

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Iveta Dvořáková

Diplomová práce

Adaptace rostlin rodu *Plantago* k abiotickému stresu: mechanismy tolerance

Abiotic Stress Adaptation in *Plantago*: mechanisms of tolerance

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

Praha, 2016

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 prvním místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Haně Konrádové, Ph.D., která mi věnovala mnoho času a pomohla mi vyřešit všechny problémy, které mě potkaly při psaní této práce. Cenné rady a odbornou péči mi též poskytla doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D., které také patří moje velké poděkování. Zásluhy na dokončení této práce má i kolektiv laboratoře 007. Nikoliv na posledním místě patří můj dík rodině a především sestře za psychickou podporu.

Abstrakt:

Rostliny jsou v průběhu životního cyklu vystaveny mnohým nepříznivým faktorům. Abiotické stresy významně omezují růst i vývoj rostlin. Mezi mechanismy obrany k abiotickému stresu patří syntéza a akumulace kompatibilních solutů (především cukrů, cukerných alkoholů, aminokyselin). Hlavním cílem diplomové práce bylo charakterizovat reakce rostlin z rodu *Plantago* na abiotický stres sucha, zasolení, chladu a kombinovaného stresu. Zhodnocení probíhalo na několika úrovních - nejprve na úrovni růstových parametrů, a následně i na úrovni sacharidového metabolismu, částečně také akumulace prolinu. Pro diplomovou práci byl zvolen soubor rostlin z rodu *Plantago*, které se liší svou tolerancí k zasolení, obsahuje tedy jak druhy halofytní (odolné) tak druh glykofytní (citlivý). Celistvé rostliny byly pěstovány v podmínkách *in vitro*. Rostliny z rodu *Plantago* produkují mimo běžné rozpustné sacharidy (sacharóza, glukóza, fruktóza) i cukerný alkohol sorbitol, proto byla testována i reakce rostlin na kvalitativní a kvantitativní změnu zdroje uhlíku a energie v médiu. Růstové parametry glykofytního druhu *Plantago lanceolata* byly ovlivněny při zasolení dříve než u halofytního *P. maritima*. Sorbitol se ukázal jako důležitá složka sacharidového spektra u *Plantago maritima* i *Plantago lanceolata*, která citlivě reaguje na déletrvajícím stresové působení. Obsah sorbitolu se u obou druhů s déletrvajícím stresovým působením zvyšuje. Při působení PEG (simulace sucha) však zvyšující se obsah sorbitolu neznamena celkové navýšení rozpustných sacharidů jako je tomu při působení zasolení a kombinovaného stresu zasolení a chladu. Dále byla popsána reakce zatím blíže necharakterizované frakce sacharidového spektra (v práci nazvané RTOS) na individuální stres zasolení a kombinovaný stres (zasolení a chlad).

Klíčová slova: abiotický stres, glykofyty, halofyty, kultivace *in vitro*, metabolismus sacharidů, *Plantago*, prolin, sorbitol

Abstract:

Plants are exposed to many adverse factors during their life cycles. Abiotic stresses are significantly limiting plant growth and development. Abiotic stress response mechanisms involve compatible solute synthesis (e.g. sugars, sugar alcohols and amino acids). The aim of this study was to characterise the responses of plants from *Plantago* genus to different abiotic stresses (drought, salinity, cold and stress combination). The complete plants grew under *in vitro* conditions. I compared morphological parameters, selected metabolic parameters (carbohydrates balance and proline accumulation) under optimal conditions and stress exposure. This study was focused on plants from genus *Plantago*, because they differ from each other in their tolerance to the salinity. Both, the glycophyte and the halophyte species are described within this genus. Plantains produce besides widespread soluble carbohydrates (sucrose, glucose, fructose) also sugar alcohol sorbitol, which has been reported as a significant component of the stress response. In addition, the reaction of plants to different carbon and energy sources was tested. More severe growth inhibition of the glycophyte *Plantago lanceolata* compared to the halophyte *P. maritima* was observed under salt treatment. Significant accumulation of sorbitol was observed under prolonged abiotic stress in both species. Osmotic stress caused by non-penetrating osmoticum induced sorbitol accumulation as well, but did not increase the total soluble carbohydrate content. Moreover, the reaction of yet undetermined fraction of carbohydrate spectrum (in this study called RTOS) to the salinity and stress combination (salinity and cold) was observed.

Key words: abiotic stress, carbohydrates metabolism, glycophytes, halophytes, *in vitro* cultivation, *Plantago*, proline, sorbitol

Seznam zkratek:

A6PR	aldóza-6-fosfátreduktáza
ABI1	ABA insenzitivní mutant
FRU	fruktóza
G6P	glukóza-6-fosfát
GLU	glukóza
GSA	glutamát-G-semialdehyd
MdSOT1-MdSOT6	transportéry sorbitolu u jabloně <i>Malus domestica</i>
MS	základní kultivační medium (Murashige a Skoog, 1962)
MST	monosacharidový transportér
P5C	pyrrolin-5-karboxylát
P5CR	pyrrolin-5-karboxylátreduktáza
P5CS	pyrrolin-5-karboxylátsyntáza
PcSOT1 a PcSOT2	transportéry sorbitolu ve višni <i>Prunus cerasus</i>
PDH	prolindehydrogenáza
PEG	polyethylenglykol
PLC	fosfolipáza C
PmPLT1 a PmPLT2	transportéry sorbitolu v jitroceli <i>Plantago major</i>
PmSUC2	transportér sacharózy v jitroceli <i>Plantago major</i>
RFO	(raffinose family oligosaccharides) sacharidy rafinózové řady
ROS	(reactive oxygen species) reaktivní formy kyslíku
SACH	sacharóza
SDH	sorbitoldehydrogenáza
SDL	SDH-like protein
SOR	sorbitol
SOT	transportér sorbitolu
SUC	transportér sacharózy
SWEET	transportér sacharózy
TMT	vakuolární transportér
vGT	glukózový vakuolární transportér
WT	(wild type) divoký typ

OBSAH

1. Úvod.....	1
1.1. Cíl práce.....	2
2. Literární úvod	3
2.1. Zasolení.....	3
2.2. Sucho.....	3
2.3. Chlad.....	4
2.4. Kombinovaný stres.....	4
2.5. Kompatibilní soluty.....	7
2.5.1. Sacharóza	9
2.5.2. Sorbitol	9
2.5.2.1. Sorbitoldehydrogenáza.....	10
2.5.2.2. Transport sorbitolu	12
2.5.2.3. Účast sorbitolu při stresových reakcích.....	14
2.5.3. Sacharidy rafinózové řady.....	16
2.5.4. Prolin	17
3. Materiál a metody	20
3.1. Výsev semen	20
3.2. Sterilní práce.....	20
3.3. Kultivace rostlin.....	21
3.3.1 Modifikace MS média.....	22
3.4. Vegetativní množení indukci adventivních rostlin z kořenových segmentů.....	23
3.5. Analýza obsahu nestruturních sacharidů.....	23
3.5.1 Odběr vzorků	23
3.5.2. Příprava vzorků pro analýzu nestruturních sacharidů	23
3.5.3. Stanovení obsahu a spektra nestruturních sacharidů	24
3.6. Stanovení obsahu prolinu	24
3.7. Identifikace frakce "RTOS"	26
3.8. Zpracování dat	26
3.9. Přehled experimentů.....	27
4. Výsledky	29
4.1. Výběr vhodného kultivačního materiálu a způsobu kultivace.....	29
4.2. Manipulace zdrojem uhlíku a energie	30
4.2.1. Vliv typu exogenního sacharidu na růstové parametry kultur jitrocele	30
4.2.2. Obsah a spektrum endogenních sacharidů rostlin <i>P. eriopoda</i> , <i>P. maritima</i> a <i>P. lanceolata</i> v závislosti na různém zásobení exogenním sacharidem	35
4.3. Zasolení, nízké teploty a kombinovaný stres	38
4.3.1 Vliv zasolení, nízké teploty a kombinace obou stresů na růstové parametry <i>P. maritima</i> a <i>P. lanceolata</i>	38
4.3.2. Vliv zasolení, nízké teploty a kombinace obou stresů na obsah a spektrum endogenních sacharidů rostlin <i>P. maritima</i> a <i>P. lanceolata</i>	44
4.4. Omezení dostupnosti vody nepenetrujícím osmotikem.....	49
4.4.1. Vliv osmotického stresu na růstové parametry <i>P. maritima</i> a <i>P. lanceolata</i>	49
4.4.2. Vliv osmotického stresu na obsah a spektrum rozpustných endogenních sacharidů rostlin <i>P. maritima</i> a <i>P. lanceolata</i>	52
4.5. Identifikace frakce RTOS.....	55
4.5.1. Identifikace frakce RTOS- inkubace vzorku s α -galaktosidázou.....	55
4.5.2. Identifikace frakce RTOS - inkubace vzorku s invertázou	57
4.6. Změny obsahu prolinu při zasolení v rostlinách <i>P. maritima</i> a <i>P. lanceolata</i>.....	58

5. Diskuse	60
5.1. Experimentální materiál a způsob kultivace	60
5.2. Ovlivnění růstových parametrů a obsahu a spektra sacharidů v závislosti na různém zásobení sacharidem	60
5.3. Vliv zasolení, chladu a kombinovaného stresu	62
5.4. Osmotický stres	65
5.5. Identifikace frakce RTOS	65
5.6. Změny v obsahu prolinu v reakci na zasolení	67
6. Závěry	68
7. Seznam literatury	69

1. Úvod

Rostliny jsou hlavní součástí lidské potravy. Jsou však během svého života prakticky neustále konfrontovány s množstvím nepříznivých podmínek, které mají negativní vliv na jejich vitalitu. V současné době nejvýznamnější limitací produkce a výnosů kulturních rostlin představují abiotické stresy. V kontrastu s tím je fakt, že se stoupající lidskou populací kladen stále větší důraz na růst rostlinné produkce. Z abiotických stresů se rostliny nejčastěji potýkají se suchem, zasolením a výkyvy teplot, přičemž v přirozených podmínkách se tyto nepříznivé faktory obvykle kombinují. Jednotlivé stresy ale mají ve vztahu k rostlinám mnoho společných vlastností, a i jejich dopady jsou tak podobné. Hlavním obecným omezením je ztížený příjem vody z důvodu sníženého osmotického potenciálu v půdě, který je klíčovým faktorem pro příjem nebo výdej vody. Rostliny si v průběhu evoluce vyvinuly mnoho mechanismů, jak zhoršeným podmínkám prostředí odolávat. Jednou ze zásadních vlastností pro přežití rostlin v nepříznivých podmínkách je syntéza a akumulace kompatibilních solutů, jakožto látek umožňujících osmotické přizpůsobení. Mezi kompatibilními soluty patří cukry, cukerné alkoholy a aminokyseliny. Změny sacharidového metabolismu tedy hrají zásadní roli v toleranci rostlin k abiotickému stresu.

Mnoho druhů rostlin se v průběhu evoluce úspěšně dokázalo přizpůsobit nepříznivým podmínkám. Jednou takovou skupinou jsou halofyty, které se přirozeně vyskytují v zasoleném prostředí. Rostliny použité v této diplomové práci řadíme do rodu *Plantago*, spadající do čeledi *Plantaginaceae*. Rod *Plantago* zahrnuje více než 200 druhů, z nichž přibližně 1/10 tvoří právě halofyty. Jitrocele jsou tedy vhodnými rostlinami pro porovnávací studie, protože jsou taxonomicky velmi příbuzné, mají podobné genetické pozadí, ale zároveň odlišnou toleranci ke stresu. Studium fyziologických základů odlišné tolerance mezi jednotlivými druhy bylo předmětem mé experimentální práce.

1.1. Cíl práce

Cílem této diplomové práce je sledování odpovědi rostlin na abiotický stres na úrovni růstových parametrů a syntézy a akumulace kompatibilních solutů, zvláště pak ovlivnění sacharidového metabolismu u rostlin, které se liší svou odolností ke stresu.

Dílčí cíle:

- vypracování postupu a následného využití vegetativního množení rostlin *in vitro*
- porovnání využitelnosti různých zdrojů energie a uhlíku rostlinami
- sledování změn v růstových parametrech ovlivněných působením abiotického stresu
- sledování vlivu abiotického stresu na obsah a spektrum nestrukturních sacharidů
- porovnání rozdílů v reakcích ve výše zmíněných parametrech u halofytního a glykofytního druhu
- sledování změn v obsahu prolinu při působení abiotického stresu

Hypotézy:

- 1) Abiotickými stresi bude na úrovni růstových parametrů více ovlivněn glykofytní druh
- 2) Míra odolnosti rostliny k abiotickému stresu alespoň z části závisí na její schopnosti operativně přizpůsobit sacharidový metabolismus typu působícího stresu
- 3) Příslušné změny sacharidového metabolismu zahrnují změny celkového obsahu rozpustných nestrukturních sacharidů a změny v sacharidovém spektru
- 4) Akumulace prolinu je součástí reakce rostlin k abiotickému stresu

2. Literární úvod

2.1. Zasolení

V současné době je celosvětově více než 45 milionů hektarů uměle zavlažované zemědělské půdy zasaženo zasolením. První zmínky o zasolení pocházejí již z druhého tisíciletí před n. l. (Carillo et al., 2011). Zasolené půdy najdeme napříč všemi podnebnými pásy, od vlhkých tropů až po polární regiony. Téměř každá půda obsahuje určité množství různých solí, stejně tak jako jakákoli voda běžně používaná na zavlažování, ať už se jedná o vodu povrchovou nebo čerpanou z hloubky.

Zasolením jako stresovým faktorem se rozumí proces, kdy se do půdy dostává velké množství solí, které v půdě původně nebyly (Munns et al., 2004). Jedná se například o draselné, hořečnaté, chloridové nebo sodné soli. Zasolení negativně ovlivňuje rostliny dvěma hlavními skupinami mechanismů: 1) vysoké koncentrace solí v půdě znesnadňují příjem vody a v ní rozpuštěných látek kořeny; a 2) nahromadění iontů uvnitř buněk zde působí toxicky. Délétrvající zasolení způsobuje redukci růstu, akumulaci ROS (ROS - z angl. reactive oxygen species) nebo také snížení příjmu K^+ a Ca^{2+} (Munns and Tester, 2008). Nejčastěji je zasolení vyvoláno NaCl. Při nízkých koncentracích soli není většina rostlin výrazně ovlivněna, ale při navýšení koncentrace na 100-200 mM NaCl se výnos u většiny plodin podstatně snižuje. Velkou část kulturních plodin řadíme mezi glykofyty, tedy rostliny citlivé k zasolení. Tyto rostliny se evolučně vyvinuly při nízkých koncentracích soli a nedisponují mechanismy tolerance k zasolení. Opakem jsou rostliny halofytní, které se v průběhu evoluce adaptovaly na růst v zasoleném prostředí (například v pobřežních oblastech) a dokáží přežít koncentrace až 400 mM NaCl (Glenn and Brown, 1999).

2.2. Sucho

Stejně tak jako zasolení i sucho negativně ovlivňuje životní procesy rostlin ve všech podnebných oblastech světa. Sucho je ovlivněno nejen množstvím srážek, ale i klimatickými podmínkami, teplotou, vlhkostí vzduchu nebo rychlostí větru. Vyschlá nebo zasolená půda jsou nejčastějšími limitujícími faktory ovlivňujícími výnosy hospodářských plodin. Při nedostatku vody dochází v rostlinách k poklesu turgorového tlaku. Na počátku působení sucha se zastavuje růst nadzemní části rostlin, zatímco růst kořenů zůstává zachován, aby se kořeny dostaly do

dalších vrstev půdy, ze kterých by bylo možné čerpat vodu. Při delším působení vodního deficitu dochází i k významnému omezení fotosyntézy, nejprve pouze díky uzavírání průduchů, později i omezením exprese fotosyntetických genů. Také záleží na tom, v jakém vývojovém stádiu sucho rostlinu postihne. Obecně je dostatečný turgorový tlak potřeba udržet pro zachování růstu a dělení buněk. Proto je velká část rostlin citlivější k nedostatku vody právě v období aktivního růstu (Wang et al. 2003).

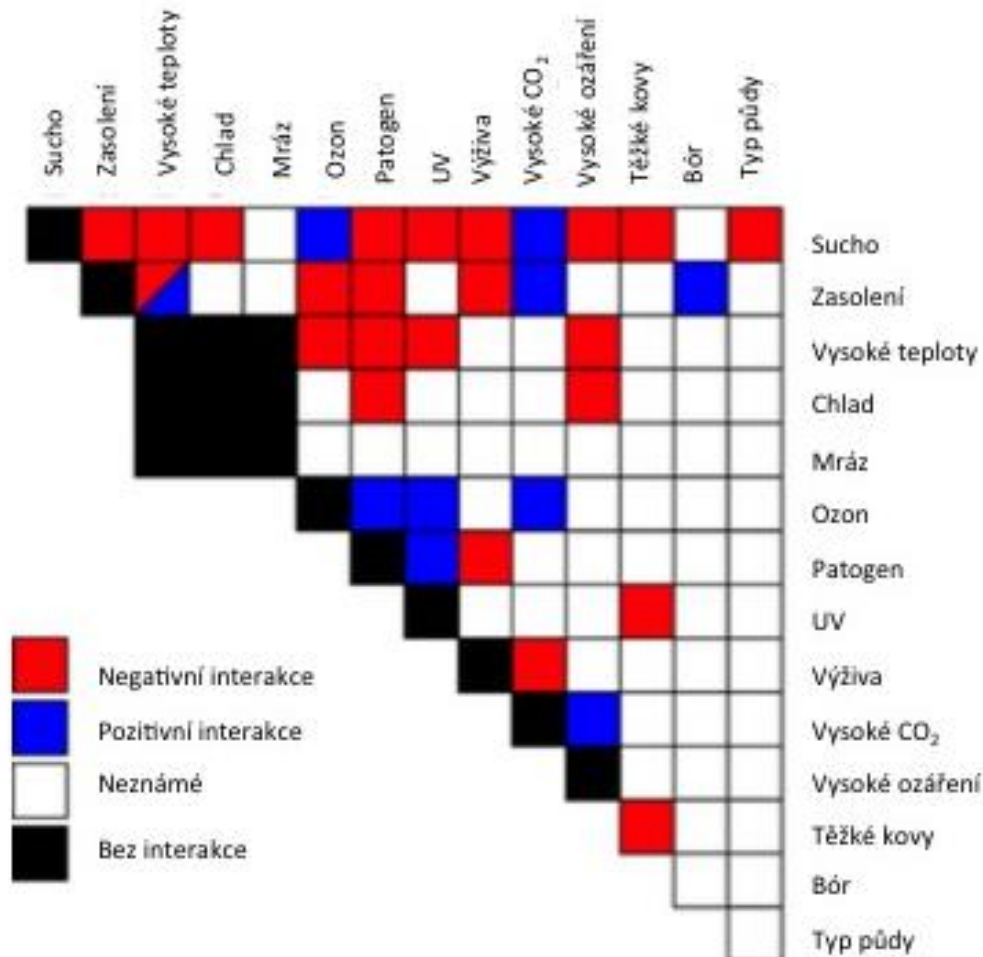
2.3. Chlad

Jakmile se teplota více vzdaluje od optima pro růst rostlin, nastávají mnohé fyziologické změny na úrovni biochemické i molekulární tak, aby rostlina co nejdéle zachovala normální růst a vývoj (Guy et al., 2008). Když se stresové podmínky prohlubují nebo trvají déle, běžné rostlinné procesy přestávají být funkční. Při nižší teplotě se nejprve aktivují mechanismy, které vedou k tzv. chladové toleranci. Chladová tolerance je schopnost rostlin přežít v teplotách od 0 do 15 °C bez poškození (Lyons et al., 1964). Nízká teplota vede u rostlin ke změnám metabolismu - buněčný metabolismus se musí přizpůsobit klesajícím teplotám, aby se nezměnily katalytické schopnosti a funkce enzymů a transport metabolitů přes membránu. Fluidita membrány se při teplotách blízko nuly výrazně mění, buněčné membrány se postupně s klesající teplotou dostávají do stavu pevného gelu. Trvalé poškození membrán je častější u rostlin na chlad citlivých, které v membránách obsahují více nasycených než nenasycených mastných kyselin (Murata and Los, 1997). Mezi změny fyziologické patří snížení rychlosti fotosyntézy, méně se syntetizuje sacharóza. Dochází ke změně pH cytoplasmy tím, že aktivita vakuolární ATPázy, která aktivně transportuje protony do vakuoly, je u rostlin citlivých na chlad negativně ovlivněna. Tím, že přestává za nízkých teplot fungovat, dochází k okyselování cytoplasmy (Yoshida et al. 1999).

2.4. Kombinovaný stres

Mnoho studií se zabývá působením individuálních stresů na rostliny, ať už v polních, skleníkových, či laboratorních podmínkách. Problémem těchto studií je, že jejich výsledky jsou obtížně přenositelné do reálných podmínek, protože tam se rostlina musí vyrovnat velmi často s více než jedním stresovým faktorem zároveň. V této kapitole je popsáno, že odpověď rostliny na

kombinaci stresů je diametrálně odlišná od odpovědi na stresy jednotlivé. Kulturní plodiny jsou na polích často vystaveny kombinaci sucha s jiným stresovým působením, např. s vysokými teplotami nebo zasolením. Vědci se tímto problémem ve větší míře zabývají až ve 21. století.



Obr. 1- Kombinace stresových faktorů. Interakce jsou barevně odlišeny- potenciálně negativní interakce (červeně), potenciálně pozitivní interakce (modře), bílou barvou jsou vyznačeny zatím neznámé reakce na kombinace a černě jsou vyznačeny kombinace stresů bez interakcí. Upraveno podle Suzuki et al. (2014).

Reakce rostliny na kombinovaný stres je unikátní a nemůže být vyvozena z prostého součtu odpovědí rostliny na stresy jednotlivé. Na obr. 1 je přehled interakcí při kombinaci stresů, které mohou potenciálně působit na rostliny. Část těchto stresových kombinací je dále v textu podrobněji komentována. Jak již bylo v předchozím odstavci zmíněno, v reálných podmínkách je velmi častá kombinace sucha a vysoké teploty. Reakcí rostliny na vysoké teploty je otevření průduchů pro ochlazení listů pomocí transpirace, ale pokud vysoké teploty působí spolu se suchem, rostlina musí lépe hospodařit s vodou a průduchy musí nechat zavřené. V experimentu

na tabáku (*Nicotiana tabacum*) se při působení sucha zároveň s vysokou teplotou výrazně zvýšila teplota listů. Expres fotosyntetických genů byly potlačeny, ale respirace byla posílena. Expres genů pro enzymy glykolýzy a pentózofosfátového cyklu byly naopak indukovány. Vzniklé sacharidy jsou použity pravděpodobně přednostně pro dotace řešení stresových reakcí, které jsou energeticky velmi náročné (Rizhsky et al., 2002). U huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) působení kombinace nedostatku vody a vysoké teploty indukovalo transkripci 454 specifických genů. V porovnání s tabákem se zde také snížila expres fotosyntetických genů a zvýšila respirace, ale nebyla zde zaznamenána signifikantní změna v teplotě listů rostlin vystavených teplu a listů vystavených kombinaci tepla a sucha. V huseníčku se při působení obou stresových faktorů akumulovalo větší množství sacharózy a dalších sacharidů, jako je maltóza, melibióza a gulóza. Naopak akumulace aminokyseliny prolinu, jenž je typická při vyrovnávání se se suchem, nebyla pozorována. Sacharóza by tedy mohla funkčně nahrazovat prolin a sloužit jako hlavní osmoprotektant (Rizhsky et al., 2004). Naopak výsledky práce Cvirková et al. (2013) ukazují na důležitou roli prolinu jako osmoprotektantu u rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. M51) při kombinovaném stresu sucha a vysoké teploty. Růst a fyziologické parametry zde byly porovnávány mezi transgenním tabákem s posílenou akumulací prolinu, a divokým genotypem (wildtype, WT). Transgenní tabák vytvářel více biomasy a vykazoval větší relativní obsah vody oproti WT v průběhu působení stresů. Rostliny WT ve fázi zotavení obsah prolinu rychleji redukovaly na původní hodnoty. Syntéza polyaminů (vysoká množství polyaminů v buňce při stresu odpovídá vyšší toleranci) v transgenních rostlinách byla při stresu redukována, ale ve fázi zotavení rychle vzrůstala. Autoři navrhují, že prolin hraje důležitou roli při působení stresové kombinace zvláště tím, že ovlivňuje syntézu polyaminů. V rozsáhlejší studii na huseníčku, kde Rasmussen a kol. (2013) testovali změny v transkriptomu po působení jednotlivých stresů v porovnání s kombinací těchto stresů (chlad, vysoká teplota, vysoké ozáření, biotický stres - flagelin- bakteriální protein, zasolení), bylo zjištěno, že 61 % změn v transkriptomu rostlin stresovaných kombinací podmínek nebylo možné predikovat ze změn transkriptomu způsobených jednotlivými stresy. Například kombinace zasolení a vysoké teploty vykazovala nejmenší shodu transkriptů (pouze 1 %) (Rasmussen et al., 2013). V jiné studii na huseníčku, kde autoři zjišťovali rozdíly kombinovaných stresů a jednotlivého působení zasolení, osmotického stresu a vysoké teploty bylo také zjištěno, že kombinované stresy působí naprosto neočekávaně a nelze „sčítat“ reakce rostlin na stresy individuální. Indukována byla expres 2067 genů při jednotlivých ošetřeních a expresi pouze 833 z nich (odpovídá 41 %) můžeme detekovat i při kombinaci stresů (Sewelam et al., 2014). Na ječmen (*Hordeum vulgare*) působí kombinace zasolení a sucha velmi negativně. Je snížen obsah chlorofylu, tím snížena rychlost fotosyntézy,

snížen osmotický i vodní potenciál. Divoký ječmen je odolnější než ječmen kulturní. Divoký ječmen má schopnost účinnějšího zhášení ROS díky vyšším aktivitám superoxiddismutázy, katalázy, glutathionreduktázy a také díky udržení nižšího poměru $\text{Na}^+:\text{K}^+$ (Ahmed et al., 2013). Další významnou hospodářskou plodinou, u které recentně proběhla studie zaměřující se na vliv kombinovaného stresu, je kukuřice. Metabolomický profil kukuřice stresované zasolením (NaCl) byl více podobný rostlinám stresovaným suchem než vysokým teplotám. Metabolomický profil kukuřice stresované kombinací stresů sucha a vysoké teploty byl více podobný profilu za sucha. Dále bylo zjištěno, že určité koncentrace soli mohou působit pozitivně při vyrovnání se se suchem. Sodík může v rostlinách indukovat odpovědi na nedostatek vody. Zdá se tedy, že všechny kombinované stresy nemusí nutně působit více negativně než stresy působící jednotlivě (Sun et al., 2016).

Některé stresové kombinace mohou dokonce fungovat benefičně tím, že jeden stres zmírňuje působení stresu jiného. Již výše bylo zmíněno, že sucho může redukovat stomatální vodivost. Tím, že se uzavírají průduchy, se ale rostlina může lépe vyrovnat s působením ozonu. Ozon redukuje rostlinou biomasu, ovlivňuje ukládání asimilátů a indukuje předčasnou senescenci. Na tolici (*Medicago truncatula*) se zjišťovalo působení O_3 , sucha a kombinace těchto stresů. Samotné sucho způsobovalo vadnutí a mírné chlorózy, samotný O_3 způsoboval chlorózy a nekrotické leze. Překvapivé je, že v kombinaci obou stresů se vytvářelo menší množství ROS ve srovnání se samostatně působícími stresy. K poklesu množství ROS dochází pravděpodobně díky tomu, že se navyšují koncentrace redukovaného askorbátu a glutathionu v rostlinách, na které bylo působeno stresovou kombinací než u rostlin ošetřených pouze jedním stresem (Iyer et al., 2013).

2.5. Kompatibilní soluty

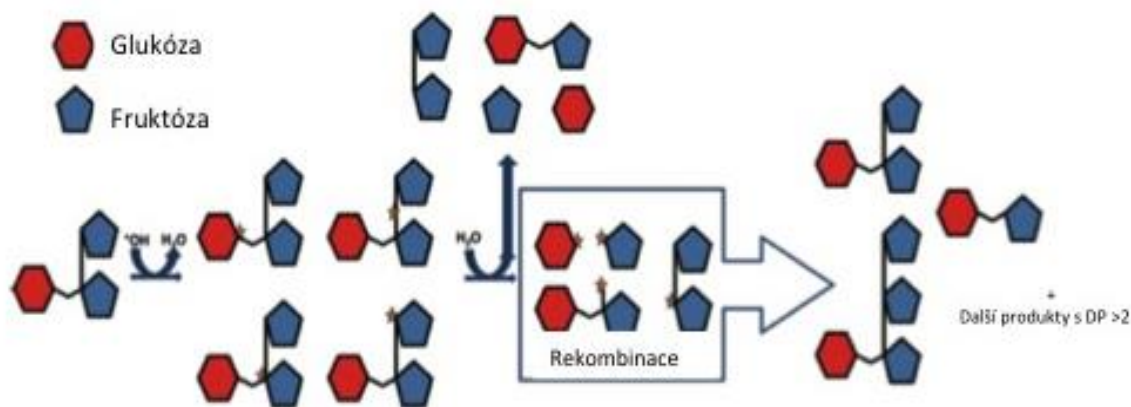
Pravděpodobně obecným mechanismem aktivní obrany rostlin proti nepříznivým podmínkám je syntéza kompatibilních solutů. Kompatibilní soluty jsou nízkomolekulární organické sloučeniny, které neinterferují s běžnými metabolickými procesy buňky. Primární funkcí kompatibilních solutů je účast na osmotickém přizpůsobení. Dalšími neméně podstatnými funkcemi je schopnost zhášení ROS, zamezení poškození membrán a stabilizování proteinů. Několik kompatibilních solutů může být akumulováno souběžně. Koncentrace konkrétního kompatibilního solutu závisí na buněčné kompartmentaci, orgánu, vývojovém stadiu i okolních podmínkách. Sloučenin, které řadíme mezi kompatibilní soluty, je široké množství typů. Jedná se

o mono-, di-, oligo- i polysacharidy, kterými jsou například sacharóza, rafinóza, fruktany, nebo cukerné alkoholy, jako sorbitol a manitol. Široce rozšířena je i akumulace aminokyselin, prolinu nebo glycin betainu (Tipirdamaz et al., 2006).

Kompatibilní soluty snižují osmotický potenciál v buňkách, a tím se účastní osmotického přizpůsobení. Snižování vodního potenciálu je zásadní v souvislosti s udržením dostatečného obsahu vody v buňce při vysokém obsahu soli v okolním prostředí.

Další důležitou funkcí kompatibilních solutů je stabilizace makromolekulárních struktur - proteinů a membrán - v podmínkách, při kterých normálně dochází k denuraci. Kompatibilní soluty zlepšují termodynamickou stabilitu proteinů pomocí vodíkových vazeb, které pak nijak nezasahují do dalších procesů v buňce. Ne všechny kompatibilní soluty mají stejné účinky ve stabilizaci makromolekulárních struktur. Prolin chrání enzymy, např. nitrátreduktázu, při působení těžkých kovů a arsenu (Mishra and Dubey, 2006). V případě dehydratace hydroxylová skupina cukerných alkoholů efektivně nahrazuje vodu při stabilizaci vodíkových vazeb, aktivita enzymů tak není omezena a je chráněna membrána (Noiraud et al., 2001).

Reaktivní formy kyslíku se v buňce běžně tvoří, ale jejich hladina je přísně regulována. Při abiotickém stresu se ROS akumulují. Kompatibilní soluty mohou omezovat tvorbu ROS, přímo fungovat jako jejich zhášecí nebo podporovat funkci antioxidačních enzymů (Ozgun et al., 2013). Přesný popis mechanismu zatím většinou chybí. Pouze u fruktanů byl recentně publikován způsob, jakým fungují jako zhášecí ROS (Peshev et al. 2013). Zvláště nebezpečnými jsou pro buňku hydroxylové radikály, které jsou (v porovnání s peroxidem vodíku a kyslíkovým radikálem) nejreaktivnější. Na Obr. 2 je znázorněna reakce hydroxylového radikálu s 1-kestotriózou za vzniku 1-kestotriózového radikálu. Ten se může rozpadnout na nižší sacharidy nebo reagovat s dalším radikálem a vytvoří se vyšší oligosacharidy.



Obr. 2- Schématické znázornění neenzymatické syntézy oligosacharidů z 1-kestotriózy. Volné radikály jsou znázorněny hvězdou. Upraveno podle Peshev et al. (2013).

2.5.1. Sacharóza

Sacharóza je disacharid složený z jedné molekuly glukózy a fruktózy. Redukující konec molekuly fruktózy se spojí s redukujícím koncem molekuly glukózy a vytvoří se neredukující disacharid. Díky tomu sacharóza získává zásadní vlastnosti pro transport a skladování. Kromě vyšších rostlin se vyskytuje i u některých bakterií, sinic a řas. Proteobakterie a sinice používají sacharózu pro stabilizaci osmotického tlaku a pro skladování uhlíku. U většiny rostlin je sacharóza nejčastěji transportovaný sacharid, iniciuje signální dráhy buněčného dělení a vývojových procesů jako např. kvetení a účastní se jako osmoprotektant při abiotickém stresu (Lunn and MacRae, 2003; Straud et al. 2003).

