

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra botaniky a fyziologie rostlin



**Determinace senzitivních míst fotosyntézy během krátkodobého  
vodního deficitu po aplikaci osmoticky aktivních látek**

doktorská disertační práce

**Autor: Ing, Kamil Kraus**

**Školitel: doc. Ing. František Hnilička, Ph. D.**

**Praha 2023**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma **Determinace senzitivních míst fotosyntézy během krátkodobého vodního deficitu po aplikaci osmoticky aktivních látek**, vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Praze dne 27.02.2023

Podpis

.....

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval doc. Ing. Františkovi Hniličkovi, Ph.D. za odborné vedení a konzultace, které mi poskytl během celého studia a při psaní této doktorské disertační práce. Poděkování patří také Ing. Heleně Hniličkové, Ph.D. za cenné rady a připomínky. A v neposlední řadě děkuji všem členům katedry Botaniky a fyziologie rostlin za pomoc při mé činnosti na této práci. A samozřejmě je poděkovat rodičům za podporu a zázemí, které mi poskytovali během celého studia.

# Obsah

1	Úvod.....	6
2	Literární přehled.....	7
1.1	Definice stresu .....	7
2.1.1	Reakce na stres.....	10
2.2	Vybrané abiotické stresory .....	15
2.2.1	Sucho .....	16
2.2.2	Zasolení.....	17
2.3	Vodní deficit.....	19
2.3.1	Vliv vodního deficitu na fyziologický a metabolický stav rostlin.....	20
3	Cíle a hypotézy disertační práce .....	27
4	Metodika .....	28
4.1	Použité metody .....	28
4.1.1	Stanovení relativního obsahu vody v listech (RWC).....	28
4.1.2	Stanovení vodního potenciálu ( $\psi_w$ ).....	29
4.1.3	Gazometrické stanovení výměny plynů.....	29
4.1.4	Stanovení maximálního kvantového výtěžku PSII (Fv/Fm).....	31
4.1.5	Stanovení obsahu fotosynteticky aktivních pigmentů .....	31
4.1.6	Stanovení obsahu prolinu.....	32
4.1.7	Stanovení obsahu malondialdehydu (MDA) .....	33
5	Publikované práce .....	34
6	Souhrnná diskuse .....	87
6.1	Reakce fotosyntetického aparátu .....	87

6.2	Osmotické zatížení .....	91
6.3	Osmoprotektivní látky .....	94
6.4	Vliv na výnos.....	96
7	Závěr a doporučení .....	97
7.1	Závěrečná zhodnocení stanovených cílů a hypotéz.....	98
8	Seznam použité literatury .....	99

# 1 Úvod

Je obecně známo, že celková rozmanitost života na naší planetě je primárně založena na ekologickém základu, tvořeném převážně rostlinami. Pro obyvatele naší planety nejsou rostliny pouze obživou, ale i zdrojem léčiv. Mohou být využívány jako oděvní materiál, palivo, krmivo pro zvířata či případné hnojivo a v neposlední řadě je lze vnímat jako zdroj krásna.

Průměrný roční nárůst světově vypěstované biomasy se vlivem intenzivní práce v zemědělství pohybuje okolo 1,25 %. Nicméně se stále zvyšuje i náročnost na množství produkované biomasy, ať už z důvodu nárůstu počtu obyvatelstva, tak i stále se zmenšující výměře orné půdy. Neméně významně se na produkci biomasy podílí stále výraznější vlivy variability počasí. Nejen z těchto důvodů se klade stále vyšší důraz na vyšší výnosu jednotlivých plodin a samozřejmě i na kvalitu získané komodity.

Veškeré biotické i abiotické negativní vlivy působící na rostliny jsou nazývány jako stresor. Je zřejmé, že jedním z nejvýznamnějších abiotických stresorů je nedostatek vody pro rostlinu, který může být způsoben suchem nebo zasolením. Sucho jako takové je faktor ovlivňující kvalitu růstu rostlin v důsledku přímého vlivu na jejich primární metabolismus.

Vznikající riziko půdního sucha a následného vodního deficitu pro rostliny v důsledku změny klimatu jsou značným rizikem i pro Českou republiku (dále jen ČR). Srážky na území ČR jsou značně nevyrovnané jak v průběhu vegetace, tak i v průběhu roku. V rámci ČR jsou oblasti, u kterých hrozí dlouhodobé či trvalé sucho, a to především jižní Morava a Polabí. Z čehož vyplývá, že sucho může být jedním z nevýznamnějších stresorů na našem území. Vodním deficitem je ohroženo přibližně 1,7 % zemědělské půdy. Tímto rizikem může být v budoucnu zasaženo až 6,8 % celkové plochy ČR. Předpokládá se, že v roce 2050 by suchem mohlo být zasaženo až 20 % orné plochy ČR.

Z výše uvedeného se očekává snížení výnosů polních plodin. To spolu s nárůstem světové populace, kdy odhady k roku 2050 jsou 9 až 10 miliard obyvatel, poukazuje na problém se zajištěním dostatku zdrojů potravy pro světovou populaci a hospodářská zvířata. Tento problém bude stále náročnější ve všech oblastech zemědělské produkce.

## 2 Literární přehled

Vodní deficit (sucho) je jedním z nejvýznamnějších abiotických stresorů, a to v celosvětovém měřítku. Sucho je faktor ovlivňující produktivitu přirozených i uměle vytvořených ekosystémů a dále se podílí na biodiverzitě rostlinných i živočišných druhů, sekvestraci uhlíku a s ní spojených dějů (Boyer et al., 2008a; Zivcak et al., 2013).

Výsledek současných změn klimatu představuje nedostatek vody, který je velmi diskutovaným tématem. Dá se předpokládat, že tento nedostatek bude mít čím dál významnější vliv i v oblastech, ve kterých tento problém doposud nebyl zaznamenán. Z pohledu zemědělské produkce je nejrizikovějším vnějším faktorem právě vodní deficit, kdy v rámci naší planety je cca 61 % ploch se srážkami nižšími než 500 mm za rok. Podle jiných odhadů se jedná o méně než 10 % veškeré světové plochy orné půdy, která není zasažena suchem či zasolením (Brázdil, 2015).

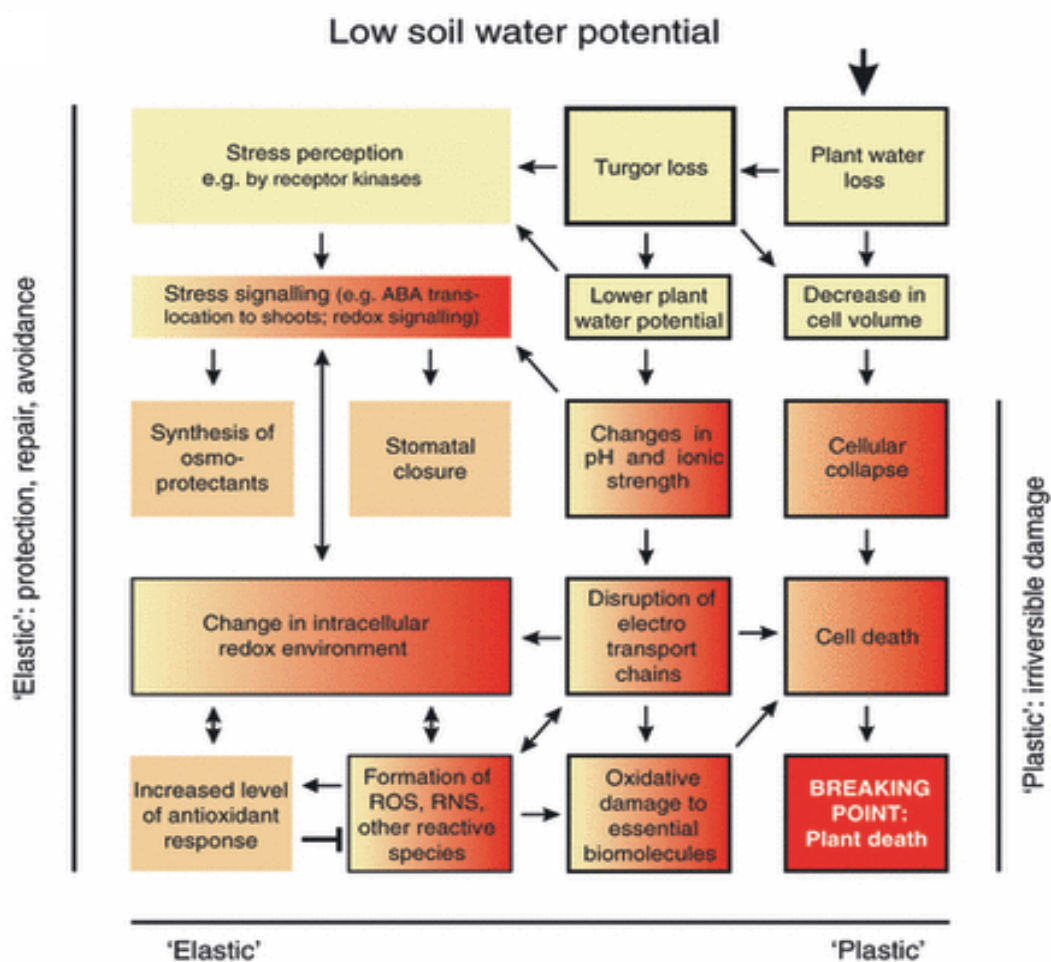
Z výše uvedeného je patrné, že stres z nedostatku vody vyvolaný suchem či zasolením je velmi aktuální téma, proto je pozornost věnována studiu reakcí rostlin na tyto stresory a také na určení faktorů odolnosti vůči nim (Takele and Farrant, 2013). Mezi vlastnosti, které ovlivňují suchovzdornost lze zařadit udržení vysokého vodního potenciálu, turgoru, stomatální a nestomatální inhibici, osmotické přizpůsobení (Siahpoosh and Dehghanian, 2012) a dále vodivost průduchů a rychlost výměny plynů (Peng and Krieg, 1992).

### 1.1 Definice stresu

Stres lze popsat jako napětí nebo tlak, které byly definovány ve fyzikální teorii pružnosti jako množství síly na danou jednotku plochy. Když je na materiál vyvinuta dostatečná síla, materiál se ohýbá a změna délky a tvaru se nazývá deformace. S rostoucím napětím se původně lineární vztah mezi napětím a deformací stává nelineárním až k hranici úměrnosti. Po jejím překročení se materiál deformuje elasticky a může se ohýbat zpět. Následně se deformuje plasticky a nemůže se ohýbat zpět, což vede až k prasknutí (Cauchy, 1821).

Od 30. let 20. století se biologové pokoušeli aplikovat tuto terminologii na biologické systémy, i když povaha napětí se bude lišit mezi neživými materiály a organismy (Levitt, 1980). Ve srovnání s mechanikou je terminologie napětí neboli deformace zmatená, protože počáteční napětí obvykle vede k řetězci deformací, ale ty jsou často označovány jako napětí.

Jako příklad složitého souboru propojených reakcí rostliny na nedostatek vody (obr. 1.) slouží situace, kdy nízký vodní potenciál půdy je považován za počáteční stres. Všechny další efekty by byly deformacemi podle terminologie v mechanice. Jednotlivé deformace, stresy nebo také napětí mohou vést k poškození, ale na rozdíl od neživých materiálů mohou také vyvolat reakce rostliny bránící nebo napravující poškození. Analogicky s mechanikou by elastická odezva zahrnovala reverzibilní poškození, které lze opravit, takže funkce a životaschopnost jsou zachovány, zatímco plastická odezva může zahrnovat nevratné poškození v důsledku selhání opravných mechanismů a dosáhnout konečného poškození, neboli bod zlomu, jehož výsledkem je smrt rostlin (Kranner et al., 2010).



Obr. 1 Schéma možné odezvy stresové reakce (Kranner et al., 2010)

Stres rostlin byl definován Lichtenthalerem (Lichtenthaler, 1998) jako jakýkoli nepříznivý stav nebo látka, která ovlivňuje nebo blokuje metabolismus, růst nebo vývoj rostliny. Strasser jej definoval jako stav způsobený faktory, které mají tendenci měnit rovnováhu. Larcher (2003) jako změny ve fyziologii, ke kterým dochází, když jsou druhy vystaveny mimořádně nepříznivým



podmínkám, které nemusí představovat ohrožení života, ale vyvolají poplachovou reakci (Gaspar et al., 2002). Rostlinný stres lze tedy definovat i jako nepříznivé působení environmentálních vlivů. Čím vyšší silou (neboli stresem) na rostlinu působíme, tím silnější odezvu od rostliny zaznamenáváme. Z toho plyne, že čím vyšší je stres, tím vyšší je zátěž organismu a z něj vyplývající poškození organismu (Levitt, 1980). Proto je možné konstatovat, že stres je jakákoli změna okolního prostředí způsobující jakékoli biologické zatížení, které zpomalí či zcela zastaví biologický vývoj organismu (Selye, 1973). Dále lze pojmem stres označit situaci, kdy se životní podmínky významně odchyli od běžných optimálních podmínek k životu. Jedná se o stav nebo reakci na konkrétní situaci celého organismu (Koyro et al., 2012; Larcher, 1994).

