser *et al.*, 2014).

## 2.5. Kombinovaný stres

Při pěstování v přirozených podmínkách jsou rostliny nejčastěji vystaveny působení více stresových faktorů zároveň. Bohužel zatím nebylo provedeno mnoho studií, které by se zabývaly vlivem kombinace několika druhů stresu na rostliny čiroku. Přitom kombinovaný stres může způsobovat daleko rozsáhlejší poškození. Zhao *et al.* (2014) provedli experiment, ve kterém sledovali vliv sodných kationtů v kombinaci s různým pH na klíčení a růst semenáčů cukrového čiroku. Při pokusu byly použity dvě neutrální soli – NaCl a  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a jedna zásaditá sůl –  $\text{NaHCO}_3$  a v průběhu experimentu byly udržovány tři koncentrace  $\text{Na}^+$  – 100 mM, 200 mM a 300 mM. Bylo

zjištěno, že při nízké koncentraci soli (100 mM) nemá pH vliv na úspěšnost klíčení, dobu, po kterou klíčení probíhá a počet přeživších semenáčů. V kombinaci s vyšší koncentrací soli již rostliny nebyly schopné vysoké pH tolerovat a došlo k výraznějšímu poškození než v případě působení jednotlivých stresových faktorů. Při vyšší koncentraci  $\text{Na}^+$  a vyšším pH došlo k snížení růstu stonku a snížení obsahu chlorofylu b. Dále došlo ke zvýšení růstu kořenů a zvýšení obsahu chlorofylu a. To umožňuje rostlinám udržovat příjem vody a živin a asimilaci uhlíku. Přitom poměr hmotnosti kořene a nadzemní části rostliny byl významně ovlivněn hodnotou pH; koncentrace  $\text{Na}^+$  na tento poměr neměla významný vliv. Autoři sledovali též reakci rostlin na působení oxidativního stresu. Při vyšší koncentraci  $\text{Na}^+$  a vyšším pH se v rostlině tvořilo velké množství ROS a byla zjištěna vyšší hladina jednoho z produktů peroxidace lipidů – malondialdehydu. U rostlin pěstovaných při 100 mM  $\text{Na}^+$  a v neutrálním prostředí došlo ke zvýšení obsahu rozpustných proteinů a aktivity enzymů zhášejících ROS (SOD, CAT, guajakolperoxidasa). Při vystavení vyššímu pH nebo koncentraci  $\text{Na}^+$  k této reakci již nedošlo. Z toho autoři usuzují, že kombinace těchto stresových faktorů významně snižuje regenerační schopnost semenáčů (Zhao *et al.*, 2014).

Reakce rostliny nemusí být pouhým součtem odpovědí na jednotlivé stresové faktory. Johnson *et al.* (2014) zjistili, že u rostlin vystavených zároveň působení sucha a vysoké teploty došlo ke změně exprese cca 20 % genomu. Z toho 60 % genů vykazovalo změněnou expresi při zvýšené teplotě, 13 % genů při vystavení suchu a 27 % byly geny, u nichž došlo ke změně exprese pouze při kombinovaném stresu. Mezi ně patří např. transkripční faktory MYB78 a ATAF1. Dále byla změněna exprese genů kódujících různé chaperony. Také došlo ke změně exprese genů kódujících enzymy účastníci se syntézy polyaminů. Studie potvrdila, že při kombinaci působení sucha a vysoké teploty na rostliny jsou aktivovány jednak geny pro proteiny, které se uplatňují při odpovědi na tyto jednotlivé stresové faktory, a jednak geny kódující proteiny, které se zapojují pouze do reakce na kombinaci těchto stresových faktorů (Johnson *et al.*, 2014). Podobné výsledky byly dříve zjištěny u tabáku (Rizhsky *et al.*, 2002) a huseníčku (Rizhsky *et al.*, 2004).