Syntéza sacharózy probíhá v cytoplasmě, z triózafosfátů vytvořených během fotosyntézy, ze škrobových rezerv nebo z lipidů. Z trióz se syntetizuje fruktóza-6-fosfát (přes fruktóza-1,6-bisfosfát). Syntéza sacharózy zahrnuje dvě reakce, sacharózafosfátsyntáza katalyzuje konverzi UDP-glukózy a fruktóza-6-fosfátu na sacharóza-6-fosfát a sacharózafosfátfosfatáza umožňuje konverzi sacharóza-6-fosfátu na sacharózu. Další možnou cestou je syntéza sacharózy z UDP-glukózy a fruktózy pomocí sacharózasyntázy (Wind et al., 2010). Nově syntetizovaná sacharóza je transportována floémem do sinkových pletiv, kde je skladována ve vakuole nebo metabolizována. Nakládání sacharózy do floému je druhově specifické. Záleží na propojení mezofylových buněk a buněk průvodních. Buď nakládání do floému probíhá symplasticky přes plasmodesmy, nebo apoplasticky v případě, že nejsou symplastická propojení. Při apoplastické cestě je třeba sacharózových transportérů (Sauer, 2007). Sacharóza může být degradována v mitochondriích, chloroplastech i ve vakuolách (Szarka et al., 2008; Gerrits et al., 2001). Konverzi sacharózy na glukózu a fruktózu katalyzují invertázy a sacharózasyntázy. Sacharóza je nejen zdrojem energie a uhlíku, ale jedná se i o důležitou signální molekulu. Podílí se na reakci rostlin k mnoha abiotickým stresům (např. nízké teploty nebo sucho), kdy dochází k její akumulaci (Guy et al., 1992).

2.5.2. Sorbitol

Sorbitol patří mezi cukerné alkoholy. Cukerné alkoholy jsou redukované formy aldóz a ketóz. V případě sorbitolu se jedná o lineární sloučeninu odvozenou od glukózy, kde je aldehydická skupina glukózy přeměněna na hydroxylovou. Hned po manitolu (další zástupce cukerných alkoholů) se jedná o druhý nejrozšířenější cukerný alkohol. U cévnatých rostlin se

vyskytuje 17 různých druhů cukerných alkoholů (Noiraud et al., 2001). Sorbitol je důležitým transportním sacharidem, patřícím mezi hlavní fotosyntetické produkty u čeledi *Rosaceae* (růžovité) a *Plantaginaceae* (jitrocelovité). Nejvíce studovaným rostlinným druhem produkujícím sorbitol je jablň (*Malus domestica*). Sorbitol u jabloně představuje až 70 % uhlíku transportovaného floémem ze zdrojových listů (Klages et al., 2001).

Syntéza sorbitolu probíhá ve dvou krocích. Glukóza-6-fosfát (G6P) je za katalýzy NADPH-dependentní aldóza-6-fosfátreduktázy (A6PR) přeměněn na sorbitol-6-fosfát, ten je následně defosforylován sorbitol-6-fosfatázou za vzniku sorbitolu (Negm and Loescher, 1981; Zhou et al., 2003). Za utilizaci sorbitolu v sinkových orgánech, jakými jsou vyvíjející se listy, kořeny nebo plody, je zodpovědný enzym sorbitoldehydrogenáza (SDH).

2.5.2.1. Sorbitoldehydrogenáza

Sorbitoldehydrogenáza, systematickým názvem NADH-dependentní sorbitoldehydrogenáza, zkráceně SDH, je enzym, který je zodpovědný za oxidaci sorbitolu na metabolicky dostupnou fruktózu. Reakce může probíhat oběma směry. Enzym obsahuje dva zinečnaté kationty, jeden strukturní a jeden katalytický (Pauly et al., 2003). SDH dokáže oxidovat sorbitol, ale i ribitol a xylitol. Všechny tyto polyoly mají stejnou konfiguraci R na uhlíku C4 a S na uhlíku C2, hydroxylová skupina, která je oxidována za vzniku fruktózy, ribulózy nebo xylulózy je u všech tří polyolů na C2 (Aguayo et al., 2013; Aguayo et al., 2015). Je zajímavé, že se liší preference substrátu SDH u různých čeledí rostlin. Ribitol je u rostlin, které nemají sorbitol jako hlavní transportovatelnou formu uhlíku, oxidován SDH z více jak 60 %, ale u čeledi *Rosaceae* pouze méně jak 15 % (v porovnání s oxidací sorbitolu u jabloně) (Aguayo et al., 2015).

SDH se vyskytuje hned v několika říších. Najdeme ji u bakterií, kvasinek, živočichů, včetně člověka, kde se SDH studuje zvláště u diabetiků (Malone et al., 1980). Samozřejmě se nachází SDH i v rostlinné říši, kde je široce rozšířena. U 42 druhů krytosemenných rostlin bylo nalezeno 92 genů kódujících SDH. Tyto geny jsou v čeledi *Rosaceae* hojně duplikovány, ale u jednoděložných nebo v čeledi *Brassicaceae* a *Vitaceae* nalezneme pouze jeden gen pro SDH. U vyšších dvouděložných rostlin SDH divergovaly do dvou fylogenetických linií, označovaných jako třídy I a II (Jia et al., 2015). Sorbitol je hlavním transportovaným zdrojem uhlíku v čeledi *Rosaceae* a *Plantaginaceae*. V čeledích, kde je SDH zastoupena pouze jedním genem, je sorbitol přítomen pouze v malých množstvích, která jsou ale pravděpodobně velmi zásadní pro správný

růst a vývoj rostliny (Jia et al., 2015). Ve výše zmíněné studii se bohužel vůbec nevěnují SDH u čeledi *Plantaginaceae*.

U jabloně bylo zjištěno, že SDH je přítomná v epidermis, parenchymatických buňkách i v cévních svazcích vyvíjejících se děložních lístků. V buňce se SDH nachází v cytosolu, v membránách endoplazmatického retikula. Nachází se také v lumen vakuoly. V průběhu pozdějšího vývoje semen je převážně skladována v zásobních vakuolách (Wang et al., 2013). Při sekvenční analýze SDH byl také nalezen signální úsek, který má transmembránovou doménu. Při studiu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana*, které měly deletovaný tento signální úsek, bylo zjištěno, že signalizace slouží k transportu SDH do vakuoly (Wang et al., 2013). U broskvoně je aktivita SDH v různých fázích vegetační sezóny, a tedy i v různých fázích zrání plodů odlišná. Nejmenší aktivita SDH byla detekována u nadzemní části broskvoně na počátku a ke konci vegetační sezóny, kdy je nejpomalejší růst. Tehdy je poměr sorbitolu ku sacharóze 2:1. V průběhu vegetační sezóny se ale aktivita SDH zvyšuje a poměr sorbitolu ku sacharóze se sníží na 1:1. V plodech je největší aktivita SDH v průběhu fáze, kdy dochází k aktivnímu zvětšování buněk (Lo Bianco et al., 1999). V podobně zaměřené studii Yamada et al., (2001) zjistili, že SDH izolovaná z broskvoně sdílí 77% strukturní podobnost s SDH z jabloně. Aktivita SDH je udržována vysoká v době, kdy je ještě plod nezralý a další nárůst aktivity byl zaznamenán až ve zralém plodu. V broskvoni je sacharóza akumulována v průběhu vývoje plodu, sorbitol, který je metabolizován SDH, poskytuje substrát pro syntézu sacharózy pomocí sacharózasyntázy. Naopak v jabloni je zaznamenána výrazná akumulace fruktózy (Yamada et al., 2001). Aktivita SDH je největší ve dvou obdobích stejně jako u broskvoně, první zvýšená aktivita v nezralých plodech odpovídá pozorované výrazné akumulaci fruktózy a druhé pozorované maximum aktivity odpovídá pozorované akumulaci fruktózy spolu se sacharózou. Aktivita SDH koresponduje s množstvím mRNA a proteinu (Suzuki et al., 2001).

U *Arabidopsis thaliana* byly studovány knockoutované *sdh*-mutanty, které vykazovaly výrazné navýšení obsahu sorbitolu v listech. Při působení sucha se sorbitol akumuloval jak v kontrolních rostlinách, tak i v *sdh*-mutantech a fenotyp obou variant byl velmi podobný. Výrazný rozdíl nastal ve fázi zotavení ze stresu, kdy *sdh*-mutanty nebyly schopny obnovit růst (Nosarzewski et al., 2012). V následující studii (Aguayo et al., 2013) vykazovaly *sdh*-mutanty *Arabidopsis thaliana* výraznější odolnost k suchu než rostliny kontrolní. *sdh*-mutanty měly vyšší hodnoty relativního obsahu vody díky akumulaci sorbitolu. Autoři rozpor mezi studii s *sdh*-mutanty připsali rozdílům v kultivačních podmínkách. Odolnější rostliny byly kultivovány při krátkém dni, oproti mutantům téměř totožným s kontrolními rostlinami, které rostly při dlouhém dni (Aguayo et al., 2013). Pravděpodobně zde hrají také roli další cukerné alkoholy,

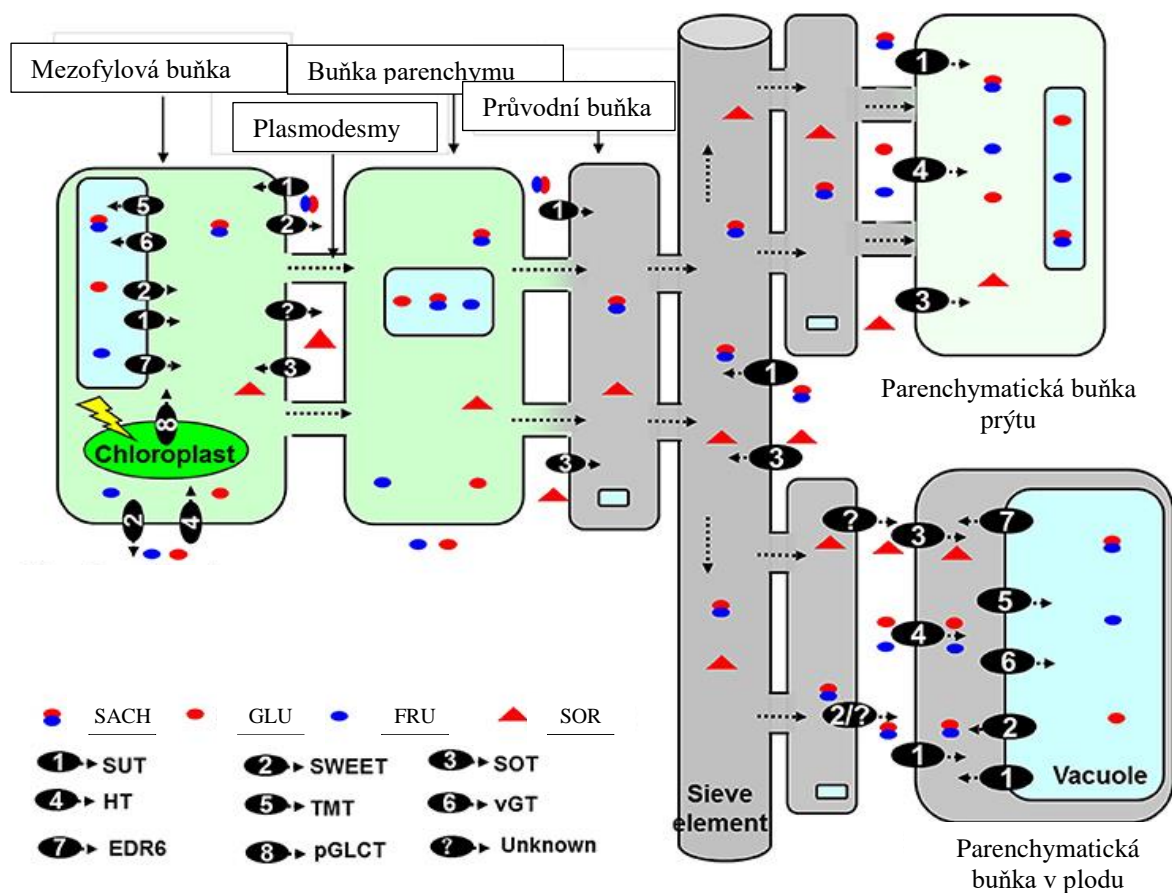
které je SDH schopna metabolizovat (ribitol, a xylitol). U *sdh*-mutantů *Arabidopsis thaliana* dochází k překročení kritického koncentrace právě těchto alternativních substrátů pro SDH (Wang et al., 2013).

Analýza floému kukuřice ukázala, že sacharóza je hlavním cukrem transportujícím uhlík z listů do kukuřičných klasů. Prvním krokem metabolismu sacharózy v pletivech endospermu kukuřice je produkce fruktózy, která může být dále konvertována na sorbitol (Doehlert, 1987, de Sousa et al., 2008). Endosperm kukuřice vykazuje vysoké aktivity SDH, velká část vytvořené fruktózy se tedy v endospermu přeměňuje na sorbitol, který ale není ve velkých množstvích skladován. Jeho význam je tak pravděpodobně v kukuřičných zrnech fungovat jako intermediát při vytváření škrobu, pokud je přítomna aldózareduktáza, která katalyzuje přeměnu sorbitolu na glukózu (Doehlert, 1988; de Sousa et al., 2008). V rostlinách sóji je přítomnost sorbitolu vázána stejně jako u kukuřice pouze do určité vývojové fáze. Sorbitol se zde vyskytuje pouze při klíčení a má pravděpodobně stejný význam jako u kukuřice, že je intermediátem přeměny mezi glukózou a fruktózou. SDH byla u sóji nalezena v ose embrya, ale enzym aldózareduktáza v této rostlině nebyla detekována (Kuo et al., 1990). SDH-like protein (SDL) byl také nalezen v rostlinách rajčete při analýze cDNA. Při enzymatické charakterizaci SDL proteinu bylo zjištěno, že katalyzuje konverzi sorbitolu a fruktózy a byla zjištěna strukturní podobnost mRNA pro SDH a SDL větší než 80 %. Proto autoři studie uzavřeli, že se jedná o sorbitoldehydrogenázu a přejmenovali SDL na LeSDH (Ohta et al., 2005).

2.5.2.2. Transport sorbitolu

Mezi bylinnými druhy transportujícími sorbitol na dlouhou vzdálenost z čeledi *Plantaginaceae* a dřevinami z čeledi *Rosaceae* je rozdíl v typu floému. Zatímco u *Plantaginaceae* se vyskytuje uzavřený typ floému, který má minimum plazmodezmatických spojení mezofylových buněk s buňkami průvodními, u dřevin čeledi *Rosaceae* se nachází smíšený typ floému, kde převládají symplastická propojení. Situace ale není zcela jednoznačná. Přestože u jabloně převažuje symplastické plnění floému, byly zde nalezeny transportéry sorbitolu, které se účastní nakládání sorbitolu do floému (MdsOT1-MdsOT6) (*Malus domestica*) (Gao et al., 2005). Watari et al. (2004) identifikovali z těchto šesti tři přenašeče: MdsOT3, MdsOT4 a MdsOT5. Tyto transportéry umožňují nakládání sorbitolu do floému zvláště v nejmenších žilkách, kde se nacházejí ve velkém množství. Reidel et al. (2009) však navrhuje, že transportéry sorbitolu při nakládání do floému v jabloni neplní zásadní funkce

a účastní se pouze při transportu sorbitolu uniklého do apoplastu zpět do floému. Tito autoři zjistili, že není koncentrační gradient mezi floémem a okolními buňkami listové čepele, a proto se přiklání k symplastickému transportu. Transportéry sorbitolu však budou hrát důležitou roli při ukládání sorbitolu v plodech. Symplastická cesta zde není pravděpodobná, protože byla změřena koncentrace sorbitolu v apoplastu plodu mnohem vyšší než ve floému (Zhang et al., 2004). Schéma transportu sorbitolu (a sacharózy) u jabloně včetně zapojení přenašečů je znázorněno na Obr. 3. U višně byly také nalezeny transportéry sorbitolu. PcSOT1 a PcSOT2 jsou proton-dependentní transportéry. Zatímco se gen *PcSOT1* nejvíce exprimuje ve zrajících plodech, PcSOT2 je důležitý pro správný vývoj plodu v raných fázích. Oba tyto transportéry jsou vysoce specifické (Gao et al., 2003).



Obr. 3- Schéma transportu sacharózy a sorbitolu u jabloně. Sorbitol i sacharóza jsou syntetizovány v mezofylových buňkách, odkud jsou pomocí plasmodesmů transportovány zdrojovým listem a následně naloženy do floému, v plodu jsou z průvodní buňky do buněk parenchymu čerpány přes apoplast. V jabloni jsou 4 různé rodiny transportérů zodpovědné za distribuci sorbitolu, sacharózy, glukózy a fruktózy. SUT a SWEET - transportéry sacharózy, SOT - transportér sorbitolu, MST - monosacharidový transportér (včetně HT). vGT - glukózový vakuolární transportér, TMT - vakuolární transportér, pGLCT - glukózový plastidový transportér. ERD6- sacharidový transportér (early response to dehydration), SWEET fungují jako uniportery, bez nutnosti dodání energie, SUT, SOT i HT jsou charakterizovány jako H⁺ symportery. vGT a TMT jsou H⁺ antiportery. Upraveno podle Wei et al. (2014).

U *Arabidopsis thaliana* byly překvapivě nalezeny geny homologní k transportérům cukerných alkoholů. Rostliny *Arabidopsis thaliana* netransportují na delší vzdálenosti žádné polyoly, pouze sacharózu a malé množství rafinózy. Přesto byl identifikován gen *AtPLT5*, který dokáže transportovat přes plasmatickou membránu cukerné alkoholy, vedle sorbitolu také xylitol, erythritol nebo glycerol, a to symportem s H^+ (Klepek et al., 2005).

2.5.2.3. Účast sorbitolu při stresových reakcích

Sorbitol se účastní stresových reakcí i v čeledi *Rosaceae*. Za nízké teploty se zvyšuje exprese genu *S6PDH* u rostlin broskvoně (*Prunus persica*). Díky tomu se výrazně změnil obsah glukózy, která byla metabolizována ve prospěch sorbitolu. Na základě těchto výsledků bylo pro broskvoň navrženo, že akumulace sorbitolu je posílena nízkými teplotami (Deguchi et al., 2002). Při poklesu teploty ze 6 °C na 0 °C byl detekován výrazný nárůst sorbitolu v xylému hrušně (*Pyrus pyrifolia*). V souvislosti s navýšením koncentrace sorbitolu byla pozorována zvýšená exprese genu pro transportér sorbitolu *PpSOT2*. Xylémový transport je u opadavých dřevin posílen v zimních měsících, kdy se jedná o zásadní transportní cestu sacharidů. U hrušně byl nejvyšší nárůst sorbitolu v prosinci při teplotách blížících se nule (Ito et al., 2013). Při suchu u broskvoně je sorbitol zodpovědný za osmotické přizpůsobení z téměř 80 %. V suchu vystavených rostlinách byl nárůst sorbitolu ve výhonech pozorován po třech týdnech. Akumulace sorbitolu je pravděpodobně možná díky snížení aktivity SDH (Lo Bianco et al., 2000). Ke stejným závěrům došli i autoři Cui et al. (2004), kteří také pozorovali nárůst sorbitolu v listech broskvoně za sucha. Popsali rozdíly mezi různě stresovanými rostlinami, rostliny, kterým nebyla nejdéle dodávána voda, měly nejvyšší obsah sorbitolu. Po zotavení se ze stresu (již první den po zalití) se obsah sorbitolu dostal na původní hladiny. Změna v obsahu sorbitolu byla detekována pouze v listech, nikoli v kořenech (Cui et al., 2004). Za sucha se ale i v kořenech může koncentrace sorbitolu měnit. V experimentu s *Eriobotrya japonica*, myšpulníkem, který je odolný k nedostatku vody, se zvyšovala koncentrace sorbitolu v listech i kořenech ošetřených rostlin (Cui et al., 2003).

U *Plantaginaceae* se vyskytuje minimum plasmodesmatických propojení mezi mezofylovými buňkami a buňkami průvodními, a proto je třeba funkce transportérů, které se uplatňují při nakládání do floému. Při reakci rostlin k abiotickému stresu dochází ke změnám exprese sorbitolových transportérů. U *Plantago major*, což je glykofytní druh jitrocele, byly pozorovány změny v hladinách mRNA pro transportéry sorbitolu *PmPLT1* a *PmPLT2*, i mRNA

pro transportér sacharózy PmSUC2 (Ramsperger-Gleixner et al., 2004; Pommerening et al., 2007). PmPLT1 a 2 jsou H⁺ symportéry, které nejsou vysoce specifické, dokáží transportovat i manitol. Při experimentech, kdy bylo na rostliny *Plantago major* působeno 400 mM NaCl, se výrazně zvýšila exprese genů pro transportéry sorbitolu, zvláště *PmPLT2*, zvýšená hladina mRNA byla pozorována již po dvou hodinách od ošetření. Při zasolení má pravděpodobně tento transportér zásadnější vliv na zvýšení hladiny sorbitolu ve floému. Hladina mRNA pro transportér sacharózy se při zasolení nejprve neměnila a po 24 hodinách začala klesat. Tyto změny odpovídají pozorované změně zvýšení poměru sorbitolu a sacharózy ve floému v reakci na stres (Ramsperger-Gleixner et al., 2004; Pommerening et al., 2007). U jabloně byly pozorovány podobné výsledky se zvýšenou expresí sorbitolových transportérů při abiotickém stresu. Rostliny jabloně, které byly vystavené suchu, měly zvýšené hladiny mRNA pro MdSOT3, MdSOT4 a MdSOT5 a akumulovaly více sorbitolu ve floému (Li et al., 2012).

Nárůst obsahu sorbitolu byl pozorován v kořenech a listech při zvyšujícím se zasolení u rostlin *Plantago coronopus*, které řadíme mezi halofyty. Při překročení určité koncentrace soli (NaCl), tzv. prahu slanosti, se redukuje listová plocha, uzavírají se průduchy, proto je omezena fotosyntéza i transpirace. Kontrolní rostliny měly čtyřikrát nižší obsah sorbitolu než rostliny ošetřené NaCl (Koyro, 2006). Další halofytní druh jitrocele *Plantago maritima* také akumuloval v experimentu se zvyšujícím se zasolením vysoké množství sorbitolu. Při zasolení do 400 mM NaCl byl obsah sorbitolu lineárně závislý na koncentraci NaCl, a sorbitol byl potvrzen jako kompatibilní solut, neboť nedocházelo k inhibici aktivity enzymů extrahovaných z prýtu (Ahmad et al., 1979). U čeledi *Plantaginaceae* není zcela vyjasněno, zda sorbitol je u všech druhů zodpovědný za osmotické přizpůsobení. Důležitou roli může hrát i akumulace prolinu, dalšího kompatibilního solutu. Metabolismus sorbitolu a prolinu se pravděpodobně může lišit mezi různými ekotypy tohoto druhu jitrocele. Obsah sorbitolu se lišil u vzorků sebraných z populace od sladkovodního jezera od vzorků z mořského pobřeží. *Plantago maritima* rostoucí u jezera měl jako hlavní kompatibilní soluty prolin a glycin betain, zatímco vzorky od mořského pobřeží obsahovaly několikanásobně více sorbitolu (Tipirdamaz et al., 2006). V roce 2004 byl publikován experiment, který navrhoval jako kompatibilní solut u halofytního? *Plantago crassifolia* místo sorbitolu prolin. Rostliny byly ošetřeny různými koncentracemi soli od 0 do 200 mM NaCl. Obsah prolinu se se vzrůstající koncentrací navyšoval, opačný trend byl pozorován u koncentrace sorbitolu (Vicente et al., 2004). Stejný tým autorů později provedl experiment se čtyřmi halofytními druhy jitrocele (*P. coronopus*, *P. major*, *P. crassifolia*, *P. lagopus*), kde se snažili dokázat účast glycin betainu a prolinu na osmotickém přizpůsobení. Zjistili, že sorbitol je nejdůležitějším kompatibilním solutem při zasolení v koncentracích, se

kterými se mohou rostliny běžně v přírodě setkat (do 400 mM NaCl). Při velmi vysokých koncentracích soli (450-600 mM NaCl) mají tyto rostliny pravděpodobně možnost zapojit další mechanismy obrany a syntetizují prolin jako další kompatibilní solut (Pacurar et al., 2013). K podobnému závěru o účasti sorbitolu na osmotickém přizpůsobení u *Plantago crassifolia* došla i další studie, v níž byla slanost půdy sledována v souvislosti se sezónními výkyvy počasí a endogenními hladinami sorbitolu. V letních měsících byla koncentrace NaCl v půdě nejvyšší, a právě tehdy byl největší i obsah sorbitolu v rostlinách *Plantago crassifolia* (Gil et al., 2011).

2.5.3. Sacharidy rafinóзовé řady

Sacharidy rafinóзовé řady, často nazývané RFO (z angl. raffinose family oligosaccharides) jsou dalšími sloučeninami, které se mohou uplatňovat jako kompatibilní soluty. RFO jsou neredukující sloučeniny, složené z molekuly sacharózy, na kterou jsou glykosidickou vazbou připojeny galaktozylové zbytky. Nejmenším členem RFO je rafinóza složená z jedné galaktózy a jedné sacharózy. Dalším připojením galaktozylového zbytku vzniká stachyóza. Schopnost syntézy RFO je v rostlinné říši široce rozšířena, většinou v určité fázi vývoje rostliny. Rafinóza spolu se stachyózou jsou významnými transportními látkami například v čeledích *Lamiaceae* nebo *Cucurbitaceae* (Zimmermann and Ziegler, 1975; Sprenger and Keller, 2000). Vyšší RFO (s více galaktozylovými podjednotkami) jsou často skladovány v zásobních orgánech (Kandler and Hopf, 1984). K syntéze RFO je třeba galaktinolu, který vzniká pomocí galaktinolsyntázy z UDP-galaktózy a myo-inositolu - tato dráha se nazývá galaktinol-dependentní. Galaktinol-independentní dráha využívá enzymu galaktosyltransferázy. Independentní dráha se uplatňuje pro vyšší RFO. Syntéza RFO probíhá v cytoplasmě a je zahájena vytvořením rafinózy a galaktinolu. Enzymy, které se podílejí na syntéze RFO jsou označovány jako α -galaktosyltransferázy. Naopak katabolismus je zajišťován α -galaktosidázami (Keller and Pharr, 1996). Díky svým vlastnostem plní RFO nejen funkci transportní a zásobní, ale uplatňují se i jako kompatibilní soluty (Rejšková et al., 2007; Nishizawa et al., 2008). Nejčastěji studovanými rostlinami v souvislosti s akumulací RFO je vedle zástupců čeledi *Cucurbitaceae* zběhovec plazivý (*Ajuga reptans*) patřící do čeledi *Lamiaceae*. Zběhovec skladuje RFO v listovém mezofylu, kde může tvořit i více než polovinu hmotnosti sušiny. Při experimentech, kdy byly rostliny zběhovce vystaveny chladu (3 °C v noci, 10 °C přes den) se významně navyšuje obsah nestrukturních sacharidů, který je dán hlavně zvýšením RFO. Zvyšuje

se také stupeň polymerace díky zvýšení aktivity galaktosyltransferázy (Bachmann et al., 1994). Výskyt RFO byl popsán i u rostlin jitrocele (Janeček et al., 2011).

2.5.4. Prolin

Rostliny při abiotickém stresu, jakým je například zasolení, sucho, extrémní výkyvy teplot nebo kontaminace těžkými kovy, obvykle akumulují prolin. Množství akumulovaného prolinu je druhově specifické, po působení stresu může dojít u některých druhů až ke stonásobnému zvýšení oproti kontrolním rostlinám. Aminokyselina prolin je významným kompatibilním solutem, působícím jako osmoprotektant, a zároveň slouží i jako zásoba uhlíku a dusíku (Verbruggen and Hermans, 2008). Při oxidativním stresu se uplatňuje také jako zhášec volných radikálů (Smirnoff and Cumbes, 1989).

V rostlinách jsou dvě různé dráhy syntézy prolinu. První vychází z glutamátu. Glutamát je dvěma redukcemi katalyzovanými nejprve pyrrolin-5-karboxylátsyntázou (P5CS) a následně pyrrolin-5-karboxylátreduktázou (P5CR) přeměněn na prolin. P5CS katalyzuje první aktivaci glutamátu a následně potom i redukcí nestálého meziprojektu. P5CS je typicky u *Arabidopsis thaliana* kódován dvěma geny. *P5CS1* je transkribován v kořeni i nadzemní části, a *P5CS2* je transkribován v aktivně se dělících buňkách. *P5CS1* se významněji podílí na stresové odpovědi než *P5CS2* (Szekely et al., 2008). Druhým možným prekurzorem pro syntézu prolinu je ornitin, kde se uplatňuje enzym ornitinaminotransferáza (Delaunay and Verma, 1993). Při akumulaci prolinu v důsledku abiotického stresu je častější syntéza z glutamátu. Degradace prolinu probíhá opačným směrem než jeho syntéza a je katalyzována prolindehydrogenázou (PDH) (Verbruggen and Hermans, 2007). Syntéza probíhá v cytosolu a plastidech, degradace v mitochondriích (Szoke et al. 1992). Je několik signálních drah, které vedou při zasolení ke zvýšení exprese genu *P5CS1*. Exprese *P5CS1* je u *Arabidopsis thaliana* zprostředkována signální drahou fosfolipázy C při zasolení, ale ne při suchu (Parre et al. 2007). Při osmotickém stresu se při akumulaci prolinu také uplatňuje kyselina abscisová (Verslues et al., 2007). Poprvé byla osmoprotektivní funkce prolinu objevena u bakterií (Csonka et al., 1988; Csonka et al., 1991). Později i u jiných organismů včetně rostlin. Akumulace prolinu v mnoha rostlinách při stresu pozitivně koreluje s jejich tolerancí k danému stresu. Například u rýže byla porovnávána odolnost k osmotickému stresu mezi tolerantním kultivarem a kultivarem citlivým. Oba kultivary při osmotickém stresu akumulovaly prolin, ale tolerantnější ve výrazně větších množstvích. Větší obsah prolinu u tolerantního kultivaru byl díky navýšení aktivity P5CS (Choudhary et al., 2005). Ve studii, která

porovnávala akumulaci prolinu u vybraných halofytů, se ukázalo, že prolin je nejhojněji zastoupenou aminokyselinou, a například u halofytu bařičky přímořské (*Triglochin maritima*) prolin tvoří až 70 % poolu aminokyselin. Jitrocel přímořský (*Plantago maritima*) byl jediný halofyt v tomto polním experimentu, u kterého prolin byl v minimálních množstvích a tvořil pouze 3 % z poolu aminokyselin. Obsah prolinu se nezměnil ani v laboratorních podmínkách při pokusech se zasolením (Stewart and Lee, 1974). Oproti halofytnímu druhu *Plantago maritima* byl v glykofytním druhu *Plantago crassifolia* prolin látkou, jejíž obsah se navyšoval se vzrůstající koncentrací soli (Vicente et al. 2004). V pozdější publikaci se však ani u tohoto glykofytního druhu jitrocele s prolinem nepracovalo jako s kompatibilním solutem, a stejně tak jako u *Plantago maritima* byl hlavním kompatibilním solutem sorbitol (Gil et al. 2011).

Pokroky se zvyšováním odolnosti rostlin k abiotickým stresům jsou zaznamenány při genetických modifikacích s nadprodukcí prolinu. Transgenní tabák, který akumuloval větší množství prolinu, byl odolnější vůči osmotickému stresu. Prolin významně redukoval hladiny volných radikálů, zároveň také byla pozorována odolnější semena těchto transgenních rostlin, která byla schopna vyklíčit i při koncentracích 200 mM NaCl (Hong et al., 2000). U *Arabidopsis thaliana* byl proveden experiment, ve kterém se při zablokování PDH akumuloval prolin, který způsobil odolnost daných rostlin k velmi nízkým teplotám i pod bodem mrazu (až -7 °C), a zároveň i odolnost k zasolení až 600 mM NaCl (Nanjo et al., 2003). Rychlejším způsobem zvyšování odolnosti rostlin k abiotickým stresům by mohla být exogenní aplikace prolinu. Benefiční příspěvek prolinu byl pozorován v mnoha situacích. Nízké koncentrace exogenně dodaného prolinu zlepšují růstové vlastnosti rýže při zasolení (Roy et al., 1993). Při suchu může prolin u kukuřice zlepšovat příjem iontů K^+ , Ca^+ , P i N (Ali et al., 2008). Jak již bylo zmíněno, prolin se uplatňuje i jako účinný zhášec reaktivních forem kyslíku. Při exogenní aplikaci prolinu ke kořenům *Arabidopsis thaliana* došlo k výraznému poklesu obsahu ROS (Cuin and Shabala, 2007). Prolin také zvyšuje aktivity antioxidantních enzymů, katalázy, peroxidázy a superoxiddismutázy (Hoque et al., 2007). Je zajímavé, že u rostlin tabáku a *Arabidopsis thaliana* se při vysokých teplotách prolin neakumuluje, a naopak při experimentech, kdy se u těchto rostlin navýšil obsah prolinu v médiu, byly ke zvýšeným teplotám mnohem citlivější (Rizhski et al., 2004). Exogenní dodávání prolinu rostlinám v kontrolních podmínkách může mít dokonce toxické účinky. Stále není jasné, zda toxicky působí prolin nebo P5C (Mani et al., 2002).