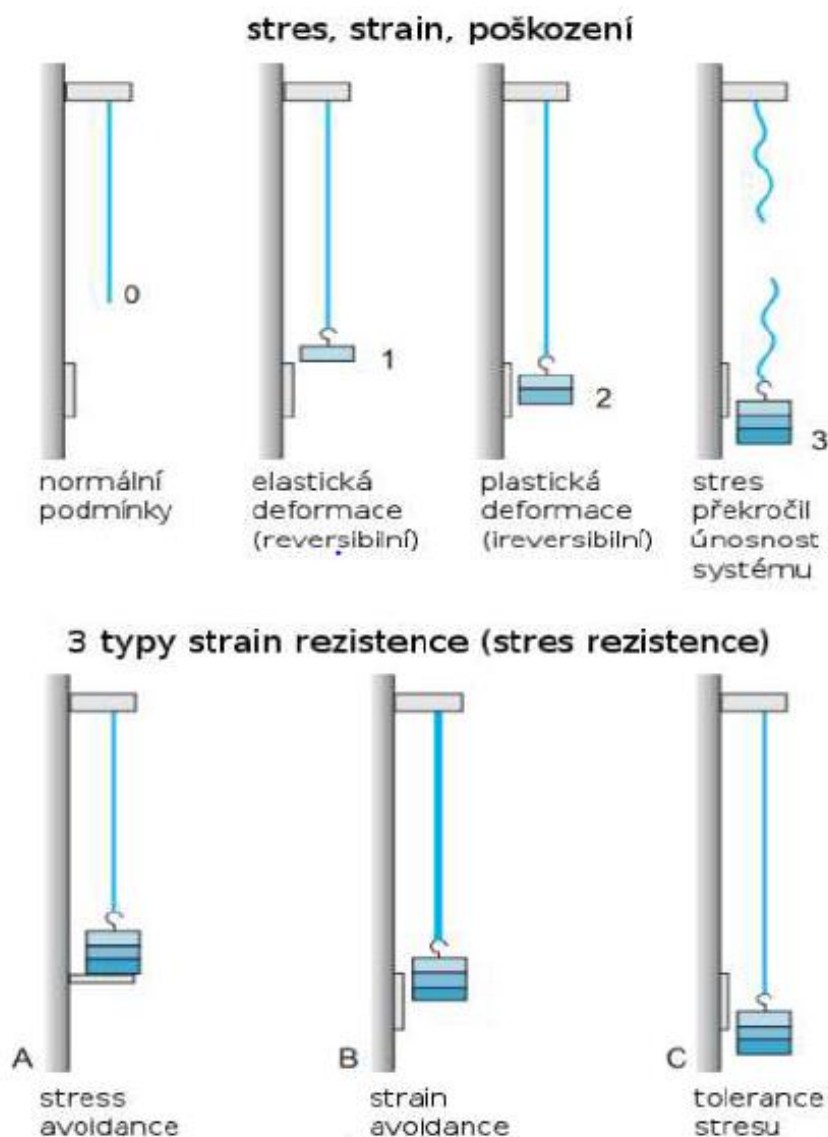
Jako ekvivalent stresu a napětí v mechanice, je v rostlinné fyziologii často používán stresový faktor a stres. Bez ohledu na terminologii je třeba odlišit stresové faktory (nebo stresy) přicházející z vnějšího prostředí od stresu (nebo napětí) v organismu. Faktory, které vyvolávají stres, mohou být biotické, které způsobují živé organismy, jako jsou viry, bakterie, houby, rostliny a hmyz, nebo abiotické tedy neživé faktory, jako je např. sucho, extrémní teploty, salinita či znečišťující látky, například rizikové kovy.

Rovnováha mezi tolerancí a citlivostí může určit, zda má stresový faktor pozitivní (eustres) nebo negativní (distres) vliv. Kromě toho je třeba rozlišovat krátkodobé a dlouhodobé (přetrvávající) stresy, stejně jako nízko stresové události“, které lze částečně kompenzovat aklimatizací, adaptací a regenerací, a silné nebo chronické stresové události, které způsobují značné škody vedoucí k smrti buněk a rostlin (Andersson et al., 1992; Lichtenthaler, 1998, 1996).

Reakce rostliny na stres se liší s rostoucí dobou trvání a závažností stresu. Tyto reakce je dále možno rozlišit a definovat na základě principu obecného průběhu stresových reakcí, viz obr. 2. Kdy je stres představován působením přírodních faktorů působící na těleso a definuje stres jako faktor vnějšího prostředí, který je schopen indukovat potenciálně škodlivý účinek, biologický stres a biologické napětí či jakoukoli jinou změnu v podmínkách vnějšího prostředí, která může zpomalit nebo nepříznivě ovlivnit rostlinný vývoj (Levitt, 1980). Biologické napětí je tou omezenou nebo změněnou funkcí (Salisbury and Ross, 1992).

Ze schématu na obrázku 2 vyplývá, že organismus je napínán silou, kterou Schulze et al. (2005) označují pojmem stres, tedy jako tlak působící na těleso v našem případě rostlinu. Jak už bylo řečeno výše, tato fáze je reverzibilní a je označována pojmem elastická deformace. Pokud síla působí dále a vyšší měrou, dochází již k nevratnému poškození organismu neboli

plastické deformaci. Pokud dojde ke změnám v morfologii těla organismu, a to v důsledku působení stresu neboli napětí v tomto případě užíváme termínu strain (Schulze et al., 2005).



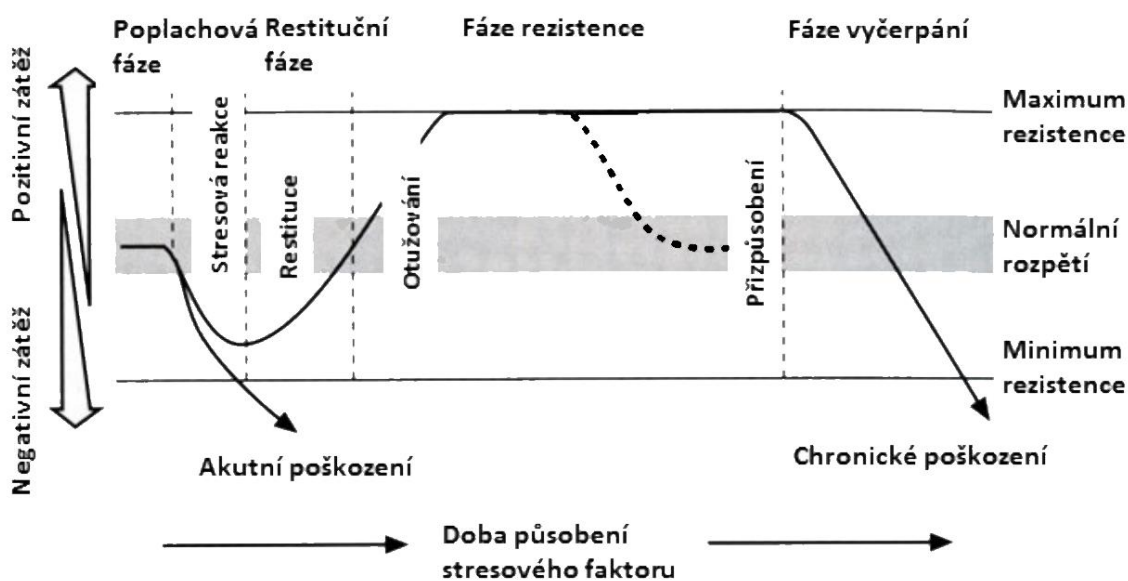
Obr. 2 Fyzikální koncept stresu upraveno dle (Levitt, 1980)

### 2.1.1 Reakce na stres

Rostliny mohou na působení stresorů reagovat, či se adaptovat různými způsoby. Obecnou reakcí na biotické stresory může být adaptace, která je závislá na aktivaci celé řady reakcí zapojených do určení stresového faktoru při přenosu signálu a exprese genů (Agrios, 2005). To má za následek zvýšení tolerance k danému stresoru (Shao et al., 2015, 2007b, 2007a). Rostlina může adaptace dosáhnout buď vyhnutím se stresu, kdy se jedná o tzv. stresovou avoidanci, nebo vytvořením vnitřní tolerance, rezistence (Levitt, 1980). Stresová avoidance představuje způsob

obranu, zahrnující tvorbu mechanické obrany rostliny, jež má většinou dlouhodobý charakter, například silnější kutikula, zásobníky vody nebo výrazná impregnace buněčné stěny (Piterková et al., 2005).

Stresová reakce má čtyři fáze (Lichtenthaler, 1996), jak lze sledovat v grafickém znázornění obr. 3. Z něho je patrné, že první fáze stresové reakce je fáze poplachová, která označuje stav, kdy rostlina zaznamená stres, či stresy. Další fází je fáze restituční, při které rostlina aktivuje kompenzační mechanismy, aby se uchránila před stresorem. Fáze restituční má dvě možné výslednice, buď nastane letální fáze, kdy nástup stresu byl příliš rychlý a rostlina se neubrání, nebo obranné mechanismy rostliny ji přesunou do třetí a nejdélejší fáze. Tato fáze trvá většinou nejdéle z důvodu snahy o vytvoření tolerance v průběhu aklimace vůči danému stresoru. Při přetrvávajícím působení stresoru, může dojít k fázi vyčerpání, kdy účinky stresu jsou na rostlinu příliš vysoké a může nastat chronické poškození až usmrcení jedince (Lichtenthaler, 1996).



Obr. 1 Schéma průběhu stresové reakce upraveno dle (Levitt, 1980)

Tolerance vůči stresu nastává v momentě, kdy není potřeba vynaložit další energii na ochranu před stresorem. Dochází tak ke dvěma různým druhům přizpůsobení se. Mechanismus obrany, který se neuloží do genetické výbavy a následné potomstvo by jej muselo opět vyvinout, je pojmenován jako modifikace. Na rostlině se může projevit změnou stavby těla, nejčastěji tvarem či velikostí v podzemní nebo nadzemní části jedince. Pokud se tato změna projeví i v dalších generacích, ač není vyvolaná stresem, jedná se již o mutaci, tedy o vznik nové odrůdy dané rostliny (Gilliam et al., 2017).

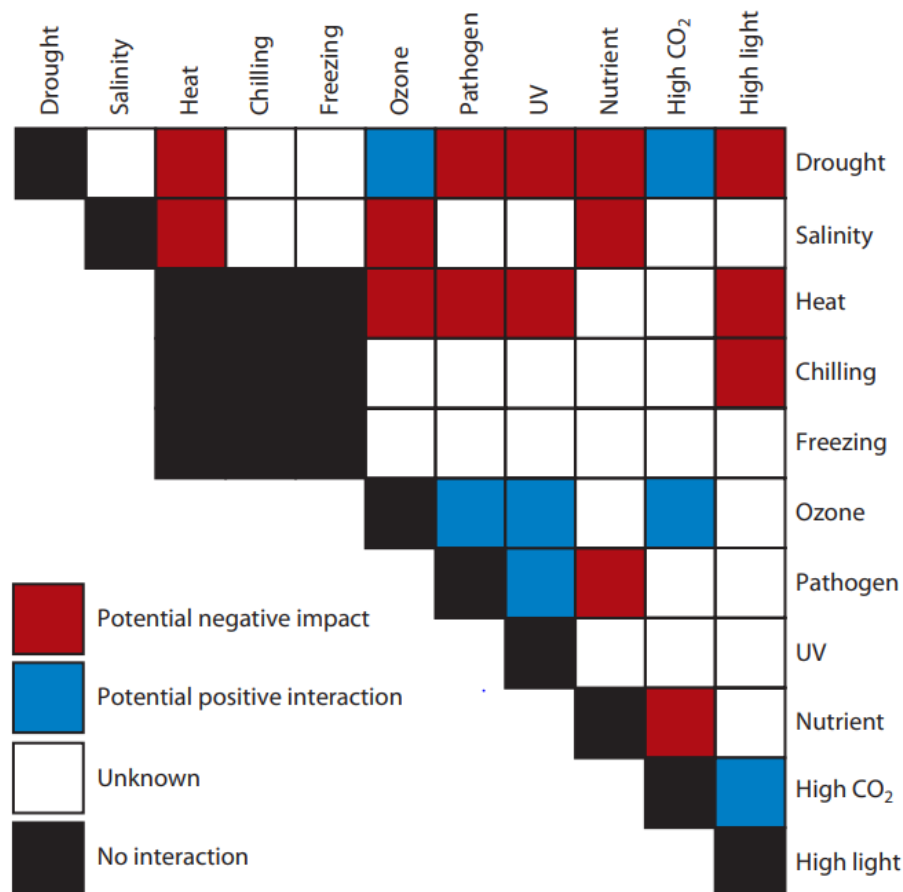
Aklimatizace rostlin na daný abiotický stres vyžaduje reakci přizpůsobenou přesným podmínkám prostředí (Chinnusamy and Zhu, 2009; Verslues and Zhu, 2007). Některé biochemické, fyziologické a molekulární události spuštěné specifickou stresovou podmínkou prostředí by se většinou lišily od událostí aktivovanou jinou sadou stresových podmínek neboli abiotických parametrů (Denby and Gehring, 2005; Rizhsky et al., 2004, 2002). Podobně u aklimatizace na kombinaci různých abiotických stresů, vyžaduje dobře přizpůsobenou reakci jednotlivým stresům, stresovým podmínkám, jakož i potřebu reagovat na každou jednotlivou stresovou situaci. Důležité je rovněž přizpůsobit se některým antagonistickým nebo synergickým aspektům kombinace stresů (Mittler, 2006).

Abiotické a biotické stresory působí převážně ve vzájemné kombinaci (Mittler, 2006). Rozsah škod způsobených v zemědělství těmito kombinacemi stresů podtrhuje potřebu vyvíjet plodiny se zvýšenou tolerancí vůči společnému působení abiotických stresů (Mittler, 2006). Na základě omezených fyziologických, molekulárních a metabolických studií provedených na rostlinách vystavených současně dvěma různými abiotickým faktorům, nestačí studovat každý z těchto jednotlivých stresů zvlášť (Hewezi et al., 2008; Keleş and Öncel, 2002; Koussevitzky et al., 2008; Rizhsky et al., 2004, 2002). Konkrétní kombinace stresů by měla být zpracovávána jako nový stav abiotického stresu v rámci rostliny, který vyžaduje nový typ aklimatizace (Mittler, 2006).

Sucho a tepelný stres představují vynikající příklad dvou odlišných abiotických stresových podmínek, které se v polních podmínkách vyskytují současně (Heyne and Brunson, 1940; Mittler, 2006; Mittler et al., 2001; Pnueli et al., 2002; Savage and Jacobson, 1935). Bylo zjištěno, že tato kombinace má výrazně vyšší škodlivý účinek na růst a produktivitu kukuřice, ječmene, čiroku a různých trav, než kdyby byl aplikován každý z nich jednotlivě (Abraham et al., 2008; Erice et al., 2006; Heyne and Brunson, 1940; Jiang and Huang, 2001; Savage and Jacobson, 1935; Savin and Nicolas, 1996; Yan et al., 2006). Fyziologická charakteristika rostlin vystavených současnému působení sucha a tepla ukázala, že kombinace stresů má několik jedinečných aspektů, jako je vysoká respirace a zároveň nízká fotosyntéza, nízká stomatální vodivost a vysoká teplota listů (Rizhsky et al., 2004, 2002).

Mnoho studií uvádí, že stresové interakce, včetně sucha a tepla, slanosti a tepla, ozónu a slanosti, ozónu a tepla, nutričního stresu a sucha, nutričního stresu a slanosti, UV a tepla, UV a sucha a vysoké intenzity světla v kombinaci s teplem, suchem nebo chladem mají výrazně vyšší negativní dopad na produktivitu plodin, než každá z různých složek stresu aplikovaná jednotlivě (Mittler and Blumwald, 2010; Suzuki et al., 2014). Nicméně jiné studie uvádějí příznivé účinky,

jako výsledek interakce dvou různých stresorů aplikovaných současně (Suzuki et al., 2014). Na obrázku 4 jsou shrnuty některé kombinace podmínek prostředí, které by mohly mít významný vliv na zemědělské plodiny. Jsou zobrazeny ve formě stresové matice vytvořené Mittlerem (2006) a dále rozpracovány Mittler a Blumwald (2010), Suzuki et al. (2014). Tato verze „stresové matice“ zobrazuje nové kombinace abiotických faktorů spolu s jejich potenciálními pozitivními nebo negativními účinky na produktivitu a růst rostlin.