### **3. Vliv mykorhizy na odolnost čiroku k abiotickému stresu**

Dalším faktorem, se kterým by se mělo při výzkumu tolerance čiroku k různým druhům stresu počítat, je mykorhiza. Je známo, že soužití s různými druhy mykorhizních hub u mnoha rostlin zvyšuje jejich schopnost odolávat působení nepříznivých podmínek (např. Augé, 2001; Ruiz-Lozano, 2003). Laei *et al.* (2011) sledovali vliv přítomnosti mykorhizních hub na růst a příjem živin čiroku pěstovaného na médiu s různou úrovní zasolení (0, 50, 100, 150, 200, 250 mM NaCl). Rostliny byly kultivovány 15 týdnů a byla zaznamenávána úroveň absorpce K, Na, P, N, nárůst sušiny kořene a stonku a délka stonku. Čím vyšší byla koncentrace NaCl, tím nižší byl stonek, a to u rostlin s mykorhizou i kontrolních rostlin bez mykorhizy. U rostlin s mykorhizou byla ovšem délka stonku

a množství sušiny stonku výrazně vyšší než u kontrolních rostlin. U obou skupin nebyla pozorována významná změna v množství sušiny kořene při zvyšování koncentrace NaCl. Obsah N, P a K v pletivech rostlin se snižoval se vzrůstající koncentrací NaCl. V pletivech rostlin s mykorhizou byl obsah těchto prvků vyšší než v pletivech kontrolních rostlin. Obsah Na v pletivech obou skupin rostlin se zvyšoval se vzrůstající koncentrací NaCl, což pomáhá rostlinám udržovat příjem vody díky zvýšení osmotického potenciálu v buňkách. Na druhou stranu vyšší obsah Na v buňkách způsobuje narušení metabolismu (Laei *et al.*, 2011).

Mehraban *et al.* (2009) zjistili, že mykorhiza též zvyšuje odolnost, a tím i výnos čiroku při nedostatku vody. Ve svém experimentu zaznamenávali rozdíly mezi rostlinami čiroku pěstovanými s mykorhizními houbami *Glomus etanicatum* nebo *G. mossae* a rostlinami neočkovanými. Rostliny pěstované s mykorhizními houbami lépe hospodařily s vodou, měly v pletivech vyšší obsah živin a jejich výnos byl vyšší než u neočkovaných rostlin. Rostliny pěstované s *G. mossae* měly průměrně lepší výsledky než rostliny pěstované s *G. etanicatum*. Autoři se domnívají, že mykorhiza zvyšuje odolnost čiroku k suchu díky vyššímu příjmu živin, zejména N a P (Mehraban *et al.*, 2009). Z výsledků těchto studií vyplývá, že očkování čiroku vhodnými druhy mykorhizních hub má velký potenciál ve zvýšení výnosu při pěstování v méně příznivých podmínkách.

Cho *et al.* (2006) sledovali vliv mykorhizních hub na reakci rostlin čiroku vystavených působení sucha nebo kombinace sucha a zasolení. Autoři očekávali, že zasolení by mohlo prohloubit odpověď na suchu indukovanou u rostlin pěstovaných s mykorhizními houbami *Glomus intraradices* nebo *Gigaspora margarita*. Tuto hypotézu se jim ovšem nepodařilo potvrdit. V několika případech udržovaly rostliny pěstované s mykorhizními houbami déle otevřené průduchy v případě vystavení kombinovanému stresu než v případě působení samotného sucha. V jiných případech naopak přidání soli zrušilo pozitivní účinky mykorhizy pozorované při vystavení suchu (Cho *et al.*, 2006).

## **4. Způsoby zvýšení odolnosti čiroku k abiotickému stresu**

### **4.1. Exogenní aplikace různých látek**

Existují různé další způsoby jak zmírnit následky působení stresu na rostliny čiroku. Jedním z nich je aplikace křemíku (Si), který dokáže významně ovlivnit hospodaření rostlin s vodou při jejím nedostatku. Vliv křemíku v půdě na příjem a transport vody v semenáčích čiroku vystavených stresu zkoumali ve své studii Liu *et al.* (2014). U jedné skupiny rostlin byl stres vyvolán působením 10% PEG 6000 a u druhé skupiny zrušením závlivky po dobu tří dnů. Podobný pokus provedli Yin *et al.* (2014), kteří nechali na semenáče působit 10% PEG 6000 po sedm dní a poté sledovali rozdíly mezi rostlinami s přidáním Si (0,83 mM H<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) a bez Si (Yin *et al.*, 2014). Osmotický stres