K přehledu funkcí prolinu je třeba doplnit, že akumulace v rostlinách nesouvisí pouze s odpovědí na stres. Vysoký obsah prolinu byl detekován v květech a pylových zrnech *Arabidopsis thaliana*, kde se v těchto reprodukčních orgánech nacházelo 26 % veškerých aminokyselin rostliny, a to právě ve formě prolinu. Ve vegetativních orgánech byl prolin

zastoupen pouze 1-3 %. Nestresová akumulace prolinu je asociována s pletivou, která obsahuje relativně malý obsah vody (velké množství vody je například v listové růžici, kde se nachází pouze minimální množství prolinu) (Chiang and Dandekar, 1995). Zdá se, že prolin bude důležitý i v prodlužování květního stvolu, získání kompetence ke kvetení nebo při vývoji embrya, kdy nedostatek prolinu (experiment s knockoutovanými mutanty *Arabidopsis thaliana* v genu *P5CS2*) znamená zastavení vývoje embrya (Mauro et al., 1996; Székely et al., 2008).

3. Materiál a metody

Experimentální práce byla prováděna na Katedře experimentální biologie rostlin Univerzity Karlovy v Praze. Pro experimenty byla použita semena dodaná specializovanými semenářskými firmami (*P. eriopoda* a *P. maritima* - horizonherbs.com a *P. lanceolata* a *P. major* - semena.cz). Kultivace rostlin probíhala v podmínkách *in vitro*.

3.1. Výsev semen

Před kultivací v podmínkách *in vitro* byla semena povrchově sterilizována následovně:

- promytí v 70% etanolu (1 min)
- přidání 15% SAVO (odpovídá 0,7% NaClO) do kádinky se semeny + malé množství (kapka) detergentu (přípravek na nádobí JAR)
- přikrytí kádinky alobalem, 15 min sterilizace na třepačce (300 ot./min, IKA KS 130 control).

Další práce již probíhala ve flowboxu ve sterilních podmínkách:

- 3x promytí ve sterilní destilované vodě
- výsev semen - manipulace sterilními nástroji (viz následující odstavec), 3 semena do jedné 100ml Erlenmayerovy baňky.

3.2. Sterilní práce

Se semeny, mladými semenáčky i dospělými rostlinami bylo při sázení a přesazování zacházeno ve sterilních podmínkách laminárního flowboxu (*Faster* Schoeller Instruments nebo *Heraeus LaminAir*® TL2448). S rostlinami bylo pracováno na sterilních Petriho miskách. Nástroje (pinzety a skalpely) byly uloženy ve skleněných obalech překrytých alobalem. Takto byly nástroje desinfikovány v horkovzdušném sterilizátoru (BINDER, 3 hodiny při teplotě 150 °C). Při práci ve flowboxu byly používané nástroje odkládány do 96% etanolu, bezprostředně před použitím byl alkohol opálen a nástroje ponechány po dobu chladnutí na sterilní Petriho misce.

3.3. Kultivace rostlin

Rostliny jitrocele byly pěstovány na tuhém MS médiu (Murashige and Skoog, 1962), složení zásobních roztoků viz Tab. 1. Kultivace probíhala ve 100ml Erlenmayerových baňkách, umístěných v kultivačním boxu při konstantní teplotě 20 °C a fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy (intenzita osvětlení 7500 lx a fotosynteticky aktivní záření 220 μmol fotonů/ m^2/s).

Zásobní roztok	Složka zásobního roztoku	Navážka na objem 500 ml zásobního roztoku (g)	Zásobní roztok na litr média (ml)
A	KNO_3	19	50
	NH_4NO_3	16,5	
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7	
	KH_2PO_4	1,7	
B	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,23	5
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,86	
	H_3BO_3	0,62	
	KI	0,083	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0025	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0025	
C	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,78	5
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,73	
D	Myo-inositol	10	5
	Kyselina nikotinová	0,05	
	Pyridoxin- HCl	0,05	
	Thiamin-HCl	0,05	

Tab. 1- Složení zásobních roztoků pro kultivační médium MS.

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky A, B, C a D viz Tab. 1. Pro zásobní roztoky A a B byly přesně naváženy složky, postupně smíchány s destilovanou vodou a uchovávány v lednici

při 4-6 °C. Zásobní roztok C byl připraven tak, že se nejprve každá složka rozpustila zvlášť, zahřála se na cca 80 °C, a až poté se obě složky za stálého míchání pomalu smíchaly. Hotové zásobní roztoky byly skladovány v lednici při 4-6 °C, v případě zásobního roztoku D v mrazicím boxu při -18 °C.

Médium bylo připravováno následovně: dané množství zásobních roztoků dle Tab. 1 bylo vmícháno do destilované vody. Poté byla přidána sacharóza (30 g/l média) a pH bylo pomocí 1M NaOH a 1M HCl upraveno na hodnotu 5,75. Po přidání agaru (8 g/l média) se médium nechalo převařit v mikrovlnné troubě, aby se agar rozpustil. Médium bylo ihned po vyndání z mikrovlnné trouby rozléváno do 100ml Erlenmayerových baněk, přibližně po 25 ml. Baňky byly překryty dvojitou vrstvou alobalu, označeny, vloženy do autoklávu (Tuttnauer 2540EK-N, Chirana PS20A nebo Systec DX-23) a sterilizovány (121° C, tlak 0,144 MPa, 20 min).

3.3.1 Modifikace MS média

V průběhu experimentu byly připravovány následující modifikace základního média:

- Experiment exogenní vliv sacharidu - MS média ve variantě s 3% sacharózou, druhá varianta s 3% sorbitolem, třetí varianta s 3% manitolem, čtvrtá varianta bez přidání sacharidu (vše uzavřeno tradičními alobalovými víčky) a pátá bez přidání sacharidu pod víčky z polypropylénové fólie s vloženými terčíky Sun cap (Sigma Aldrich, 2ks terčků na 1 baňku)
- Experiment zasolení, chlad, kombinovaný stres - 1/2 MS média (složky média A, B, C a D) byly použity ve snížené, poloviční koncentraci) s 1,5% sacharózou pro klíčení, a 1/2 MS média s 1,5% sacharózou a 1,5% sorbitolem pro následný růst, přídavek NaCl do média (v koncentraci 5,844 a 11,688 g/l)
- Experiment osmotický stres - 1/2 MS médium s 1,5% sacharózou pro klíčení; 1/2 MS médium s 1,5% sorbitolem a 1,5% sacharózou pro následný růst, přídavek PEG do média (30 a 60 g/l)
- Experiment prolin - 1/2 MS médium s 1,5 % sacharózou pro klíčení, 1/2 MS média s 1,5% sacharózou a 1,5% sorbitolem pro následný růst.

3.4. Vegetativní množení indukci adventivních rostlin z kořenových segmentů

Při úvodních metodických experimentech byla testována i možnost vegetativního množení s cílem získat co nejvíce homogenní materiál. Dospělé, cca 1 měsíc staré rostliny získané výsevem semen byly ve flowboxu vyndány z Erlenmayerových baněk na Petriho misky se sterilní destilovanou vodou. Kořeny byly očištěny od média. Skalpelem byly kořeny odděleny od prýtů. Pro vegetativní množení byly využity mladé světlé kořeny, které byly rozřezány skalpelem na stejně velké, cca 2cm dlouhé segmenty (za použití milimetrového papíru pod Petriho miskou). Tyto segmenty byly sterilní pinzetou položeny na tuhé MS médium do 100ml Erlenmayerových baněk. Do jedné baňky bylo dáno přibližně deset segmentů. Po 8 týdnech kultivace bylo možné získaný trs adventivních rostlin rozdělit a získat individuální rostliny pro další využití.

3.5. Analýza obsahu nestrukturních sacharidů

3.5.1 Odběr vzorků

Vzorky pro růstové analýzy, analýzy obsahu a spektra endogenních sacharidů i obsahu prolinu byly odebírány do 1ml plastových mikrozkuavek (v případě rostlin rostoucích pod víčky Sun cap prýt do 2ml mikrozkuavek). Rostlina byla pinzetou vyndána z baňky, očištěna od kultivačního média, případně omyta v destilované vodě a osušena na filtračním papíru. Pečlivě byl oddělen skalpelem prýt od kořenů. Celé části rostliny, tedy celý prýt či kořen, byly dány do příslušných, označených, předem zvážených mikrozkuavek s propíchnutými víčky. Co nejrychleji byla naplněná mikrozkuavka zvážena na analytických vahách a ihned byla zmrazena v termonádobě s tekutým dusíkem. Buď byly vzorky ihned dále zpracovávány pro analýzu nestrukturních sacharidů, nebo byly uloženy v -80 °C.

3.5.2. Příprava vzorků pro analýzu nestrukturních sacharidů

Vysušení vzorků bylo provedeno pomocí lyofilizace (Lyovac GT 2, Finn-Aqua, cca 12 hodin). Ihned poté byla zvážena hmotnost sušiny. U vzorků vážících více než 30 g suché hmotnosti byla přímo v mikrozkuavkách provedena homogenizace pomocí plastového tloučku a odebráním byla hmotnost vzorku upravena na 15-20 mg. Následně byl do mikrozkuavek přidáno 0,5 ml 80% methanolu. Bylo-li zapotřebí, materiál v mikrozkuavce byl kopistkou zatlačen na dno, aby byl celý objem pletiva dostatečně vyluhován v methanolu. S methanolem

byly vzorky inkubovány v termobločku (Grant-Boeckel BBD) při teplotě 75 °C po dobu 15 min. Methanol byl vakuově odpařen (SpeedVac Plus SC110A, Savant; program V-AL, 3 hodiny a 45°C). Pro extrakci sacharidů bylo k peletům v mikrozkušavkách následně přidáno odpovídající množství ultračisté (Mili Q, Millipore) vody dle tab. 2. Poté byly vzorky na 15 min umístěny do ultrazvukové lázně. Pro dokonalé oddělení supernatantu byla použita centrifugace (10 min při maximálním výkonu 14 000×g). Supernatant byl odebírán pomocí jehly a stříkačky a přefiltrován přes membránové filtry (Millex Milipore, velikost pórů 0,22 µm) do nové mikrozkušavky. Vzorky obsahující méně než 5 mg, kam byl přidán pouze objem 0,2 ml Mili Q H₂O, nebyly filtrovány, ale byl pouze opatrně odebrán supernatant do injekční stříkačky a ten převeden do nové mikrozkušavky.

Hmotnost sušiny v mg	Přídavek Mili Q H ₂ O v ml
Méně než 5	0,2
5-10	0,3
10-20	0,5
20-30	1

Tab. 2- Objem přidané vody na hmotnost sušiny vzorku

3.5.3. Stanovení obsahu a spektra nestrukturních sacharidů

Analýza sacharidů probíhala pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC) s refraktometrickou detekcí. Parametry měřicího systému: mobilní fáze - MiliQ H₂O; průtoková rychlost 0,5 ml/min; teplota kolony 80 °C; objem injikovaného vzorku 50 µl; kolona Shodex Ca²⁺; isokratická pumpa SISw HPI-300 nebo Delta Chrom SDS 030; refraktometrická detekce (detektor Shodex RI-71); počítačový program CLARITY; standardy (Sigma-Aldrich).

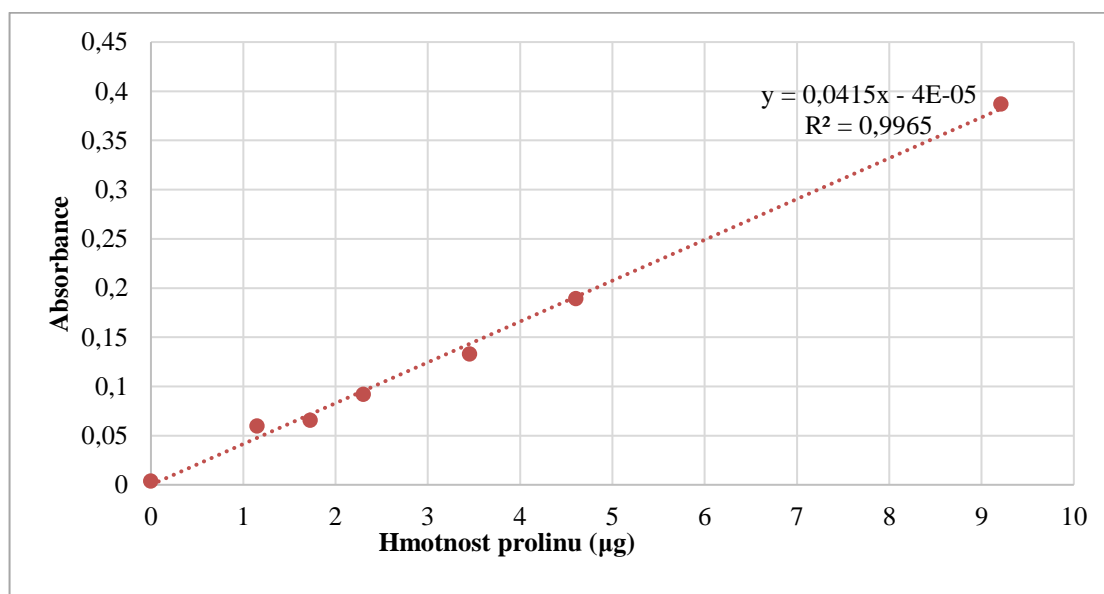
3.6. Stanovení obsahu prolinu

Metodika pro stanovení obsahu prolinu vychází z původní práce (Bates, 1973). Celá nadzemní část rostlin byla zvážena v mikrozkušavkách a ihned umístěna do tekutého dusíku. Vzorky byly uchovávány při -80 °C. Při dalším zpracování bylo nutné vzorky homogenizovat s tekutým dusíkem. Homogenizované vzorky byly doplněny destilovanou vodou na objem 8 ml. Takto upravené vzorky se mohly uchovávat v mrazáku při -24 °C. Další zpracování vzorků probíhalo následovně- k 8ml destilované vody s homogenizovanými vzorky bylo přidáno 2 ml

15% kyseliny sulfosalicylové, poté byly vzorky míchány na třepače 30 min a centrifugovány 5 min při 5000 otáčkách. Do nových zkumavek byl napipetován 1 ml roztoku ninhydrinu kyseliny octové (složení v Tab. 3) a 1 ml kyseliny octové spolu s 1 ml vzorku. Směs byla pomocí Vortexu promíchána. Poté byly připravené vzorky vloženy do vodní lázně (70 minut při 90 °C). Poté byla reakce zastavena ponořením zkumavek do vody s ledem. Ke každému vzorku bylo přidáno 3 ml toluenu, zkumavky dobře promíchány a uloženy v lednici do druhého dne. Druhý den po ustálení fází byla odebrána horní fáze a přepipetována do plastových kyvet. Množství prolinu bylo stanoveno spektrofotometricky při vlnové délce 520 nm (Unicam Helios α). Čistý toluen byl použit jako blank. Pro zjištění, jaké množství prolinu obsahují vzorky, bylo nutné připravit kalibrační křivku. Roztok o koncentraci 1 mM prolinu byl použit pro vytvoření 5 různých zředěných vzorků, pro které byl spočítán obsah prolinu, který je vyneseno do kalibrační křivky. Měření absorbancí vzorků pro kalibraci probíhalo společně s experimentálními vzorky.

sloučenina	objem v 1 l
HNO ₃ (65%)	830 ml
HClO ₄ (60%)	150 ml
H ₂ O	20 ml

Tab. 3- Složení roztoku ninhydrinu



Kalibrační křivka prolinu

3.7. Identifikace frakce "RTOS"

Dostatečně velký testovací vzorek byl připraven smícháním vzorků jedné varianty (*P.lanceolata*, kultivace 14 dní, na kontrolním médiu bez NaCl či PEG), které byly použity pro analýzu sacharidů. Nejprve byla pro zjištění, zda se jedná o oligosacharidy rafinózové řady použita α -galaktosidáza (z *Aspergillus niger*, Magazyme). Byl připraven enzymatický roztok obsahující 900 IU enzymu v 1 ml 0,1 M acetátovém pufru (pH 4,5). Nový vzorek byl v mikrozkuhavce, kdy byl smíchán původní vzorek s enzymatickým roztokem v poměru 1:1. Zároveň byl připraven i kontrolní vzorek, ve kterém byl smíchán původní vzorek pouze s přidáním acetátového pufru také v poměru 1:1. Takto připravené vzorky byly inkubovány v termobločku (Grant-Boeckel BBD) při 45 °C po dobu 4 hodin, následně byl termobloček vyhřátý na 95 °C po dobu 5 min pro zastavení reakce. Vzorky byly skladovány v mrazáku při -24 °C. Měření probíhalo na HPLC. Následně byl podobný postup zvolen s enzymem invertázou (ze *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma Aldrich). Byl připraven enzymatický roztok obsahující 1500 IU enzymu v 1 ml 0,1 M acetátovém pufru (pH 4,5). Doba inkubace byla zvolena totožná jako u galaktosidázy - 4 hodiny při 45 °C a následně zastavení reakce při 95 °C po dobu 5 min. Měření bylo prováděno na HPLC.

3.8. Zpracování dat

Výsledky jsou prezentovány ve formě sloupcových grafů vytvořených v programu Microsoft Excel, průměry a směrodatné odchylky taktéž. Vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí statistického programu NCSS97 (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA). Pro porovnávání dat byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění (one-way ANOVA). Při normálním rozdělení dat byl použit Tukey-Kramer test, pokud nebyla data rozdělena normálně, byl ke zhodnocení použit Kruskal-Wallis Z test. Hladina významnosti byla zvolena $\alpha = 0,05$.

3.9. Přehled experimentů

Vliv typu exogenního sacharidu na růstové parametry rostlin a obsah a spektrum nestrukturních sacharidů

- *P. eripoda*, *P. maritima*, *P. lanceolata*
- využití rostlin ze semen, klíčení MS médium, 3% sacharóza, růst 21 dní
- přesazení rostlin (pouze prýty), 4 varianty MS média - 3% sacharóza, 3% sorbitol, 3% manitol, bez přidání sacharidu a bez přidání sacharidu pod víčkem Sun cap
- růst 28 dní, jeden odběr 28. den, 6 vzorků z varianty- 3% sacharóza, bez přidání sacharidu a bez přidání sacharidu pod víčkem Sun cap, 2 vzorky z varianty 3% sorbitol a 3% manitol
- analýza prýtů a kořenů
- celkem 132 vzorků

Vliv zasolení, nízké teploty a kombinace obou stresů na růstové parametry a obsah a spektrum nestrukturních sacharidů

- *P. maritima*, *P. lanceolata*
- rostliny ze semen, klíčení 1/2 MS médium, 1,5 % sacharóza, růst 14 dní
- přesazení (pouze prýty) na 1/2 MS media s 1,5% sorbitolem a 1,5% sacharózou + dané ošetření
- 4 varianty- kontrola, chlad, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl
- chlad působení po 14. dnech od přesazení
- 4 odběry, 1. po týdnu, 2. po dvou týdnech, 3. po 15 dnech (první den chladu) a 4. odběr po 17 dnech (třetí den chladu)
- 6 vzorků z každé varianty, analýza prýtů a kořenů
- celkem 384 vzorků

Vliv osmotického stresu na růstové parametry a obsah a spektrum nestrukturních sacharidů

- *P. maritima*, *P. lanceolata*
- rostliny ze semen, klíčení 1/2 MS médium, 1,5 % sacharóza, růst 14 dní
- přesazení rostlin (pouze prýty) na 1/2 MS media s 1,5% sorbitolem a 1,5% sacharózou + dané ošetření

- 3 varianty- kontrola 0 % PEG, 3% PEG, 6% PEG
- tři odběry 1., 3., 14. den
- 5 vzorků z každé varianty, analýza prýtu
- celkem 90 vzorků

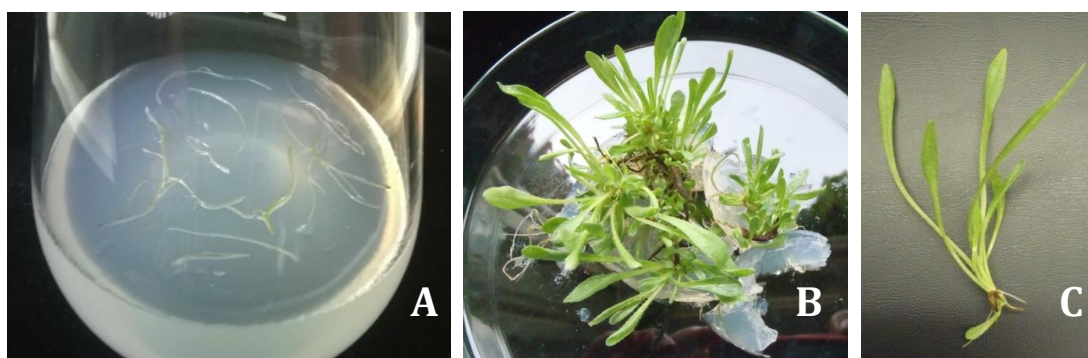
Změny obsahu prolinu v rostlinách při zasolení

- *P. maritima*, *P. lanceolata*
- rostliny ze semen, klíčení 1/2 MS médium, 1,5 % sacharóza, růst 14 dní
- přesazení rostlin (pouze prýty) na 1/2 MS media s 1,5% sorbitolem a 1,5% sacharózou + dané ošetření
- 3 varianty- kontrola, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl
- 3 vzorky z každé varianty
- celkem 18 vzorků

4. Výsledky

4.1. Výběr vhodného kultivačního materiálu a způsobu kultivace

Původně bylo pro úvodní metodicko-experimentální práci zamýšleno studovat čtyři druhy jitrocele, halofyty *P. maritima* a *P. eriopoda*, které by byly porovnávány se dvěma druhy glykofytními *P. lanceolata* a *P. major*. Při testování klíčivosti a rychlosti růstu jsem však zjistila, že semena *P. major* byla pravděpodobně poškozená, z vysazených 100 semen ve 25 baňkách vyrostla pouze jediná rostlina. Žádné kontaminace nebyly pozorovány. Navíc rostlina *P. major* byla v podmínkách *in vitro* morfologicky odlišná od habitu ostatních pěstovaných druhů a výsledky růstových parametrů by tedy byly obtížně porovnatelné. Proto nebylo s tímto druhem jitrocele dále pracováno. Klíčení i růst rostlin třech dalších druhů jitrocele byl na základním MS médiu (Murashige a Skoog, 1962) bezproblémový, s minimem kontaminací. Semena klíčila velmi rychle, již za tři dny bylo většinou možné pozorovat primární kořen. Velikosti listu kolem 2 cm délky (tedy velikosti zvolené jako vhodné pro plánované experimenty) bylo docíleno přibližně za 14 dní růstu na klíčícím médiu. V 1. experimentu, kde se zabývám vlivem různého typu exogenního sacharidu na růstové parametry i sacharidový metabolismus, jsou použity tři druhy jitrocele- *P. maritima*, *P. eriopoda* a *P. lanceolata*. V dalších experimentech jsem kvůli limitaci kapacitou měření na HPLC se současným zachováním dostatečného množství opakování pro konkrétní druh a situaci musela redukovat experimentální materiál na *P. maritima* a *P. lanceolata*. Tyto dva druhy jsem zvolila kvůli jejich větším makroskopickým i vývojovým podobnostem (stejná délka klíčení, *P. eriopoda* klíčil o několik dní později; i srovnatelným morfologickým parametrům) i podobné reakci na druh sacharidu poskytnutého do média jako zdroj uhlíku a energie (viz následující kapitola).



Obr. 4- Vegetativní množení jitrocele. Na fotografiích *P. maritima*. A- kořenové segmenty na médiu, B- populace vzrostlých rostlin na primárních explantátech (stáří kultury 8 týdnů), C- izolovaná vegetativně množená rostlina.

Kromě klíčení ze semen byl navržen a testován i další možný kultivační přístup vedoucí k získání rostlinného materiálu pro experimenty - vegetativní množení. Jako použitelný se ukázal postup vegetativního množení pomocí kořenových segmentů jitrocele. Pro vegetativní množení je třeba využívat mladých rostlin (světlé, tenké kořeny, viz Obr. 4, kapitola 3.4. v metodické části). Metodickou výhodou tohoto způsobu množení je snadné provedení a možnost použití médií bez růstových regulátorů. Tento kultivační postup byl však velmi zdlouhavý, až za měsíc byly pozorovány malé adventivní rostliny, po dvou měsících měly rostliny narostlé listy do velikosti kolem dvou centimetrů (stejně délky listu je při růstu ze semen dosaženo cca za 2-3 týdny). Proto byl postup pěstování ze semen zvolen jako vhodnější.

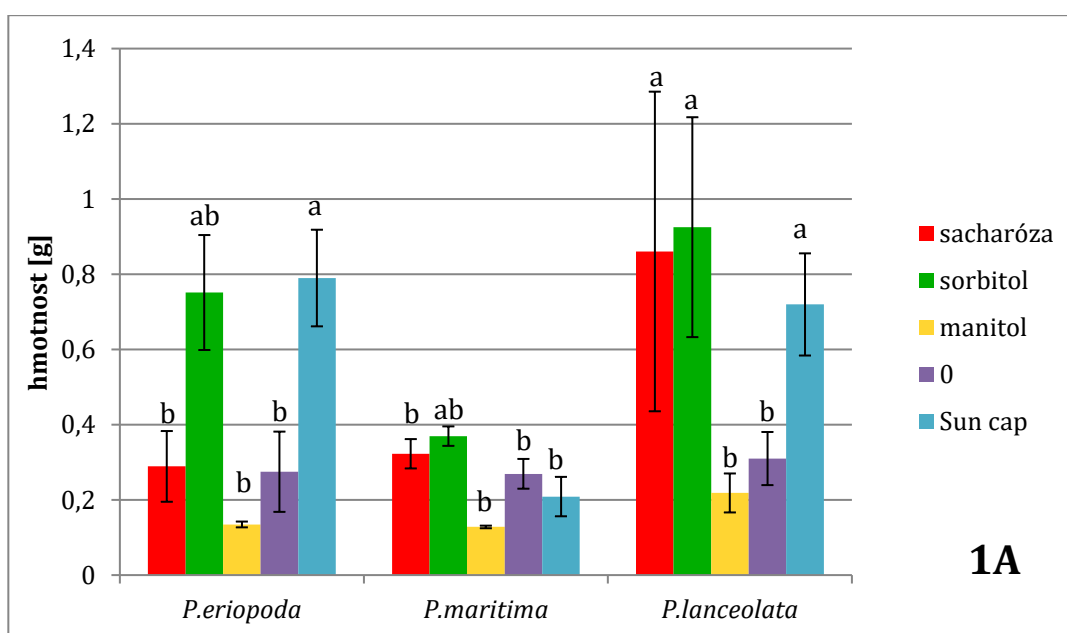
4.2. Manipulace zdrojem uhlíku a energie

4.2.1. Vliv typu exogenního sacharidu na růstové parametry kultur jitrocele

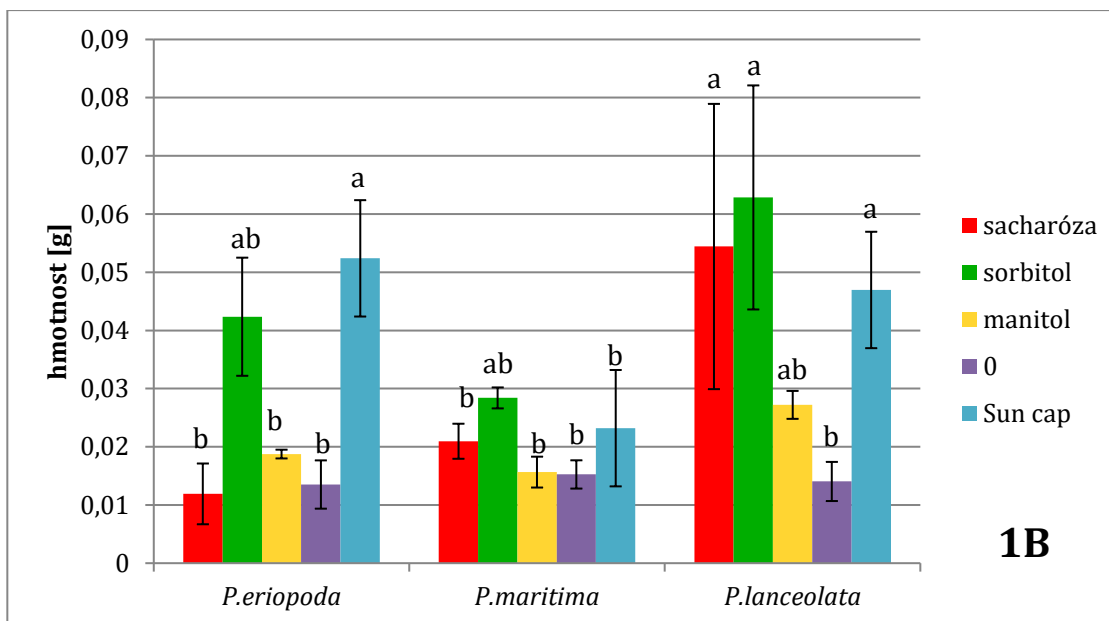
Cílem tohoto experimentu bylo charakterizovat vliv různého zásobení exogenním sacharidem na růst rostlin jitrocele v podmínkách *in vitro*. Rostliny jitrocele byly při tomto experimentu pěstovány na MS médiu (Murashige a Skoog, 1962) s přidavkem různého sacharidu jako zdroje uhlíku a energie, respektive v případě varianty 0 a Sun cap bez přidavku jakéhokoli sacharidu. Varianta Sun cap testovala možnost kultivovat jitrocel plně fotoautotrofně, neboť uzavírací víčka s vloženou touto speciální fólií (na rozdíl od běžně užívaného alobalového uzávěru) umožňují dostatečnou výměnu plynů v kultivační nádobě. Byly použity tři druhy jitrocele: *P. eriopoda* a *P. maritima*, jako zástupci halofytních druhů, a *P. lanceolata* jako druh glykofytní. Obr. 5-7 představují fotografie těchto tří druhů jitrocele po 30 dnech růstu na příslušných médiích, těsně před odběrem vzorků pro analýzu růstových parametrů a analýzu endogenních sacharidů. Sloupcový graf 1A znázorňuje čerstvou hmotnost a graf 1B hmotnost sušiny prýtlů. U rostlin *P. maritima* a *P. lanceolata* nebyl výraznější rozdíl v hmotnosti sušiny i čerstvé hmotnosti mezi variantami na 3 % sorbitolu a 3 % sacharóze. U *P. eriopoda* byla nejvyšší hmotnost čerstvé hmotnosti i sušiny na médiu se sorbitolem a při použití Sun cap (z důvodu malého počtu vzorků se nejedná o průkazný rozdíl pro varianty na sorbitolu). Oba další druhy (zvolené pro následující detailní experimenty) využívaly se srovnatelnou účinností sorbitol i sacharózu. Manitol se ukázal jako nevhodný zdroj energie, neboť rostliny vykazovaly značné růstové defekty, byly viditelně světlejší, drobnější s minimálním kořenovým systémem. I přesto bylo pozorováno na médiu s 3% manitolem přirůstání prýtlů (porovnání s původní velikosti největšího listu 2 cm při přesazení). Schopnost růstu jitrocele bez využitelného zdroje uhlíku a

energie byla potvrzena kultivací na médiu bez přídavku sacharidu v běžně uzavřené nádobě (varianta 0) (viz obr. 5-7) i v nádobě uzavřené fólií Sun cap (varianta Sun cap). Fotoautotrofní kultivace druhů *P. eriopoda* a *P. lanceolata* byla schopna rostlinám zajistit plnohodnotný růst (ve srovnání s nejlépe prosperujícími variantami se sacharidy v médiu), nicméně nebyla podobně výhodná u druhu *P. maritima*. Proto tato kultivace nebyla v další experimentální práci používána.

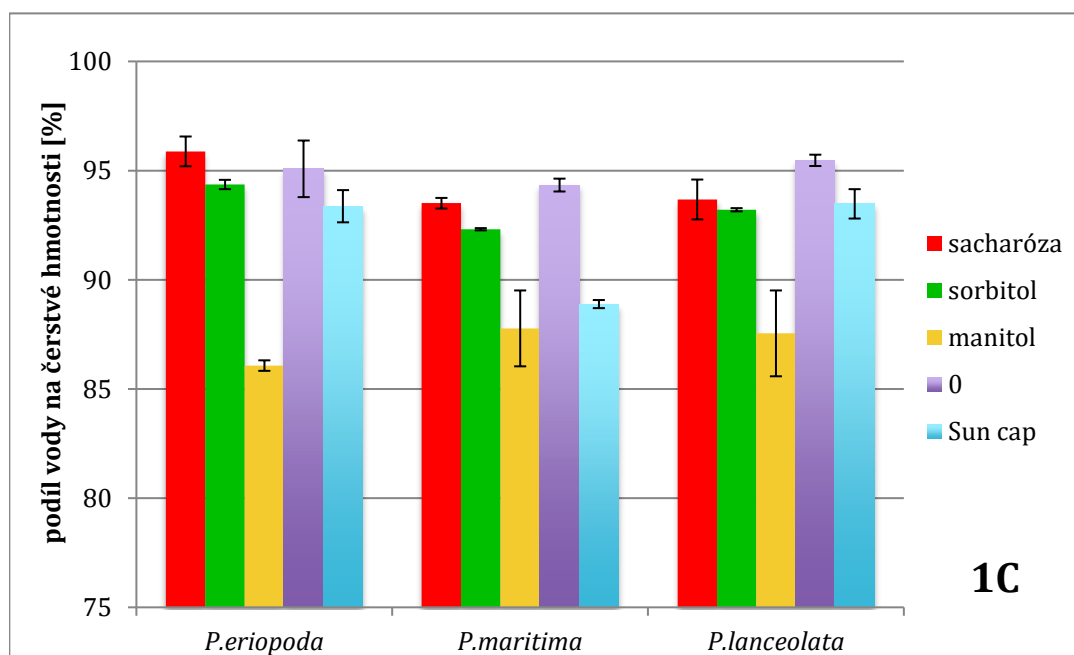
U kultur byl stanoven také podíl vody na čerstvé hmotnosti (graf 1C). Nejmenší obsah vody byl u všech tří druhů na médiu s manitolem, naopak vyšší podíl vody si udržovaly prýty kultivované na sorbitolu, v případě druhu *P. lanceolata* i na sacharóze.