Obr. 4 Stresová matice upraveno dle (Mittler, 2006; Mittler and Blumwald, 2010)

Kromě rozdílů, které existují mezi aklimatizací rostlin k různým abiotickým podmínkám, mohou různé stresy v kombinaci vyvolat antagonistické reakce (Mittler, 2006; Ton et al., 2009; Yasuda et al., 2008). Mezi stresové interakce, které mají škodlivý vliv na produktivitu plodin, patří sucho v kombinaci s horkem, ozón a slanost, ozón a teplo, nedostatek živin a sucho, nedostatek živin a slanost, UV záření a teplo, UV záření a sucho, vysoké intenzita světla v kombinaci s horkem, suchem s vysokou teplotou (Giraud et al., 2008; Haghjou et al., 2009; Hartikainen et al., 2009; Heyne and Brunson, 1940; Jiang and Huang, 2001; Ranieri et al., 2001; Sandermann, 2004). Další negativní interakce mezi dvěma různými abiotickými stresory byly popsány u kombinace

sucho a chlad (Sales et al., 2013), těžké kovy v kombinaci s UV (Srivastava et al., 2012), tepelný stres a vysoká koncentrace CO<sub>2</sub> (Wang et al., 2016), kombinace zinku a kadmia (Cherif et al., 2011), zamokření v kombinaci se salinitou (Alhdad et al., 2013) nebo interakce ozonu s tepelným stresem (Mittler and Blumwald, 2010) nebo s kadmíem (Castagna et al., 2015).

Například během tepelného stresu rostliny zvyšují svou stomatální vodivost, aby se listy ochladily transpirací. Nicméně, pokud se tepelný stres vyskytne současně se suchem, rostliny nejsou schopny otevřít své průduchy a teplota jejich listů je o 2-5 °C vyšší (Rizhsky et al., 2004, 2002). Zasolení nebo těžké kovy by mohly představovat podobný problém v kombinaci s tepelným stresem, protože zvýšená transpirace by mohla vést ke zvýšenému příjmu solí a kovů nebo těžkých kovů (Keleş and Öncel, 2002; Wen et al., 2005).

Vysoká intenzita světla by se mohla ukázat jako problematická pro rostliny vystavené tomuto stresoru v kombinaci se suchem nebo chladem (Haghjou et al., 2009). Za těchto podmínek jsou temnostní (sekundární) reakce fotosyntézy inhibovány v důsledku nízké teploty nebo nedostatečné dostupnosti CO<sub>2</sub>, a přebytek energie absorbované rostlinou, díky vysoké světelné intenzitě zvyšuje redukci kyslíku, a tím dochází k zvýšené produkci ROS (Mittler, 2002; Mittler et al., 2004). Podobné důsledky má vystavení rostlin vysoké intenzitě světla a suchu (Giraud et al., 2008). V této kombinaci stresorů způsobila vysoké intenzity světla zvýšenou akumulaci ROS.

Například u ječmene jednotlivě stres zasolením nebo stres ze sucha snížil růst, obsah chlorofylu, rychlost fotosyntézy, maximální fotochemickou účinnost fotosystému II (PSII) ( $F_v/F_m$ ), vodní potenciál a osmotický potenciál, ale kombinace uvedených stresů měla vyšší negativní účinek než samostatně působící stresy (Ahmed et al., 2013).

Na druhé straně některé kombinace stresů mohou mít příznivé účinky na rostliny, ve srovnání s účinky jednotlivých stresů aplikovaných samostatně. Mezi interakce, které nemají škodlivý vliv na výnos a mohly by mít ve skutečnosti příznivý vliv ve vzájemném působení, patří např. sucho a ozón, ozón a UV záření, dále vysoká koncentrace CO<sub>2</sub> v kombinaci se suchem, ozónem nebo vysokým UV zářením (Ainsworth et al., 2008; Pääkkönen et al., 1998; Sullivan and Teramura, 1990; Wilkinson and Davies, 2009). Příznivá může být kombinace ozónu a sucha, ve kterých by snížení průduchové vodivosti v důsledku účinku stresu ze sucha mohlo snížit příjem ozonu průduchy (Iyer et al., 2013; Löw et al., 2006; Pääkkönen et al., 1998). Kombinace zasolení a stresu teplem u pšenice může například zhoršit škodlivé účinky obou stresů, pokud jsou aplikovány jednotlivě (Keleş and Öncel, 2002). U rostlin rajčat zvyšuje kombinace zasolení

a tepelného stresu ochranu před škodlivými účinky zasolení jako takového, což naznačuje, že akumulace osmoprotektivních látek, jako je glycinbetain a trehalóza, by mohla hrát důležitou roli při ochraně rostlin před touto kombinací stresu (Rivero et al., 2014, p. 201).

Globální klimatické změny způsobující zvýšený obsah CO<sub>2</sub>, ozónu a UV záření spolu s vysokou průměrnou teplotou se stávají hlavními faktory ve výzkumu kombinace stresů (Ainsworth et al., 2008; Brouder and Volenec, 2008). Účinky zvýšených koncentrací CO<sub>2</sub> jsou považovány za příznivé pro odolnost plodin vůči abiotickým stresům, pokud nejsou rostliny limitovány živinami. Při posuzování těchto účinků v různých oblastech naší zeměkoule a u různých plodin je ovšem třeba postupovat opatrně (Ainsworth et al., 2008; Brouder and Volenec, 2008).

Snad nejlépe prostudované interakce, uvedené na obrázku 4, jsou účinky různých abiotických stresů spolu se škůdci nebo patogeny. V některých případech bylo zaznamenáno, že určitý abiotický stres zvýšil toleranci rostlin vůči napadení patogeny (Bowler and Fluhr, 2000; Sandermann, 2004). Nicméně ve většině případů mělo dlouhodobé vystavení rostlin abiotickým stresorům, jako je sucho nebo zasolení, za následek oslabení obranyschopnosti rostlin a zvýšené náchylnosti ke škůdcům nebo patogenům (Amtmann et al., 2008; Anderson et al., 2004). Vzhledem k tomuto nedostatku energie a zdrojů živin by mohl pro rostliny představovat vážný problém ve snaze se vyrovnat se stresem (Weinstein et al., 1991). S omezenou dostupností klíčových mikroprvků jako je železo, měď, zinek nebo mangan, které jsou nezbytné pro funkci různých detoxikačních enzymů, jako jsou superoxidodismutázy mědi/zinku, železa a manganu nebo některé peroxidázy (Perl et al., 1993; Ranieri et al., 2001), by mohlo vést ke zvýšené oxidačního stresu u rostlin vystavených různým abiotickým stresům (Rizhsky et al., 2002).

## **2.2 Vybrané abiotické stresory**

Sucho jako takové je jedním z nejvýznamnějších abiotických stresorů, protože významně ovlivňuje produktivitu přirozených i umělých ekosystémů (Boyer et al., 2008a; Zivcak et al., 2013). Salinita, podobně jako sucho, patří k nejzávažnějším problémům moderního zemědělství (Läuchli and Grattan, 2007; Pitman and Läuchli, 2002). Zasolování půdy, kdy je půda přesycena solemi, které již nejsou vázány ve vodném roztoku, se stává jedním z hlavních omezení zemědělství v teplých a suchých oblastech. Lze konstatovat, že sucho a zasolení v půdě obecně snižuje příjem vody, což způsobuje deficit vody v rostlinných pletivech a snížení výnosu (Meng et al., 2018).

### 2.2.1 Sucho

Sucho je normální opakující se projev klimatu, který souvisí s jeho kolísáním. Sucho jako přechodná anomálie klimatu se může vyskytovat ve všech klimatických zónách a liší se tak od aridity, kterou považujeme za trvalý znak klimatu (Blinka, 2002).

Sucho jako klimatický extrém, který se v posledních 20 - ti letech objevuje na území České republiky stále častěji, a to díky rostoucím teplotám. A to především v letech 2000, 2003, 2012, 2015 a 2017 (Brázdil, 2015).

Je nutné připomenout, že výskyty sucha jsou u nás nahodilé, a proto je velmi obtížně jejich výskyt předpovídat. Tímto se stávají o to škodlivější, protože přicházejí neočekávaně v různých ročních obdobích (Rožnovský et al., 2018). Sucho je v podstatě výsledek bilance srážek a výparu, na jeho projevy dále mají vliv také další meteorologické prvky (Kříž, 1966). Neexistuje žádná univerzální a všeobecně uznávaná definice sucha. Sucho způsobuje problémy zejména v zemědělství, lesnictví a vodním hospodářství a podle jeho projevů jej můžeme rozdělit do čtyř kategorií: meteorologické, zemědělské, hydrologické a socio-ekonomické sucho (Wilhite, 2005). Hovoříme-li o agronomickém suchu, které je z našeho pohledu významné, máme na mysli množství půdní vláhy, které nevyhovuje potřebám rostlin. Agronomické sucho tak vztahujeme zejména k deficitu vody v půdě. Nastává po meteorologickém suchu, ale před hydrologickým. Zemědělství jako takové tak představuje první segment, který je zasažen suchem (Wilhite, 1991). Podle délky expozice lze sucho definovat jako moment, který nastává, když půdní vlhkost nestačí pokrýt požadavky půdní potenciální evapotranspirace (Critchfield, 1985). Dle tohoto autora rozlišujeme tři typy sucha, a to:

1. Stále sucho spojené s aridním podnebím.
2. Sezonní sucho, které se vyskytuje v podobě zřetelných každoročních období suchého počasí.
3. Sucho způsobené proměnlivostí srážek.

Je zřejmé, že sucho můžeme hodnotit z hlediska času, důležitý je zejména začátek, konec a délku trvání sucha. Kromě času se na charakteru a průběhu sucha podílejí také další faktory, jako vysoká teplota a rychlost větru, nízká relativní vlhkost vzduchu a další. Tyto faktory mohou významně zvýšit sílu sucha (Blinka, 2002). Tím pádem je možno uvést, že sucho je meteorologický termín a znamená nedostatek srážek během delšího časového intervalu. Z pohledu rostlinné fyziologie používáme pojem vodní stres jako vliv na rostliny (Kirkham, 2005; Nilsen and Orcutt,



1996). Suchem tedy rozumíme obecný nedostatek vody v důsledku nízkých srážek či špatného zavlažování (Ashraf and Harris, 2005).

Dopady sucha jsou méně nápadné, avšak sucho postihuje větší území než jakákoli jiná přírodní rizika. Kvantifikace škod způsobených suchem bývá velmi obtížná. Nicméně podle různých studií převyšují odhady ztrát způsobených suchem škody z jiných přírodních neštěstí. Dopady sucha jsou pozorovatelné ve třech základních kategoriích: ekonomické, environmentální a sociální (Wilhite, 2000).

### 2.2.2 Zasolení

Zasolování půdy je stav, kdy je půda přesycena solemi a minerály, které již nejsou vázány na vodu. V této míře jsou škodlivé pro veškeré přítomné organizmy a jedná se o jedno z hlavních omezení zemědělství v teplých a suchých oblastech. Zasolování půdy také poškozuje strukturu a snižuje propustnost půdy (Quirk, 1986). Salinita patří k nejdůležitějším problémům moderního zemědělství, kde odhadované roční ztráty přesahují 12 miliard USD (Pitman and Läuchli, 2002). I na území ČR lze najít místa se zvýšeným obsahem solí v půdě. Podle původu zasolení rozlišujeme půdy na sodické, které jsou zasoleny  $\text{Na}^+$  kationty, a na zasolené, které obsahují zbývající ionty solí, například  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  a další (Bláha et al., 2003).

Primární příčinou zasolení bývá akumulace rozpustných solí. Tento jev se přirozeně vyskytuje v aridním prostředí, kde vzniká z důvodu vyšší evaporace, než je příjem srážek daného území. Tento jev lze nejčastěji pozorovat ve vnitrozemských oblastech, kde je dán právě zmíněným zvýšeným výparem vody. Podobný jev může nastávat v blízkosti moří, kde je salinita zvyšována slaností vody moře (Niu and Cabrera, 2010).

Zasolení je tedy spojeno s vyšším obsahem solí v půdním roztoku, a to z různých zdrojů jako jsou podzemní voda, závlahová voda či průmyslová hnojiva. Vznik zasolení je nejčastěji z primárních minerálů, kdy rozpuštěním těchto solí vznikají v alkalických půdách nejčastěji ionty:  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  a v půdách kyselých  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  (Šarapatka et al., 2002). Primárně zasolení vzniká podle Munns a Gilliam (2015), Šarapatka et al. (2002) a Gupta a Huang (2014) přírodním půdotvorným procesem, činností člověka však může docházet k zasolení sekundárnímu. Sekundární zasolení je obdobné jako zasolení primární i s vlivy na půdu a rostliny. Uvedení autoři dále konstatují, že jsou odlišné příčiny vzniku sekundárního zasolení, které může být způsobováno například znečištěním podzemní vody, přílišnou závlahou pěstebních ploch

kontaminovanou vodou používanou k zavlažování pěstebních ploch, výstavbou vodních děl, aplikací nadměrného množství průmyslových hnojiv a celkovým důsledkům přetěžování půdy, používání neudržitelných postupů vznikajícím z tlaků na pěstitele využívat okrajové pozemky pro produkci.

Účinky zvýšeného zasolení lze pozorovat v řadě důležitých ekologických i neekologických půdních funkcí (Daliakopoulos et al., 2016). Intenzita zasolení půd závisí vedle obsahu rozpustných solí i na kapilárním vztlávacím tlaku vody, které je ovlivněno zrnitostním složením půdy a evaporací (Šarapatka et al., 2002). Nejméně náchylné k zasolení bývají zejména půdy písčité a skalnaté s promyvným typem vodního režimu v chladných oblastech, naopak velmi snadno náchylné k sekundárnímu zasolení jsou půdy těžké v zamokřených oblastech s výparným typem vodního režimu (Šarapatka et al., 2002).

Zasolení je pro rostliny značný stresor, a to jak z důvodu omezeného příjmu vody a v ní rozpuštěných látek, tak vlastní toxicity některých iontů, nejčastěji  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . Souborem těchto faktorů se mění složení rostlinných pletiv, snižuje se tvorba enzymů a ostatních látek (Jones et al., 2008). V počátečních fázích stresu zasolením se schopnost absorpce vody kořenovým systémem snižuje. Dochází ke snížení odparu vody z listů, vlivem osmotického stresu akumulací solí v půdě a následně v rostlinách. Stres zasolením je z tohoto pohledu považován za hyperosmotický (Gupta and Huang, 2014). Při dlouhodobé salinitě nastává u rostlin nerovnováha v příjmu esenciálních látek (Mořková et al., 2014). Zvýšená koncentrace solí v půdním roztoku obvykle vede k osmotickému namáhání, specifické iontové toxicitě, iontové nerovnováze a následně dochází k snížení růstu rostlin (Ghorbani et al., 2018). Soli se hromadí na vnější straně kořenů a uvnitř rostlinných buněk (Rengasamy, 2010).