vyvolaný PEG snížil produkci biomasy, obsah chlorofylů, rychlost fotosyntézy, rychlost transpirace, vodivost průduchů a obsah vody v listech. Také došlo ke zmenšení plochy listů a změně poměru kořene k nadzemní části. U rostlin, kterým byl aplikován Si, nebyla tato redukce tak výrazná jako u rostlin bez Si (Liu *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2014). Osmotický stres též významně snížil schopnost kořene a listů vést vodu. Vodivost stonku podstatně ovlivněna nebyla. Rostliny s přidaným Si udržovaly vyšší obsah vody v listech, vyšší vodivost průduchů, vyšší vodivost kořene a vyšší hladinu transpirace než rostliny bez Si. Vyšší vodivost kořene byla způsobena zvýšením počtu akvaporinů v membráně kořenových buněk, což bylo dokázáno pomocí inhibitoru akvaporinů – rtuti a následnou regenerací pomocí dithiothreitolu. Také byla pozorována zvýšená exprese některých genů pro akvaporiny (Liu *et al.*, 2014). Osmotický potenciál se přidáním Si nezměnil, což značí, že změny osmotického potenciálu se neúčastní odpovědi na suchu vyvolané Si (Liu *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2014). Přidání Si také nezpůsobilo žádné změny povrchu kořene nebo jeho vnitřní stavby (Liu *et al.*, 2014). V listech i kořenech rostlin s přidaným Si byl pozorován vyšší obsah volných i konjugovaných polyaminů (putrescin, spermidin, spermin) než u rostlin bez Si. U rostlin s přidaným Si byla pozorována zvýšená exprese genů pro syntézu polyaminů. Dále byl pozorován vyšší obsah cukrů, zatímco obsah prolinu byl nižší. Došlo ke snížení obsahu kyseliny 1-aminocyklopropan-1-karboxylové (ACC), která je prekurzorem ethylenu (Yin *et al.*, 2014). Z výsledků těchto studií vyplývá, že Si se podílí na odolnosti čiroku k suchu zvýšením vodivosti kořene, a to pomocí indukce vyšší exprese genů pro akvaporiny v buněčné membráně (Liu *et al.*, 2014), a že zvyšuje odolnost k suchu řízením rovnováhy mezi množstvím ACC a polyaminů. V listech dochází díky vyšší hladině polyaminů a nižšímu obsahu ethylenu k udržování obsahu chlorofylů a zpomalení senescence. V kořenech vyšší hladina polyaminů a nižší obsah ethylenu způsobuje vyšší plasticitu kořene, vyšší růst kořene v poměru k nadzemní části a zvýšení příjmu vody (Yin *et al.*, 2014).

Jiný způsob zlepšení růstu čiroku za sucha testovali Ibrahim *et al.* (2003). 40 dní staré rostliny vystavili působení sucha po dobu 24 dnů a na část z nich exogenně aplikovali ve formě spreje buď TMG, šikimát, nebo obě látky společně. TMG se ukázal jako látka významně zvyšující osmotický potenciál buněk čiroku (Wood *et al.*, 1996), zatímco šikimát je mimo jiné prekurzor syntézy fenolických látek, kterým je přisuzována role v reakci rostlin na různé druhy stresu (Dicko *et al.*, 2005). Aplikace TMG, šikimátu, nebo obou látek společně způsobila nižší degradaci fotosyntetických barviv, zvýšení obsahu cukrů, snížení rychlosti transpirace a snížení obsahu prolinu oproti rostlinám pěstovaným za sucha bez aplikace těchto látek. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití obou látek společně, což je dle autorů způsobeno příznivým vlivem obou látek na rostliny (Ibrahim *et al.*, 2003). TMG pozitivně působí i na klíčení semen čiroku na zasoleném substrátu. Arafa *et al.* (2009) sledovali vliv exogenně aplikovaného TMG na klíčení semen čiroku v substrátu s různou mírou zasolení (1500, 3000 a 6000 ppm NaCl). Též byl sledován vliv aplikace kyseliny askorbové, která hraje roli ve zhášení volných radikálů (Foyer *et al.*, 1983). TMG a kyselina askorbová byly aplikovány