Graf 1A- Akumulace biomasy (čerstvá hmotnost) prýtu tří druhů jítrocele v závislosti na různém zásobení exogenním sacharidem. Varianty MS média: 3% sacharóza, 3% sorbitol, 3% manitol, 0 bez přidání sacharidu, Sun cap bez přidání sacharidu pod víčkem Sun cap. Doba kultivace na daných médiích- 30 dní. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$, $n=6$ (varianta sacharóza, 0, Sun cap), resp. $n=2$ (varianta sorbitol, manitol).

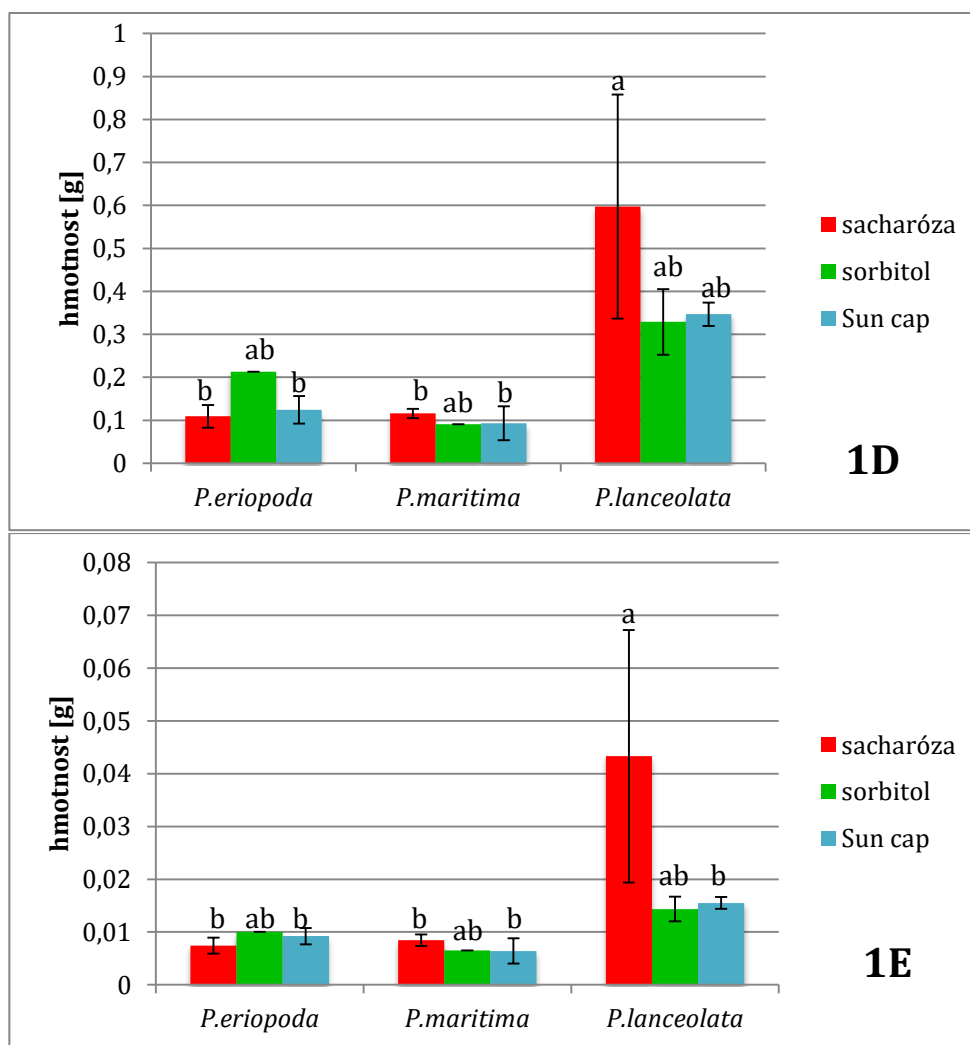


Graf 1B- Akumulace biomasy (hmotnost sušiny) prýtu tří druhů jitrocele v závislosti na různém zásobení exogenním sacharidem. Varianty MS média - 3% sacharóza, 3% sorbitol, 3% manitol, 0 bez přidání sacharidu Sun cap bez přidání sacharidu pod víčkem Sun cap. Doba kultivace na daných médiích- 30 dní. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$. $n=6$ (varianta sacharóza, 0, Sun cap), resp. $n=2$ (varianta sorbitol, manitol)

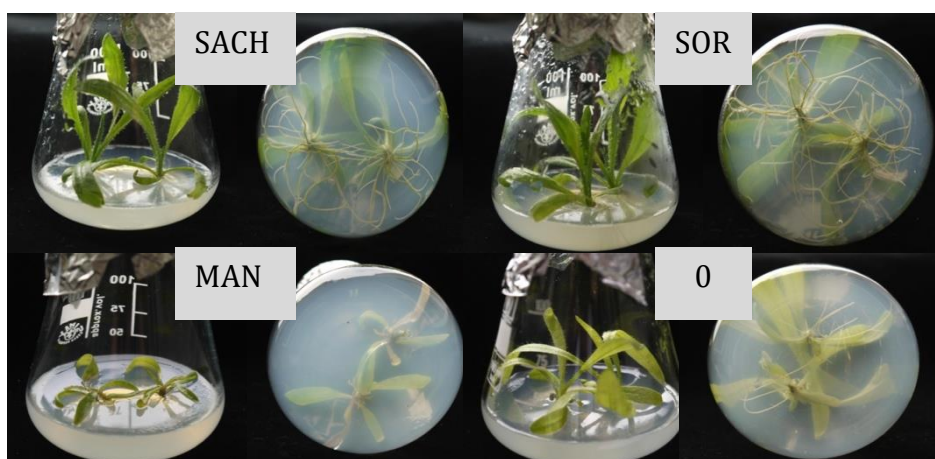


Graf 1C- Podíl obsahu vody na čerstvé hmotnosti prýtu tří druhů jitrocele v závislosti na různém zásobení exogenním sacharidem. Varianty MS média: 3% sacharóza, 3% sorbitol, 3% manitol, 0 bez přidání sacharidu, Sun cap bez přidání sacharidu pod víčkem Sun cap. Doba kultivace na daných médiích- 30 dní. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky. $n=6$ (varianta sacharóza, 0, Sun cap), resp. $n=2$ (varianta sorbitol, manitol).

Protože růst kořenů byl na médiu s manitolem a na médiu bez přidání sacharidu s tradičním uzávěrem výrazně omezen, nebylo možné u těchto variant odebrat vzorky pro analýzy. Špatný růst kořenů je dobře patrný na fotografiích (Obr. 5,6,7). V následujících grafech je uvedena čerstvá hmotnost (graf 1D) a sušina (graf 1E) kořenů pro všechny tři druhy jitrocele, se kterými bylo pracováno v tomto experimentu, avšak z již zmíněných důvodů pouze na médiu se sacharózou, sorbitolem a pod víčkem Sun cap. I když především u druhu *P. lanceolata* je nápadný trend sacharózy podporovat nárůst čerstvé i suché hmotnosti kořenů, tento rozdíl není statisticky průkazný. Kořenový systém *P. eriopoda* a *P. lanceolata* byl makroskopicky bohatší a více větvený než kořenový systém *P. maritima* (viz Obr. 5-7).



Graf 1D,E- Akumulace biomasy (čerstvá hmotnost-1D; hmotnost sušiny-1E) kořenů tří druhů jitrocele v závislosti na různém zásobení exogenním sacharidem. Varianty MS média - 3% sacharóza, 3% sorbitol, 3% manitol, 0 bez přidání sacharidu, Sun cap bez přidání sacharidu pod víčkem Sun cap Doba kultivace na daných médiích - 30 dní. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$. $n=6$ (varianta sacharóza, Sun cap), resp. $n=2$ (varianta sorbitol).



Obr. 5- Fotografie *P. eriopoda* po 30 dnech na daných médiích



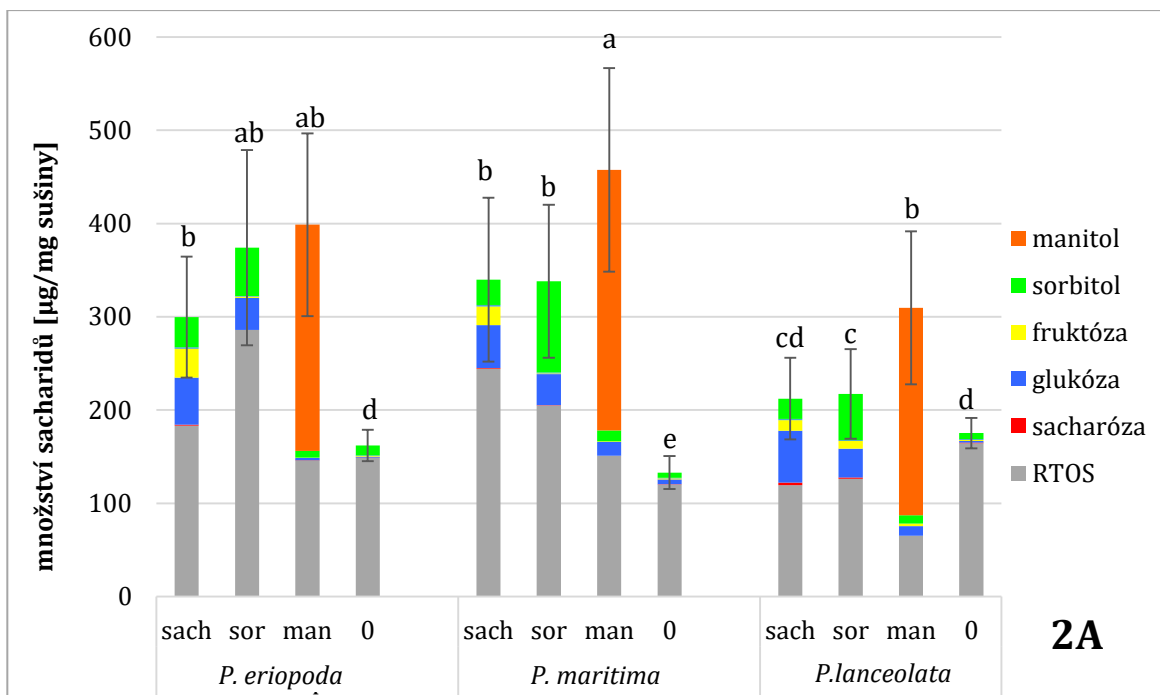
Obr. 6- Fotografie *P. maritima* po 30 dnech na daných médiích



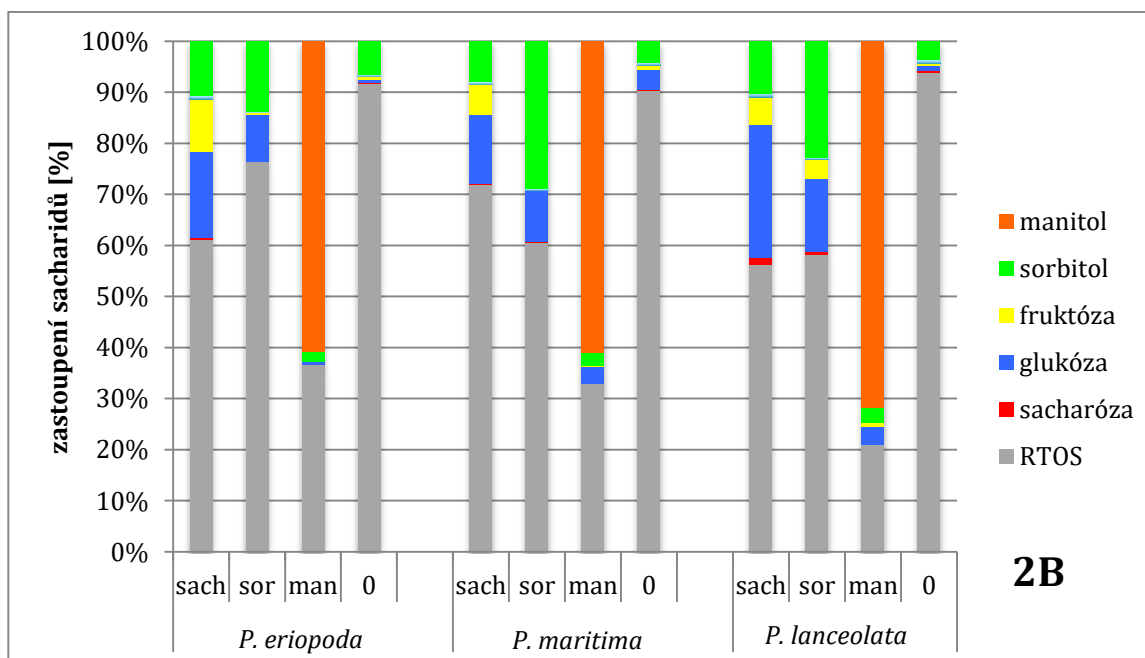
Obr. 7- Fotografie *P. lanceolata* po 30 dnech na daných médiích

4.2.2. Obsah a spektrum endogenních sacharidů rostlin *P. eriopoda*, *P. maritima* a *P. lanceolata* v závislosti na různém zásobení exogenním sacharidem

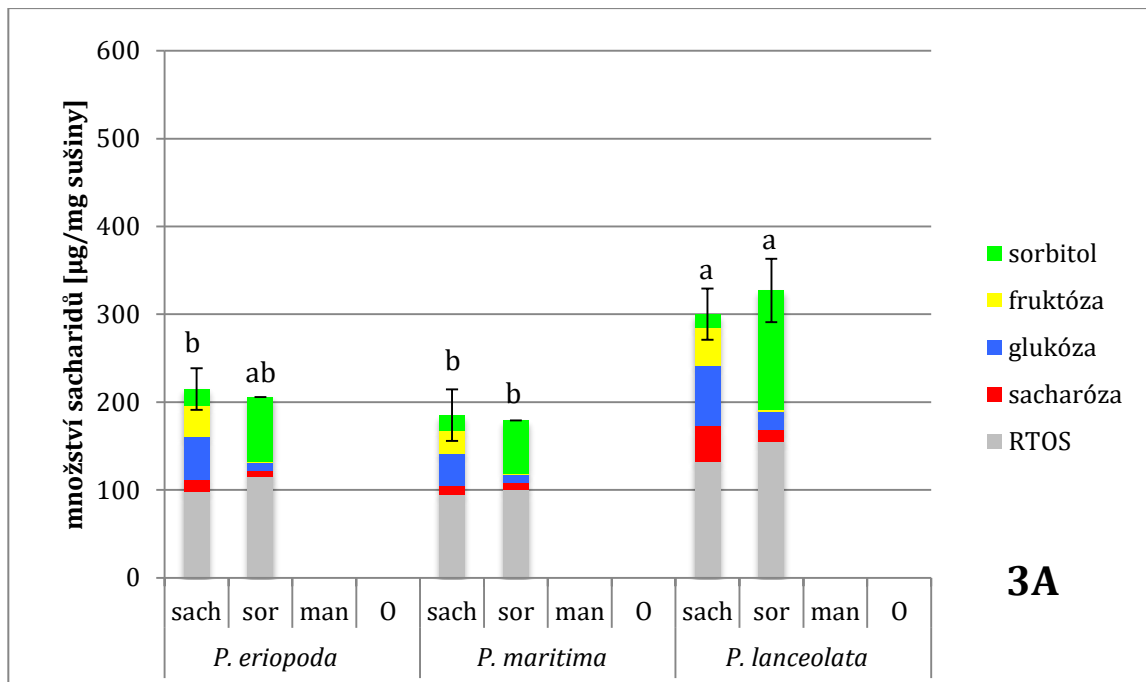
U vzorků použitých pro stanovení růstových parametrů prýtlů byl následně sledován i obsah a spektrum endogenních sacharidů. Výsledky jsou znázorněny ve sloupcových grafech. Graf 2A znázorňuje obsah celkových sacharidů a graf 2B procentuální zastoupení jednotlivých sacharidů ve spektru u prýtlů (graf 3A a 3B totéž u kořenů). Chybové úsečky u sloupcových grafů znázorňují směrodatné odchylky pro celkový obsah sacharidů. Celkově nejnižší obsah sacharidů byl v rostlinách rostoucích na médiu bez přídavku zdroje energie. U všech studovaných druhů jitrocele byla v této variantě převažující složkou spektra frakce, v této práci označovaná jako RTOS (v kapitole 4.5.2. blíže specifikováno). Frakce RTOS byla majoritní složkou sacharidového spektra u všech druhů jitrocele na všech médiích s výjimkou varianty rostoucí na 3% manitolu. V rostlinách rostoucích na médiu s manitolem se manitol v nadzemní části rostlin výrazně akumuloval a navyšoval celkový obsah sacharidů. I v těchto manitolových variantách bylo možné detekovat endogenní sorbitol, avšak v menších množstvích než u variant rostoucích na sorbitolu nebo sacharóze. Obsah sorbitolu byl nejvyšší v rostlinných variantách rostoucích na médiu s přídavkem 3% sorbitolu. U všech tří druhů *P. eriopoda*, *P. maritima* i *P. lanceolata* byla fruktóza ve větších množstvích detekována na médiu s 3% sacharózou a u rostlin *P. lanceolata* i na variantě s 3% sorbitolem a médiu bez přídavku sacharidu. Sacharóza tvořila pouze minimální množství z celkového obsahu sacharidů u všech druhů ve všech variantách.



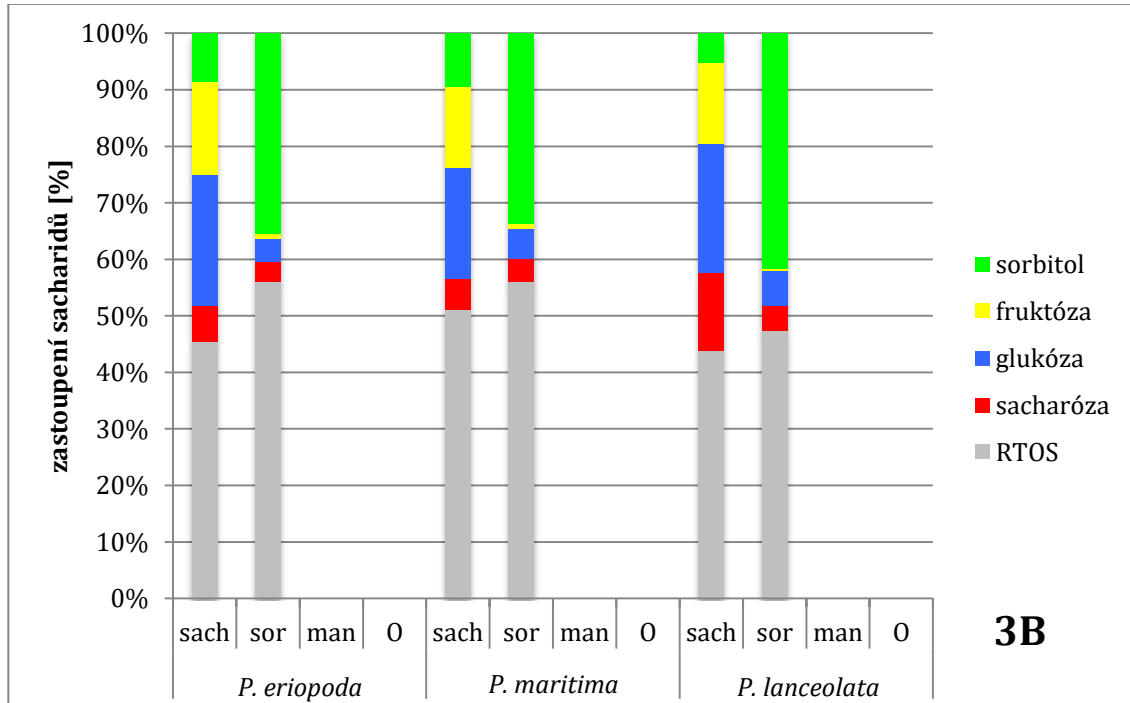
Graf 2A- Obsah rozpustných sacharidů v prýtech u tří druhů jítrocele v závislosti na různém zásobení exogenním sacharidem. Varianty MS média - 3% sacharóza, 3% sorbitol, 3% manitol, 0 bez přidání sacharidu. Doba kultivace na daných médiích - 30 dní. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky pro celkové sacharidy, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových rozpustných sacharidů, $\alpha=0,05$. $n=6$ (varianta sacharóza, 0), resp. $n=2$ (varianta sorbitol, manitol).



Graf 2B- Podíl endogenních sacharidů u tří druhů jítrocele v závislosti na různém zásobení exogenním sacharidem. Varianty MS média - 3% sacharóza, 3% sorbitol, 3% manitol, 0 bez přidání sacharidu. Doba kultivace na daných médiích - 30 dní.



Graf 3A- Obsah rozpustných sacharidů v kořenech u tří druhů jitrocele v závislosti na různém zásobení exogenním sacharidem. Varianty MS média - 3% sacharóza, 3% sorbitol, 3% manitol, 0 bez přidání sacharidu. Doba kultivace na daných médiích - 30 dní. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky pro celkové sacharidy, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových rozpustných sacharidů, $\alpha=0,05$. $n=6$ (pro sacharózu), $n=2$ (pro sorbitol).



Graf 3B- Podíl rozpustných sacharidů v kořenech u tří druhů jitrocele v závislosti na různém zásobení exogenním sacharidem. Varianty MS média - 3% sacharóza, 3% sorbitol, 3% manitol, 0 bez přidání sacharidu. Doba kultivace na daných médiích - 30 dní. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky pro celkové sacharidy. $n=6$ (pro sacharózu), resp. $n=2$ (pro sorbitol).

4.3. Zasolení, nízké teploty a kombinovaný stres

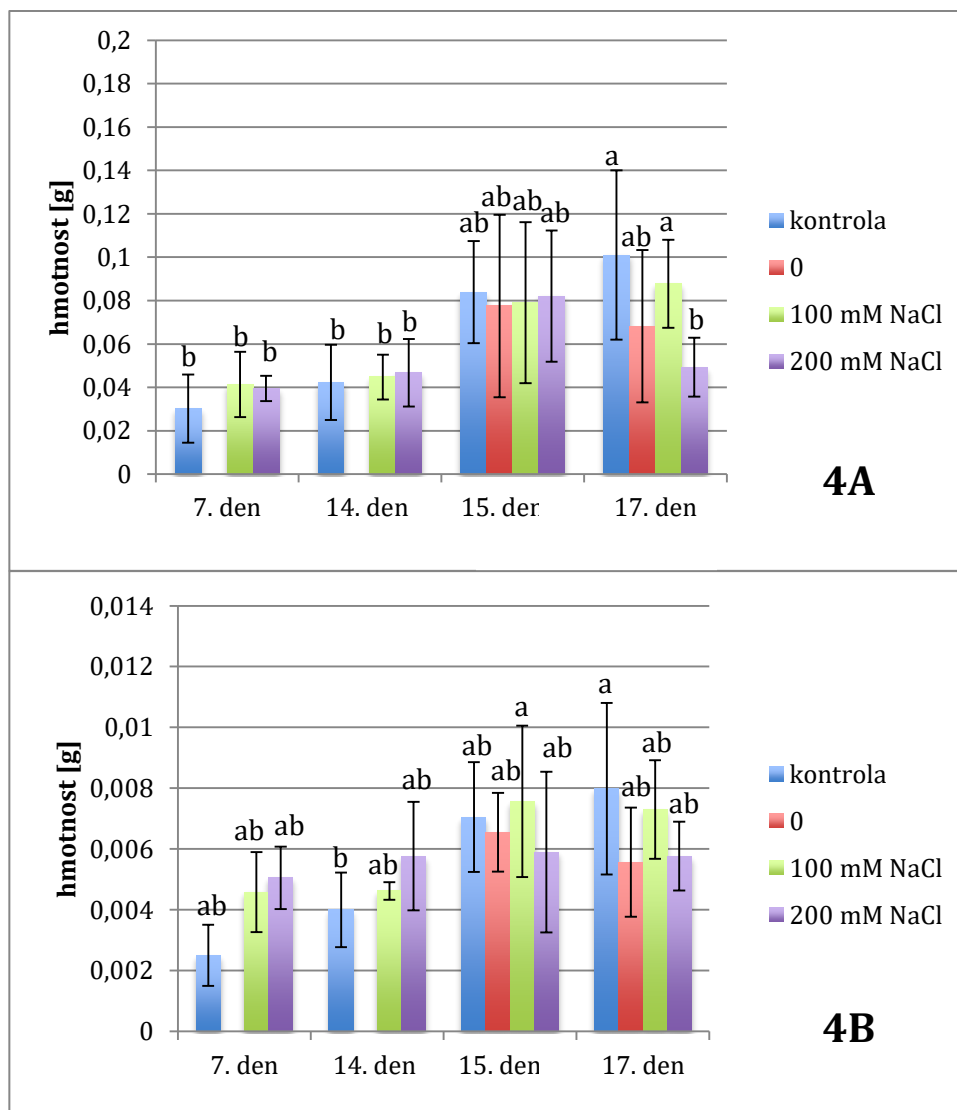
4.3.1 Vliv zasolení, nízké teploty a kombinace obou stresů na růstové parametry *P. maritima* a *P. lanceolata*

Pro zjištění reakce na zasolení, chlad a kombinovaný stres halofytního a glykofytního druhu byly použity rostliny *P. maritima* a *P. lanceolata*. Bylo použito tzv. 1/2 MS médium (viz kapitola 3.3.1.) se zdrojem uhlíku sestávajícím ze 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu. Pro vyvolání reakce rostlin na zasolení byl do média přidán chlorid sodný ve dvou koncentracích - 100 a 200 mM. Na tato média byly přesazeny 14 denní rostliny obou druhů. Odběry byly prováděny 7. a 14. Den po přesazení na experimentální média, zde se jednalo pouze o vliv zasolení, proto jsou v těchto dnech odběru v grafech 4 A-H znázorněny pouze tři sloupce představující tři varianty - kontrolní rostliny a rostliny kultivované na 100 mM NaCl a 200 mM NaCl. Na obr. 8 a 9 jsou znázorněny fotografie *P. maritima* a *P. lanceolata* po 14 dnech kultivace. V následujících odběrech se již hodnotil vliv individuálního i kombinovaného stresu, proto odběry 15. a 17. den obsahovaly čtyři varianty - kontrolní rostliny; rostliny, na které bylo působeno pouze nočním chladem (10 °C po dobu trvání temné periody); rostliny, které byly vystaveny kombinaci zasolení 100 mM a 200 mM NaCl současně s nočním chladem. Vzhled rostlin po 14. dnech růstu na experimentálních médiích dokumentují fotografie (Obr. 8 a 9).

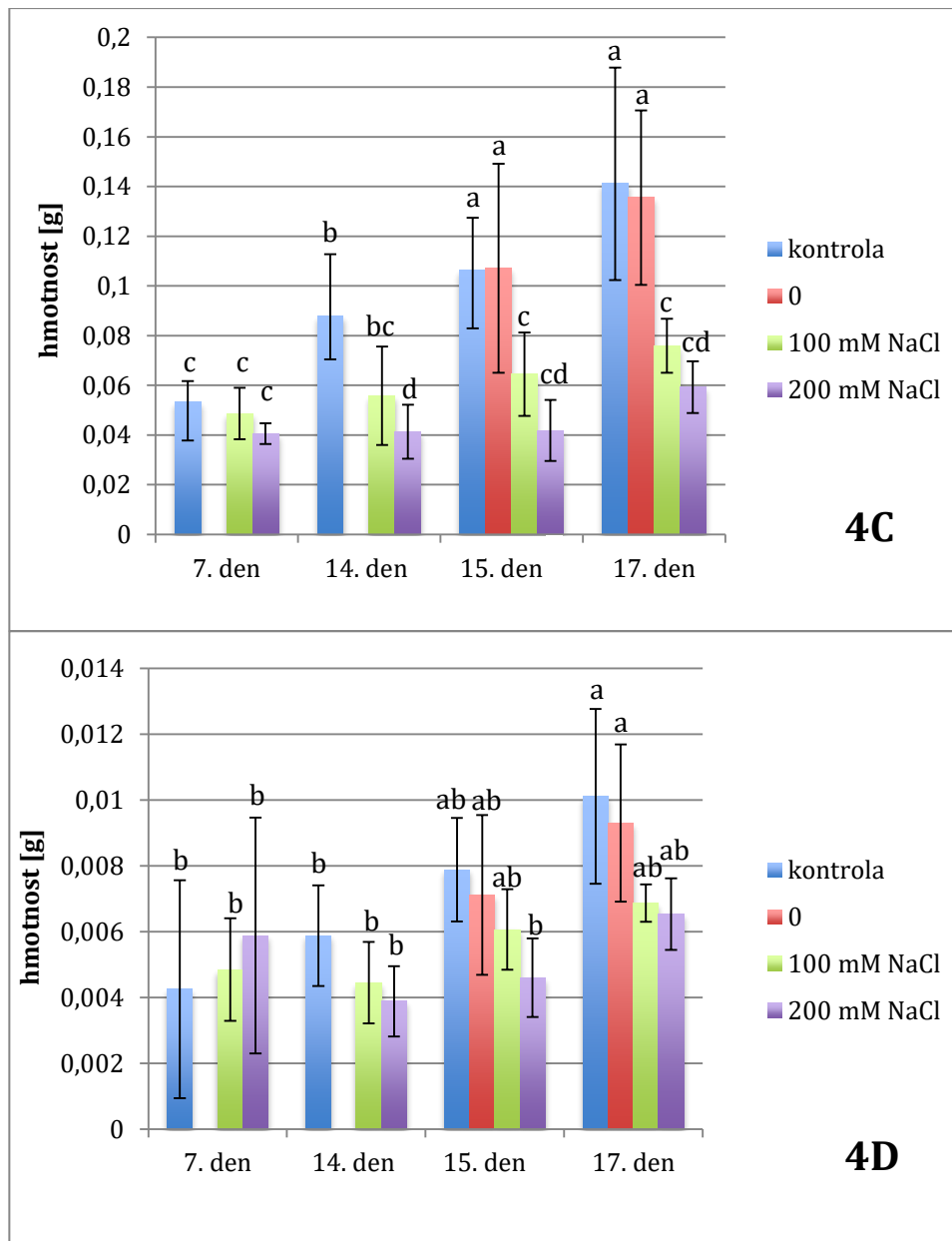
Rostliny jitrocele po 7 dnech nereagovaly na NaCl v médiu změnou čerstvé hmotnosti ani sušiny prýtu (graf 4A-D). V hmotnostech kořenů je patrná změna u *P. lanceolata*, kde je výrazně ovlivněna čerstvá hmotnost u varianty rostoucí na médiu 200 mM NaCl (graf 4G). Hmotnost je zde snížena na méně než 50 % čerstvé hmotnosti kontroly. K menšímu, avšak stále signifikantnímu poklesu došlo v této variantě v hmotnosti sušiny (graf 4H). Reakce rostlin vyjádřená čerstvou hmotností i hmotností sušiny kořenů *P. maritima* nebyla výrazná, pouze je pozorovatelný trend ke snížení čerstvé hmotnosti u varianty potýkající se s 200 mM zasolením NaCl (graf 4E). Po 14. dnech zasolení stále nedochází k ovlivnění hmotnosti prýtu ani kořenů *P. maritima*. Glykofytní druh reaguje signifikantním poklesem čerstvé hmotnosti prýtu. Sušiny jsou ovlivněny stejným směrem jako čerstvé hmotnosti, rozdíly však nejsou statisticky průkazné. U kořenů je dokonce zjištěna zvýšená hmotnost sušiny u rostlin vystavených 14. dní 200 mM NaCl oproti kontrolním rostlinám.

Vliv chladu na růstové charakteristiky rostlin jitrocele vyjádřené hmotností rostlin byl pouze minimální. Po jednom působení nočního chladu jsou růstové parametry srovnatelné s kontrolními rostlinami. A ani třetí den nedochází k žádným signifikantním změnám.