Většina rostlin je citlivá na stres způsobeným nadbytkem solí. Tento stres může inhibovat růst, může vyvolat iontové toxicity, osmotický a oxidativní stres (Meng et al., 2018). Míra škodlivosti jednotlivých solí je v závislosti na typu soli a její koncentraci v půdním roztoku, druhu rostliny soli vystavené a obsahu organické hmoty v půdě (Šarapatka et al., 2002). Díky zvýšené úrovni technologií se v dnešní době znatelně rozšiřují znalosti o mechanismech tolerance rostlinné ke stresu zasolením. Různé rostlinné druhy vykazují rozdílnou citlivost na zasolení díky morfologickým rozdílům a rozdílným schopnostem využívat ochranné složky dané evolučním vývojem (Rengasamy, 2010).

## 2.3 Vodní deficit

Je známo, že sucho a zasolení v půdě snižuje schopnost rostlin přijímat vodu kořenovým systémem, což způsobuje osmotický stres a deficit vody pro rostlinu (Meng et al., 2018). Deficit vody je obecně charakterizován jako nedostatečný stav vody v rostlině neboli negativní vodní bilance, která se projevuje vadnutím. Může vést k poklesu výnosu, a proto je vodní deficit v podstatě definován až svými následnými účinky (Slatyer and Markus, 1968).

Deficit vody se dá rozdělit do tří skupin, a to na mírný, střední a silný. Mírný vodní deficit nebo také provozní vodní deficit se projevuje snížením vodního potenciálu rostliny o desetiny MPa a snížením relativního obsahu vody (dále RWC) o 8 až 10 %. Středně silný vodní deficit, taktéž subletální, nastává v momentě, kdy vodní potenciál nabývá hodnot -1,2 až -1,5 MPa a RWC je nižší o 10 %, ale ne nižší 20 %. Rostliny vystavené letálnímu vodnímu deficitu mají velmi silný nedostatek vody jejich vodní potenciál klesá pod hodnoty -1,5 MPa a RWC je nižší než 20 %. Jestliže je RWC nižší než 50 % pletiva rostliny ztratila více jak polovinu obsahu vody. A jedná se o silnou dehydrataci, rostlina vstupuje do bodu trvalého vadnutí a tento stav může být letální (Hsiao, 1973).

Fáze trvalého vadnutí nebo bod trvalého vadnutí mimo jiné vyjadřuje stav půdy, kdy vodní potenciál půdy je v rozmezí hodnot od -1,0 do -2,0 MPa. U zdravých zavlažovaných rostlin nabývá vodní potenciál hodnot od -0,2 do -0,6 MPa. Rostliny vystaveny nedostatkem vody, nabývají hodnot vodního potenciálu v rozmezí od -2,0 až -5,0 MPa (Hale and Orcutt, 1987). Bod trvalého vadnutí vyjadřuje moment, kdy je bilance příjmu vody kořeny záporná ku odparu vody povrchem listu a u rostliny se projevuje deficit vody vadnutím. Tento jev je závislý na půdních hydrolimitech, kdy může být maximální vodní kapacita (MVK). Tato charakteristika je definována tak, že veškeré půdní póry jsou naplněny půdní vodou. Hodnota pórovitosti půdy je  $pF = 0$ . Polní vodní kapacita (PVK) nebo také maximální kapilární kapacita (MKK), kdy jsou vodou zaplněny všechny kapilární póry, a ostatní póry jsou vyplněny vzduchem. Hodnota  $pF = 2,0$  až  $2,9$ . Bod snížené dostupnosti půdní vody. Obsah půdní vody je na hranici, který omezuje příjem vody kořeny. Jedná se o minimální přípustnou zásobu využitelné půdní vody pro rostliny, hodnoty  $pF = 3,1$  až  $3,5$ . A bod vadnutí nastává při poklesu zásoby půdní vody. Pod hranici využitelnosti pro rostliny je hodnota  $pF = 4,1$  (Nilsen and Orcutt, 1996). Ať je vodního deficit definován jakkoliv, nedostatek vody v půdě a následně v rostlině povede k záporné vodní bilanci, a ovlivní jak metabolické, a následně růstové procesy rostlin (Kirkham, 2005).

### 2.3.1 Vliv vodního deficitu na fyziologický a metabolický stav rostlin

Vodní deficit ovlivňuje přímo i nepřímo většinou negativně celou řadu biochemických, fyziologických, anatomických i morfologických změn na úrovni buněk, pletiv, orgánů, tedy celé rostliny, a tím pádem snižuje jejich produktivitu (Holá et al., 2009). Mezi první rostlinné části, u kterých je nedostatek vody patrný, patří nejstarší orgány (Farooq et al., 2009). Pokud je rostlina vystavena vodnímu stresu dlouhodobě, začnou se u rostliny projevovat viditelné změny (Sourour et al., 2017).

Vodní deficit se na buněčné úrovni projevuje nejrůznějšími reakcemi, které umožňují rostlině aklimaci a následně adaptaci (Beck et al., 2007). Následným projevem nedostatku vody je omezení dlouhivého růstu, který vede ke zmenšení velikosti buněk (Brestič and Olšovská, 2001; Nilsen and Orcutt, 1996). Jedním z prvních projevů nedostatku vody, z pohledu buňky, je ztráta turgoru. Ztráta turgoru je nejcitlivější reakcí na vodní deficit, způsobuje pokles relativního obsahu vody v buňce rostlin (Slama et al., 2006). V důsledku poklesu turgoru jsou iniciována osmoregulační opatření. Ta souvisí s akumulací osmoprotektivních sloučenin (solutů), do buněčných kompartmentů. Tyto změny stimulují osmotický příjem vody, který napomáhá udržení vody uvnitř buněk, a tím oddaluje ztrátu turgoru v mezofylu listů (Larcher, 2003).

Mírný vodní deficit ovlivňuje délku, povrch, hmotnost a množství kořenů (Bláha and Hnilička, 2004). Kořeny můžeme považovat za primární senzory vodního deficitu a jsou významným výnosotvorným faktorem (Kramer and Boyer, 1995; Středa et al., 2012). Vysoká citlivost kořenů je dána tím, že v nich probíhá rychlý přenos informací, a to nejen v rámci kořene jako takového, ale i do nadzemních orgánů rostlin. V kořenech může být vyvolána vlivem působení stresorů lokální stresová reakce, která se následně projeví na celé rostlině (Lichtenthaler, 1996).

Vodní stres podporuje růst kořenů do větších hloubek (Haberle et al., 2008; Scott, 2008). Tento růst se děje na základě omezení růstu nadzemních orgánů a změn transportu asimilátů. Při působení stresu dochází k přesunu asimilátů z nadzemní části směrem do rostoucích kořenových špiček (Lynch and Brown, 2012). Jako první je patrné zpomalení růstu u listů, a to vrcholových a postranních výhonů, které jsou zakrnělé, bledě zelené až světle žluté. Listy žloutnou, hnědnou, jsou menší, předčasně opadávají, rostliny méně kvetou a plodí, jejich celková vitalita je snížena. Jedná se o zvýšený transport sacharidů do kořenů v důsledku omezení růstu listové plochy (Lambers et al., 2008). V suchu rostliny vstupují do generativní fáze rychleji, čímž se zkracuje vegetační doba. Pokud sucho pokračuje i nadále, rostliny vadnou a odumírají (Guilioni et al., 2003).

Avšak v případě silného vodního deficitu dochází k omezení růstu i u kořenové soustavy podobně jako u ostatních částí rostlin, a to z důvodu nedostatku asimilátů (Haberle et al., 2008). Ten vzniká vlivem snižující se dostupnosti vody v půdě a okolí kořenů. Dochází k omezování příjmu vody s živinami a jejich následného transportu do nadzemních orgánů (Sperry et al., 2002).

Z metabolických procesů je nepříznivými podmínkami prostředí ovlivněna především fotosyntéza. Schopnost rostlin aklimatizovat se neboli přizpůsobit se v různých prostředích, je přímo spojena s jejich schopností přizpůsobit se na úrovni fotosyntézy. Existují rozdíly v adaptaci na vodní deficit mezi rostlinami C3 a C4 cyklu (Voronin et al., 2014). Tyto rozdíly jsou dány tím, že rostliny C3 cyklu se primárně vyvinuly v oblastech s mírným klimatem, kdežto rostliny s C4 cyklem v oblastech tropických a aridnějších, kde byly zatěžovány větší měrou suchem a horkem (Nelson et al., 2006; Voronin et al., 2014; Ward et al., 1999). Uvedení autoři konstatují, že u rostlin C4 je účinnější kvantový výtěžek fotosyntézy (poměr mezi množstvím absorbovaných molekul CO<sub>2</sub> a množstvím světelných kvant vynaložených na tento proces) a efektivní výdej vody na transpiraci (Nelson et al., 2006; Voronin et al., 2014). Dále je nutno doplnit, že rostliny C4 cyklu se v porovnání s rostlinami C3 cyklu vyznačují nižší koncentrací CO<sub>2</sub> v mezofylových buňkách, menší korelací mezi stomatální vodivostí a fotosyntézou, ale vyšší efektivitou využití vody (WUE) (Buchmann and Schulze, 1999).

U obou metabolických skupin rostlin existují obdobné reakce na vodní deficit, které v případě vodního deficitu vedou ke snížení fotosyntézy rostlin v důsledku aktivních či pasivních obranných reakcí. Pasivní obranné reakce je možné označit jako vyhnutí se stresu (stress avoidance) a mezi ně lze zařadit např. rychlý vývoj, zkrácení doby vegetace, snížení listové plochy, svinování listů, změnu v počtu průduchů apod. (Arora et al., 2002; Ludlow et al., 1983). Například jako aktivní obranné reakce rostlin je možné označit stomatální či nestomatální inhibice (Chaves et al., 2009; Lawlor and Uprety, 1993; Tang et al., 1998). U stomatální inhibice dochází k uzavření průduchů, ke snížení transportu CO<sub>2</sub> do listu, čímž je inhibována aktivita karboxylačních enzymů, především RUBISCO (Carriquí, 2015; Da Silva and Arrabaça, 2004; Flexas, 2012). Nestomatální inhibice zahrnuje např. změny ve struktuře thylakoidní membrány chloroplastů, přenos elektronů v rámci fotosystémů a snížení množství fotosynteticky aktivních pigmentů (Kirchhoff, 2014).

Snížení obsahu fotosyntetických pigmentů se týká především chlorofylů, a to zejména chlorofylu *a*. Rovněž se snižuje poměr chlorofylu *a* ku *b* (Mafakheri et al., 2011, 2010). Tento trend potvrdil ve své práci se slunečnicí Johnson et al. (2011) a Manivannan et al. (2007). Řada autorů

uvádí, že dochází ke zvýšení množství xantofylových barviv oproti chlorofylům (Demmig-Adams et al., 1990; Maroco et al., 2002b, 2002a; Müller et al., 2001).

V souvislosti s výše uvedenými skutečnostmi s vodní bilancí souvisí také rychlost výměny plynů. Ta přímo ovlivňuje intenzitu fotosyntézy, jejíž rychlost je nezměněna nebo je mírně inhibována přivřenými průduchy v závislosti na míře stresu, kterému je vystavena (Ghannoum, 2009).

Vodní deficit tedy zpomaluje růst rostlin a tvorbu sušiny také tím, že se omezuje transport vzniklých asimilátů do rostoucích orgánů či do orgánů generativních nebo zásobních, a proto lze v souladu s již historickou prací Mokronosov et Borzenkova (1978) konstatovat, že mezi růstem a fotosyntézou existuje koordinovaná vazba, v níž fotosyntéza zabezpečuje látky a energetické zdroje pro celý soubor růstových a morfogenetických procesů, včetně diferenciálního růstu. Aktivita růstu rostliny tak zpětně působí na rychlost fotosyntézy spotřebou a translokací vytvořených asimilátů na růst rostlinných orgánů.

Při působení abiotických stresorů se obvykle obsah energeticky bohatých látek v rostlině snižuje, jak uvádí (Hejnák, 2003; Hnilíčková and Novák, 2000; Martinková et al., 2007), což souvisí s omezenou tvorbou asimilátů a jejich translokací do jednotlivých orgánů. Obsah energeticky bohatých látek pro jednotlivé rostlinné orgány v podmínkách vodního deficitu se liší oproti nestresovaným rostlinám. Jedná se nejenom o tvorbu a hromadění meziproductů, ale také o rozdílný podíl a zastoupení obsahových látek. Uvedený závěr ve svých pracích uvádí např. (Bláha et al., 1998; Hnilička et al., 2007, 2008, 2009b). Uvedení autoři konstatují, že například v obilkách pšenice v závislosti na vodním stresu je obsah energie dán především obsahem škrobu ve srovnání s ostatními obsahovými látkami, jako jsou tuky a bílkoviny (Hnilička et al., 2009a).

Vedle limitace aktivity karboxylačních enzymů v důsledku vodního deficitu bylo potvrzeno také snížení fotofosforylace a tvorby ATP. Například během působení vodního deficitu dochází ke snížení množství ATP ve fotosynteticky aktivních pletivech (Lawlor, 1995; Lawlor and Uprety, 1993). Toto snížení je dáno inhibicí aktivity ATP syntézy (Meyer and de Kouchkovsky, 1992). Na druhé straně obsah NADPH a NADH, včetně redukčního potenciálu zůstává vysoký i během působení velmi silného stresu (Nelson et al., 2006; Pradet and Raymond, 1983; Sage et al., 1989; Scheuermann et al., 1991). Změny v přenosu elektronů při působení vodního stresu jsou dány inhibicí fotosyntetické aktivity, která je způsobena nerovnováhou mezi zachycením světla a jeho využitím (Foyer and Noctor, 2005). Vlivem této nerovnováhy dochází k indukci tvorby reaktivních

forem kyslíku a následně k působení oxidativního stresu (Nayyar and Gupta, 2006; Peltzer et al., 2002).

Dále je se změnami přenosu elektronů u rostlin spojeno i nefotochemické zhášení fluorescence. Nefotochemické zhášení je detekováno rychle reverzibilní složkou qE (rozptyl energie závislý na pH), která se podílí u PS II na tepelném rozptýlení absorbované přebytečné energie (Müller et al., 2001). Toto rozptýlení je dáno nízkým pH v lumenu tylakoidů a vysokým trans-tylakoidním gradientem pH. Složka qE je aktivována nízkým pH v lumenu tylakoidů, který aktivuje enzym violaxantin-deepoxidázu, který převede violaxantin na antheroxantin a zeaxantin (Demmig-Adams et al., 1990). Přebytečná energie může být z reakčního centra PS II odvedena pomocí přenosu elektronů (Ivanov et al., 2012, 2008) a část energie může být využita při fotorespiraci.