samostatně i společně namáčením semen v roztoku. Při nízké koncentraci soli (1500 ppm) došlo ke zvýšení klíčivosti semen u neošetřených rostlin, vyšší koncentrace soli (3000 a 6000 ppm) klíčivost snížily. Aplikace TMG, kyseliny askorbové i obou látek společně zvýšila klíčivost u semen v substrátu bez soli i v zasoleném substrátu. Největší efekt měla aplikace samotné kyseliny askorbové (Arafa *et al.*, 2009).

Nimir *et al.* (2014) zjistili, že klíčivost semen čiroku lze podpořit též aplikací kyseliny gibberelové nebo kinetinu. Kyselina gibberelová stimuluje klíčení díky indukci aktivity hydrolytických enzymů (např.  $\beta$ -mannosidasy), které štěpením látek v endospermu jednak odstraňují mechanická omezení při klíčení, a jednak poskytují energii pro růst embrya (Andreoli *et Khan*, 1999). Cytokininy zvyšují odolnost k různým abiotickým stresovým faktorům včetně zasolení a vysoké teploty (Barciszewski *et al.*, 2000). Ve své studii Nimir *et al.* (2014) sledovali účinky 288,7 $\mu$ M roztoku kyseliny gibberelové, 232,37 $\mu$ M roztoku kinetinu nebo obou těchto látek na klíčení semen čiroku v zasoleném substrátu (100, 200, 300 mM NaCl) nebo při různé teplotě (25, 35 a 39 °C). Byla pozorována imbibice, úspěšnost klíčení a růst kořene a stonku. Vyšší teplota zvýšila imbibici, naopak vyšší koncentrace soli imbibici snížila. Vyšší teplota i zasolení též snížily růst kořene i stonku. Aplikace hormonů způsobila vyšší příjem vody rostlinami při obou typech stresu a celkové zmírnění následků stresu. Aplikací kyseliny gibberelové bylo dosaženo ve všech parametrech lepších výsledků než použitím kinetinu, kromě příjmu vody, kde bylo nejlepších výsledků dosaženo aplikací obou látek dohromady (Nimir *et al.*, 2014).

#### 4.2. Genetické modifikace čiroku

Dosáhnout větší odolnosti čiroku k abiotickému stresu je možné šlechtěním nových kultivarů nebo pomocí genetické modifikace rostlin. Zatím bylo ovšem provedeno pouze několik úspěšných transformací čiroku, např. vnesení genů *CryIA* nebo *CryIB* kódujících BT toxin, který má insekticidní účinky (Visarada *et al.*, 2013) nebo vnesení genů *HarChit* nebo *HarCho*, které kódují chitinasu a chitosanasu štěpící buněčnou stěnu hub, a tím zvyšující odolnost k antraknóze (*Colletotrichum sublineolum*) (Kosambo-Ayoo *et al.*, 2011). Dosud jedinou úspěšnou transformací čiroku zaměřenou na zvýšení odolnosti k abiotickému stresu provedli Maheswari *et al.* (2010). Cílem bylo zvýšit odolnost čiroku vůči suchu a zasolení pomocí akumulace vyššího množství manitolu v rostlině (Maheswari *et al.*, 2010). Ten je jednou z osmoticky aktivních látek, jejichž obsah se v rostlině zvyšuje při odpovědi na osmotický stres (Pavli *et al.*, 2013). Do rostliny byl pomocí biolistické metody (gene gun) vnesen gen *MtID* původem z *E. coli*, který kóduje manitol-1-fosfátdehydrogenasu. Bylo zjištěno, že listy transgenních rostlin vystavené působení PEG 8000 byly schopné udržovat vyšší obsah vody než listy netransformovaných rostlin. Při pěstování na médiu s 200mM NaCl měla semena transgenních rostlin vyšší klíčivost než semena netransformovaných rostlin a růst stonku i kořene

transgenních rostlin byl též vyšší než u netransformovaných. U transgenních rostlin byl pozorován vůči netransformované kontrole vyšší přírůstek u kořene než v případě stonku. Není ovšem jisté, jakým způsobem manitol růst kořenů stimuluje. Jednotlivé linie transgenních rostlin se mezi sebou v odpovědi na stres lišily, což bylo způsobeno nejspíš rozdílnou úrovní exprese genu *MtID* (Maheswari *et al.*, 2010).