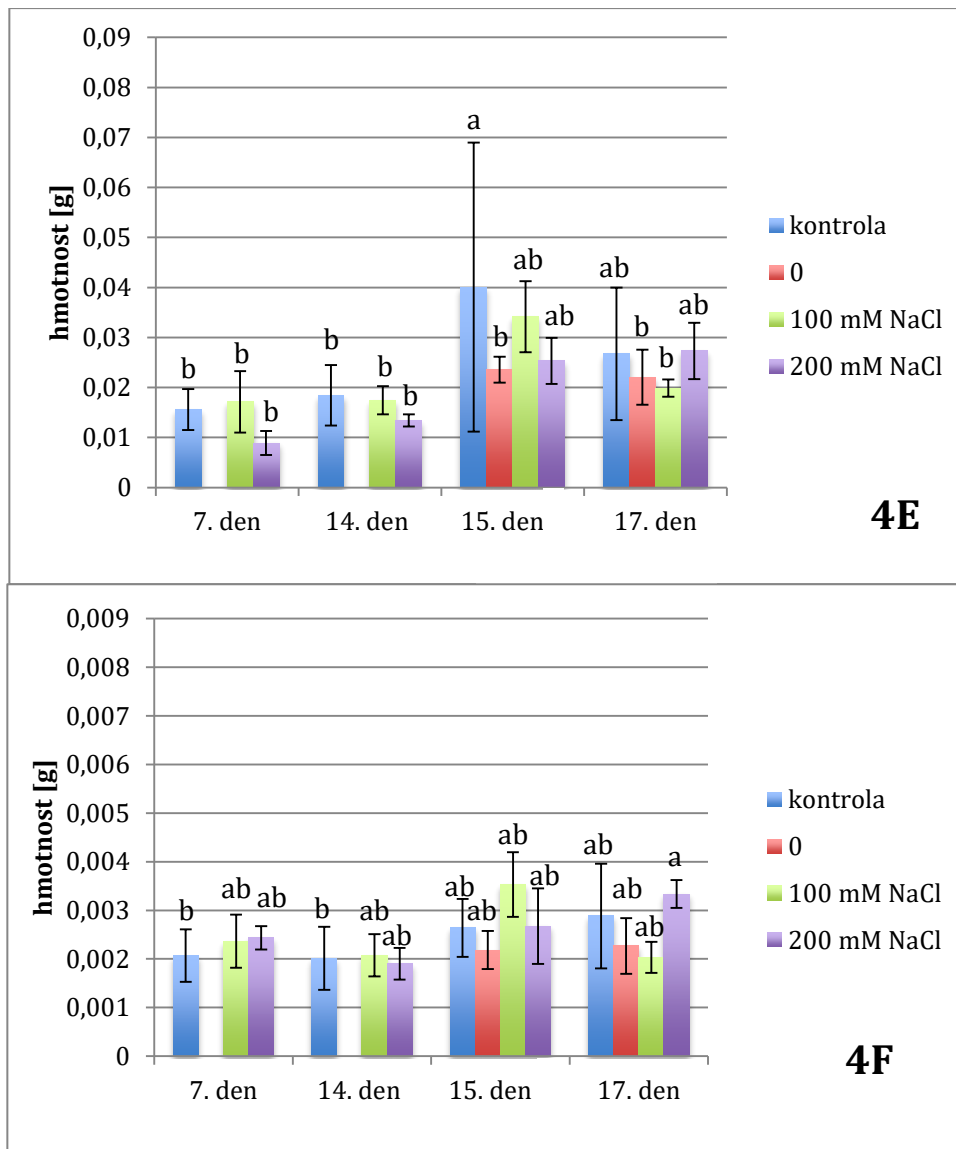
Ve třetím a čtvrtém odběru (15. a 17. den experimentu), kdy byly rostliny vystaveny taktéž kombinovanému stresu, již dochází k větším rozdílům hmotností prýtů obou druhů oproti kontrolním variantám. Výrazněji se odlišují i reakce glykofytního a halofytního druhu. Zatímco u *P. maritima* se po 1. dni kombinovaného stresu rostliny ve sledovaných růstových charakteristikách neliší, rostliny *P. lanceolata* se zvyšující se koncentrací soli snižují jak čerstvou hmotnost, tak hmotnost sušiny. 15 a 17. den je reakce u *P. lanceolata* podobná. Hmotnost kořenů je u *P. lanceolata* ovlivněna opačným směrem než prýty. Nejedná se o významnou změnu, ale je zde patrný trend nárůstu sušiny. Změny nastávají 17. den i u *P. maritima*, kde je významně snížena čerstvá hmotnost varianty vystavené 200 mM NaCl



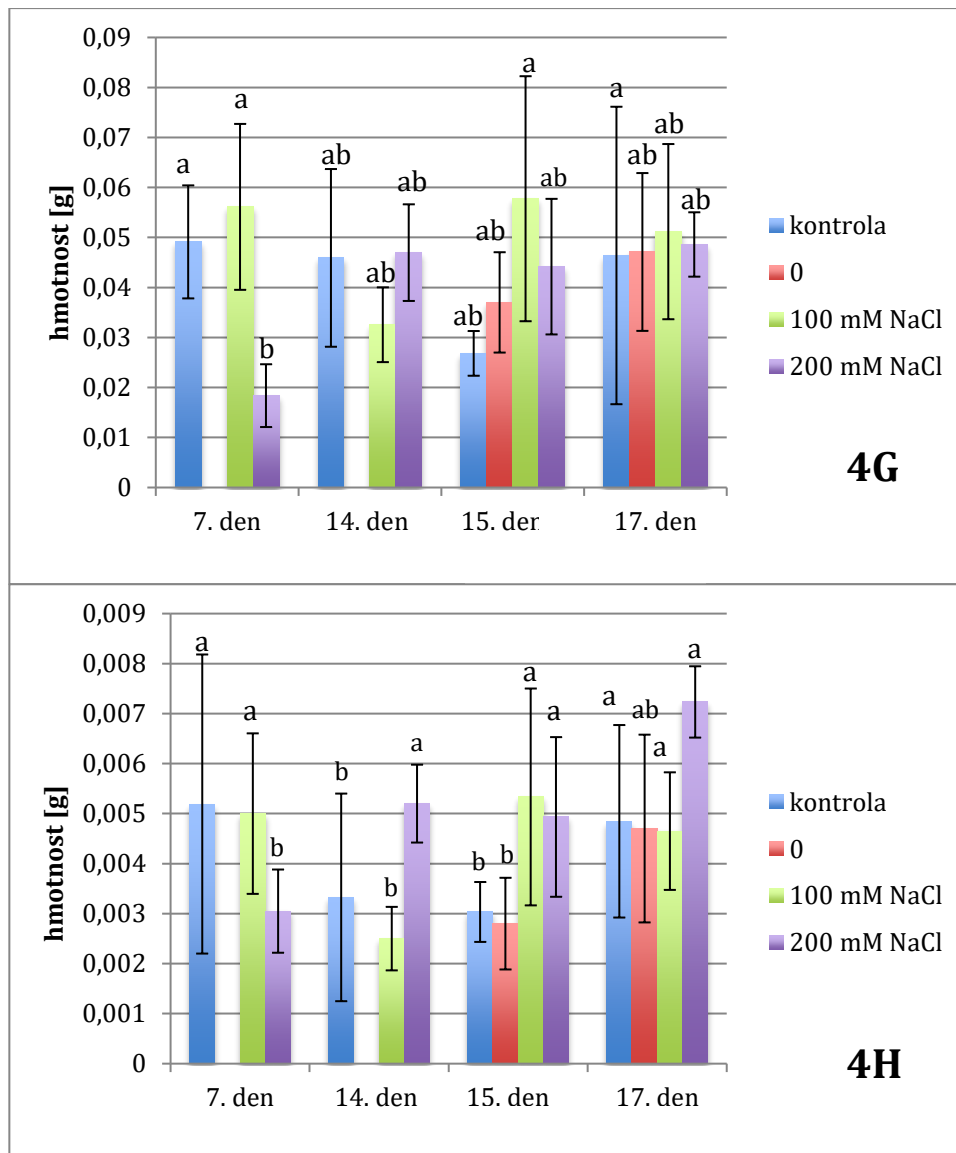
Graf 4A,B- Akumulace biomasy prýtů u jitrocele *Plantago maritima* v závislosti na zasolení, nízké teplotě a kombinaci obou stresů, **A:** čerstvá hmotnost; **B:** hmotnost sušiny. Kontrola – kontrolní varianta; 0 – varianta vystavená nočnímu chladu; 100 mM NaCl a 200 mM NaCl: varianty s přidavkem NaCl do média, od 15. dne vystaveny nočnímu chladu. Osa x: délka kultivace jitrocele na daných médiích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$, $n=6$.



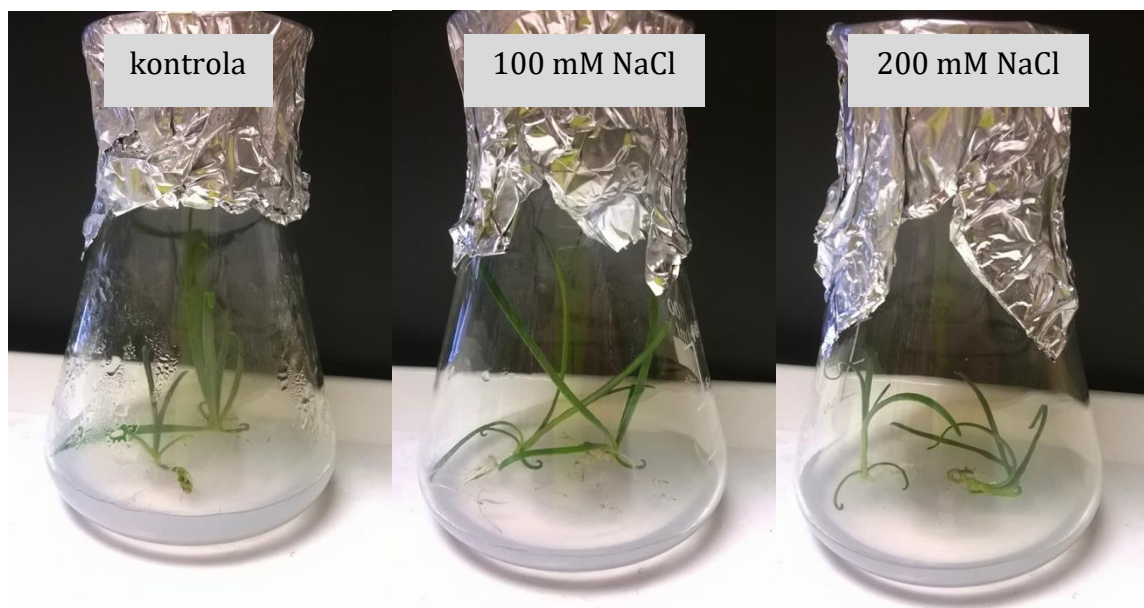
Graf 4C,D- Akumulace biomasy prýtů u jitrocele *Plantago lanceolata* v závislosti na zasolení, nízké teplotě a kombinaci obou stresů, **C:** čerstvá hmotnost; **D:** hmotnost sušiny. Kontrola – kontrolní varianta; 0 – varianta vystavená nočnímu chladu; 100 mM NaCl a 200 mM NaCl: varianty s přidavkem NaCl do média, od 15. dne vystaveny nočnímu chladu. Osa x: délka kultivace jitrocele na daných médiích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$, $n=6$.



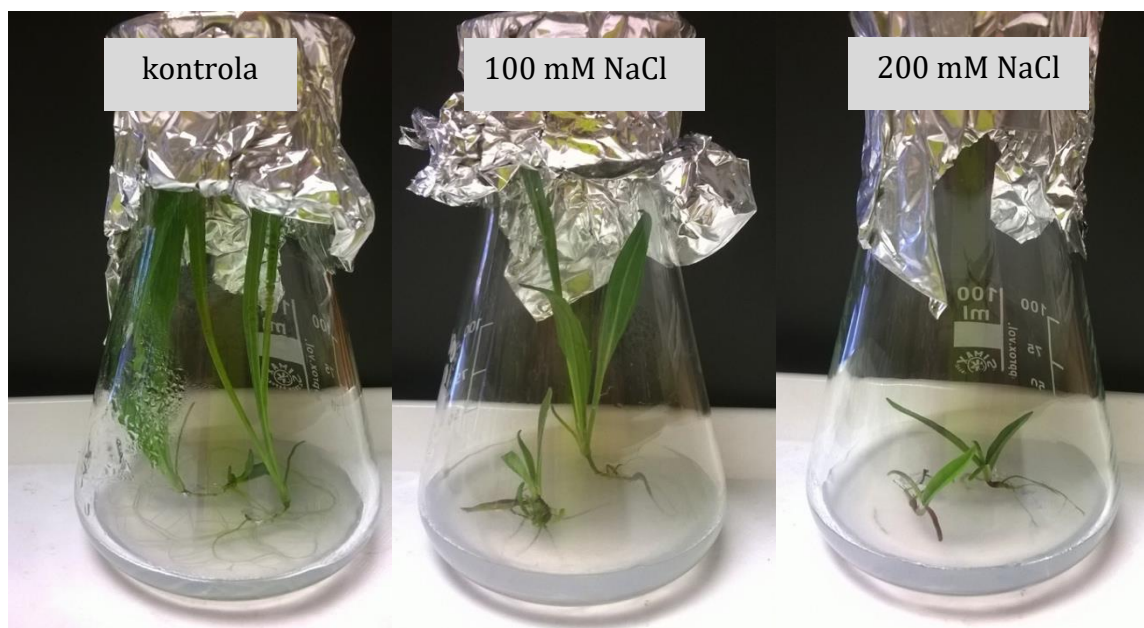
Graf 4E,F- Akumulace biomasy kořenů u jitrocele *Plantago maritima* v závislosti na zasolení, nízké teplotě a kombinaci obou stresů, **E:** čerstvá hmotnost; **F:** hmotnost sušiny. Kontrola – kontrolní varianta; 0 – varianta vystavená nočnímu chladu; 100 mM NaCl a 200 mM NaCl: varianty s přidavkem NaCl do média, od 15. dne vystaveny nočnímu chladu. Osa x: délka kultivace jitrocele na daných médiích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$, $n=6$.



Graf 4G,H- Akumulace biomasy kořenů u jitrocele *Plantago lanceolata* v závislosti na zasolení, nízké teplotě a kombinaci obou stresů, **G:** čerstvá hmotnost; **H:** hmotnost sušiny. Kontrola – kontrolní varianta; 0 – varianta vystavená nočnímu chladu; 100 mM NaCl a 200 mM NaCl: varianty s přidavkem NaCl do média, od 15. dne vystaveny nočnímu chladu. Osa x: délka kultivace jitrocele na daných médiích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$, $n=6$.



Obr. 8- Fotografie *P. maritima* po 14 dnech kultivace na médiích s NaCl. Zleva- kontrolní varianta, rostlina na médiu se 100 mM NaCl a rostlina na médiu s přidáním 200 mM NaCl.



Obr. 9- Fotografie *P. lanceolata* po 14 dnech kultivace na médiích s NaCl. Zleva- kontrolní varianta, rostlina na médiu se 100 mM NaCl a rostlina na médiu s přidáním 200 mM NaCl.

4.3.2. Vliv zasolení, nízké teploty a kombinace obou stresů na obsah a spektrum endogenních sacharidů rostlin *P. maritima* a *P. lanceolata*

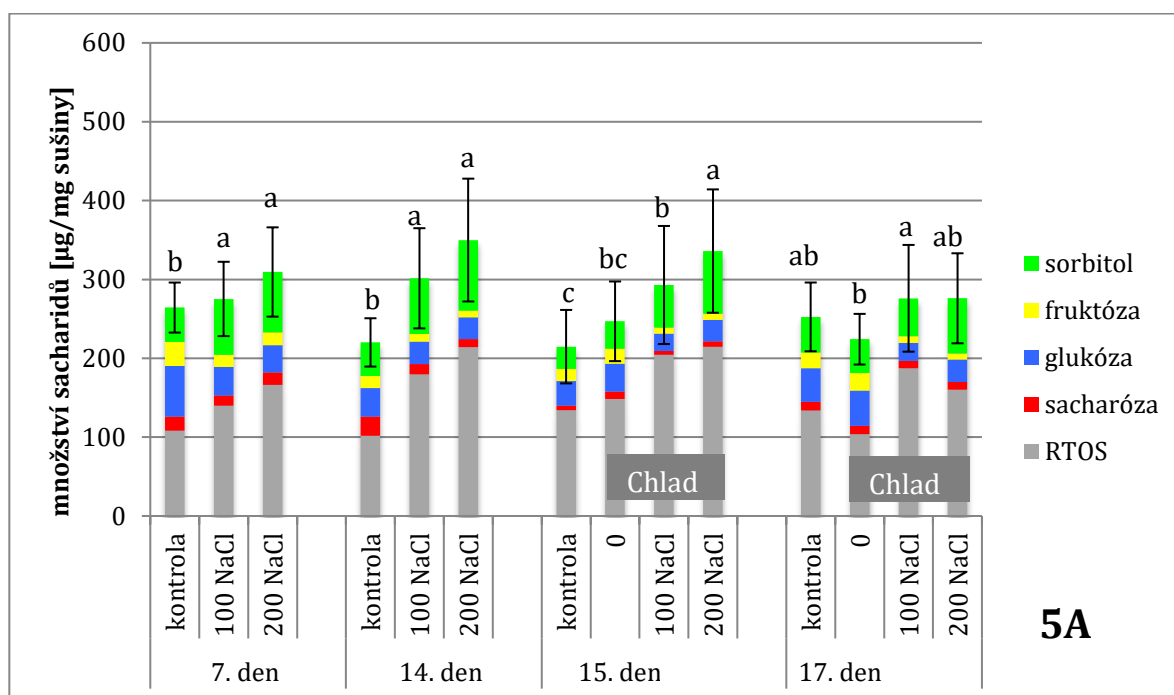
V následujících výsledcích prezentuji porovnání reakce sacharidového metabolismu glykofytního druhu *P. lanceolata* a druhu halofytního *P. maritima* na zasolení, chlad a kombinaci zasolení a chladu. Obsah a spektrum endogenních sacharidů byly sledovány u vzorků použitých pro stanovení růstových parametrů. Uspořádání a prezentace zjištěných dat v grafech je stejné jako v předchozí kapitole.

Sedmý den po vystavení rostlin *P. maritima* individuálnímu solnému stresu je patrný trend vzestupu obsahu celkových sacharidů v prýtech. Na vzestupu celkových sacharidů se výraznou měrou podílí nárůst sorbitolu. Vzestup množství sorbitolu u variant na 100 a 200 mM NaCl je oproti kontrole signifikantní. Kromě sorbitolu se navyšuje i podíl frakce RTOS, zatímco podíl fruktózy je u variant vystavených zasolení přibližně 50%. V kontrolních rostlinách je i vyšší podíl glukózy. V rostlinách *P. lanceolata* je také pozorovatelný trend zvyšujícího se množství celkových sacharidů. Stejně jako u *P. maritima* se na zvýšení podílí signifikantní nárůst sorbitolu. Liší se mezidruhové zastoupení sacharidů. Frakce RTOS tvoří u *P. lanceolata* nejméně 65 % rozpustných sacharidů. U *P. maritima* jsou podstatnou složkou sacharidového spektra vedle sorbitolu i hexózy a sacharóza. Trend zvýšeného množství celkových sacharidů i nárůst sorbitolu v rostlinách vystavených zasolení pokračuje i 14. den. Hodnocení výsledků *P. lanceolata* je obtížnější z důvodu větší variability rostlinného materiálu (viz vyšší směrodatné odchylky při stejném počtu hodnocených vzorků). Reakce kořenů u *P. maritima* se mezi jednotlivými variantami neliší.

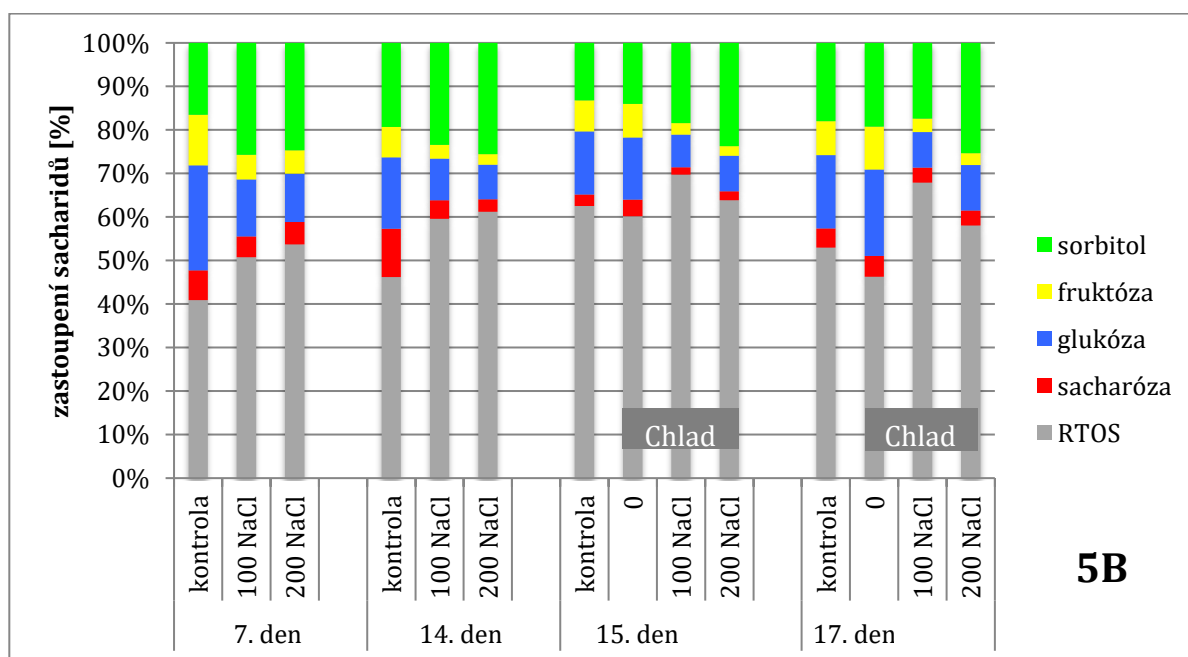
Odpověď rostlin jitrocele se liší mezi 1. a 3. dnem vystavení nočnímu chladu. V prýtech i kořenech nedošlo k téměř žádným změnám ani v obsahu, ani ve spektru sacharidů obou druhů jitrocele 1. den působení chladu. Třetí den je v prýtech zaznamenán pokles celkových sacharidů a pokles množství sorbitolu v chladové variantě *P. maritima*. Kořeny rostlin vystavených chladu se neliší od kontrolních. Reakce kořenů *P. lanceolata* je rozdílná. Obsah celkových sacharidů chladové varianty je nižší.

Kombinovaný stres v prýtech více prohlubuje rozdíly mezi halofytním a glykofytním druhem. Celkový obsah sacharidů se téměř neliší u *P. maritima*. Mění se zastoupení jednotlivých sacharidů. Při ošetření NaCl vzrůstá podíl frakce RTOS a sorbitolu, oproti snížení podílu glukózy a fruktózy. Na 200 mM koncentraci NaCl 3. den kombinovaného stresu rostliny *P. lanceolata* reagují dramatičtěji. Výrazně se zvyšuje celkové množství sacharidů. Nárůst je způsoben hlavně signifikantními změnami v obsahu sorbitolu. V kořenech obou druhů nebyly

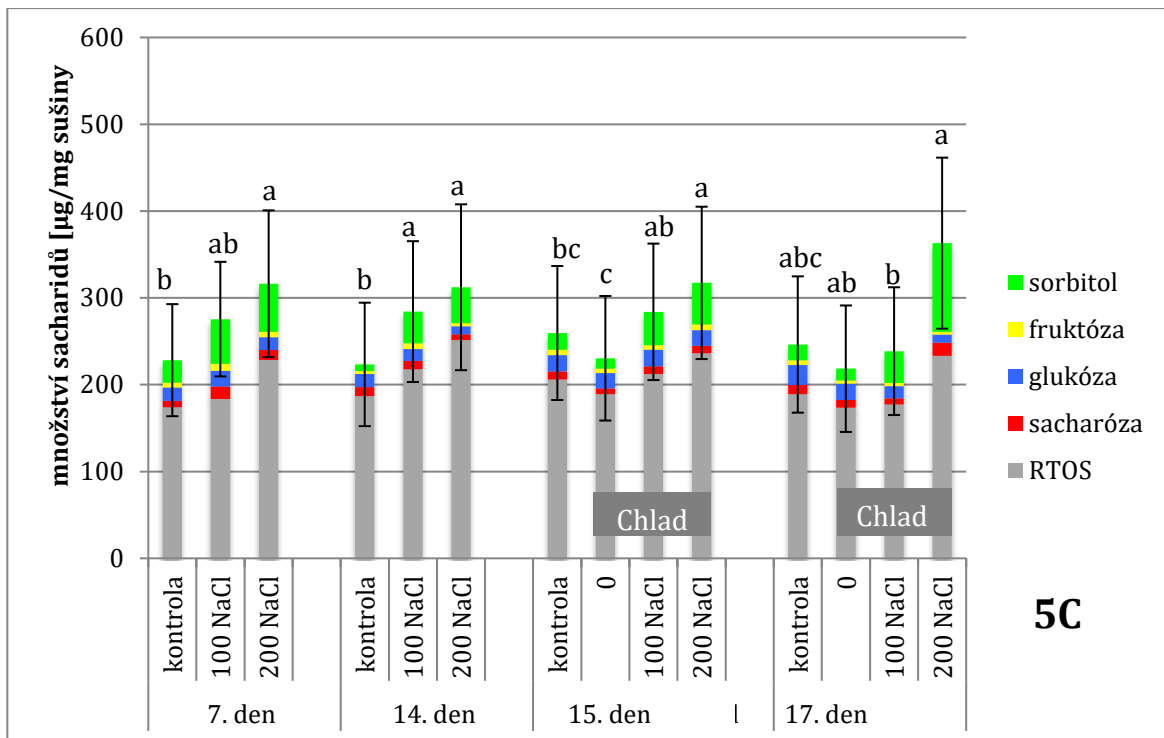
pozorovány rozdíly v obsahu sorbitolu, je zde patrný trend růstu podílu i absolutních hodnot frakce RTOS.



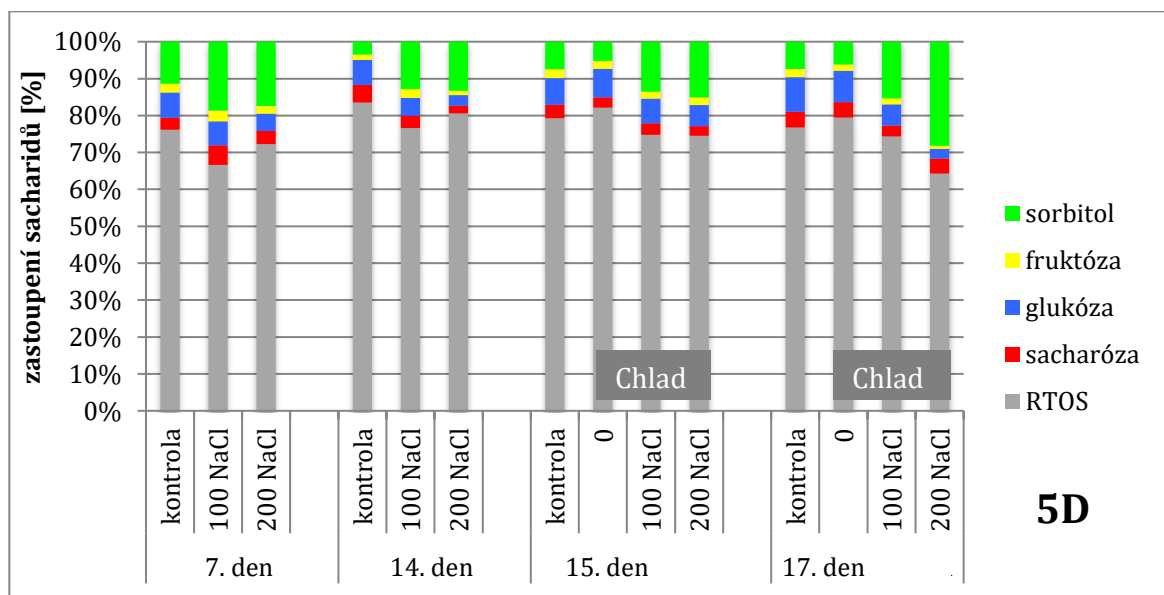
Graf 5A- Obsah rozpustných sacharidů v prýtech jitrocele *Plantago maritima* v závislosti na zasolení, nízké teplotě a kombinaci obou stresů. Kontrola – kontrolní varianta; 0 – varianta vystavená nočnímu chladu; 100 mM NaCl a 200 mM NaCl: varianty s přidavkem NaCl do média, od 15. dne vystaveny nočnímu chladu. Osa x: délka kultivace jitrocele na daných médiích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky pro celkové sacharidy, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových rozpustných sacharidů, $\alpha=0,05$, $n=6$.



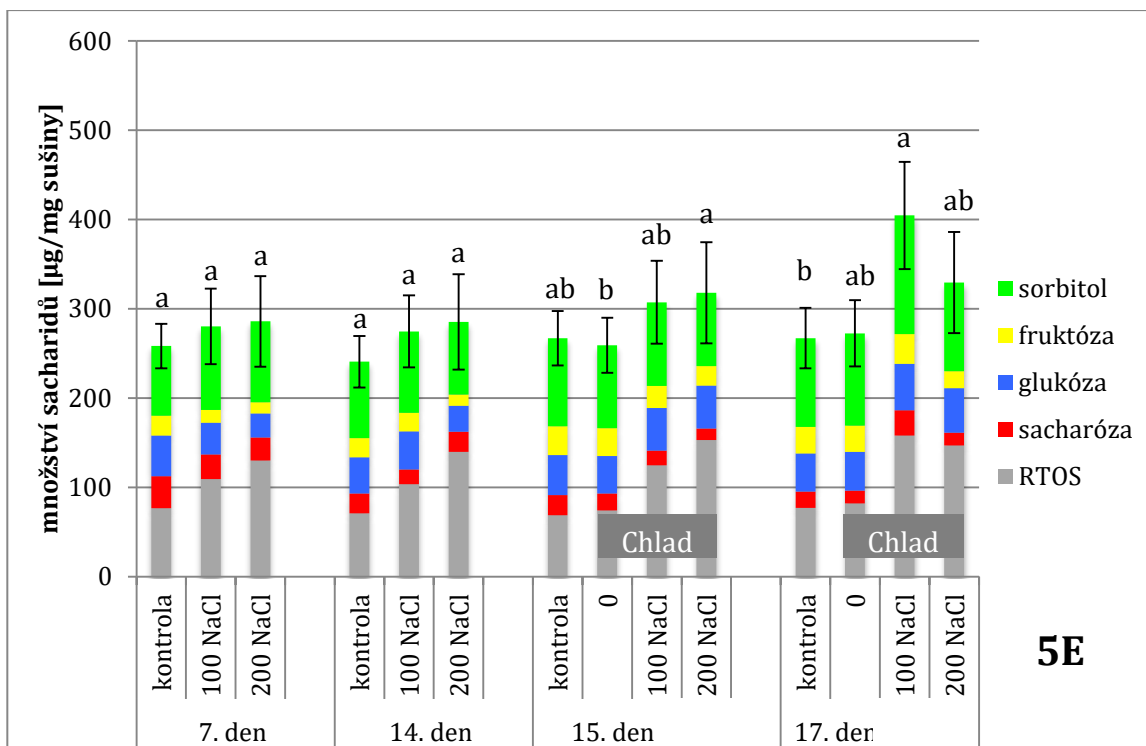
Graf 5B- Podíl rozpustných sacharidů v prýtech *P. maritima* v závislosti na zasolení, nízké teplotě a kombinaci obou stresů. Popis variant viz legenda grafu 5A.



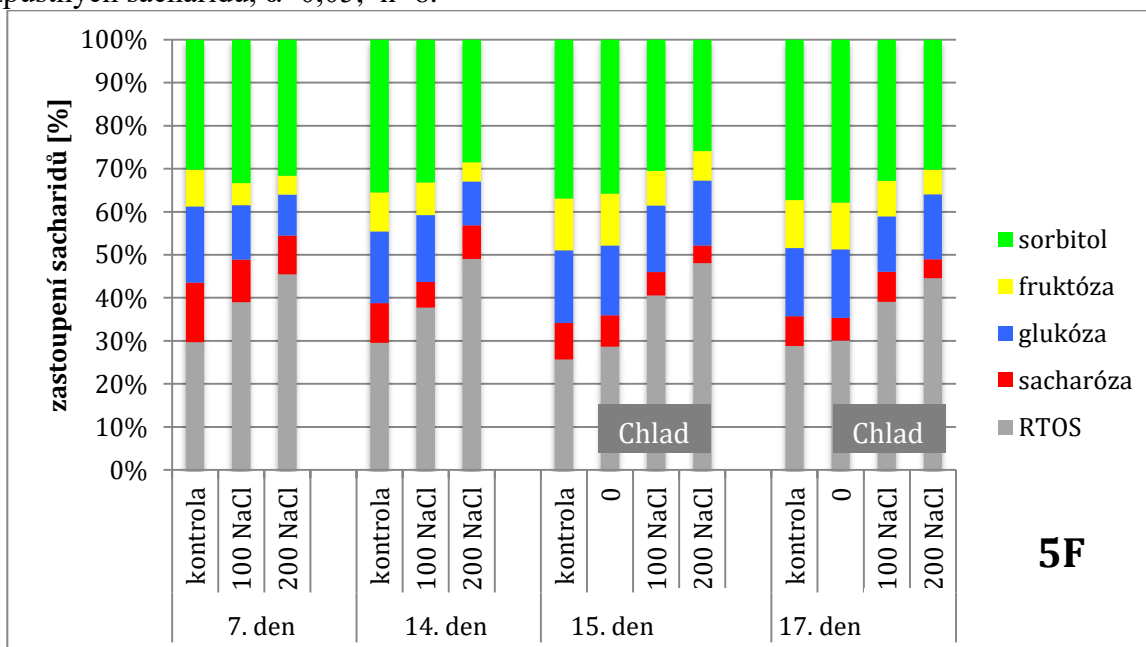
Graf 5C- Obsah rozpustných sacharidů v prýtech jitrocele *Plantago lanceolata* v závislosti na zasolení, nízké teplotě a kombinaci obou stresů. Kontrola – kontrolní varianta; 0 – varianta média, od 15. dne vystaveny nočnímu chladu. Osa x: délka kultivace jitrocele na daných médiích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky pro celkové sacharidy, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových rozpustných sacharidů, $\alpha=0,05$, $n=6$.