Dále je známo, že u rostlin dochází nejprve k zastavení růstu, přestože fotosyntéza stále probíhá. Dochází k akumulaci asimilátů a ke snížení osmotického potenciálu. Tím se zvýší gradient vodního potenciálu a rostlina může přijímat vodu z okolního prostředí. Toto osmotické přizpůsobení stojí rostlinu energii, kterou by běžně nemusela vynakládat, což ji negativně ovlivňuje (Hsiao, 1973).

Významným obranným mechanismem rostlin vůči vodnímu stresu je mimo jiné tzv. osmotické přizpůsobení. Osmotické přizpůsobení (OA) je adaptivní reakcí rostlin, např. pšenice (Morgan, 2000), čiroku (Tangpremsri et al., 1995, 1991a, 1991b), kukuřice (Chimenti et al., 2006), rýže (Babu et al., 2001), slunečnice (Chimenti et al., 2002) na vodní deficit (Nguyen, 2010), který vede k udržení buněčného napětí, a to prostřednictvím lepší extrakce vody z půdy, což stimuluje růst kořenů (Gonzalez et al., 2010; Kusaka et al., 2005b, 2005a). Dále usnadňuje lepší transport asimilátů k tvořícím se semenům (Subbarao et al., 2000).

Principem osmotického přizpůsobení je snížení osmotického potenciálu a tvorba osmoticky aktivních látek. Vodní potenciál je veličina, která představuje stav vody v buňce, a tím i v rostlině (Verslues et al., 2023). Jednou ze složek vodního potenciálu je osmotický potenciál, který je určen koncentrací rozpuštěných látek v buněčném obsahu. Čím více je v roztoku rozpuštěných látek kompatibilních solutů, tím je nižší koncentrace vody a tedy nižší vodní potenciál. Voda se pohybuje z prostředí s vyšším vodním potenciálem tedy vyšším osmotickým potenciálem do prostředí s nižším vodním potenciálem tedy nižším osmotickým potenciálem. Pokud má rostlina nižší vodní potenciál, proudí do ní voda z okolí, vakuola zvětšuje objem a vznikne tlak (turgor), který zajišťuje

pevnost rostliny, rostlina tedy vodu neztrácí (Goufo et al., 2017; Silva et al., 2023). Tyto osmoticky aktivní látky kompatibilní soluty se podle Yancey (2005, 1994) a Qayyum et al (2011) hromadí v cytoplazmě, kde se chovají jako osmoprotektanty membránových proteinů a integrity membrán a dochází ke snížení obsahu vody v buňce. Řada autorů konstatuje, že osmotické přizpůsobení přímo ovlivňuje turgor, kdežto zvýšená elasticita buněčné stěny naopak oddaluje snížení turgoru, které je spojené s redukcí vodního potenciálu. (Chimenti et al., 2006; Saliendra and Meinzer, 1991; Wenkert et al., 1978a, 1978b, 1978c). Lze tedy uvést, že buňky ztratí více vody dříve, nežli se sníží turgor. Oproti tomu podle Hessini et al. (2019, 2009), a Nilsen et Orcutt (1996) vede snížená elasticita buněčné stěny sice ke snížení vodního potenciálu buněk, ale za stabilizovaného obsahu vody a symplastu na úkor turgoru. Z toho důvodu je v suchém prostředí je pro rostlinu výhodné mít více rozpuštěných látek, které sníží vodní potenciál, a tím zabrání úniku vody. Nejčastějšími soluty jsou ionty solí, cukry nebo nízkomolekulární látky, které dále nezasahují do metabolismu, jako jsou prolin, glycin Betain a další (Eppel et al., 2013).

Osmotické přizpůsobení je možné rozdělit do dvou kategorií, a to na aktivní a pasivní. Pasivní osmotické přizpůsobení je spojeno se ztrátou vody, a tedy se snížením celkového objemu buňky, čímž dochází k pasivní změně koncentrace rozpuštěných látek, a tedy ke snížení osmotického potenciálu. Toto přizpůsobení je do jisté míry typické pro všechny rostliny, vyjma sukulentů, ale nejedná se o adaptaci rostlin (Boyer et al., 2008b). Naopak aktivní osmotické přizpůsobení zahrnuje akumulaci rozpuštěných látek v buňce nebo jejich syntézu de novo a podle těchto autorů se tyto látky podílejí na snížení osmotického potenciálu buněk, a tím se snižuje celkový vodní potenciál buňky. Z tohoto pohledu je třeba osmotické přizpůsobení chápat jako faktor adaptace rostlin k suchu, a nikoliv pouze jako odpověď na sucho (Kozłowski and Pallardy, 2002).

Rozpuštěné látky v buňce mohou zahrnovat metabolity, které jsou použity na počátku stresu pro zpomalení růstu (Boyer et al., 2008a; Munns, 1988; Munns and King, 1988), nebo se jedná o již existující látky vzniklé rozkladem škrobu, jenž se pohybuje v mezibuněčných prostorech (Morgan, 2000, 1984). Jsou uváděny nejčastěji čtyři skupiny rozpuštěných látek v buňce podílejících se na osmotickém přizpůsobení a snížení vodního potenciálu pletiv: anorganické kationty a anionty, cukry a cukerné alkoholy, neproteinové aminokyseliny a organické kyseliny (2010).

Anorganické ionty jsou energeticky méně náročné a jsou často omezovány na vakuolu. Jejich hlavním úkolem je chránit cytoplazmu před možným toxickým účinkem (Nilsen and Orcutt, 1996). Další skupinu osmoticky aktivních látek je možné označit jako kompatibilní soluty,



kdy podle Ashraf et Foolad (2007a) je jejich hlavní funkcí v buňce udržování její hydratace a turgoru. Dále se podílí na ochraně buněčné membrány, stabilizaci enzymů a proteinů a zabraňují oxidativnímu stresu. Po chemické stránce se jedná o látky vysoce rozpustné, bez náboje, bez toxicity v závislosti na jejich koncentraci (McNeil et al., 1999).

Rozlišujeme mezi nimi metabolicky aktivní látky, označované jako kompatibilní rozpuštěné látky a látky relativně stabilní. Kompatibilní rozpuštěné látky jsou zastoupeny sacharidy (např. fruktóza, sacharóza, glukóza), cukernými alkoholy (polyoly, glycerol, mannitol, sorbitol, quercitol, pinitol atd.), aminokyselinami (zejména prolin) a kvarterními dusíkatými látkami (zejména glycin betain), jak uvádí např. Meloni et al (2004).

Mezi osmoticky aktivní látky patří neredukující disacharid trehalóza. Podle Chimenti et al. (Levitt, 1980, p. 198) a Redillas et al. (2012a) se trehalóza podílí na stabilizaci dehydratovaných enzymů, bílkovin, membránových lipidů, biologických struktur, makromolekul v průběhu působení vodního deficitu. Trehalózy je v rostlinných pletivech velmi malé množství, ale hraje klíčovou roli v mnoha metabolických procesech, které souvisejí s tolerancí vůči suchu. Jedná se o velmi významný osmoprotektant. Uvedení autoři dále konstatují, že exogenně aplikována trehalóza je snadno absorbována kořeny a pletivy listů. Velmi snadno je distribuována v rámci rostlinného těla (Kozlowski and Pallardy, 2002; Redillas et al., 2012b).

Další osmoticky aktivní látkou je kvarterní dusíkatá sloučenina glycin betain, která je látkou osmoticky aktivní. Jeho význam v obranných reakcích rostlin vůči suchu spočívá v tom, že nepřímo ovlivňuje enzymatickou aktivitu rostlin, stabilizuje membránové proteiny (Zhang et al., 2004), chrání cytoplazmu, chloroplasty (Frye et al., 2007) a fotosyntetický aparát (Sakamoto and Murata, 2002). Dále působí jako lapač volných kyslíkových radikálů (Arora et al., 2002). U některých druhů rostlin (např. tabák, pšenice, ječmen, kukuřice) se tato látka nevytváří. Jejím významným zdrojem je cukrová řepa (Rhodes and Hanson, 1993). Exogenní aplikací glycin betainu se zabýval např. (Zhang et al., 2004). Podle těchto autorů se glycin betain po foliární aplikaci rychle vstřebává a je velmi dobře transportován v rámci jednotlivých orgánů.

Aminokyselina prolin představuje pro většinu rostlin jednu ze základních charakteristik působení stresu a je výsledkem degradace proteinů. Při působení stresu se jeho hladina v buňce zvyšuje (Kavi Kishor and Sreenivasulu, 2014; Kishor et al., 2015). Důvodem zvýšení jeho koncentrace v buňce je fytohormonální vliv kyseliny abscisové na metabolismus prolinu a dále, že vlivem působení vodního deficitu dochází ke zvýšení enzymů příslušné syntetázy a zároveň

ke snížení jeho rozkladu (Rontein et al., 2002). Podle Bandurska et Jozwiaka (2010) je změna koncentrace prolinu u jílku vytrvalého a kostřavy červené synchronizována s poklesem relativního obsahu vody a snížením turgoru. Obdobné závěry uvádí odborníci pro pšenici (Ahmadi and Sio-Se Mardeh, 2004) a hrách (Alexieva et al., 2001). Konstatují, že prolin má důležitou úlohu v rovnováze osmózy v buňce (Fedina et al., 2002).

Další z kompatibilních solutů je například kyselina 5-aminolevulová. Vzniká kondenzací glycinu a sukcinu přes 2-amino-3-oxo-1,6-hexándiovou kyselinu, která se následně dekarboxyluje za vzniku 5-aminolevulové kyseliny. Enzym, který uvedenou reakci katalyzuje je umístěn v matrix mitochondrie (Wang et al., 2005). Dále se uvádí, že kyselina 5-aminolevulová je klíčovým prekurzorem v biosyntéze všech porfyrinových sloučenin, tedy také fytochromů a chlorofylů (Naeem et al., 2012).

Dosud nejsou mechanismy účinku kyseliny 5-aminolevulové v podmínkách stresu plně objasněny (Akram and Ashraf, 2013). Avšak exogenní aplikace kyseliny 5-aminolevulové zvyšuje výnos rýže, ječmene, brambor, česneku (A. Tanaka et al., 1993; Tanaka et al., 1992; Y. Tanaka et al., 1993). Wang et al. (2004) konstatují, že její aplikace v nízkých koncentracích se podílí na zvýšení tolerance vůči tepelné zátěži (Wang et al., 2005, 2004; Zhang et al., 2012). Obdobné závěry byly potvrzeny také pro zasolení (Zhang et al., 2006), herbicidní stres (Kumar et al., 1999). Dále je uváděn pozitivní vliv kyseliny 5-aminolevulové na růst klíčících rostlin např. řepky, některých druhů zelenin a dále působí na zvýšení rychlosti fotosyntézy, obsahu chlorofylů a jako antioxidant, kdy zabraňuje oxidativnímu poškození membrán. V neposlední řadě při zasolení limituje příjem sodných iontů (Chimenti et al., 2006).

### 3 Cíle a hypotézy disertační práce

Deficit vody vyvolaný suchem či zasolením je pro rostliny jedním z globálních abiotických stresů. Pochopení reakcí rostlin vůči vodnímu deficitu, je velmi důležité pro zvýšení jejich tolerance a pro výběr vhodného genetického materiálu pro šlechtění. Schopnost rostlin aklimatizovat se v různých prostředích je přímo nebo nepřímo spojena s jejich schopností přizpůsobit se na úrovni fotosyntézy. Z těchto důvodů je pozornost zaměřena na studium změn výměny plynů a aktivitu fotosyntetického aparátu ve vztahu k abiotickým stresorům a možné aplikaci látek, které by snižovaly negativní vliv stresorů na rostliny. Hlavním cílem disertační práce je komplexnější pohled na vliv vodního deficitu, aplikace osmoticky aktivních látek a jejich ovlivnění fotosyntetického aparátu rostlin.

#### **Dílčí cíle práce jsou:**

1. Kvantifikovat změny vodního režimu a fotosyntetických parametrů v závislosti na délce působení vodního deficitu a aplikaci osmoticky aktivních látek.
2. Stanovit rozdílnou citlivost sledovaných fyziologických parametrů a jejich význam v toleranci k vodnímu deficitu u C3 a C4 rostlin.
3. Stanovit fyziologickou odezvu rostlin na působení vodního deficitu a aplikaci osmoticky aktivních látek.
4. Kvantifikovat na základě fyziologických parametrů možnost aplikace osmoticky aktivních látek před a v době působení vodního deficitu na rostliny.

#### **V souvislosti s uvedenými cíli práce byly navrženy následující hypotézy:**

1. U vybraných rostlinných druhů dochází při působení vodního deficitu a aplikaci osmoticky aktivních látek k ovlivnění sledovaných fyziologických charakteristik.
2. Lze stanovit relevantní fyziologické ukazatele odolnosti rostlin k vodnímu deficitu.
3. Jsou fyziologické odezvy C3 a C4 rostlin odlišné v podmínkách různého prostředí a působení stresoru.

## 4 Metodika

Vliv vodního deficitu u rostlin navozeného metodou postupné dehydratace nebo zasolením, byl sledován u vybraných druhů C3 a C4 rostlin: *Triticum aestivum*, *Beta vulgaris*, *Portulaca oleracea* a *Eruca sativa*. Pokusy byly založeny jako nádobové v podmínkách klimatizované komory Conviron E8 případně skleníku KBFR nebo sklenících ÚEB AV ČR (Ústav experimentální botaniky Akademie věd České Republiky) za řízených světelných a teplotních podmínek, dále byly uskutečněny polní maloparcelkové pokusy. Schéma pokusů odpovídalo běžně používaným metodickým postupům pro sledování vlivu stresového faktoru na fyziologický stav sledovaných rostlin a aplikaci osmotického solutu. V průběhu jednotlivých pokusů se uskutečnily odběry a měření vybraných fyziologických charakteristik, a to v rámci různých vývojových fází.

V rámci měření vodního režimu rostlin byl sledován relativní obsah vody v rostlinném pletivu, vodní a osmotický potenciál na zařízeních (Psypro, Wescor, USA a WP4C Dew Point PotentialMeter (Decagon Devices, Inc.)). Parametry fotosyntézy byly sledovány pomocí infračerveného analyzátoru plynů LC pro+ SD (ADC BioScientific, VB) a fluorescence chlorofylů pomocí fluorometru (OS1, ADC BioScientific, VB). Obsah fotosyntetických pigmentů byl stanoven spektrofotometricky (UV-vis, Evolution 201, Thermo Scientific, USA). Jako další produkt odpovědi metabolismu rostlin na stres byl sledován obsah aminokyseliny prolin a malondialdehydu (MDA) stejně jako u obsahu pigmentů spektrofotometricky. V neposlední řadě byly sledovány růstové charakteristiky jako velikost rostlin, hmotnost rostlin, vývojová fáze rostlin, počet listů, délka a šířka listu, sušina nadzemní části rostliny a kořene a jejich vzájemný poměr (R/S).