## 5. Závěr

V současné době je k dispozici poměrně velké množství prací zabývajících se reakcemi čiroku na působení stresu, včetně rozsáhlých transkriptomických, proteomických a metabolomických studií z několika posledních let. Přibývá prací zabývajících se určováním míst v genomu odpovědných za toleranci k jednotlivým stresovým faktorům. Řada autorů se zabývá zjišťováním korelace mezi dílčími přizpůsobeními organismu s cílem pochopit komplexní odpověď na daný druh stresu. I přes to je ovšem v současnosti dostupné relativně malé množství článků zabývajících se působením kombinace různých stresových faktorů. Poměrně málo prozkoumaná je též symbióza čiroku s mykorrhizními houbami, což je ovšem pochopitelné vzhledem k obtížnosti studia tohoto složitého vztahu. Čirok je slibná alternativní plodina pro pěstování ve zhoršených podmínkách, obzvlášť při nedostatku vody. Zásadní při pěstování je ovšem správné vyhodnocení podmínek v dané oblasti a využití dostupných znalostí k vybrání vhodného kultivaru a aplikace vhodné péče. Kultivary s krátkou vegetační dobou odolné k chladu je například možné pěstovat i v České republice.

## 6. Seznam použité literatury

- Ali G., Srivastava P. S., Iqbal M. (1999) Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in *Bacopa monniera* regenerants grown under NaCl stress. *Biologia Plantarum* 42: 89-95
- Andreoli C., Khan A. A. (1999) Matriconditioning integrated with gibberellic acid to hasten seed germination and improve stand establishment of pepper and tomato. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 34: 1953-1958
- Arafa A. A., Khafagy M. A., El-Banna M. F. (2009) The effect of glycinebetaine or ascorbic acid on grain germination and leaf structure of sorghum plants grown under salinity stress. *Australian Journal of Crop Science* 3: 294-304
- Augé R. M. (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42
- Barciszewski J., Siboska G., Rattan S. I. S., Clark B. F. C. (2000) Occurrence, biosynthesis and properties of kinetin (N6-furfuryladenine). *Plant Growth Regulation* 32: 257-265
- Bekele W. A., Fiedler K., Shiringani A., Schnaubelt D., Windpassinger S., Uptmoor R., Friedt W., Snowdon R. J. (2014) Unravelling the genetic complexity of sorghum seedling development under low-temperature conditions. *Plant, Cell and Environment* 37: 707-723
- Borrell A. K., Mullet J. E., George-Jaeggli B., van Oosterom E. J., Hammer G. L., Klein P. E., Jordan D. R. (2014) Drought adaptation of stay-green sorghum is associated with canopy development, leaf anatomy, root growth, and water uptake. *Journal of Experimental Botany* 65: 6251-6263
- Dalal M., Inupakutika M. (2014) Transcriptional regulation of ABA core signaling component genes in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Molecular Breeding* 34: 1517–1525
- Dalal M., Kumar G. S., Mayandi K. (2012) Identification and expression analysis of group 3 LEA family genes in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 979-984
- Dicko M. H., Gruppen H., Barro C., Traore A. S., Berkel W. J. H., Voragen A. G. J. (2005) Impact of phenolic compounds and related enzymes in sorghum varieties for resistance and susceptibility to biotic and abiotic stresses. *Journal of Chemical Ecology* 31: 2671-2678
- Djanaguiraman M., Prasad P. V. V., Murugan M., Perumal R., Reddy U. K. (2014) Physiological differences among sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) genotypes under high temperature stress. *Environmental and Experimental Botany* 100: 43–54