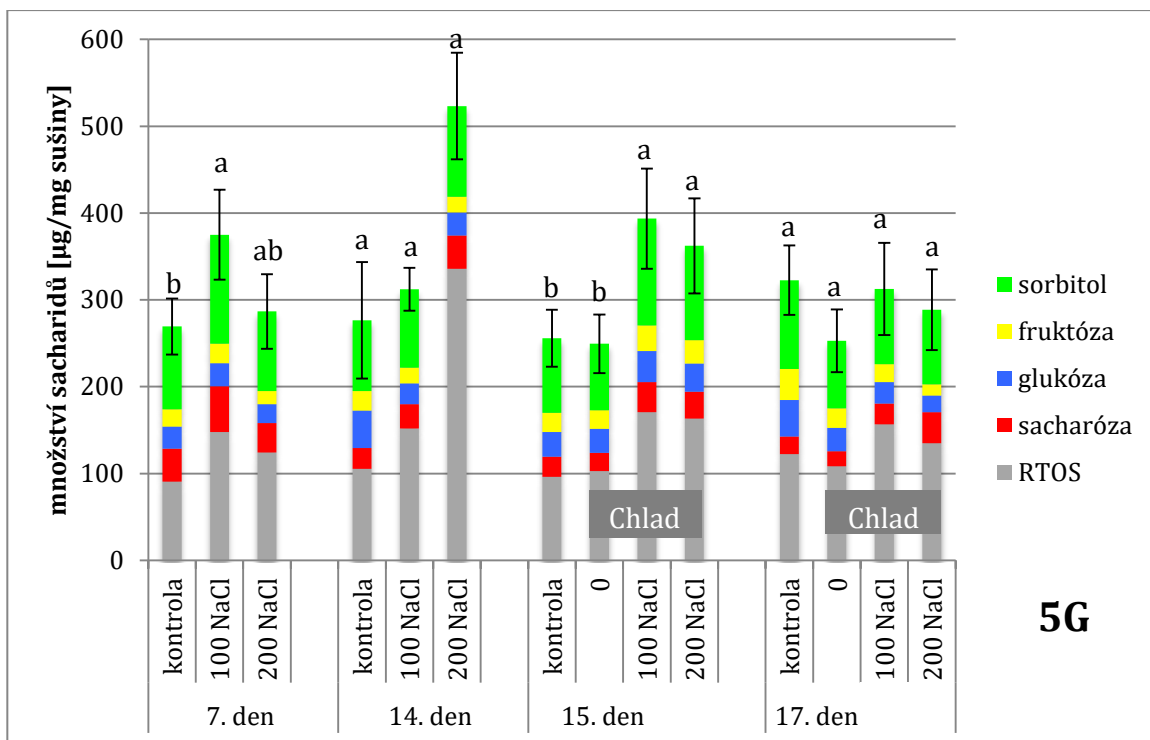
Graf 5D- Podíl rozpustných sacharidů v prýtech *Plantago lanceolata* v závislosti na zasolení, nízké teplotě a kombinaci obou stresů. Popis variant viz legenda grafu 5C.



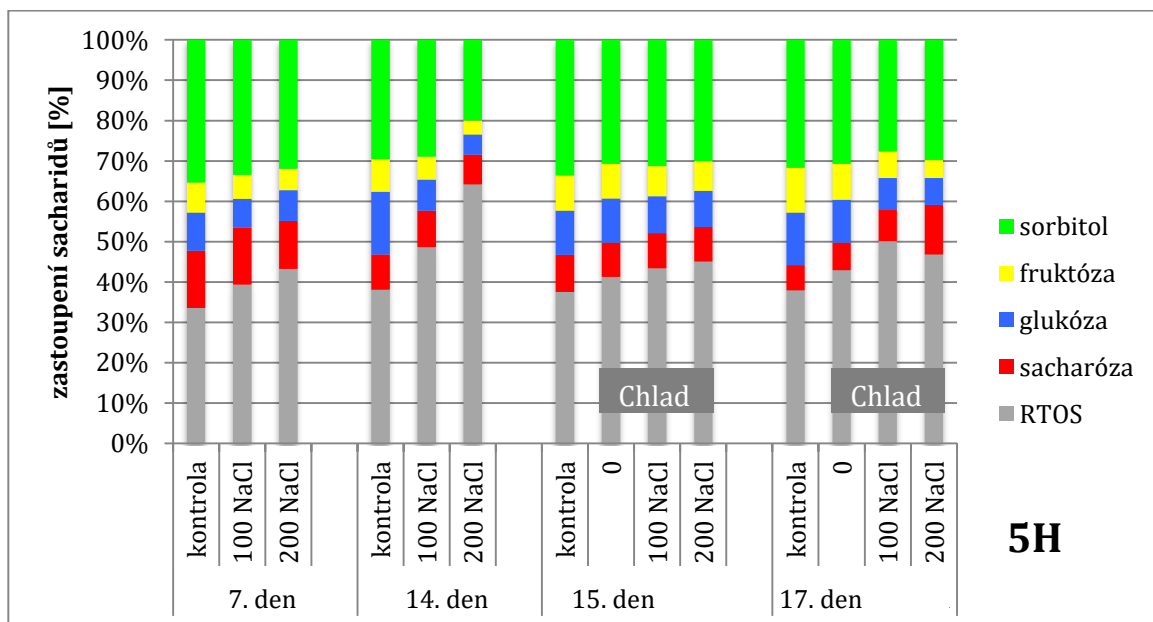
Graf 5E- Obsah rozpustných sacharidů v kořenech jitrocele *Plantago maritima* v závislosti na zasolení, nízké teplotě a kombinaci obou stresů. Kontrola – kontrolní varianta; 0 – varianta bez zasolení, vystavená pouze nočnímu chladu; 100 mM NaCl a 200 mM NaCl: varianty s přidavkem NaCl do média, od 15. dne vystaveny nočnímu chladu. Osa x: délka kultivace jitrocele na daných médiích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky pro celkové sacharidy, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových rozpustných sacharidů, $\alpha=0,05$, $n=6$.



Graf 5F- Podíl rozpustných sacharidů v kořenech *Plantago maritima* v závislosti na zasolení, nízké teplotě a kombinaci obou stresů. Popis variant viz legenda grafu 5E.



Graf 5G- Obsah rozpustných sacharidů v kořenech jitrocele *Plantago lanceolata* v závislosti na zasolení, nízké teplotě a kombinaci obou stresů. Kontrola – kontrolní varianta; 0 – varianta vystavená nočnímu chladu; 100 mM NaCl a 200 mM NaCl: varianty s přidavkem NaCl do média, od 15. dne vystaveny nočnímu chladu. Osa x: délka kultivace jitrocele na daných médiích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky pro celkové sacharidy, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových rozpustných sacharidů, $\alpha=0,05$, $n=6$.



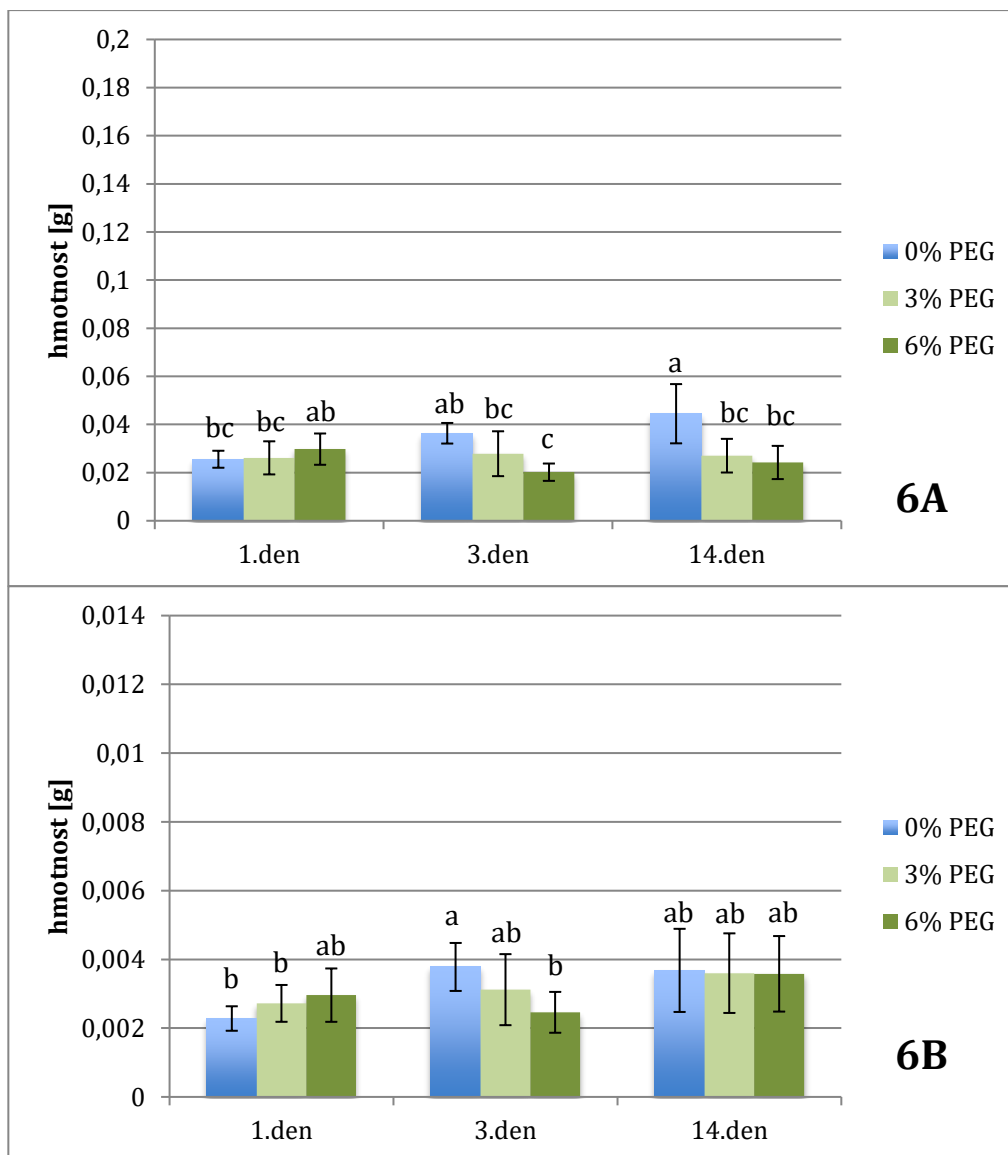
Graf 5H- Podíl rozpustných sacharidů v kořenech *Plantago lanceolata* v závislosti na zasolení, nízké teplotě a kombinaci obou stresů. Popis variant viz legenda grafu 5G.

4.4. Omezení dostupnosti vody nepenetrujícím osmotikem

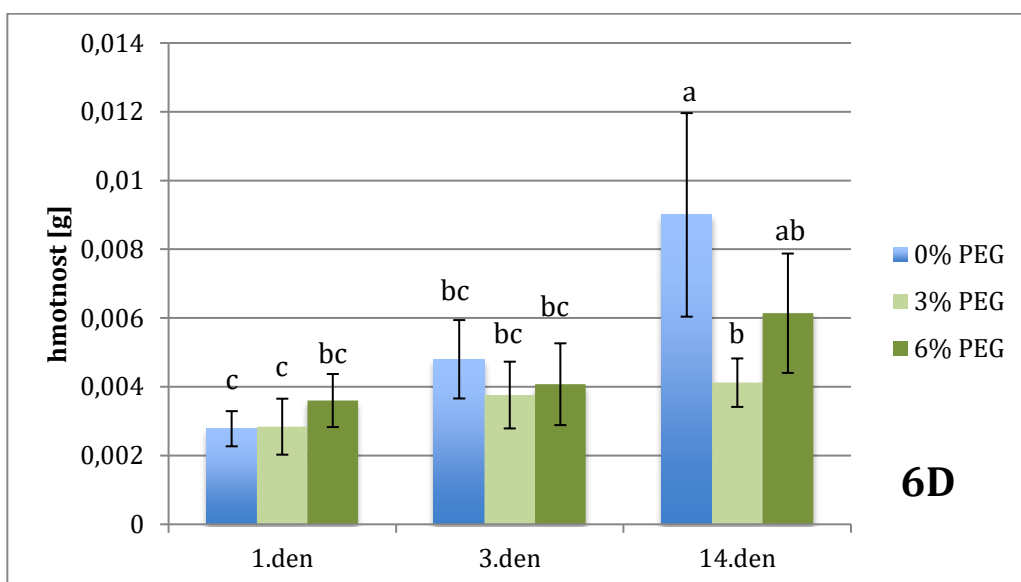
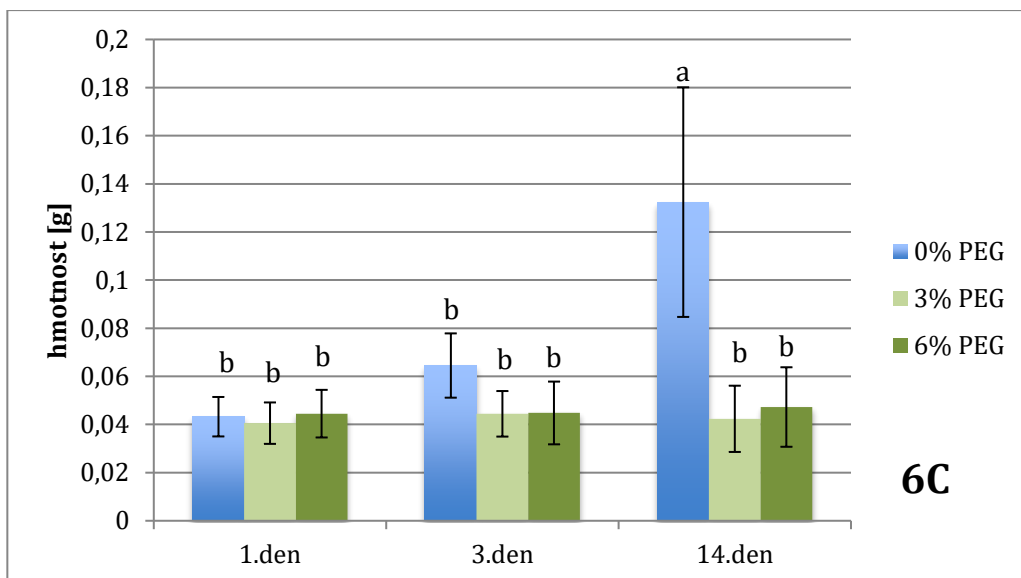
4.4.1. Vliv osmotického stresu na růstové parametry *P. maritima* a *P. lanceolata*

Pro navození osmotického stresu byl do médií přidán PEG (polyethylenglykol) o průměrné molekulové hmotnosti 4000. PEG o této molekulové hmotnosti má charakter nepenetrujícího osmotika. Proto přidání PEG do kultivačního média indukuje pouze reakce rostlin na stres osmotický, způsobený zhoršením příjmu vody, a ne jako je tomu u zasolení, kombinovaný s reakcí rostlin na toxicitu iontů soli penetrujících do buněk. Rostliny *P. maritima* a *P. lanceolata* byly po čtrnácti dnech od vyklíčení přesazeny na experimentální média (1/2 MS médium, zdroj uhlíku a energie sestávající z 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu). Pro zjištění reakce rostlin na nedostupnost vody byly použity dvě koncentrace PEG (média s 3% a 6% PEG). Odběry vzorků byly prováděny 1. a 3. den pro zjištění rychlé reakce rostlin na nedostatek vody, a 14. den, kdy by již měla odeznít akutní reakce na nepříznivé podmínky. Kvůli odběrům brzy po přesazení mladých rostlin nebylo možné získat dostatek materiálu pro analýzy kořenů.

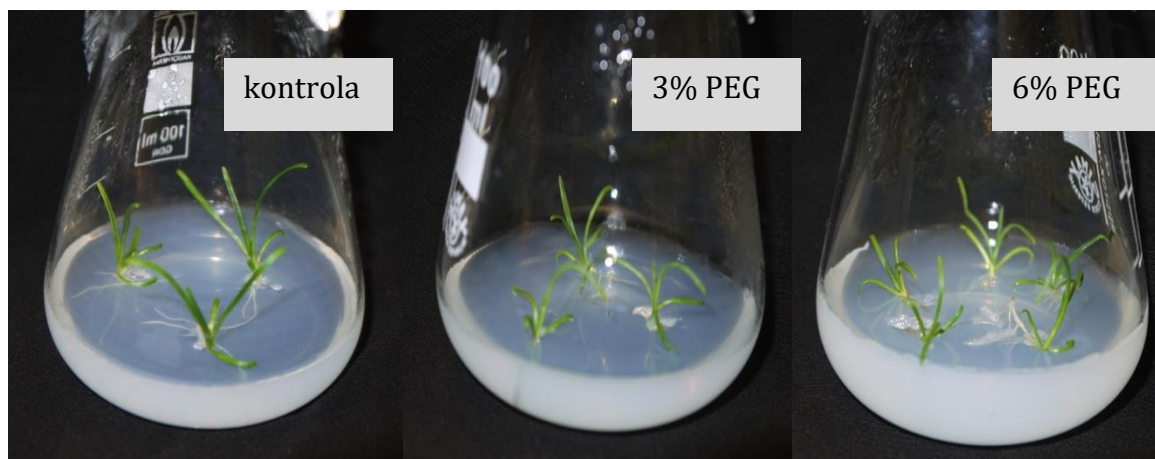
První rozdíly mezi variantami se v růstových charakteristikách začínají projevovat až 3. den po zahájení experimentu. U rostlin *P. maritima* je čerstvá hmotnost 3. den negativně ovlivněna pouze u varianty na 6% PEG oproti kontrole. Odběr ve 14. dni neukazuje na rozdíl v čerstvé hmotnosti mezi rostlinami *P. maritima* na 3 a 6% PEG, ale je zde patrný rozdíl v hmotnosti mezi těmito variantami a kontrolními rostlinami (graf 6A). Naopak hmotnost sušiny 14. den u rostlin *P. maritima* ovlivněna není (graf 6B). Po 14 dnech byly více ovlivněny rostliny *P. lanceolata* rostoucí na médiu s přidáním PEG. Čerstvá hmotnost těchto rostlin dosahovala pouze 50 % hmotnosti kontroly (0% PEG) (graf 6C). Je patrné, že rozdíly v růstových parametrech rostlin rostoucích na médiu s přidáním PEG a kontrolních rostlin se projevují až za delší časový úsek, v mém případě až 14. den (graf 6C,D). Obr. 10 a 11 znázorňují fotografie obou druhů jitrocele po 14. dnech od přesazení na experimentální média.



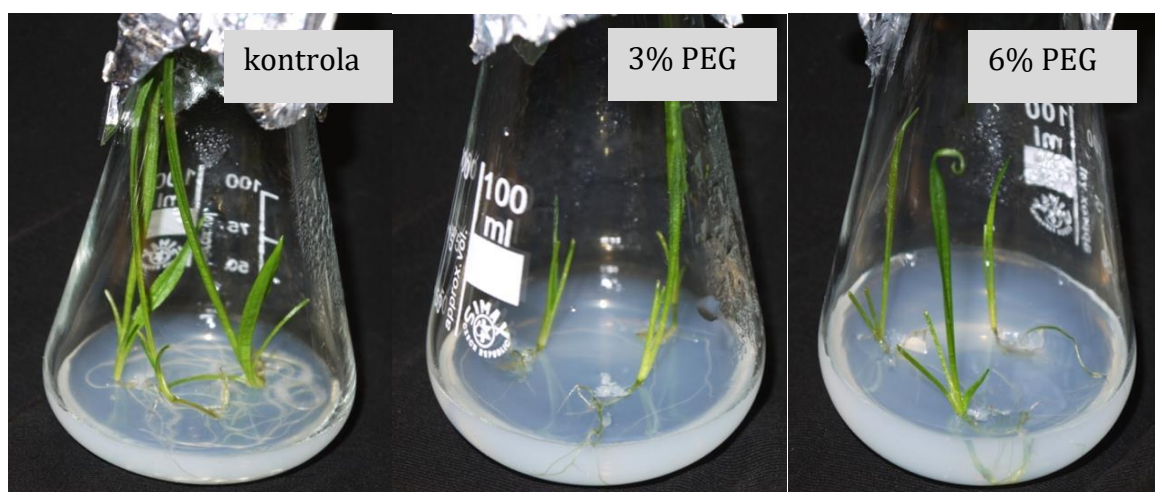
Graf 6A,B- Akumulace biomasy prýtu u jitrocele *Plantago maritima* v závislosti na snížení osmotického potenciálu média nepenetrujícím osmotikem, **A:** čerstvá hmotnost; **B:** hmotnost sušiny 0 % PEG: kontrola; 3 % PEG a 6 % PEG: varianty s přidavkem PEG 4000 do média. Osa x: délka kultivace na daných médiích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$, $n=5$.



Graf 6C,D- Akumulace biomasy prýtu u jitrocele *Plantago lanceolata* v závislosti na snížení osmotického potenciálu média nepenetrujícím osmotikem, C: čerstvá hmotnost; D: hmotnost sušiny 0 % PEG: kontrola; 3 % PEG a 6 % PEG: varianty s přidavkem PEG 4000 do média. Osa x: délka kultivace na daných médiích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$, $n=5$.



Obr. 10- Fotografie rostlin *P. maritima* 14 dní od přesazení na daná média, zleva- kontrolní varianta, rostliny na 3% PEG a 6% PEG

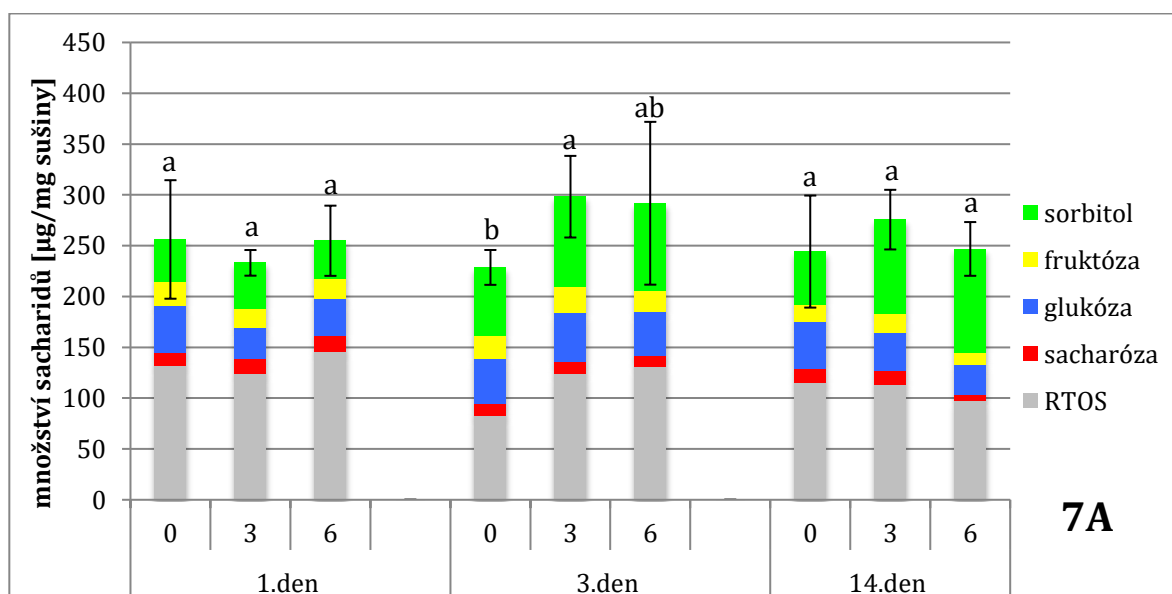


Obr. 11- Fotografie rostlin *P. lanceolata* 14 dní od přesazení na daná média, zleva- kontrolní varianta, rostliny na 3% PEG a 6% PEG

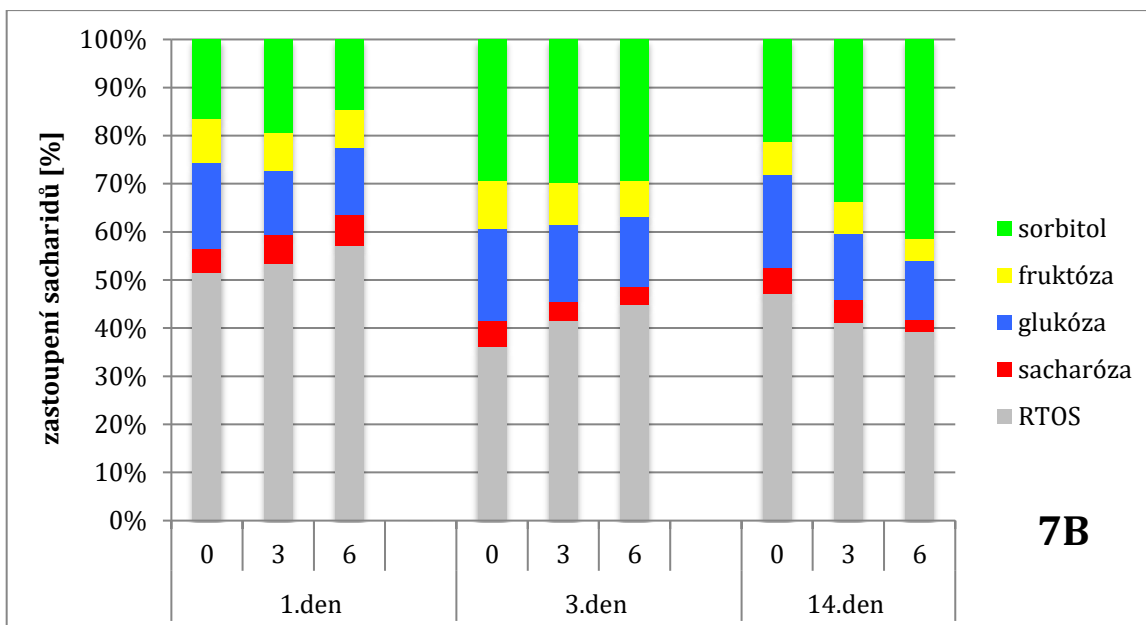
4.4.2. Vliv osmotického stresu na obsah a spektrum rozpustných endogenních sacharidů rostlin *P. maritima* a *P. lanceolata*

V následující části prezentuji výsledky porovnání reakce sacharidového metabolismu glykofytního druhu *P. lanceolata* a druhu halofytního *P. maritima* na snížení osmotického potenciálu kultivačního média pomocí nepenetrujícího osmotika PEG 4000 a takto vyvolaný osmotický stres. Obsah a spektrum endogenních sacharidů byly sledovány u vzorků použitých pro stanovení růstových parametrů. Uspořádání a prezentace zjištěných dat v grafech je stejné jako v předchozí kapitole.

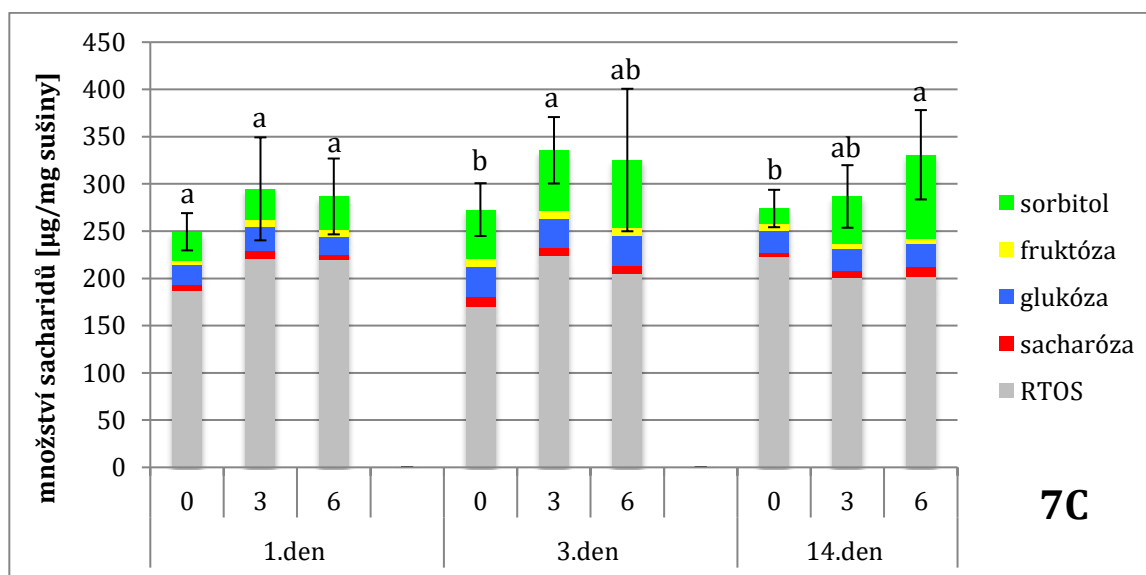
První odběr vzorků (prýtů) probíhal po jednom dni od přesazení na experimentální média. V tomto odběru nebyly ani u jednoho druhu jitrocele pozorovány signifikantní změny mezi jednotlivými variantami. Množství sacharidů i jejich zastoupení bylo ve vzorcích jednotlivých druhů srovnatelné. Celkové množství sacharidů se první den signifikantně neliší ani mezi *P. maritima* a *P. lanceolata* (graf 7A a 7C). Liší se zastoupení jednotlivých sacharidů, kde jsou výsledky srovnatelné jako v experimentu se zasolením. U *P. lanceolata* převažuje frakce RTOS, která tvoří přibližně 75 % spektra rozpustných sacharidů (graf 7D), u *P. maritima* tato frakce tvoří přibližně 50 % (graf 7B). Třetí den dochází u *P. maritima* k signifikantnímu navýšení obsahu sorbitolu u varianty na 3% PEG. U varianty na 6% PEG dochází pouze k narůstající tendenci obsahu sorbitolu. Žádné průkazné změny nebylo možné pozorovat mezi variantami *P. lanceolata*. Ve 14. dni došlo navýšení sorbitolu u varianty na 6 % PEG u obou druhů. Překvapivě se neliší celkové množství sacharidů mezi variantami, a to ani v porovnávání mezi všemi odběry u *P. maritima* (graf 7A). Pozorovaný nárůst sorbitolu je ve 14. dni doprovázen úbytkem glukózy a frakce RTOS. Ve 14. dni rostliny *P. lanceolata* také zvyšují množství sorbitolu v reakci na osmotický stres (graf 7C). Je pozorovatelný trend zvyšujícího se množství sorbitolu u variant na 3% i 6% PEG.



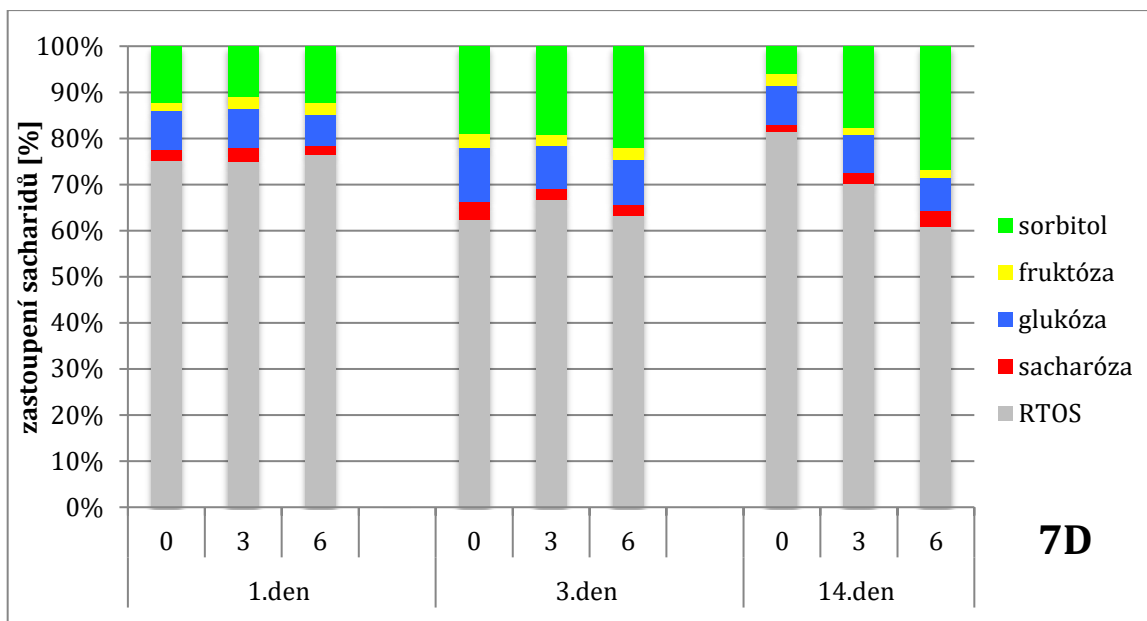
Graf 7A- Obsah rozpustných sacharidů v prýtech jitrocele *Plantago maritima* v závislosti na snížení osmotického potenciálu média nepenetrujícím osmotikem. 0 – kontrolní varianta; 3 a 6 – varianty s přidavkem 3%, respektive 6 % PEG 4000 do média Osa x: délka kultivace jitrocele na daných médiích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky pro celkové sacharidy, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových rozpustných sacharidů, $\alpha=0,05$, $n=5$.