### 4.1 Použité metody

#### 4.1.1 Stanovení relativního obsahu vody v listech (RWC)

Stanovení RWC se uskutečnilo na základě metodiky (Hniličková et al., 2017). Z pěti rostlin bylo odebráno 25 terčičků, korkovrtem o průměru 1 cm. Terčičky byly získávány z celé plochy listů s výjimkou střední žilky. Byla stanovena jejich okamžitá čerstvá hmotnost (FM) následně byly 2 hodiny ve tmě syceny v destilované vodě a zváženy (SM) a následně sušeny do konstantní hmotnosti při teplotě 80 °C (DM). RWC v listech byla stanovena jako  $100 \times (FM-DM) / (SM-DM)$ .

#### **4.1.2 Stanovení vodního potenciálu ( $\psi_w$ ).**

U obou přístrojů je používán totožný postup přípravy vzorků, kdy vzorky listů jsou umístěny do injekční stříkačky o objemu 5 ml, utěsněny parafilmem a zmrazeny při teplotě -18 až -24 °C. Před vlastním měřením jsou injekční stříkačky ponechány při laboratorní teplotě, dokud pletivo zcela neodtaje. Vodní potenciál je následně stanoven z vytlačené buněčné šťávy na terčíku filtračního papíru o průměru dle typu zařízení.

##### **Psypro Wescor**

Přístroj PSYPRO měří vodní potenciál z pletiva či roztoků metodou rosného bodu. Vložením vzorku do komůrky a jejím uzavřením nastává po určité době ustálení hodnoty tlaku vodní páry nad vzorkem oproti tlaku nasycené vodní páry vzorku. Měřicím termočlávkovým spojem prochází proud, který jej ochlazuje oproti teplotě okolí. Nižší teplota spoje způsobuje, že na jeho povrchu zkondenzuje vodní pára. V okamžiku kondenzace má povrch spoje teplotu rosného bodu okolního vzduchu, z které je zjišťován tlak vodní páry. Suchým termočlávkem je měřena teplota vzduchu, která je v rovnováze se vzduchem obsaženým ve vzorku (Procházka, 1998; Wiebe et al., 1972).

##### **Dew Point Potential Meter (WP4C)**

Stanovení vodního potenciálu na zařízení WP4C provedeno na základě metodiky (Hniličková et al., 2017), kdy WP4C měří vodní potenciál vzorku na principu rosného bodu. U tohoto typu přístroje, se vzorek dostává do rovnovážného stavu se vzduchem v utěsněné komoře, která obsahuje zrcadlo a prostředky pro detekci kondenzace na zrcadle. Při dosažení rovnovážného stavu je vodní potenciál vzduchu v komoře stejný jako vodního potenciálu vzorku. Ve WP4C je teplota zrcadla přesně řízena termoelektrickým chladičem. Detekce přesného okamžiku, kdy se objeví první kondenzace na zrcadle je pozorována u fotoelektrického článku. Světelný paprsek je směřován na zrcadlo a odrážen do fotodetektoru. Fotodetektor snímá změnu odrazu, když dojde ke kondenzaci na zrcadle. Termočlánek připojený k zrcadlu pak zaznamená teplotu, při které dochází ke kondenzaci.

#### **4.1.3 Gazometrické stanovení výměny plynů**

Rychlost čisté asimilace CO<sub>2</sub> (A), rychlost transpirace (E) a stomatální vodivost ( $g_s$ ) byly určeny přímým měřením na plně expandovaném listu s využitím přenosného infračerveného

analyzátoru plynů LCpro+ (ADC BioScientific Ltd.). Parametry výměny plynů byly měřeny vždy mezi 8:00 až 14:00 hodinou. Každá varianta byla měřena ve více opakováních, kdy měření každého ze vzorků trvalo minimálně 15 minut a v intervalu 0,5 minuty byly zaznamenávány sledované charakteristiky. Při měření výměny plynů byl stanoven ustálený stav uvnitř měřicí komory. Parametry výměny plynů byly v asimilační komůrce měřeny při teplotě 23 až 25 °C a ozáření 650  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  fotosynteticky aktivní radiace (PAR).

Sledované charakteristiky byly měřicím analyzátozem kalkulovány na základě naměřených a vypočtených údajů podle níže uvedených vztahů:

#### **Rychlost čisté asimilace CO<sub>2</sub> (A):**

Je vypočtena jako  $A = u_s \Delta c$  běžně uváděna v jednotkách [ $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ], kdy  $\Delta c$  je rozdílem koncentrací CO<sub>2</sub> při vstupu a výstupu do měřicí komory v [ $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ] a  $u_s$  označuje průtok vzduchu na  $\text{m}^2$  listové plochy v [ $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ].

#### **Rychlost transpirace (E):**

Je vypočtena jako  $E = \Delta e u_s / P$  běžně uváděna v jednotkách [ $\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ], kdy  $\Delta e$  je rozdílem koncentrací vodní páry v  $\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  a  $u_s$  označuje průtok vzduchu na  $\text{m}^2$  listové plochy v [ $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ] a  $P$  je okolní tlak v mbar.

#### **Stomatální vodivost (g<sub>s</sub>):**

Je vypočtena jako  $g_s = 1/r_s$  běžně uváděna v jednotkách [ $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ], kdy  $r_s$  označuje stomatální odpory vůči přenosu vodní páry v [ $\text{m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ].

#### **Koncentrace CO<sub>2</sub> uvnitř průduch (c<sub>i</sub>):**

Je vypočtena jako  $c_i = \{[(g_c - (E/2)) c'] - A\}/g_c + (E/2)$  uváděna v jednotkách [ $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ]. Kdy  $c'$  vyjadřuje množství CO<sub>2</sub> vystupujícího z měřicí komory v jednotkách [ $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ].  $E$  popisuje úroveň transpirace [ $\text{molH}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ] dále  $A$ , která vyjadřuje intenzitu asimilace CO<sub>2</sub>, a to v [ $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ].  $g_c$  je vypočteno ze vztahu kde  $g_c = 1/(1,6r_s) + (1,37r_b)$ , kdy  $r_s$  odpovídá meznímu odporu průduchu vůči páře a  $r_b$  odpovídá meznímu odporu povrchu vůči vodní páře, obě hodnoty jsou v jednotkách [ $\text{m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ].

#### **Teplota komory a listu (T<sub>ch</sub>, T<sub>leaf</sub>):**

Kdy teplota uvnitř komory, značena jako  $T_{ch}$ , je měřena termočlánkem a uváděna v °C. Teplota povrchu listu, značena  $T_{leaf}$ , je vypočtena z teploty komory, a to jako  $T_{leaf} = T_{ch} + \{[(Q \times H_{faktor}) - \lambda E] / [((0.93 \times M_a \times C_p) / r_b) + 4\sigma (T_{ch} + 273,16)^3]\} \times 1$  opět uváděna v °C. Kdy  $Q$  je hustota světelného záření na okně měřicí komory v [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ],  $H_{faktor}$  označuje množství přeměněné energie v [ $\text{J}/\mu\text{mol}$ ],  $\lambda$  skryté skupenské teplo po odpaření vody v [ $\text{J } \mu\text{mol}^{-1}$ ], používaná hodnota je  $2,4387 \times 10^{-2}$  v  $\text{m}^3$ .  $E$  je úroveň transpirace v [ $\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ].  $M_a$  je molekulová hmotnost vzduch, kdy používaná hodnota je 28,97.  $C_p$  je specifická teplota při konstantním tlaku používaná hodnota je 1,012 v [ $\text{J g}^{-1} \text{K}$ ],  $r_b$  vyjadřuje mezní odpor povrchu vůči přenosu páry v [ $\text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ].  $\sigma$  vyjadřuje takzvanou Boltzmannovu konstantu, která činí hodnotu  $5,7 \times 10^{-8}$  v jednotkách [ $\text{Wm}^{-2} \text{K}^{-4}$ ].

#### 4.1.4 Stanovení maximálního kvantového výtěžku PSII (Fv/Fm)

Maximální kvantový výtěžek fotosystému II (Fv/Fm), základní fluorescence ( $F_0$ ), maximální fluorescence (Fm) a variabilní fluorescence (Fv) byly zaznamenávány pomocí přenosného fluorometru OS1-FL (*Opti-Sciences, ADC, BioScientific, Ltd.*). Na čerstvý list je umístěn zatemňovací klips po dobu 20 minut, aby se nastavil stav přizpůsobený tmě. Fluorescence chlorofylu je dále excitována 660 nm pevným zdrojem světla s filtry blokujícími záření delší než 690 nm. Nasycení měřeného fotosystému bylo dosaženo použitím filtrované 35 W halogenové lampy (350–690 nm) s pulzem  $15\,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  po dobu 0,8 sekundy. Maximální kvantový výtěžek PSII (Fv/Fm) byl vypočten jako  $Fv/Fm = (Fm - F_0)/Fm$ . Měření zmíněných parametrů se uskutečnilo vždy v dostatečném počtu opakování ve všech variantách v každém vybraném termínu měření.

#### 4.1.5 Stanovení obsahu fotosynteticky aktivních pigmentů

Měření obsahu fotosynteticky aktivních pigmentů je možno stanovit metodami destruktivními i nedestruktivními. Kdy u destruktivních metod je využíván přechodu pigmentu do roztoku a následného proměření vzniklého roztoku na spektrofotometru v našem případě UV-Vis. U nedestruktivní metody se využívají infračervené analyzátoři.

##### **Destruktivní metoda**

Obsah fotosynteticky aktivních pigmentů byl stanovován destruktivní metodou na základě metodických postupů dle Porra et al. (2002), kdy z dostatečného množství listu jsou korkovrtem

vyseknu ty terčíky o definované ploše. Jednotlivé terčíky jsou vloženy do zkumavek typ Eppendorf s extrakčním činidlem dimethylformamidu (N, N – dimethylu kyseliny mravenčí). Zkumavky jsou umístěny ve tmě při teplotě 4 °C po dobu 24 hodin. Následně třepány po dobu 1 hodiny z důvodu vytřepání zbytku nepřeslých pigmentů do objemu extraktu. Nakonec je stanovena absorbance při 480; 646,8; 663,8 a 710 nm. Z absorpčních hodnot jsou podle rovnic níže dopočítávána množství jednotlivých chlorofylu a, b a celkových karotenoidů.

Rovnice pro výpočet chlorofylu a:  $\text{Chl a} = 12,0 \times A_{663,8} - 3,11 \times A_{646,8}$

Rovnice pro výpočet chlorofylu b:  $\text{Chl b} = 20,78 \times A_{646,8} - 4,88 \times A_{663,8}$

Rovnice pro výpočet celkového chlorofylu:  $\text{Chl a} + \text{b} = 7,12 \times A_{663,8} + 17,67 \times A_{646,8}$

Rovnice pro výpočet karotenoidů:  $\text{Car}_{x+c} = (1000 \times A_{480} - 1,12 \text{ Chl a} - 34,07 \text{ Chl b}) / 245$

### **Nedestruktivní metoda**

Pro měření obsahu pigmentů nedestruktivní metodou je využíván přístroj CCM-300 (*Opti-Sciences, ADC, BioScientific, Ltd.*), využívá fluorescenci chlorofylu, přesněji emisi fluorescenčního světla o vlnové délce 735 nm ku emisi fluorescenčního světla o vlnové délce 700 nm. Přístroj automaticky přepočítává primární data na koncentraci chlorofylu. Ve výchozím nastavení je používána rovnice (Gitelson et al., 1999), kterou však lze uživatelsky upravovat. Měření je dle stejné studie přesné v rozsahu 41–675 mg chlorofylu na čtvereční metr listové plochy.

### **4.1.6 Stanovení obsahu prolinu**

Použitá metodika pro detekci koncentrace prolinu v rostlinném pletivu vychází původně z metodiky podle Batese (Bates et al., 1973) po modifikaci. Volný prolin je z rostlinného pletiva získán za pomoci 3 % kyseliny sulfosalicylové. Ta je bezbarvá a působí jako efektivní proteinové srážedlo ve vodném roztoku. Pro detekci prolinu je využita reakce s ninhydrinem, jelikož společně tvoří látku schopnou absorbovat elektromagnetické záření tzv. chromofor. K extrakci prolin-ninhydrinového chromoforu se používá toluen. Spektrum daného chromoforu je zjištěno ve spektrofotometru (Bates et al., 1973).

Vzorek listového pletiva (bez střední žilky) o definované hmotnosti je nejprve rozetřen v 5 ml 3 % kyseliny sulfosalicylové v třecí misce. Homogenizovaná směs je přefiltrována. Směs z 1 ml filtrátu, 1 ml ninhydrinu a 1 ml kyseliny octové je promísena na třepačce a posléze uvařena při 90 °C. Po zchlazení jsou ke vzorku přidány 3 ml toluenu a směs je opět promíchána



na třepačce. Po oddělení fází je měřena absorbance horní vrstvy vzorků při 520 nm na UV-Vis spektrofotometru (*Evolution 210, Thermo Scientific*).

#### **4.1.7 Stanovení obsahu malondialdehydu (MDA)**

Obsah malondialdehydu (MDA) se obvykle stanovuje reakcí s kyselinou thiobarbiturovou v kyselém prostředí. Je měřen na základě modifikované metody dle Heath and Packer, 1968.

Čerstvý nebo zamražený rostlinný materiál je homogenizován v kapalném dusíku, výsledný homogenizát je smíchán s 80 % etanolem. Po uplynulé době nezbytné k extrakci MDA je výsledný roztok filtrován a výsledný filtrát rozpipetován po dvou 0,7ml variantách do mikrocentrifugačních zkumavek. Alikvoty 0,7 ml každého filtrátu jsou smíchány s 0,7 ml 0,65 % TBA v 20 % TCA (kyselina trichloroctová) a 0,01 % BHT (butylovaný hydroxytoluen) a druhá sada 0,7 ml vzorků byla smíchána s 0,7 ml 20 % TCA a 0,01 % BHT. Mikrocentrifugační zkumavky byly inkubovány při 95 °C po dobu 25 minut a po ochlazení byly odstředovány po dobu 5 minut při 6000 ot./min. Absorbance při 440 nm, 532 nm a 600 nm byla odečtena na UV-Vis spektrofotometru (*Evolution 210, Thermo Scientific*) a koncentrace MDA ( $\text{nmol g}^{-1}$  FW) byla vypočtena pomocí rovnice Heath a Packera 23.