- Evers D., Lefe I., Legay S., Lamoureux D., Hausman J.-F., Rosales R. O. G., Marca L. R. T., Hoffmann L., Bonierbale M., Schafleitner R. (2010) Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. *Journal of Experimental Botany* 61: 2327–2343
- FAO (2015): FAOSTAT. *FAOSTAT: for a world without hunger*. [online]. © FAO 2015 [cit. 2015-04-23]. Dostupné z: [http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities\\_by\\_regions/E](http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities_by_regions/E)
- Flores H. E., Galston A. W. (1984) Osmotic- Stress-Induced Polyamine Accumulation in Cereal Leaves. *Plant Physiology* 75: 102-109
- Foyer Ch., Rowell J., Walker D. (1983) Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* 157: 239-244
- Gill P. K., Sharma A. D., Singh P., Bhullar S. S. (2003) Changes in germination, growth and soluble sugar contents of *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds under various abiotic stresses. *Plant Growth Regulation* 40: 157-162
- Gosavi G. U., Jadhav A. S., Kale A. A., Gadakh S. R., Pawar B. D., Chimote V. P. (2014) Effect of heat stress on proline, chlorophyll content, heat shock proteins and antioxidant enzyme activity in sorghum (*Sorghum bicolor*) at seedling stage. *Indian Journal of Biotechnology* 13: 356-363
- Hammer G. L. (2006) Pathways to Prosperity: Breaking the Yield Barrier in Sorghum. *Agricultural Science* 19: 16-22
- Hu Ch-A. A., Delauney A. J., Verma D. P. S. (1992) A bifunctional enzyme ( $\delta$ -1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National academy of sciences of the United states of America* 89: 9354-9358
- Cho K., Toler H., Lee J., Ownley B., Stutz J. C., Moore J. L., Auge' R. M. (2006) Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *Journal of Plant Physiology* 163: 517-528
- Ibrahim A. H., Aldesquy H. S. (2003) Glycine Betaine and Shikimic Acid - Induced Modification in Growth Criteria, Water Relation and Productivity of Droughted *Sorghum bicolor* Plants. *Phyton-Annales Rei Botanicae* 43: 351-363
- Jain M., Prasad P. V. V., Boote K. J., Hartwell Jr A. L., Chourey P. S. (2007) Effects of season-long high temperature growth conditions on sugar-to-starch metabolism in developing microspores of grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Planta* 227: 67-79



- Johnson S. M., Lim F.-L., Finkler A., Fromm H., Slabas A. R., Knight M. R. (2014) Transcriptomic analysis of Sorghum bicolor responding to combined heat and drought stress. *BMC Genomics* 15: 456
- Kocheva K., Nenova V., Karceva T., Petrov P., Georgiev G. I., Börner A., Landjeva S. (2014) Changes in Water Status, Membrane Stability and Antioxidant Capacity of Wheat Seedlings Carrying Different Rht-B1 Dwarfing Alleles under Drought Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* 200: 83-91
- Kosambo-Ayoo L. M., Bader M., Loerz H., Becker D. (2011) Transgenic sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) developed by transformation with chitinase and chitosanase genes from *Trichoderma harzianum* expresses tolerance to anthracnose. *African Journal of Biotechnology* 10: 3659-3670
- Laei G., Khajehzadeh M. H., Afshari H., Ebadi A. G., Abbaspour H. (2011) Effect of mycorrhiza symbiosis on the NaCl salinity in Sorghum bicolor. *African Journal of Biotechnology* 10: 7796-7804
- Leiser W. L., Rattunde H. F. W., Weltzien E., Cisse N., Abdou M., Diallo A., Tourè A. O., Magalhaes J. V., Haussmann B. IG. (2014) Two in one sweep: aluminum tolerance and grain yield in P-limited soils are associated to the same genomic region in West African Sorghum. *BMC Plant Biology* 14: 206
- Liu P., Yin L., Deng X., Wang S., Tanaka K., Zhang S. (2014) Aquaporin-mediated increase in root hydraulic conductance is involved in silicon-induced improved root water uptake under osmotic stress in Sorghum bicolor L. *Journal of Experimental Botany* 65: 4747-4756
- Lubec G., Afjeji-Sadat L., Yang J-W., John J. P. P. (2005) Searching for hypothetical proteins: Theory and practice based upon original data and literature. *Progress in Neurobiology* 70: 90-127
- Maheswari M., Varalaxmi Y., Vijayalakshmi A., Yadav S. K., Sharmila P., Venkateswarlu B., Vanaja M., Pardha Saradhi P. (2010) Metabolic engineering using mtID gene enhances tolerance to water deficit and salinity in sorghum. *Biologia Plantarum* 54: 647-652
- \*Maiti R. K. (1996) Sorghum Science. *Science Publishers Inc., Lebanon, New Hampshire, USA*
- Maulana F., Tesso T. T. (2013) Cold Temperature Episode at Seedling and Flowering Stages Reduces Growth and Yield Components in Sorghum. *Crop Science* 53: 564-574
- Mehraban A., Vazan S., Naroui Rad M. R., Ardakany A. R. (2009) Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) on yield of sorghum cultivars. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 7: 461-463
- Mutava R. N., Prasad P. V. V., Tuinstra M. R., Kofoid K. D., Yu J. (2011) Characterization of sorghum genotypes for traits related to drought tolerance. *Field Crops Research* 123: 10-18