Graf 7B- Podíl rozpustných sacharidů v prýtech *Plantago maritima* v závislosti na snížení osmotického potenciálu média nepenetrujícím osmotikem. Popis variant viz legenda grafu 7A.



Graf 7C- Obsah rozpustných sacharidů v prýtech jitrocele *Plantago lanceolata* v závislosti na snížení osmotického potenciálu média nepenetrujícím osmotikem. 0 – kontrolní varianta; 3 a 6 – varianty s přidavkem 3%, respektive 6 % PEG 4000 do média Osa x: délka kultivace jitrocele na daných médiích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky pro celkové sacharidy, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl v obsahu celkových rozpustných sacharidů, $\alpha=0,05$, $n=5$.

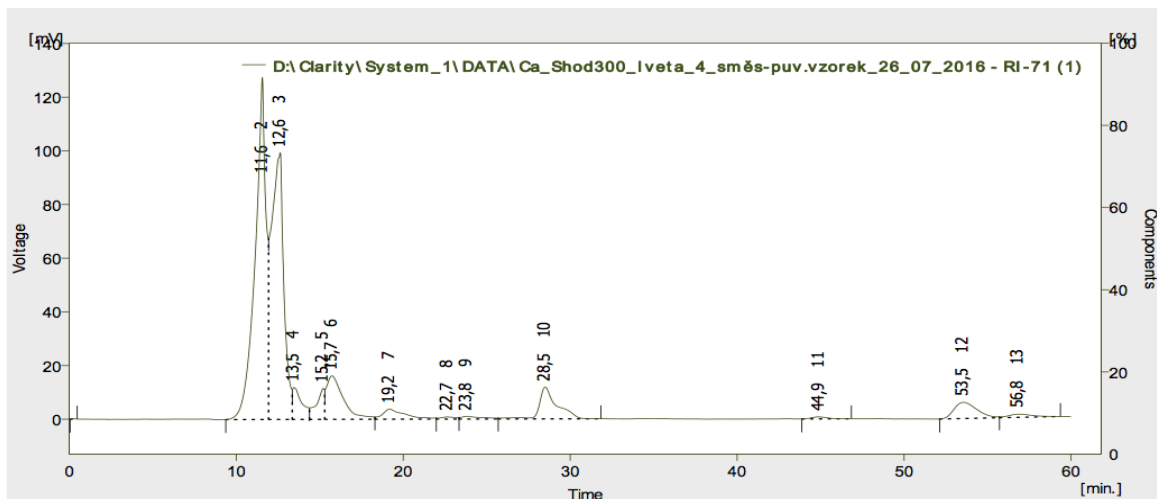


Graf 7D- Podíl rozpustných sacharidů v prýtech *Plantago lanceolata* v závislosti na snížení osmotického potenciálu média nepenetrujícím osmotikem. Popis variant viz legenda grafu 7C.

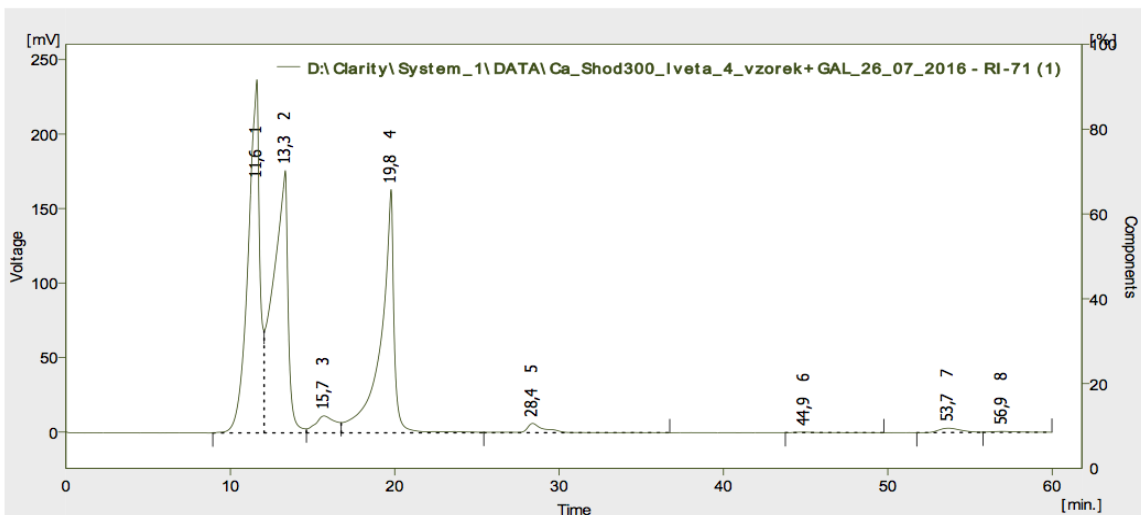
4.5. Identifikace frakce RTOS

4.5.1. Identifikace frakce RTOS- inkubace vzorku s α -galaktosidázou

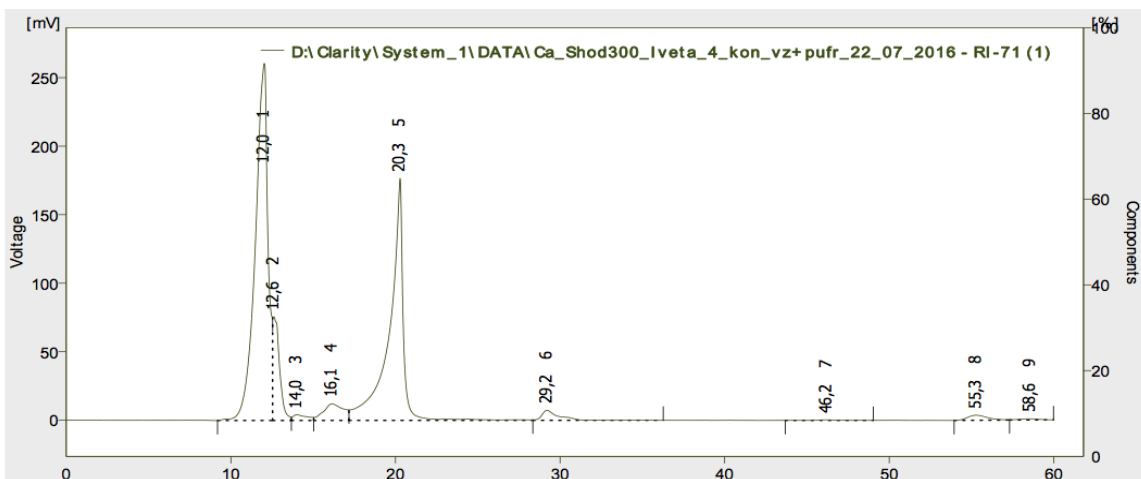
Vzorky obsahují velké množství oligosacharidů "frakce RTOS", které jsou na chromatogramu zobrazeny v retenčních časech mezi 10 až 13,5 min. Podobný retenční čas mají i oligosacharidy rafinóзовé řady, tato skupina sacharidů navíc byla v používaném rostlinném materiálu popsána (viz kap. 2.5.3. v literárním úvodu). Nejrychlejším a dostatečně specifickým ověřením, zda se jedná o RFO, je inkubace vzorku s α -galaktosidázou. Pokud by byly ve vzorku přítomny běžně známé RFO, α -galaktosidáza by měla odštěpovat galaktózové podjednotky. Chromatogram původního vzorku je na Obr. 12. Po inkubaci vzorku s α -galaktosidázou se chromatogram výrazně nelišil od kontrolního vzorku s puforem ani vzorku s puforem + α -galaktosidázou (Obr. 13 a 14), pouze se změnil tvar peaku v retenčních časech mezi 10-13,3 min. Především ale nebyl pozorován žádný peak v oblasti kolem retenčního času 17,5 min, který je retenčním časem standardu galakózy (viz Obr. 15). Identita frakce RTOS jakožto frakce obsahující cukry rafinóзовé řady tudíž nemohla být potvrzena.



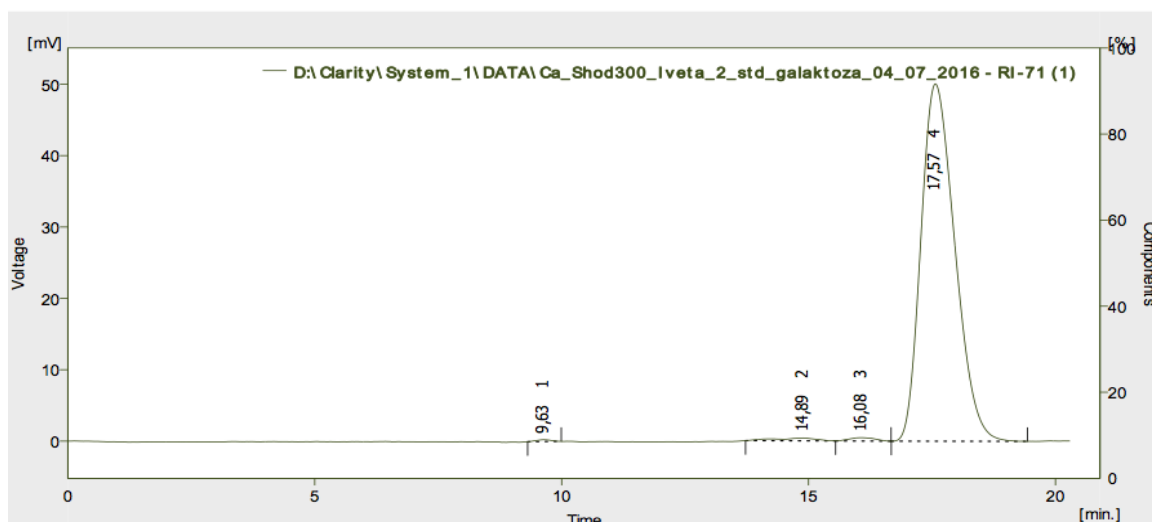
Obr. 12- Chromatogram původní vzorek



Obr. 13- Chromatogram vzorek s α -galaktosidázou a acetátovým pufrém



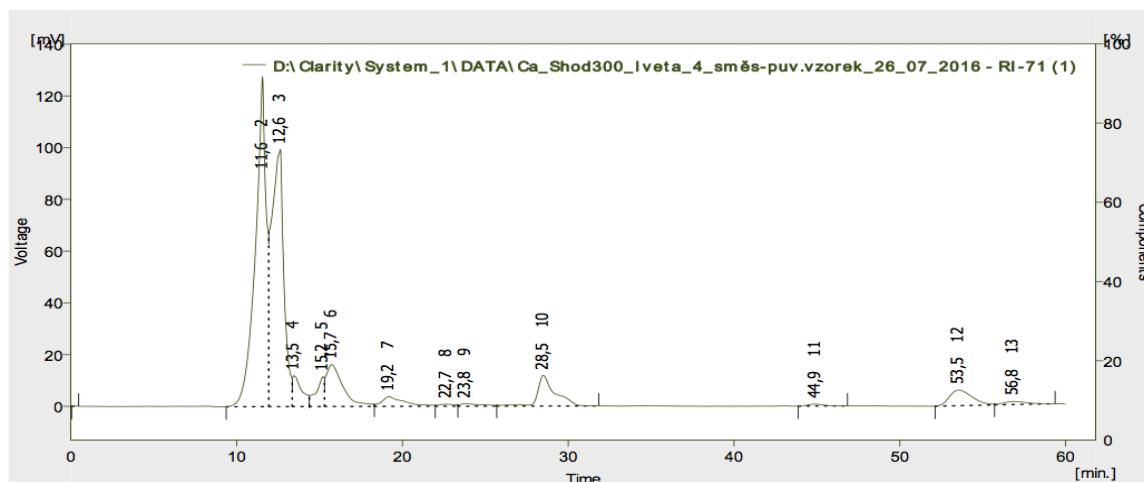
Obr. 14- Chromatogram vzorek s acetátovým pufrém



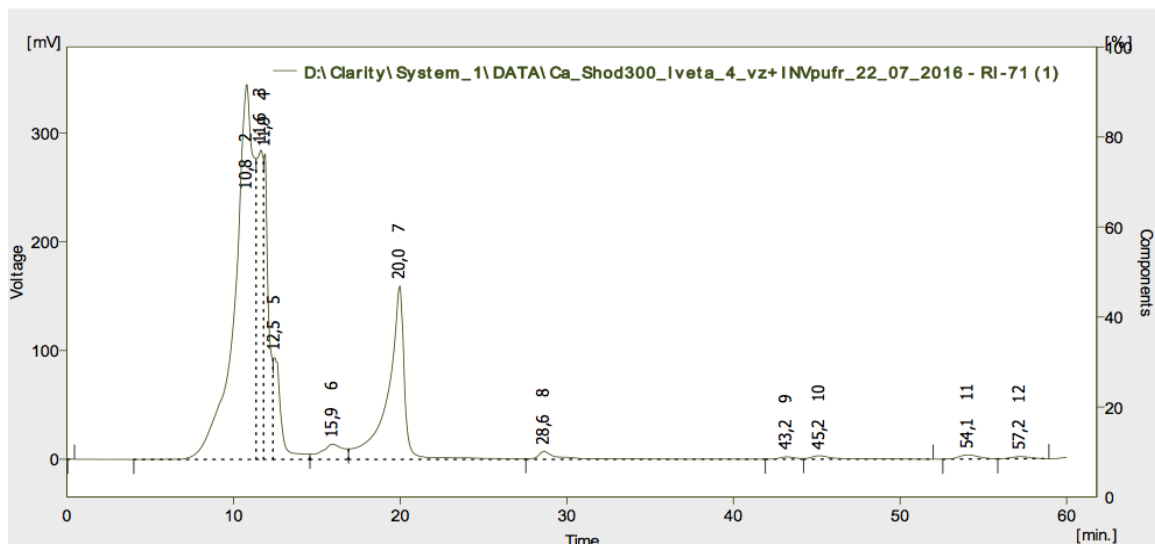
Obr. 15- Chromatogram standard galaktózy

4.5.2. Identifikace frakce RTOS - inkubace vzorku s invertázou

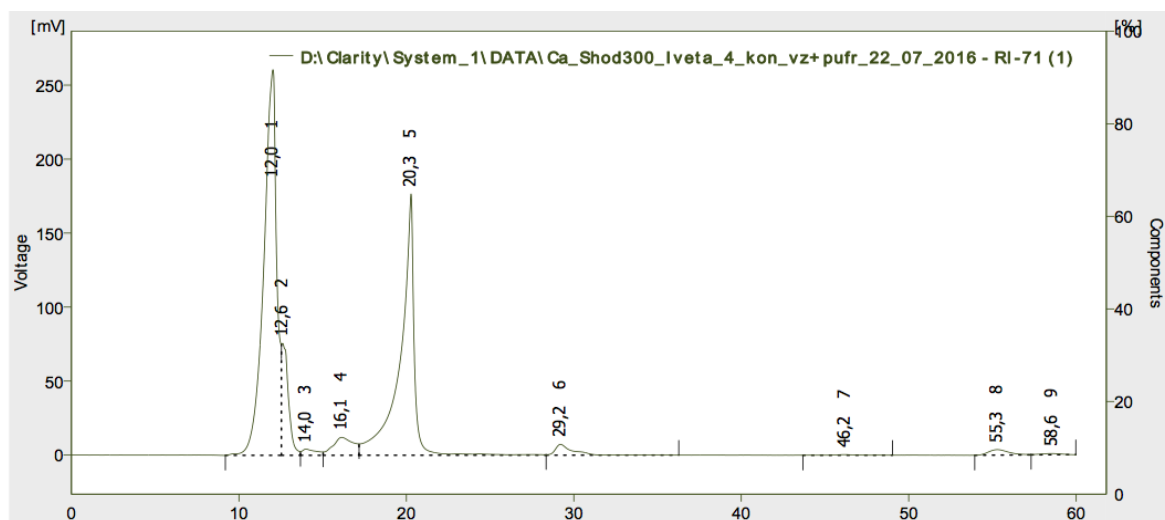
Jelikož α -galaktosidáza neodštěpila žádné galaktóзовé podjednotky, vzorek byl inkubován s kyselou invertázou. Obr. 16 opět ukazuje chromatogram původního vzorku, který byl inkubován s invertázou. Na chromatogramu (Obr. 17) vzorku s invertázou je patrný nárůst oligosacharidů okolo retenčního času 10,8 min. Naopak peak v retenčním čase 12,6 min zůstává po inkubaci vzorku s invertázou nezměněn. Změny v jiných sacharidech nejsou na chromatogramech pozorovány. Bylo nutné ověřit, zda peak v retenčním čase 20,0 min, není fruktóza. Proto byl směsný vzorek změřen i na jiné HPLC koloně (Pb^{2+}), která dělí fruktózu v jiné oblasti než na Ca^{2+} koloně, kde s fruktózou komigruje artefakt z acetátového pufru (Obr. 18). Bylo zjištěno, že se fruktóza oproti původnímu vzorku nenavýšila. Ani invertázou tedy nedochází k uvolňování monosacharidů, i když ke změnám v oblasti frakce RTOS po tomto štěpení dochází.



Obr. 16- Chromatogram původní vzorek



Obr. 17- Chromatogram vzorek s invertázou

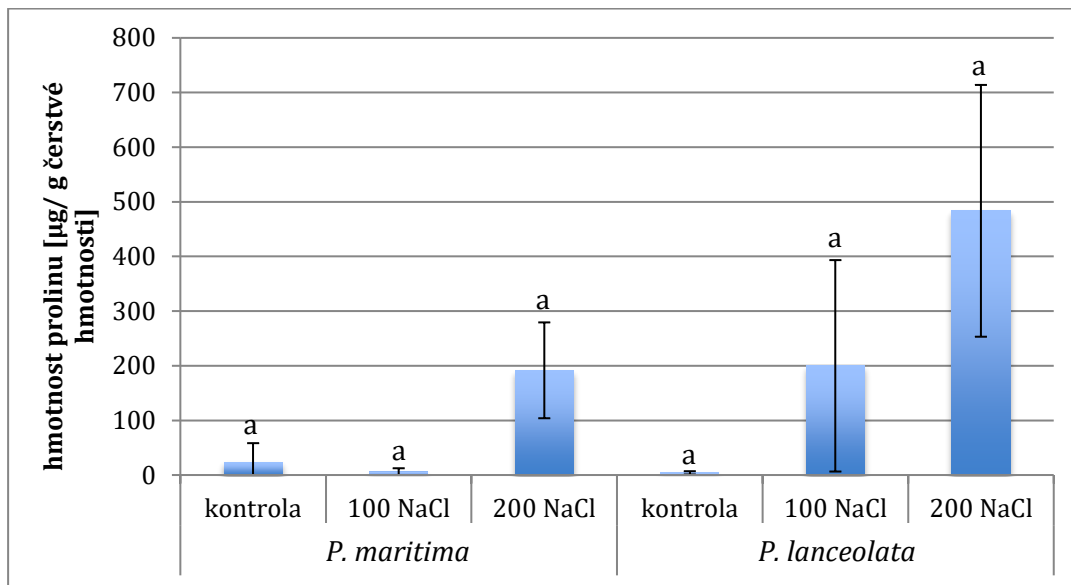


Obr. 18- Chromatogram vzorek s acetátovým pufrém

4.6. Změny obsahu prolinu při zasolení v rostlinách *P. maritima* a *P. lanceolata*

Obsah prolinu v rostlinách jitrocele *P. maritima* a *P. lanceolata* byl zjišťován po 14 dnech od přesazení na daná média. Pro experiment bylo použito 1/2 MS médium s přidáním NaCl pro dosažení koncentrace 100 a 200 mM NaCl stejně jako tomu bylo v experimentu hodnocenému v kapitolách 4.3.1. a 4.3.2. Vyhodnocovány byly pouze nadzemní části rostlin. V grafu 8 je mezi druhy jitrocele pozorovatelný, avšak nesignifikantní rozdíl v obsahu prolinu. Se zvyšujícím se zasolením je u *P. lanceolata* patrný trend ke zvýšenému množství prolinu v rostlinách. I rostliny *P. maritima* vykazují trend zvýšeného množství prolinu ve variantě

200 mM NaCl. Nesignifikantní rozdíly jsou způsobeny pravděpodobně nízkým počtem vzorků s velkým rozptylem naměřených hodnot.



Graf 8-Množství prolinu v prýtech jitrocele *P. maritima* a *P. lanceolata* v závislosti na zasolení. Kontrola – kontrolní varianta; 100 mM NaCl a 200 mM NaCl: varianty s přidavkem NaCl do média kontrola. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky, odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$, $n=3$.

5. Diskuse

5.1. Experimentální materiál a způsob kultivace

Pro experimenty byly použity celistvé rostliny z rodu *Plantago*. Na základě výběru druhů popsaném v 1. kapitole experimentální části byly pro pokusy využity nejprve tři druhy jitrocele – *Plantago maritima* a *Plantago eriopoda* jako druhy halofytní, a *Plantago lanceolata* představující druh glykofytní. Evoluce halofytů probíhala v prostředích vystavených větším koncentracím soli v půdě, a proto je jejich metabolismus přizpůsoben zasolení. Jedním z důsledků zasolení je omezení dostupnosti vody pro rostliny, což je častý mechanismus působení i jiných abiotických stresů (osmotický stres, chlad). Experimentální rostliny byly pěstovány v podmínkách *in vitro* na tuhých MS médiích (případně na jejich modifikacích). Tento způsob pěstování je velmi vhodný pro typy experimentů, které jsem prováděla, neboť dovoluje cílené a dobře kontrolovatelné manipulace se složením médií (zdroj uhlíku a energie, přidávání NaCl nebo PEG do média) i s podmínkami kultivace. Nastavené podmínky kultivace všech druhů jitrocele v mé práci odpovídaly kultivačním podmínkám, které byly zveřejněny v publikaci Fons et al. (2008). Jako vhodnější pro moji diplomovou práci se ukázalo být pěstování rostlin ze semen, nikoli vegetativní množení, především z hlediska vyšší časové náročnosti vegetativního množení. Nicméně vypracovaná metodika množení z kořenových segmentů využívající výbornou regenerační kapacitu jitrocele je také dobře využitelná a výhodná především pro svou nenáročnost a možnost regenerace velkého množství klonálních rostlin bez použití růstových regulátorů. V dostupných vědeckých publikacích se vždy používají pro vegetativní množení rostlin jitrocele růstové regulátory (Fons et al., 2008, Makowczynska and Golec, 2009), mé výsledky ukazují, že to není podmínkou. Při pěstování ze semen je však třeba počítat s určitou heterogenitou mezi rostlinami. Což může být důvod, proč jsou ve všech experimentech poměrně velké směrodatné odchylky.

5.2. Ovlivnění růstových parametrů a obsahu a spektra sacharidů v závislosti na různém zásobení sacharidem

Rostliny v podmínkách *in vitro* mají výrazně sníženou schopnost fotosyntézy, která je dána zvláště nedostatečným přísunem CO₂. Pěstování rostlin v alobalem uzavřených Erlenmayerových baňkách je dobrým příkladem omezené schopnosti fotosyntézy, především kvůli nedostatečné výměně vzduchu (Shin et al., 2013). Co možná nejtěsnější uzavření je však

nutné pro omezení kontaminací. Tím, že nedochází k výměně látek mezi rostlinou a prostředím (nebo pouze minimálně), jsou rostliny pěstované *in vitro* odkázané na složení kultivačních médií. Obsah sacharidů v médiu je velmi zásadní pro správný růst a vývoj rostliny. Jako nejčastější zdroj uhlíku a energie se používá do médií sacharóza, která je univerzálně rozšířena v celé rostlinné říši. Kromě zástupců čeledi *Rosaceae* jsou rostliny z rodu *Plantago* dalším příkladem, kdy je vedle sacharózy důležitým fotosyntetickým a transportním produktem cukerný alkohol sorbitol (Klages et al., 2001; Pommerening et al., 2007). Právě u těchto skupin rostlin bylo opakovaně popsáno, že i tyto sacharidy jsou obvykle srovnatelným zdrojem uhlíku a energie v podmínkách *in vitro* (např. Bilavčík et al. 2012, Rejšková et al. 2007). Pro rostliny rodu *Plantago* podobné informace chybí.

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda se rozdílné zásobení sacharidem projeví na růstových parametrech a endogenních hladinách sacharidů, a zda se budou tyto parametry lišit mezi jednotlivými druhy jitrocele (zvláště pak, zda budou rozdíly mezi halofytními druhy a druhem glykofytním). V rostlinách *P. eriopoda* a *P. maritima* je na médiích se sacharózou a sorbitolem vyšší celkový obsah sacharidů než u *P. lanceolata*. Tyto výsledky jsou v souladu s experimentem (Al Hassan et al., 2016), kde kontrolní rostliny halofytů (*P. crassifolia* a *P. coronopus*) obsahovaly větší celkové množství sacharidů oproti glykofytnímu druhu (*P. major*). Spektrum obsahuje stejné typy sacharidů na médiu se sacharózou i sorbitolem, tedy rostliny, které využívají sacharózu jako výlučný zdroj energie efektivně syntetizují a hromadí sorbitol a naopak. Kořeny naopak vykazují opačný trend, který však není v literatuře nikde zdokumentován. V této fázi byl pro další experimenty z halofytních druhů vybrán *P. maritima* z důvodů větší podobnosti celkového habitu rostliny (užší listy) s glykofytním druhem *P. lanceolata* pro snadnější porovnávání růstových parametrů, a z důvodů nutné redukce vzorků, kvůli časové limitaci při měření sacharidů na HPLC.

Překvapivý byl pozorovaný, byť minimální, růst kultur na manitolu jako jediném zdroji uhlíku a energie. Pro ověření, zda rostliny jitrocele nejsou schopny alespoň částečně fotosyntetizovat, a tedy tento minimální růst dotovat bez využití manitolu, byla do experimentu zařazena varianta, kdy byly rostliny přesazeny na média bez přídavku jakéhokoli sacharidu. I u této varianty jsou pozorovány přírůstky, ale vzhled rostlin je výrazně ovlivněn, jsou světlejší a s minimem kořenů. Jako vysvětlení přírůstku se nabízí dvě možné varianty. První je, že si rostliny po třech týdnech od vyklíčení dokáží udělat dostačující zásoby sacharidů pro následný růst (klíčení na médiu s 3% sacharózou) a při přesazení na média bez sacharidového zdroje těchto zásob využívají. Pravděpodobně by ale muselo dojít za delší dobu k vyčerpání těchto omezených zdrojů. Ale po dobu mého experimentu (30 dní) k úplnému zastavení růstu nedošlo. V rostlinách

byl nicméně detekován pouze minimální obsah sacharidů, u všech tří druhů jitrocele jsou hexózy přítomné pouze v zanedbatelných množstvích, podíl sorbitolu v sacharidovém spektru je o něco vyšší než je tomu u hexóz, obsah sacharózy pro obsahy na limitu detekce nebylo možné spočítat. Největší složkou sacharidového spektra je frakce RTOS. Druhou a pravděpodobnější možností, proč dochází k přírůstkům rostlin jitrocele na médiu bez přidání sacharidu, je určitá schopnost fotosyntézy a větší výměna vzduchu mezi mikroklimatem v baňce a vnějším prostředím než jak bylo původně předpokládáno z důkazů u jiných rostlin (např. Shin et al., 2013). Nebo se může jednat o kombinaci obou těchto možností. Pro ověření, jak reagují rostliny jitrocele na plně fotoautotrofní kultivaci byly použity víčka Sun cap. Rostliny jsou díky výměně vzduchu přes filtry schopny fotosyntetizovat, K nárůstu čerstvé hmotnosti však dochází jen u rostlin *P. lanceolata* a *P. eriopoda*, kde je růst srovnatelný na médiu se sorbitolem (u *P. lanceolata* i se sacharózou), rostliny *P. maritima* na tento způsob kultivace nereagují srovnatelným způsobem.

Manitol není vhodným zdrojem energie ani pro jeden druh jitrocele. Manitol se chová jako penetrující osmotikum. Pro metabolismus manitolu pravděpodobně nemají rostliny jitrocele vyvinutý enzymatický aparát a nemají tedy možnost jej využít i přes to, že je strukturně podobný se sorbitolem. Strukturní podobnost se projevuje například při nízké specifitě transportérů pro sorbitol (PmPLT1 a PmPLT2), které dokáží transportovat i manitol (Watari et al., 2004). Je viditelný negativní trend akumulace čerstvé hmotnosti prýtů všech tří druhů jitrocele na médiu s manitolem. Přírůstky jsou pravděpodobně dány především akumulací manitolu v prýtech nebo opět minimálními sacharidovými zásobami (viz předchozí odstavec). Akumulace je viditelná na výsledcích obsahu a spektra endogenních sacharidů, kde manitol u *P. maritima* i *P. lanceolata* navyšuje celkový obsah sacharidů a tvoří přibližně 60-70 % sacharidového spektra. Růst kořenů je na médiu s manitolem zcela nulový. Obsah sacharidů (bez manitolu) (u *P. eriopoda* a *P. maritima*) přibližně odpovídá variantám rostoucím na médiu bez přidání sacharidu pod alobalem. Z těchto poznatků lze uzavřít, že manitol neovlivňuje významným způsobem energetickou bilanci rostlin jitrocele a může být využit jako penetrující osmotikum pro podobné typy experimentů.

5.3. Vliv zasolení, chladu a kombinovaného stresu

Vliv zasolení na různé druhy jitrocele, ať už halofytní nebo glykofytní, je v literatuře poměrně často popisován, avšak ne se zcela jednotnými závěry (např. Ahmad et al., 1979; Erdei and Kuiper, 1979; Konigshofer; 1983; Koyro, 2006; Gil et al., 2011; Al Hassan et al., 2016).

Růst všech glykofytů a většiny halofytů je optimální v nepřítomnosti stresu zasolení. V podmínkách zasolení je však růst ovlivněn více u glykofytů. Výsledky mé práce vedou k podobnému závěru - glykofytní druh *P. lanceolata* byl testovanými abiotickými stresy obvykle ovlivněn více než halofytní druh *P. maritima*.

Při porovnávání dvou halofytních druhů *P. maritima* a *P. coronopus* s glykofytním druhem *P. media* bylo zjištěno veliké rozdíly ve schopnosti přežít při zvyšujícím se zasolení. *P. maritima* se v tomto experimentu ukázal jako velmi odolný druh, který byl stále schopen růstu při 300 mM NaCl (Erdei and Kuiper, 1979). *P. maritima* v mých experimentech byl schopen bezproblémového růstu při 200 mM NaCl, bez ovlivnění růstových parametrů. V diskutované práci ale druhý halofytní druh *P. coronopus* nepřežil koncentrace soli vyšší než 150 mM NaCl. Velmi citlivý druh *P. media* však nedokázal růst ani při 75 mM NaCl (Erdei and Kuiper, 1979). Jiný druh, který je považován za glykofytní, *P. major*, dokázal přežít i velmi vysoké koncentrace (do 800 mM NaCl). Oproti dvěma typickým halofytním druhům (*P. crassifolia* a *P. coronopus*) ale vykazoval už při 200 mM NaCl výrazné snížení čerstvé hmotnosti. Hmotnost při 200 mM NaCl odpovídala pouze 30 % hmotnosti kontrolní rostliny. Při vyšších koncentracích NaCl se pak čerstvá hmotnost dále dramaticky nesnižuje (Al Hassan, et al. 2016). V mých výsledcích není čerstvá hmotnost ani hmotnost sušiny halofytního druhu jitrocele *P. maritima* ovlivněna ani 100 mM, ani 200 mM NaCl, což odpovídá výše diskutovaným experimentům. U glykofytního druhu *P. lanceolata* byly zaznamenány rozdíly po 14 dnech působení 200 mM NaCl, kdy docházelo ke snížení čerstvé hmotnosti. Odolnost *P. lanceolata* by tedy mohla být srovnatelná s *P. major*, na rozdíl od *P. media*, které je výrazněji citlivější.

Práce uvedené v prvním odstavci této kapitoly, ve kterých byl hodnocen sacharidový metabolismus, se shodují v tom, že zvyšující se koncentrace soli v médiu či v půdě znamenají vyšší akumulace sorbitolu v halofytních druzích jitrocele. Pro halofyty byly obdobné výsledky dosaženy i v mých experimentech. V prýtech *P. maritima* se obsah sorbitolu při zasolení zvyšoval. Bylo však zjištěno, že se obsah sorbitolu zvyšoval i v rostlinách glykofytního druhu *P. lanceolata*. Při koncentracích 100 i 200 mM NaCl byl pozorován signifikantní nárůst obsahu sorbitolu v prýtech. V práci (Al Hassan et al., 2016) jsou publikovány výsledky, kde se obsah sorbitolu ani obsah celkových sacharidů spolu se vzrůstající koncentrací soli u glykofytního druhu *P. major* neliší. Naopak v kořenech jsem nepopsala žádné změny v obsahu sorbitolu ani u jednoho druhu nedochází. V mých experimentech byl pozorován v kořenech trend ke zvýšení obsahu frakce RTOS při vyšších koncentracích NaCl.