## 5 Publikované práce

### 1. The Effect of the Application of Stimulants on the Photosynthetic Apparatus and the Yield of Winter Wheat

Název Čj.: Vliv aplikace stimulantů na fotosyntetický aparát a výnos pšenice ozimé

Informace o časopise: Agronomy-basel  
IF= 3,949 (2021); ISSN: 2073-4395

### 2. Biochar in manure can suppress water stress of sugar beet (*Beta vulgaris*) and increase sucrose content in tubers

Název Čj.: Biouhel s hnojem může potlačit vodní stres u cukrové řepy (*Beta vulgaris*) a zvýšit obsah sacharózy v bulvách

Informace o časopise: Science of the total environment  
IF= 10,754 (2021); ISSN: 0048-9697

### 3. The effect of drought on the physiological state of sugar beet and the possibility of using adjuvants

Název Čj.: Působení sucha na fyziologický stav cukrové řepy a možnosti využití pomocných prostředků

Informace o časopise: Listy cukrovarnické a řepářské  
IF= 0,308 (2021); ISSN: 1210-3306

### 4. Salinity Stress Affects Photosynthesis, Malondialdehyde Formation, and Proline Content in *Portulaca oleracea* L.

Název Čj.: Stres vlivem stresu zasolením na fotosyntézu, tvorbu malondialdehydu a obsah prolinu u *Portulaca oleracea* L.

Informace o časopise: Plants-basel  
IF= 4,658 (2021); eISSN: 2223-7747




### 5. Effects of salt stress on water status, photosynthesis and chlorophyll fluorescence of rocket

Název Čj.: Vliv stresu zasolením na obsah vody, fotosyntézu a fluorescenci chlorofylu u rožky seté

Informace o časopise: Plant soil and environment  
IF= 2,328 (2021); ISSN: 1214-1178

Article

# The Effect of the Application of Stimulants on the Photosynthetic Apparatus and the Yield of Winter Wheat

Kamil Kraus <sup>1</sup>, Helena Hnilickova <sup>1,\*</sup> , Jan Pecka <sup>1</sup>, Marie Lhotska <sup>1</sup>, Alena Bezdickova <sup>2</sup>, Petr Martinek <sup>3</sup> , Lenka Kucirkova <sup>4</sup> and Frantisek Hnilicka <sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcka 129, 16500 Prague, Czech Republic; krausk@af.czu.cz (K.K.); peckaj@af.czu.cz (J.P.); lhotskamarie@af.czu.cz (M.L.); hnilicka@af.czu.cz (F.H.)

<sup>2</sup> Ditana Ltd., CSA 780, 783 53 Velka Bystrice, Czech Republic; bezdickova@ditana.cz

<sup>3</sup> Agrotest Fyto Ltd., Havlickova Z 87-121, 767 01 Kromeriz, Czech Republic; martinek@vukrom.cz

<sup>4</sup> Department of Languages, Faculty of Economics and Management, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcka 129, 16500 Prague, Czech Republic; kucirkova@pef.czu.cz

\* Correspondence: hnilickova@af.czu.cz; Tel.: +420-224-382-519

**Abstract:** The use of stimulation preparations seems to be a promising means for mitigating the effects of abiotic and biotic stressors. Their significance includes plant organism stimulation and metabolism optimisation, water regime, and nutrition during periods of stress. They help bridge it over and create conditions for rapid regeneration. In a field experiment, the effect of the application of stimulation preparations on cultivars *Triticum aestivum* L. with different genetic composition was evaluated (donor of blue aleurone colour KM-72-18; donor of a multi-row spike (MRS) KM-94-18). Our results show a predominantly positive effect of the application of stimulants on the yield and thousand-grain weight (TKW). The results obtained were influenced by the year, based on different temperatures and precipitation. Higher yields were achieved in 2020 with higher total precipitation during the grain filling period and with a higher maximum quantum yield of the photosystem II (Fv/Fm). In 2019, this period was significantly dry and warm, which was reflected in a lower yield and TKM, higher proline content in the leaves, and lower Fv/Fm values. In both experimental years, there was a higher yield of the cultivar with blue aleurone (KM-72-18). In the case of cultivars with coloured grains, the promising use of the content substances in cultivars as natural means of increasing resistance to abiotic and biotic stressors seems to be promising.

**Keywords:** stimulation; supportive preparations; abiotic stresses; photosynthesis; yield



Citation: Kraus, K.; Hnilickova, H.; Pecka, J.; Lhotska, M.; Bezdickova, A.; Martinek, P.; Kucirkova, L.; Hnilicka, F. The Effect of the Application of Stimulants on the Photosynthetic Apparatus and the Yield of Winter Wheat. *Agronomy* 2022, 12, 78. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010078>

Academic Editor: Christos A. Dordas

Received: 18 November 2021

Accepted: 27 December 2021

Published: 30 December 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Field crops in general are constantly exposed to a lot of stressors during the growing season. These are usually divided into two categories—abiotic and biotic—depending on the nature of the trigger [1]. In field conditions, individual stressors do not act on plants separately, but always in combination, e.g., high temperature, higher intensity of sunlight, and water deficit [2]. *Triticum aestivum* L. is one of the most widespread crops. Global wheat production is expected to reach a new record of 780 million tonnes in 2021, according to a preliminary forecast issued on March 4 by the Food and Agriculture Organization of the United Nations [3]. According to some predicted reports, agriculture is considered the most endangered activity adversely affected by the climate change [4].

Abiotic stress factors cause morphological, physiological, and biochemical changes. Ultimately, they can affect the yield and product quality as well as change the visual appearance and/or nutritional value [5]. Generally, many stress factors act at the same time, such as water and high-light stresses [6].

Plant adaptation and reducing the effect of stress factors are essential for the increase of the agricultural system's resilience, crop yields, and quality assurance. The environ-

mental conditions cannot be controlled, and therefore several strategies such as agronomic techniques or the breeding of more tolerant cultivars are needed [7].

For years, research and practice have been dealing with ways to reduce the effects of stressors on field crops stands: from the breeding of tolerant cultivars and the introduction of new species, to the optimisation of agricultural techniques. One possible method from the set of all used measures is the application of stimulation preparations [5]. They usually have a different chemical composition, where the stimulation effect is a consequence of the synergistic action of different bioactive molecules. These are usually products obtained from various organisms or microorganisms, or even inorganic substances that are capable of improving plant growth, productivity, and alleviating the negative effects of stress [8–10]. Mineral elements, vitamins, amino acids, poly- and oligosaccharides, traces of natural plant hormones are among the most well-known components [11]. They can act directly on the physiology of the plant and modify some molecular processes, allowing improving the efficiency of water and nutrient utilisation in crops and stimulating plant development by increasing primary and secondary metabolism [10]. According to a report by Grand View Research, Inc. in March 2018, the size of the biostimulant market is expected to reach a turnover of USD 4.14 billion by 2025 [12].

Another way to eliminate the impact of abiotic stressors is the increasing of the yield potential of new cultivars. The spike storage capacity, which stimulates the inflow of assimilates into the grain in the period after anthesis, plays an important role in the formation of the yield [13]. Therefore, gene sources are sought to increase the number of reproductive organs [14], such as the number of spikelets in a spike, the number of grains in a spikelet, or the number of embryos in a flower [15,16]. A multi-row spike (MRS) was transferred to common wheat from a hexaploid radiomutant source obtained from VIR St. Petersburg. Multi-row spike is conditioned by the recessive gene *mrs1*, located on the short arm of the 2DS chromosome. It is manifested by an increased number of sessile spikelets growing from individual nodes of the spike and by an increase in the spike storage capacity [17].

The accumulation of secondary metabolites may also be important in the elimination of abiotic stressors. The study of the resistance of coloured grain genotypes to abiotic stressors seems very promising. Coloured wheat grains biosynthesise and accumulate anthocyanin [18]. Anthocyanins have osmoregulatory abilities, thus causing a protective role under conditions of extreme temperatures. Under the influence of drought and salinity, they can prevent the oxidation of lipids and, in this way, protect the plasma membrane from damage [19,20]. Comparative analysis of almost isogenic wheat lines, differing from each other by the content of anthocyanins in the coleoptile and pericarp, showed a higher drought tolerance in the line with a higher content of purple dye [21]. Under drought stress, the expression levels of *TaCHS*, *TaCHI*, *TaF3H*, *TaDFR*, and *TaANS* in wheat leaves were upregulated, the anthocyanin content was increased, and the plants had stronger drought resistance [20]. Coloured wheat genotypes with high anthocyanin content are capable of maintaining significantly higher dry matter production after salt stress treatment [22].

The field experiment aimed to evaluate the effect of the application of stimulation preparations on cultivars with different genetic architecture to cope with unfavourable climatic conditions. First, the use of the possibility of influencing the metabolism by content substances (anthocyanins). The experimental cultivars were a donor of blue colour aleurone and donor of the multi-row spike (MRS). The monitored parameters were yield and selected physiological characteristics.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental Design

The field experiment took place in the period of 2018–2020 in Velký Týnec, Czech Republic (49°33.11838' N, 17°20.25320' E). The research was focused on monitoring the effect of the application of commercial stimulation preparations on selected physiological parameters and yield on the winter wheat. The application scheme and characteristics of the preparations

# The Effect of the Application of Stimulants on the Photosynthetic Apparatus and the Yield of Winter Wheat

are given in Table 1. The plant material was derived from cultivars in Kroměříž, the Czech Republic: (i) donor of the blue colour aleurone KM-72-18 (A), conditioned by the presence of the Ba2 gene on the long arm of the chromosome 4A [23], which causes a blue anthocyanin colouration of the grain; (ii) multirow spike (MRS) donor KM-94-18 (B), conditioned by the presence of the FRIZZY PANICLE 1 gene [24], capable of producing a larger number of spikelets from the spindle node [25] (Figure 1).

**Table 1.** Scheme of monitored preparations application and their brief characteristics. For the applied stimulation preparation (T2–T6), the applied dose (L ha<sup>-1</sup>) for the experimental stands and the period of the application according to the phenological phase (BBCH) of the experimental stand is given.

Treatments	Applied Dose of Monitored Stimulants (L ha <sup>-1</sup> ) and the Phenological Phase of the Stand (BBCH)				Preparation Characteristics
	BBCH 30	BBCH 37	BBCH 49–51	BBCH 63	
T1	-	-	-	-	-
T2	Cleanstorm (0.1)	Cleanstorm (0.1)	Cleanstorm (0.1)	Cleanstorm (0.1)	Free amino acids 12%, combustible substances in dry matter 50%
T3	Energen 3D Plus (0.1)	Energen 3D Plus (0.1)	Energen 3D Plus (0.2)	Energen 3D Plus (0.3)	Free amino acids 13%, combustible substances in dry matter 50%
T4	Atlante-Cu-Prolina (0.6)	-	-	-	K <sub>2</sub> O 20%, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 30%, Cu 0.5%, free amino acids (L-proline) 2%
T5	Aminocat 30 (0.2)	-	Aminocat 30 (0.2)	-	Free amino acids 30%, total N 3%, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 1%, K <sub>2</sub> O 1%
T6	Fertileader 2M (2.0)	-	-	-	Seactive complex *, MgO 2%, Mn 11.7%

\* Seactive complex (seaweed extract, plant extracts).



**Figure 1.** (A) Cultivar KM-72-18 (donor of the blue colour aleurone); (B) cultivar KM-94-18 (multirow spike donor).

Sowing was carried out in both years in the first decade of October in 4 million seeds per hectare. During March and April, calcium ammonium nitrate (CAN) was applied in three doses ( $151.2 \text{ kg N ha}^{-1}$  in total). During the experiment, classical agrotechnics was performed with the application of herbicides, insecticides, and morphoregulators according to current needs. The experimental plots were in blocks according to the Latin square, measuring  $1.125 \times 8.9 \text{ m}$ , in triplicate. In the experimental stands, the physiological characteristics were evaluated in phenological phases 65 and 73 BBCH-scale. The phenological phase of the stand was classified according to Meier [26].

### 2.2. Photosynthetic Pigments and Free Proline Analyses

The pigment content in the leaves was measured photometrically with the Evolution 2000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) by the Porra method [27] in ten replicates from each experimental plot and is given in  $\text{mg m}^{-2}$ . The content of free proline was determined using the method of Bates et al. [28] with modifications. A sample of leaves (0.5 g) was homogenised in 10 mL of 3% sulfosalicylic acid using a mortar and pestle, and the homogenate was filtered through filter paper. Aliquots of 1 mL of the filtrate were mixed with 1 mL of acid ninhydrin solution and 1 mL of acetic acid and placed on a shaker for 20 min. The samples were then heated at  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  for 30 min, cooled in ice water, thoroughly mixed with 3 mL of toluene, and incubated for 20 min at room temperature. The samples were stored for 24 h at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Next, the upper layer of the separation mixture was used for the measurement of absorbance at 520 nm (UV-Vis, Evolution 210, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Five plants were used as independent samples for each treatment. The proline concentration was determined using a calibration curve for proline as  $\mu\text{M g}^{-1} \text{ FW}$  (fresh weight) in five replicates from each experimental plot and is expressed in  $\mu\text{mol g}^{-1}$  of fresh biomass.

### 2.3. Chlorophyll Fluorescence

The minimum chlorophyll fluorescence ( $F_0$ ) and the maximum chlorophyll fluorescence ( $F_m$ ) were also measured in situ, with the portable fluorometer OS5p+ (ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, Great Britain) with 1 s excitation pulse (660 nm) and a saturation intensity of  $3000 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  after 20 min of darkness adaptation of the 4th or 5th fully expanded leaves. The maximum quantum yield of PSII was calculated using the formula:  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ . These parameters were measured in five replicates of each experimental plot.

### 2.4. Analysis of the Yield Components

In each plot of the experimental treatments (T1–T6), the yield ( $\text{t ha}^{-1}$ ), and the thousand-grain weight (TKW) were evaluated.

### 2.5. Statistical Analysis

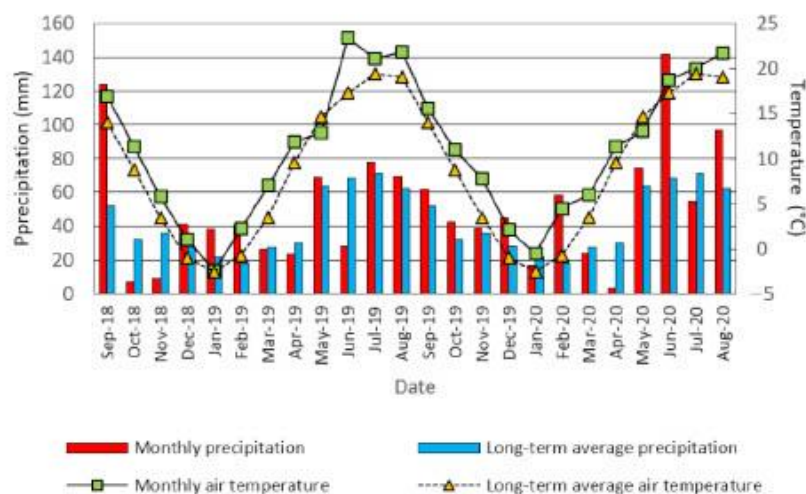
One-way ANOVA was used to evaluate the variables in treatments. After obtaining significant results ( $p < 0.05$ ), multiple comparisons using Tukey's test were applied to identify significant differences between treatments. All analyses were performed using STATISTICA 12 software (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Characteristics of the Experimental Period 2018–2020 and the State of the Stands

The characteristics of the weather during the vegetation period of 2018–2020 compared to the long-term Normal 1981–2010 (N30) are shown in Figure 2. The vegetation period from September 2018 to August 2019 was warmer by  $2.2 \text{ }^\circ\text{C}$  in the experimental locality than the long-term Normal (N30 =  $8.8 \text{ }^\circ\text{C}$ ) with a total precipitation of 579 mm, which represents 113% of the long-term Normal (512 mm). However, the precipitation was not evenly distributed; October, November, April, and June were very dry. The autumn was warm and the winter mild. Winter wheat stands were well established and survived

the winter well with no visible frost damage, no reduction of plants. The months of March and April were below normal in terms of precipitation and temperatures were up to 3 °C higher than the long-term Normal. It caused the early onset of spring, and the very rapid generative development of the winter wheat stands. May was above normal and colder than the long-term Normal (approximately 1.4 °C); June was warm and dry. July was dry and warm, which accelerated ripening.