- Ngara R., Ndimba R., Borch-Jensen J., Jensen O. N., Ndimba B. (2012) Identification and profiling of salinity stress-responsive proteins in *Sorghum bicolor* seedlings. *Journal of proteomics* 75: 4139-4150
- Nimir N. E. A., Lu S., Zhou G., Ma B. L., Guo W., Wang Y. (2014) Exogenous Hormones Alleviated Salinity and Temperature Stresses on Germination and Early Seedling Growth of Sweet Sorghum. *Agronomy Journal* 106: 2305-2315
- Paterson A. H., Bowers J. E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H., Haberler G., Hellsten U., Mitros T., Poliakov A., Schmutz J., Spannagl M., Tang H. B., Wang X. Y., Wicker T., Bharti A. K., Chapman J., Feltus F. A., Gowik U., Grigoriev I. V., Lyons E., Maher C. A., Martis M., Narechania A., Otiillar R. P., Penning B. W., Salamov A. A., Wang Y., Zhang L. F., Carpita N. C., Freeling M., Gingle A. R., Hash C. T., Keller B., Klein P., Kresovich S., McCann M. C., Ming R., Peterson D. G., Mehboob-ur-Rahman, Ware D., Westhoff P., Mayer K. F. X., Messing J., Rokhsar D. S. (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457: 551-556
- Patonnier M. P., Peltier J. P., Marigo G. (1999) Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. *Journal of Experimental Botany* 50: 1223–1229
- Pavli O. I., Vlachos Ch. E., Kalloniati Ch., Flemetakis E., Skaracis G. N. (2013) Metabolite profiling reveals the effect of drought on sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) metabolism. *Plant Omics Journal* 6: 371-376
- Prasad P. V. V., Boote K. J., Allen Jr H. (2006) Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain-sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. *Agricultural and Forest Meteorology* 139: 237-251
- Rácz I., Kovács M., Lasztiti D., Veisz O., Szalai G., Páldi E. (1996) Effect of Short-term and Long-term Low Temperature Stress on Polyamine Biosynthesis in Wheat Genotypes with Varying Degrees of Frost Tolerance. *Journal of Plant Physiology* 148: 368-373
- Razmi Z., Hamidi R., Pirasteh-Anosheh H. (2013) Seed germination and seedling growth of three sorghum (*Sorghum bicolor* L.) genotypes as affected by low temperatures. *International Journal of Farming and Allied Sciences* 2: 851-856
- Rizhsky L., Liang H., Mittler R. (2002) The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiology* 130: 1143-1151

- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler R. (2004) When Defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134: 1683-1696
- Rontein D., Basset G., Hanson A. D. (2002) Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineering* 4: 49–56
- Ruiz-Lozano J. M. (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13: 309-317
- Sankarapandian R., Adilakshmi S., Sharma V., Ganesamurthy K., Talwar H. S., Patil J. V. (2012) Effect of morpho-physiological traits on grain yield of sorghum grown under stress at different growth stages, and stability analysis. *Journal of Agricultural Science* 151: 630-647
- Sivaguru M., Fujiwara T., Šamaj J., Baluška F., Yang Z., Osawa H., Maeda T., Mori T., Volkmann D., Matsumoto H. (2000) Aluminum-Induced  $1 \rightarrow 3$ - $\beta$ -D-Glucan Inhibits Cell-to-Cell Trafficking of Molecules through Plasmodesmata. A New Mechanism of Aluminum Toxicity in Plants. *Plant Physiology* 124: 991-1005
- Sivaguru M., Liu J., Kochian L. V. (2013) Targeted expression of *SbMATE* in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. *The Plant Journal* 76: 297-307
- Slewinski T. L. (2012) Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance, and biofuel production. *Journal Of Experimental Botany* 63: 4647-4670
- Su M., Li X-F., Ma X-Y., Peng X-J., Zhao A-G., Cheng L-Q., Chen S-Y., Liu G-S. (2011) Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. *Plant Science* 181: 652-659
- Swami A. K., Alam S. I., Sengupta N., Sarin R. (2011) Differential proteomic analysis of salt stress response in *Sorghum bicolor* leaves. *Environmental and Experimental Botany* 71: 321-328
- Tester M., Davenport R. (2003)  $\text{Na}^+$  Tolerance and  $\text{Na}^+$  Transport in Higher Plants. *Annals of Botany* 91: 503-527
- Too E. J., Carlsson A. S., Onkware A. O., Were B. A., Geleta M., Bryngelsson T., Gudu S. (2014) Cell membrane integrity, callose accumulation, and root growth in aluminum-stressed sorghum seedlings. *Biologia Plantarum* 58: 768-772
- Ungar I. A. (1996) Effect of salinity on seed germination, growth, and ion accumulation of *Atriplex patula* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany* 83: 604-607

- Visarada K. B. R. S., Padmaja P. G., Saikishore N., Pashupatinath E., Royer M., Seetharama N., Patil J. V. (2014) Production and evaluation of transgenic sorghum for resistance to stem borer. *In Vitro Cellular & Developmental biology-Plant* 50: 176-189
- Wang T-T., Ren Z-J., Liu Z-Q., Feng X., Guo R-Q., Li B-G., Li L-G., Jing H-Ch. (2014) *SbHKT1;4*, a member of the high-affinity potassium transporter gene family from *Sorghum bicolor*, functions to maintain optimal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  balance under  $\text{Na}^+$  stress. *Journal of Integrative Plant Biology* 56: 315-332
- Weigel P., Weretilnik E. A., Hanson A. D. (1986) Betaine Aldehyde Oxidation by Spinach Chloroplasts. *Plant Physiology* 82: 753-759
- Wood A. J., Saneoka H., Rhodes D., Joly R. J., Goldsbrough P. B. (1996) Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum - Molecular cloning and expression of two related genes. *Plant Physiology* 110: 1301-1308
- Xu W., Rosenow D. T., Nguyen H. T. (1999) Stay green trait in grain sorghum: relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. *Plant Breeding* 119: 365-367
- Yi B., Zhou Y., Gao M., Zhang Z., Han Y., Yang G., Xu W., Huang R. (2014) Effect of Drought Stress During Flowering Stage on Starch Accumulation and Starch Synthesis Enzymes in Sorghum Grains. *Journal of Integrative Agriculture* 13: 2399-2406
- Yin L., Wang S., Li J., Tanaka K., Oka M. (2013) Application of silicon improves salt tolerance through ameliorating osmotic and ionic stresses in the seedling of *Sorghum bicolor*. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 3099-3107
- Yin L., Wang S., Liu P., Wang W., Cao D., Deng X., Zhang S. (2014) Silicon-mediated changes in polyamine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid are involved in silicon-induced drought resistance in *Sorghum bicolor* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 80: 268-277
- Zegada-Lizarazu W., Monti A. (2013) Photosynthetic response of sweet sorghum to drought and re-watering at different growth stages. *Physiologia Plantarum* 149: 56-66
- Zhao Y., Lu Z., He L. (2014) Effects of Saline-Alkaline Stress on Seed Germination and Seedling Growth of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Appl Biochem Biotechnol* 173: 1680-1691