Součástí mého experimentu byly i varianty, kdy na rostliny obou druhů bylo působeno sníženou teplotou v období temné periody (tzv. noční chlad). Rostliny *P. maritima* a

P. lanceolata byly vystaveny nočnímu chladu 10 °C po dobu tří dnů. Působení chladu po tři noci pravděpodobně pro rostliny jitrocele nepředstavuje výraznější zatížení. Růstové parametry nebyly chladem ani u jednoho druhu významně ovlivněny, pouze u rostlin *P. maritima* je možné vidět negativní trend akumulace biomasy oproti kontrolní variantě. Rozšíření *P. maritima* je široké, avšak nejčastěji vyhledává stanoviště blízko moře nebo v okolí minerálních pramenů a slanisek, kde se teplota udržuje stabilní a neklesá k nule. V dostupné literatuře byl popsán pouze vliv teploty na klíčení semen *P. maritima*. Klíčivost je výrazně ovlivněna v teplotách mezi 7 a 11 °C, kdy dosahuje pouze 0-30 %. Kolem 90 % klíčivosti je dosaženo v teplotách mezi 17 a 21 °C (Arnold, 1972). Informace o ovlivnění obsahu sacharidů nebo sacharidového spektra u tohoto druhu jitrocele při chladu jsou nedostatečné. V mých experimentech nedošlo k ovlivnění sacharidů v kořenech, v prýtech byl pozorován signifikantní pokles obsahu sorbitolu po třech dnech chladu. Vliv chladu na rostliny *P. lanceolata* je ještě mírnější. Kontrolní rostliny se od chladem ošetřených lišily minimálně. Odlišných výsledků dosáhli (Smakman and Hofstra, 1982), kde byl růst prýtu i kořenů ve 13 °C *P. lanceolata* výrazně snížený oproti kontrolním rostlinám rostoucích při 21 °C. Zároveň se jak v kořenech, tak v prýtech zvýšil obsah rozpustných sacharidů, v mých výsledcích v prýtech k signifikantní změně po třech dnech nedošlo, v kořenech byl pozorován naopak klesající trend celkového množství sacharidů a signifikantní pokles množství sorbitolu. Odlišné výsledky mohou být způsobeny odlišným uspořádáním experimentů. Ve výše popsaném experimentu byly rostliny vystaveny chladu po dobu celých deseti dní. Můj experiment trval pouze tři noci, takže je možné, že při delším působením chladu by se více prohlubovaly rozdíly.

Kombinace zasolení spolu s nízkými teplotami ovlivňuje růstové parametry spíše halofytního druhu *P. maritima*. Čerstvá hmotnost varianty rostoucí na 200 mM NaCl, na kterou je působeno 3 dny nočním chladem, je snížena přibližně na polovinu kontrolní varianty. Zatímco u *P. lanceolata* je zachován podobný pokles čerstvých hmotností jako při působení samotného zasolení. V obsahu sacharidů u *P. maritima* je možné pozorovat trend snižujícího obsahu celkových sacharidů 3 den působení kombinovaného stresu oproti variantám vystavených pouze zasolení. Zdá se tedy, že nelze se stoprocentní jistotou v mých experimentech tvrdit, že reakce na kombinovaný stres není pouhým součtem reakcí jednotlivých stresů a pro potvrzení by bylo nutné déle trvajících experimentů. Nepodařilo se mi dohledat žádné práce, které by se týkaly jitrocele v souvislosti s kombinovaným stresem, ani kombinace chladu a zasolení není dostatečně prozkoumaným tématem.

5.4. Osmotický stres

Pro vyvolání osmotického stresu bez zatížení rostlin zvýšenými koncentracemi iontů, jako je tomu u zasolení, byl pro experimenty použit PEG 4000 (o molekulové hmotnosti přibližně 4000). PEG funguje jako nepenetrující osmotikum a znesnadňuje rostlinám příjem vody. Ovlivnění jitrocele suchem není příliš častým tématem vědeckých publikací, hlavním zájmem je zasolení. Ovlivnění suchem bylo zjišťováno pouze u *P. major*, kde byl sledován vliv sucha na fotosyntézu. Při nižších vodních potenciálech půdy docházelo ke snižování rychlosti čisté fotosyntézy (Mudrik et al., 2003). První den v mých experimentech nebyla pozorovatelná žádná akutní reakce (na úrovni ovlivnění růstových parametrů ani sacharidového metabolismu) na osmotický stres ani u jednoho druhu jitrocele. Celkem překvapivě byly zjištěny signifikantní rozdíly třetí den u halofytního druhu *P. maritima*, u kterého dochází k poklesu čerstvé hmotnosti i hmotnosti sušiny na médiu s 6% PEG oproti kontrole. Rozdíly v růstových charakteristikách zjištěné 14. den v reakci na měnící se PEG jsou opět mezi oběma druhy jitrocele srovnatelné. Stejně tak jako u ovlivnění růstových parametrů, nedochází ani ke změnám v sacharidovém spektru a obsahu sacharidů 1. den vystavení PEG. Reakce i v pozdějších dnech vystavení PEG jsou velmi podobné u obou druhů jitrocele. Po 14. dnech dochází k významnému nárůstu obsahu sorbitolu na 6 % PEG u obou druhů jitrocele. U *P. lanceolata* je tato změna doprovázena i celkovým zvýšením obsahu sacharidů v rostlině. U jiných druhů, kde je sorbitol také mezi hlavními produkty fotosyntézy, byl zjišťován vliv sucha na sacharidový metabolismus. Například u jabloně byl zvýšený obsah nestrukturních sacharidů pozorován po 15 dnech vystavení rostlin (*Malus domestica* Elstar) suchu. Za zvýšení obsahu sacharidů je z největší části zodpovědný sorbitol (Šircelj et al., 2005). Podobných výsledků dosáhli i Wang et al. (1995), kde byl pozorován zvýšený obsah sorbitolu v reakci na zvyšující se vodní deficit. Reakce jitrocele je tedy do určité míry podobná reakcím dalších druhů disponujícím sorbitolovým metabolismem.

5.5. Identifikace frakce RTOS

Podstatnou část sacharidového spektra *Plantago maritima* i *P. lanceolata* tvoří frakce v mé práci nazvaná "RTOS". Při měření na HPLC je retenční čas frakce mezi 10,0 a 13,5 minutou. Nejen, že se jedná o podstatnou složku sacharidového spektra, pravděpodobně se jedná i o důležitou složku stresové reakce, protože v experimentech, kde jsem se zabývala vlivem zasolení na sacharidový metabolismus, byl pozorován vzrůstající trend při ošetření s vyššími

koncentracemi soli i při kombinovaném stresu. Mírný (nesignifikantní) pokles byl zjištěn u obou druhů jitrocele v prýtech při působení nízkými teplotami. Retenční čas mezi 10 a 13,5 min je charakteristický pro oligosacharidy rafinózové řady. V publikaci (Janeček et al., 2011) se autoři zabývali sacharidovými zásobami v rostlinách lišících se preferencemi růstu buď na vlhké nebo suché louce. Do svého experimentálního materiálu zařadili i *Plantago lanceolata*. Zjistili, že v kořenech *P. lanceolata* se nachází velké množství RFO a sorbitolu. Jedná se vlastně o jediný důkaz přítomnosti RFO v kořenech v rodu *Plantago*. Ostatní důkazy o přítomnosti RFO v rostlinách jitrocele pochází ze studií zásobních látek semen, kde se vyskytuje trisacharid planteosa (Rohrer, 1972), který ovšem není řazen mezi tzv. tradiční sacharidy rafinózové řady, i když podobně jako v jejich případě se jedná o galaktosylovaný derivát sacharózy. Na základě vlastně jediného literárního zdroje o přítomnosti RFO u rodu *Plantago* jsem provedla experiment, kdy byl sacharidový extrakt, normálně použitý pro měření obsahu sacharidů na HPLC, inkubován s enzymem α -galaktosidázou. Stejný postup byl zvolen i ve výše popsané publikaci, kde byly identifikovány RFO v kořenech. Překvapivým výsledkem však bylo, že α -galaktosidáza v mém vzorku neodštěpila žádné galaktózové podjednotky. Pokus byl dvakrát zopakován, vždy se stejným výsledkem, kdy byly pozorovatelné pouze změny tvaru peaku mezi 10 a 13,3 min a změny způsobené přidáním acetátového pufru do vzorku. Na základě těchto výsledků však musela být zamítnuta hypotéza, že frakce RTOS obsahuje sacharidy rafinózové řady. Můj experiment a experiment (Janeček et al., 2011) se lišil způsobem měření sacharidů a měřícím systémem (HPAE-PAD - vysoceúčinná aniontová chromatografie s pulzně-amperometrickou detekcí). Dalším možným způsobem přiblížení se k identifikaci frakci RTOS byla inkubace vzorku s kyselou invertázou. Kyselá invertáza ve vzorku ale neodštěpila žádné monosacharidy, došlo ke změně peaků pro oligosacharidy okolo retenčního času 10,8 min. Kyselá invertáza mohla naštěpit oligosacharidy vyšších řádů, které není v nastavených parametrech systému HPLC možné detekovat. Těmito oligosacharidy vyšších řádů by mohly být fruktany, které invertáza dokáže štěpit. Kyselá invertáza dokáže rozštěpit vyšší fruktany na kratší molekuly ne však až na monosacharidy. Tuto reakci zprostředkovávají fruktosyltransferázy (Bonnett and Simpson, 1993; Avigad and Day, 1997). Kratší invertázou naštěpené fruktany by mohly být důvodem navýšení peaku v retenčním čase 10,8 min. V publikaci (Koyro, 2006) byla v kořenech *P. coronopus* detekována neznámá sloučenina, která reagovala na vysoké koncentrace soli. Zaujímalá až 30 % sacharidového spektra. Je možné, že v mých experimentech se jedná o stejnou sloučeninu, jako tomu bylo v tomto experimentu, a je možné, že se tato neznámá sloučenina vyskytuje v rostlinách jitrocele univerzálně napříč celým rodem. Dále se budu věnovat identifikaci této sloučeniny (frakce) za využití speciálních kolon pro detekci

oligosacharidů i biochemickými metodami založenými na částečné či plné hydrolyze oligosacharidů.

5.6. Změny v obsahu prolinu v reakci na zasolení

Jak jsem se již zmínila v literárním úvodu, situace kolem kompatibilních solutů fungujících při abiotickém stresu v jitroceli není zcela vyjasněna a stále se kromě sorbitolu uvažuje i s prolinem jakožto využívaným kompatibilním solutem rostlinami z rodu *Plantago*. V důsledku těchto rozporů jsem provedla orientační experiment zaměřený na obsah prolinu v rostlinách *P. maritima* a *P. lanceolata* při zasolení. Výsledky i přes to, že nejsou signifikantní, ukazují trend vzrůstu obsahu prolinu u zasolení vystavených rostlin jitrocele. Zvyšující se trend obsahu prolinu je markantnější u *P. lanceolata*. Rozdíl v obsahu prolinu mezi halofytními a glykofytními druhy jitrocele je popsán i v dostupné literatuře. U *P. maritima* prolin není významnější sloučeninou, jejíž obsah by se výrazněji reagoval v reakci rostlin na stres (Stewart and Lee, 1974). Stejně tak i v práci (Ahmad et al., 1978) se množství prolinu při zasolení u *P. maritima* výrazně nemění. Z grafu v článku lze vyčíst pouze mírně zvýšený nárůst prolinu v koncentracích okolo 100 mM NaCl. Při vyšších koncentracích (nad 200 mM NaCl) obsah prolinu klesal, dokonce i pod hodnoty kontrolní varianty. U jiného halofytního druhu *P. crassifolia* jsou výsledky velmi rozporuplné a není zcela vyjasněno, zda je prolin hlavní sloučeninou, která reaguje na zvyšující se zasolení (Vicente et al., 2004; Vicente et al., 2005; Gil et al., 2011; Al Hassan et al., 2016). V recentně publikovaném článku (Al Hassan et al., 2016) jsou získané výsledky opačné oproti mým. Při porovnání glykofytních a halofytních druhů jitrocele bylo zjištěno, že pouze halofyty (*P. crassifolia*, *P. coronopus*) akumulovaly prolin, zatímco glykofytní druh (*P. major*) nikoli. Výrazně se ale liší koncentrace NaCl, při kterých bylo těchto výsledků dosaženo. Já jsem pracovala s koncentracemi NaCl 100 a 200 mM, v této práci jsou výrazné akumulace prolinu u halofytních druhů pozorovány až při koncentracích 600 a 800 mM NaCl.

6. Závěry

- Efektivního vegetativního množení bylo dosaženo bez růstových regulátorů z kořenových segmentů, jedná se o velmi snadný způsob získání velkého množství klonálních rostlin. Z důvodů časové náročnosti, však nebylo v této práci dále využíváno.
- Sorbitol a sacharóza jsou srovnatelnými zdroji energie u všech druhů jitrocele *P. eriopoda*, *P. maritima* i *P. lanceolata*. Halofytní druhy (*P. eriopoda* a *P. maritima*) obsahují celkově vyšší množství rozpustných sacharidů při růstu na médiu s 3% sacharózou a s 3% sorbitolem než glykofytní druh (*P. lanceolata*).
- Manitol, i přes strukturní podobnost se sorbitolem, není vhodným zdrojem energie a uhlíku. V rostlinách se akumuluje a není pravděpodobně dále využíván.
- Glykofytní druh jitrocele citlivěji reaguje na zasolení, zasolení v koncentracích 200 mM NaCl omezuje glykofytnímu druhu růst.
- Zasolení způsobuje jak v halofytním, tak glykofytním druhu akumulaci sorbitolu v prýtech, akumulace sorbitolu je při 200 mM NaCl doprovázena zvýšením i celkového množství sacharidů u obou druhů.
- Při chladu je zaznamenán pokles obsahu sorbitolu v prýtech u halofytního druhu.
- Osmotický stres při použití PEG 4000 (6%) dříve ovlivňuje halofytní druh (již po třech dnech snížení čerstvé hmotnosti), po 14 dnech je ovlivnění PEG shodné u halofytního i glykofytního druhu.
- Dlouhodobé působení PEG (6%) způsobilo u obou druhů zvýšení obsahu sorbitolu, u glykofytního druhu je zvýšení obsahu sorbitolu doprovázeno i zvýšením celkového množství rozpustných sacharidů.
- Účast prolinu při reakci jak halofytního, tak glykofytního druhu na abiotický stres (zasolení) nelze signifikantně potvrdit, je však velmi pravděpodobné u obou druhů jitrocele.

7. Seznam literatury

Aguayo, M. F., Ampuero, D., Mandujano, P., Parada, R., Muñoz, R., Gallart, M., Altabella, T., Cabrera, R., Stange, C. & Handford, M. (2013). Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 205-206, 63–75.

Aguayo, M. F., Cáceres, J. C., Fuentealba, M., Muñoz, R., Stange, C., Cabrera, R. & Handford, M. (2015). Polyol specificity of recombinant *Arabidopsis thaliana* sorbitol dehydrogenase studied by enzyme kinetics and in silico modeling. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-11.

Ahmad, I., Larher, F. & Stewart G. R. (1979). Sorbitol, a compatible osmotic solute in *Plantago maritima*. *New Phytologist*, 82, 671-678.

Ahmed, I. M., Dai, H., Zheng, W., Cao, F., Zhang, G., Sun, D. & Wu, F. (2013). Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63, 49-60.

Al Hassan, M., Pacurar, A., López-Gresa, M. P., Donat-Torres, M. P. & Llinares J.V. (2016) Effects of Salt Stress on Three Ecologically Distinct *Plantago* Species. *PLOS ONE*, 11.

Ali, Q., Ashraf, M., Shahbaz, M. & Humera, H. (2008). Ameliorating effect of foliar applied proline on nutrient uptake in water stressed maize (*Zea mays* L.) plants. *Pakistan Journal of Botany*, 40, 211–9.

Arnold, S. (1973). Interactions of Light and Temperature on the Germination of *Plantago maritima* L. *The New Phytologist*, 72, 583-593.

Avigad, G. & Dey, P. M. (2000). “Carbohydrate Metabolism: Storage Carbohydrates”. In: P. M. Dey and J. B. Harborne, Eds., *Plant Biochemistry*, Academic Press, 143-203.

Bachmann, M., & Keller, F. (1995). Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. – intercellular and intracellular compartmentation. *Plant Physiology*, 109, 991-998.

Bates, L.S., Waldren, R.P. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39, 205-207.

Bilavcik, A., Zamecnik, J., Grospietsch, M., Faltus M., & Jadrna, P. (2012). Dormancy development during cold hardening of in vitro cultured *Malus domestica* Borkh. plants in relation to their frost resistance and cryotolerance. *Trees*, 26, 1181–1192.

Bonnett, G. D. & Simpson, R. J. (1993). Fructan exohydrolase from grasses. *New Phytologist*, 123, 453–469.

Carrillo, G., Troch, P. A., Sivapalan, M., Wagener, T., Harman, C., & Sawicz, K. (2011). Catchment classification: hydrological analysis of catchment behavior through process-based modeling along a climate gradient. *Hydrology and Earth System Sciences*, 15, 3411-3430.

- Chiang, H.-H. & Dadekar, A. M. (1995). Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant, Cell & Environment*, 18, 1280–1290.
- Choudhary, N. L., Sairam, R. K., & Tyagi, A. (2005). Expression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 42, 366-370.
- Csonka, L. N., Gelvin, S. B., Goodner, B. W., Orser, C. S., Siemieniak, D., & Slightom, J. L. (1988). Nucleotide sequence of a mutation in the proB gene of *Escherichia coli* that confers proline overproduction and enhanced tolerance to osmotic stress. *Gene*, 64, 199-205.
- Csonka, L. N., & Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology*, 45, 569-606.
- Cui, S.M., Chen, G. L. & Nii, N. (2003). Effects of water stress on sorbitol production and anatomical changes in the nuclei of leaf and root cells of young loquat trees. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 72, 359-365.
- Cui, S.M., Sadayoshi, K., Ogawa, Y. & Nii, N. (2004). Effects of water stress on sorbitol content in leaves and roots, anatomical changes in cell nuclei, and starch accumulation in leaves of young peach trees. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 73, 25- 30.
- Cuin, T.A., Shabala, S. (2007). Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell and Environment*, 30, 875–885.
- Cvikrová M, Gemperlová L, Dobrá J, Martincová O, Práčil I, Gubiš J. (2012). Effect of heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. *Plant Science*, 182, 49-58.
- de Sousa, S. M., Paniago Mdel, G., Arruda, P., & Yunes, J. A. (2008). Sugar levels modulate sorbitol dehydrogenase expression in maize. *Plant Molecular Biology*, 68, 203-213.
- Deguchi, M., Saeki, H., Ohkawa, W., Kanahama, K., & Kanayama, Y. (2002). Effect of low temperature on sorbitol biosynthesis in peach leaves. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 71, 446- 448.
- Delauney, A. J. and Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, 4, 215-223.
- Deuschle, K., Funck, D., Forlani, G., Stransky, H., Biehl, A., Leister, D., Graaff, E., Kunze, R., Frommer, W. B. (2004). The Role of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase in Proline Degradation. *The Plant Cell*, 16, 3413-3425.
- Doehlert, D. C. (1987). Ketose reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiology*, 84, 830-834.

- Erdei, L. & Kuiper, P. J. C. (1979). The effect of salinity on growth, cation content, Na-uptake and translocation in salt-sensitive and salt-tolerant *Plantago species*. *Plant Physiology*, 47, 95-99.
- Fons, F., Gargadennec, A. & Rapior, S. (2008). Culture of *Plantago species* as bioactive components resources: a 20-year review and recent applications. *Acta Botanica Gallica*, 155, 277-300.
- Gao, Z., Maurousset, L., Lemoine, R., Yoo, S.-D., van Nocker, S., & Loescher, W. (2003). Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiology*, 131, 1566–1575.
- Gao, Z., Jayanty, S., Beaudry, R., & Loescher, W. (2005). Sorbitol Transporter Expression in Apple Sink Tissues : Implications for Fruit Sugar Accumulation and Watercore Development. *Journal of the American Society Horticultural Science*, 130, 261–268.
- Gerrits, N., Turk, S. C., van Dun, K. P., Hulleman, S. H., Visser, R. G., Weisbeek, P. J., & Smeekens, S. C. (2001). Sucrose metabolism in plastids. *Plant Physiology*, 125, 926-934.
- Gil, R., Lull, C., Boscaiu, M., Bautista, I., Lidón, A., & Vicente, O. (2011). Soluble Carbohydrates as Osmolytes in Several Halophytes from a Mediterranean Salt Marsh. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 39, 9-17.
- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J., & Hincha, D. K. (2008). Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 132, 220-235.
- Hoque, M.A., Banu, M.N.A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. & Murata, Y. (2008). Proline and glycine betaine enhance antioxidant defense and methyl glyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*, 165, 813-824.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., & Verma, D. P. S. (2000). Removal of Feedback Inhibition of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Results in Increased Proline Accumulation and Protection of Plants from Osmotic Stress. *Plant Physiology*, 122, 1129-1136.
- Ito, A., Sugiura, T., Sakamoto, D., & Moriguchi, T. (2013). Effects of dormancy progression and low-temperature response on changes in the sorbitol concentration in xylem sap of Japanese pear during winter season. *Tree Physiology*, 33, 398-408.
- Iyer, N. J., Tang, Y., & Mahalingam, R. (2013). Physiological, biochemical and molecular responses to a combination of drought and ozone in *Medicago truncatula*. *Plant, Cell & Environment*, 36, 706-720.
- Janeček, Š., Lanta, V., Klimešová, J. & Doležal, J. (2011). Effect of abandonment and plant classification on carbohydrate reserves of meadow plants. *Plant Biology* 13, 243-251.
- Jia, Y., Wong, D. C., Sweetman, C., Bruning, J. B., & Ford, C. M. (2015). New insights into the evolutionary history of plant sorbitol dehydrogenase. *BMC Plant Biology*, 15, 1-23.

- Kandler, O. & Hopf, H. (1982). "Oligosaccharides based on sucrose (sucrosyl oligosaccharides)". In: Loewus, F.A., Tanner, W., Eds., *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, 348-383.
- Kavi Kishor, P. B., & Sreenivasulu, N. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant, Cell & Environment*, 37, 300-311.
- Klages, K., Donnison, H., Wunsche, J. & Boldingh, H. (2001). Diurnal changes in nonstructural carbohydrates in leaves, phloem exudate and fruit in 'Braeburn' apple. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28, 131-139.
- Klepek, Y.-S., Geiger, D., Stadler, R., Klebl, F., Landouar-Arsivaud, L., Lemoine, R., Hedrich R. & Sauer, N. (2005). Arabidopsis POLYOL TRANSPORTERS, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺-Symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *The Plant Cell*, 17, 204-218.
- 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, H.W. (2006). Effect on salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). *Environmental and Experimental Botany*, 56, 136-146.
- Kuo, T. M., Doehlert, D. C., & Crawford, C. G. (1990). Sugar Metabolism in Germinating Soybean Seeds: Evidence for the Sorbitol Pathway in Soybean Axes. *Plant Physiology*, 93, 1514-1520.
- Li, F., Lei, H., Zhao, X., Shen, X., Liu, A., & Li, T. (2012). Isolation and characterization of two sorbitol transporter gene promoters in micropropagated apple plants (*Malus × domestica*) regulated by drought stress. *Plant Growth Regulation*, 68, 475-482.
- Lo Bianco, R., Rieger, M. & Sung, S.S. (2000). Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach. *Physiologia Plantarum*, 108, 71-78.
- Lunn, J.E. & MacRae, E. (2003). New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 208-214.
- Lyons, J. M., Wheaton, T. A. & Pratt, H. K. (1964). Relationship between the Physical Nature of Mitochondrial Membranes and Chilling Sensitivity in Plants. *Plant Physiology*, 39, 262-268.
- Malone, J. I., Knox, G., Benford, S., & Tedesco, T. A. (1980). Red cell sorbitol: an indicator of diabetic control. *Diabetes*, 29, 861-864.
- Makowczyńska, J. & Andrzejewska-Golec, E. (2009). Micropropagation of *Plantago maritima* L. – a vanishing species in Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 78, 13-18.
- Mani, S., Van De Cotte, B., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (2002). Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 128, 73-83.

- Mauro, M. L., Trovato, M., De Paolis, A., Gallelli, A., Constantino, P. & Altamura, M. M. (1996). The plant oncogene rolD stimulates flowering in transgenic tobacco plants. *Developmental Biology*, 180, 693-700.
- Mishra, S. & Dubey, R. S. (2006). Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. *Journal of Plant Physiology*, 163, 927-936.
- Mudrik, V., Kosobrukhov, A., Knyazeva, I., & Pigulevskaya, T. (2003). Changes in the photosynthetic characteristics of *Plantago major* plants caused by soil drought stress. *Plant Growth Regulation*, 40, 1-6.
- Munns, R., Goyal, S., & Passioura, J. (2004). Salinity stress and its mitigation. *Plant Stress Website*, Blum A. (ed). <http://www.plantstress.com/articles/index.asp>
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Murata, N., Los, D.A. (1997). Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiology*, 115, 875-879.
- Nanjo, T., Fujita, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., & Shinozaki, K. (2003). Toxicity of free proline revealed in an arabidopsis T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant and Cell Physiology*, 44, 541-548.
- Negm, F.B. & Loescher, W.H. (1981). Characterization and partial purification of aldose- 6-phosphate reductase (alditol-6-phosphate: NADP 1-oxidoreductase) from apple leaves, *Plant Physiology*, 67, 139-142.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y. & Shigeoka, S. (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*, 147, 1251- 1263.
- Noiraud, N., Maurousset, L., & Lemoine, R. (2001). Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 717-728.
- Nosarzewski, M., Downie, A.B., Wu, B. & Archbold D.D. (2012). The role of sorbitol dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 39, 462-470.
- Ohta, K., Moriguchi, R., Kanahama, K., Yamaki, S. & Kanayama, Y. (2005). Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. *Phytochemistry*, 66, 2822-2828.
- Ozgun, R., Uzilday, B., Sekmen, A.H. & Turkan, I. (2013). Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. *Functional Plant Biology*, 40, 832-847.

- Pacurar, A., Al Hasan, M., Gaspar, A., Boscaiu, M. & Vicente, O. (2013). Stress-induced accumulation of osmoprotectants in four *Plantago* species. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Horticulture*, 70, 255-256.
- Parre, E., Ghars, M. A., Leprince, A.-S., Thiery, L., Lefebvre, D., Bordenave, M., Mazars, C., Abdelly, C. & Saviouré, A. (2007). Calcium Signaling via Phospholipase C Is Essential for Proline Accumulation upon Ionic But Not Nonionic Hyperosmotic Stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 144, 503-512.
- Pauly T., Ekstrom J., Beebe D., Chrnyk B., Cunningham D. & Griffor M. (2003). Xray crystallographic and kinetic studies of human sorbitol dehydrogenase. *Structure*, 11, 1071-1085.
- Peshev, D., Vergauwen, R., Moglia, A., Hideg, E., & Van den Ende, W. (2013). Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *Journal of Experimental Botany*, 64, 1025-1038.
- Pommerrenig, B., Papini-Terzi, F. S., & Sauer, N. (2007). Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant Physiology*, 144, 1029-1038.
- Ramsperger-Gleixner, M., Geiger, D., Hedrich, R., & Sauer, N. (2004). Differential expression of sucrose transporter and polyol transporter genes during maturation of common plantain companion cells. *Plant Physiology*, 134, 147-160.
- Rasmussen, S., Barah, P., Suarez-Rodriguez, M.C., Bressendorff, S., Friis, P., Costantino, P., Bones, A.M., Nielsen, H.B. & Mundy, J. (2013). Transcriptome Responses to Combinations of Stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 161, 1783-1794.
- Reidel, E. J., Rennie, E. a, Amiard, V., Cheng, L., & Turgeon, R. (2009). Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiology*, 149, 1601-1608.
- Rejšková, A., Patková, L., Stodůlková, E. & Lipavská, H. (2007). The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *Journal of Plant Physiology*, 164, 174-184.
- Rivero, R. M., Mestre, T. C., Mittler, R., Rubio, F., Garcia-Sanchez, F., & Martinez, V. (2014). The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant, Cell & Environment*, 37, 1059-1073.
- 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.
- Roy, D., Basu, N., Bhunia, A., & Banerjee, S. K. (1993). Counteraction of exogenous L-proline with NaCl in salt-sensitive cultivar of rice. *Biologia Plantarum*, 35, 69-72.

- Sauer, N. (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters*, 581, 2309-2317.
- Sewelam, N., Oshima, Y., Mitsuda, N., & Ohme-Takagi, M. (2014). A step towards understanding plant responses to multiple environmental stresses: a genome-wide study. *Plant, Cell & Environment*, 37, 2024-2035.
- Sircelj, H., Tausz, M., Grill, D. & Batic, F. (2005). Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. *Journal of Plant Physiology*, 162, 1308-1318.
- Shin, K., Park, S. & Paek, K. (2013). Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of *in vitro* plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 49, 445-454.
- Smakman, G. & Rinie, J., H. (1982). Energy metabolism of *Plantago lanceolata*, as affected by change in root temperature. *Physiologia Plantarum*, 56, 33–37.
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28, 1057-1060.
- Sprenger, N. & Keller, F. (2000). Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: The roles of two distinct galactinol synthases. *Plant Journal*, 21, 249-258.
- Stewart, G. R., & Lee, J. A. (1974). The role of proline accumulation in halophytes. *Planta*, 120, 279-289.
- Strand, A., Foyer, C.H., Gustafsson, P., Gardestrom, P. & Hurry, V. (2003). Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant Cell & Environment*, 26, 523-535.
- Sun, C. X., Li, M. Q., Gao, X. X., Liu, L. N., Wu, X. F. & Zhou, J. H. (2016). Metabolic response of maize plants to multi-factorial abiotic stresses. *Journal of Plant Biology*, 18, 120–129.
- Suzuki, Y., Odanaka, S. & Kanayama, Y. (2001). Fructose content and fructose-related enzyme activity during the fruit development of apple and Japanese pear. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 70, 16-20.
- Suzuki, Y., & Dandekar, A. M. (2014). Sucrose induces expression of the sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene in source leaves of loquat. *Physiologia Plantarum*, 150, 355-362.
- Szarka, A., Horemans, N., Passarella, S., Tarcsay, Á., Örsi, F., Salgó, A., & Bánhegyi, G. (2008). Demonstration of an intramitochondrial invertase activity and the corresponding sugar transporters of the inner mitochondrial membrane in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Planta*, 228, 765-775.

- Székely, G., Abraham, E., Cseplo, A., Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., Koncz, C. & Szabados, L. (2008). Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal*, 53, 11-28.
- Szoke, A., Miao, G. H., Hong, Z., & Verma, D. P. (1992). Subcellular location of delta-pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. *Plant Physiology*, 99, 1642-1649.
- Tipirdamaz, R., Gagneul, D., Duhaze, C., Ainouche, A., Monnier, C., Ozkum, D. & Larher, F. (2006). Clustering of halophytes from an inland salt marsh in Turkey according to their ability to accumulate sodium and nitrogenous osmolytes. *Environmental and Experimental Botany*, 57, 139-153.
- Verbruggen, N., Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35, 753-759.
- Verslues, P. E., Kim, Y. S., & Zhu, J. K. (2007). Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate: glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant Molecular Biology*, 64, 205-217.
- Vicente, O., Boscaiu, M., Naranjo, M. Á., Estrelles, E., Bellés, J. M., & Soriano, P. (2004). Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). *Journal of Arid Environments*, 58, 463-481.
- Wang, Z., Quebedeaux, B. & Stutte, G.W. (1995). Osmotic Adjustment: Effect of Water Stress on Carbohydrates in Leaves, Stems and Roots of Apple. *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 747-754.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1-14.
- Wang, X. L., Hu, Z. Y., You, C. X., Kong, X. Z., & Shi, X. P. (2013). Subcellular localization and vacuolar targeting of sorbitol dehydrogenase in apple seed. *Plant Science*, 210, 36-45.
- Watari, J., Kobae, Y., Yamaki, S., Yamada, K., Toyofuku, K., Tabuchi, T., & Shiratake, K. (2004). Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves. *Plant & Cell Physiology*, 45, 1032–1041.
- Wei, X., Liu, F., Chen, C., Ma, F., & Li, M. (2014). The *Malus domestica* sugar transporter gene family: identifications based on genome and expression profiling related to the accumulation of fruit sugars. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1-15.
- Wind, J., Smeekens, S., & Hanson, J. (2010). Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry*, 71, 1610-1614.
- Yamada, K., Niwa N., Shiratake K., Yamaki S. (2001). cDNA cloning of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from peach fruit and its expression during fruit development. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76, 581–587.

Yancey, P.H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, 208, 2819–2830.

Yoshida, S., Hotsubo, K., Kawamura, Y., Murai, M., Arakawa, K., Takezawa, D. (1999). Alterations of intracellular pH in response to low temperature stresses. *Journal of Plant Research*, 112, 225-236.

Zimmermann, M. H. & Ziegler, H. (1975). “List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates”. In: Zimmermann, M. H., Milburn J. A., Eds., *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer, 480-503.

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