**Figure 2.** Monthly and long-term air temperature (°C) and precipitation (mm) at the experimental site Velký Týnec in the Czech Republic during the experimental period of 2018–2020. The long-term average is from the period of 1981–2010.

The growing season from September 2019 to August 2020 was warmer by 2.1 °C than the long-term Normal, with a total precipitation of 600 mm, which represents 117% of the long-term Normal. The distribution of the precipitation was again not uniform—almost no precipitation fell in April. By contrast, February, May, and especially June had above-normal precipitation. Autumn was a very warm, humid, and mild winter, followed by an early onset of spring (February was warmer by 5.2 °C than the long-term Normal). An anhydrous April (3 mm of precipitation) significantly affected the condition of the stands. May and June saw above normal precipitation, which improved the condition of the stands. It significantly increased the risk of lodging of winter wheat stands and their subsequent lodging if it was not sufficiently regulated.

The uneven distribution of precipitation is considered to be an unfavourable vegetation factor, which even in years with normal or above-normal total precipitation can affect the amount of crop yield [29–31].

### 3.2. Photosynthetic Pigments

Photosynthesis is the primary process leading to production in the Biosphere [32], and its rate is affected by various factors including high temperature and CO<sub>2</sub> concentration [33,34], drought [35], minerals [36,37], and many others [38]. The content of photosynthetic pigments is an important parameter influencing the rate of photosynthesis. It has been shown in many different scientific works that the content of photosynthetic pigments is reduced by the action of stress factors [39,40]. In the content of total chlorophylls (Chl) significant differences were determined between experimental years, vegetation phases, and genotypes [41]. For carotenoids (Car), there was a significant difference between experimental years and vegetation phases (Table 2).

# The Effect of the Application of Stimulants on the Photosynthetic Apparatus and the Yield of Winter Wheat

**Table 2.** Total chlorophylls (Chlt), carotenoids (Car), the maximum quantum yield of PS II (Fv/Fm), proline content, yield, and thousand-grain weight (TKW). The values given are means  $\pm$  SE for 2019 and 2020, phenological phases 65 and 73 BBCH, cultivars KM-72-18 (A) and KM-94-18 (B) and individual stand treatments (T1–T6). LSD post hoc test. Different letters differ significantly at  $p < 0.05$ .

	Chlt (mg m <sup>-2</sup> )	Car (mg m <sup>-2</sup> )	Fv/Fm	Proline ( $\mu$ M g <sup>-1</sup> )	Yield (t ha <sup>-1</sup> )	TKW (g)
2019	275.1 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>	45.0 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	0.768 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	49.2 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	8.65 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	43.49 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>
2020	254.2 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>	42.7 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	0.778 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	43.7 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	9.37 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	46.49 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>
65 BBCH	326.7 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	53.5 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	0.793 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	35.5 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	-	-
73 BBCH	182.9 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>	31.0 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	0.751 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	57.6 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	-	-
A	272.6 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>	43.8 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	0.776 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	55.6 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	9.42 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	48.94 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>
B	262.1 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>	44.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	0.769 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	37.3 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	8.60 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	41.05 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>
T1	267.9 $\pm$ 8.8 <sup>a</sup>	45.0 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	0.764 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>	50.7 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	8.71 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>	44.23 $\pm$ 1.34 <sup>b</sup>
T2	263.4 $\pm$ 7.2 <sup>a</sup>	43.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	0.774 $\pm$ 0.005 <sup>ab</sup>	47.3 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	9.07 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	45.11 $\pm$ 1.39 <sup>a</sup>
T3	268.2 $\pm$ 8.7 <sup>a</sup>	44.0 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	0.773 $\pm$ 0.004 <sup>ab</sup>	43.7 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	9.15 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup>	45.52 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>
T4	275.3 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup>	45.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	0.775 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	44.7 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	9.14 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	45.38 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>
T5	264.7 $\pm$ 8.0 <sup>a</sup>	43.9 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	0.779 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	44.5 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	9.18 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	44.70 $\pm$ 1.28 <sup>ab</sup>
T6	263.5 $\pm$ 7.9 <sup>a</sup>	43.2 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	0.771 $\pm$ 0.004 <sup>ab</sup>	47.6 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	8.82 $\pm$ 0.16 <sup>bc</sup>	45.03 $\pm$ 1.27 <sup>ab</sup>

The higher content of Chlt and Car was determined in phase 65 BBCH. The reduction in photosynthetic pigments was determined in phase 73 BBCH, which may be caused by gradual leaf senescence [41] or stress factors. A decrease in the content of photosynthetic pigments results in a decrease in photosynthetic activity [42]. Of the monitored cultivars, KM-72-18 with a blue aleurone had the highest Chlt content, and there were no significant differences between the cultivars for Car.

Table 3 shows the contents of Chlt and Car according to single treatments and cultivars. In 2019, the positive effect of the application of stimulation preparations was manifested. The cultivar KM-72-18 in the developmental phase 65 BBCH showed a significant increase in Chlt content compared to the control (T1) in the treatments of T3 (112%) and T4 (106%). In phase 73 BBCH, a higher content of Chlt was evident in comparison with the control in T3 (122%), while a decrease in pigment content occurred in T6. There was no significant effect of carotenoid content in the application of stimulation preparations. In the cultivar KM-94-18 with a multi-row spike, the positive effect of the application of stimulants was manifested only in the developmental phase 73 BBCH. Compared to the control (T1), the Chlt content after the treatments T6 (158%), T4 (150%), T5 (134%), and T2 (117%) was significantly higher. In phase 73 BBCH, the content of carotenoids also showed a positive effect of the application of stimulants. Compared to the control (T1), carotenoids content after the treatments T6 (149%) was significantly higher. June of this year was warm and dry, heat stress during anthesis and grain filling were found to accelerate the degradation of the leaf chlorophyll content. It resulted in a decrease in both leaf photosynthetic activity and the final biomass [43]. The increase in the pigment content of KM-72-18 with blue aleurone may also be caused by the protective function of anthocyanins in plants under stress conditions [21]. In 2020, a positive effect of the application of stimulation preparations on the content of Chlt and Car during the monitored development phases of both cultivars was not shown.



# The Effect of the Application of Stimulants on the Photosynthetic Apparatus and the Yield of Winter Wheat

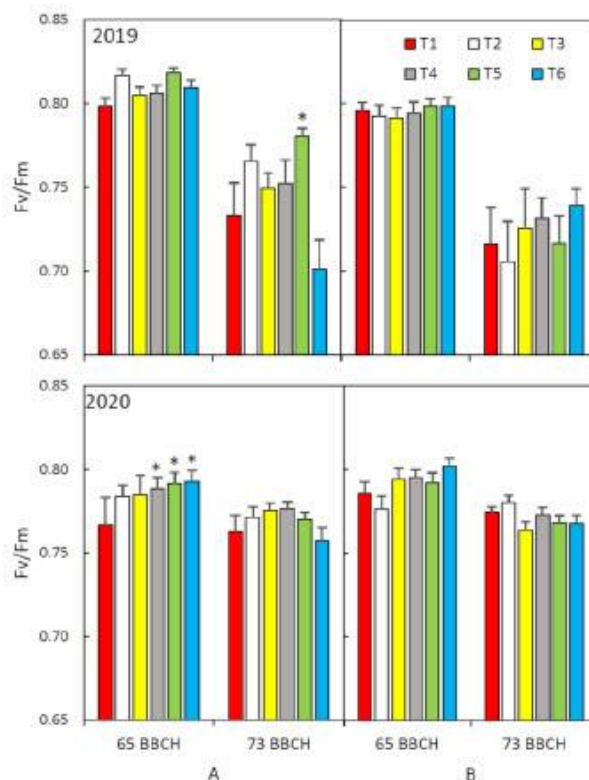
**Table 3.** Total chlorophylls (Chl) and carotenoids (Car) in the cultivar with blue aleurone KM-72-18 (A) and multi-rowed spike KM-94-18 (B) in the developmental phases 65 and 73 BBCH in single vegetation treatments (T1–T6). Means ± SE; n = 10; LSD post hoc test. Different letters differ significantly at p < 0.05.

		2019				2020			
		Chl <sub>t</sub> (mg m <sup>-2</sup> )		Car (mg m <sup>-2</sup> )		Chl <sub>t</sub> (mg m <sup>-2</sup> )		Car (mg m <sup>-2</sup> )	
		65 BBCH	73BBCH	65 BBCH	73BBCH	65 BBCH	73BBCH	65 BBCH	73BBCH
A	T1	333.1 ± 15.9 <sup>b</sup>	156.7 ± 13.4 <sup>b</sup>	51.4 ± 2.4 <sup>ab</sup>	31.7 ± 2.9 <sup>a</sup>	363.0 ± 15.7 <sup>a</sup>	206.2 ± 5.9 <sup>a</sup>	63.9 ± 2.4 <sup>a</sup>	32.8 ± 0.7 <sup>a</sup>
	T2	350.6 ± 10.5 <sup>ab</sup>	181.4 ± 23.0 <sup>ab</sup>	54.5 ± 1.5 <sup>a</sup>	30.3 ± 3.9 <sup>a</sup>	341.4 ± 13.6 <sup>a</sup>	184.9 ± 7.6 <sup>a</sup>	59.9 ± 2.1 <sup>ab</sup>	28.9 ± 1.4 <sup>a</sup>
	T3	374.0 ± 13.2 <sup>a</sup>	191.0 ± 28.2 <sup>a</sup>	56.2 ± 1.8 <sup>a</sup>	34.5 ± 4.5 <sup>a</sup>	335.6 ± 15.3 <sup>ab</sup>	193.3 ± 12.1 <sup>a</sup>	59.4 ± 2.0 <sup>ab</sup>	29.5 ± 2.1 <sup>a</sup>
	T4	353.7 ± 9.9 <sup>a</sup>	128.2 ± 21.6 <sup>bc</sup>	53.1 ± 1.4 <sup>ab</sup>	25.1 ± 3.4 <sup>b</sup>	309.2 ± 12.8 <sup>b</sup>	208.5 ± 5.6 <sup>a</sup>	54.9 ± 1.6 <sup>b</sup>	32.9 ± 0.8 <sup>a</sup>
	T5	325.9 ± 14.2 <sup>b</sup>	164.0 ± 22.6 <sup>ab</sup>	49.2 ± 2.0 <sup>b</sup>	28.4 ± 4.1 <sup>ab</sup>	342.5 ± 15.6 <sup>a</sup>	210.8 ± 6.8 <sup>a</sup>	60.7 ± 2.4 <sup>ab</sup>	33.2 ± 0.9 <sup>a</sup>
	T6	338.4 ± 13.8 <sup>ab</sup>	111.7 ± 12.4 <sup>c</sup>	51.1 ± 1.8 <sup>ab</sup>	20.4 ± 2.4 <sup>b</sup>	320.6 ± 12.5 <sup>b</sup>	203.0 ± 8.1 <sup>a</sup>	54.8 ± 3.3 <sup>b</sup>	31.3 ± 1.4 <sup>a</sup>
B	T1	332.7 ± 12.0 <sup>a</sup>	137.6 ± 21.0 <sup>c</sup>	55.4 ± 1.6 <sup>a</sup>	26.8 ± 3.6 <sup>bc</sup>	310.6 ± 8.2 <sup>a</sup>	200.8 ± 6.3 <sup>a</sup>	54.8 ± 1.7 <sup>a</sup>	31.4 ± 1.0 <sup>a</sup>
	T2	282.4 ± 8.8 <sup>b</sup>	160.9 ± 19.6 <sup>b</sup>	44.5 ± 1.7 <sup>c</sup>	29.1 ± 3.5 <sup>bc</sup>	305.4 ± 8.3 <sup>a</sup>	204.8 ± 2.9 <sup>a</sup>	53.7 ± 1.3 <sup>a</sup>	31.7 ± 0.5 <sup>a</sup>
	T3	306.8 ± 12.4 <sup>ab</sup>	140.5 ± 16.1 <sup>c</sup>	51.8 ± 1.9 <sup>ab</sup>	24.5 ± 2.7 <sup>c</sup>	284.5 ± 6.1 <sup>b</sup>	203.1 ± 3.9 <sup>a</sup>	51.6 ± 1.2 <sup>ab</sup>	31.0 ± 0.6 <sup>a</sup>
	T4	330.7 ± 8.6 <sup>a</sup>	206.8 ± 19.4 <sup>a</sup>	55.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	37.3 ± 2.8 <sup>ab</sup>	326.5 ± 7.1 <sup>a</sup>	198.7 ± 4.2 <sup>ab</sup>	56.9 ± 1.3 <sup>a</sup>	30.6 ± 0.6 <sup>a</sup>
	T5	325.2 ± 12.6 <sup>a</sup>	184.0 ± 23.4 <sup>ab</sup>	55.9 ± 2.1 <sup>a</sup>	34.7 ± 3.1 <sup>ab</sup>	285.8 ± 14.5 <sup>b</sup>	190.2 ± 4.9 <sup>ab</sup>	48.9 ± 1.8 <sup>b</sup>	30.3 ± 0.8 <sup>a</sup>
	T6	307.8 ± 17.2 <sup>ab</sup>	217.3 ± 15.8 <sup>a</sup>	50.2 ± 2.5 <sup>b</sup>	39.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	310.2 ± 10.8 <sup>a</sup>	183.9 ± 4.4 <sup>b</sup>	54.6 ± 1.9 <sup>a</sup>	29.2 ± 0.7 <sup>a</sup>
A	346.0 ± 5.4 <sup>a</sup>	155.5 ± 8.8 <sup>a</sup>	52.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	28.4 ± 1.5 <sup>b</sup>	335.4 ± 6.0 <sup>a</sup>	201.1 ± 3.3 <sup>a</sup>	58.9 ± 1.0 <sup>a</sup>	31.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	
B	314.2 ± 5.1 <sup>b</sup>	174.6 ± 8.4 <sup>a</sup>	52.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	32.1 ± 1.3 <sup>a</sup>	307.2 ± 4.1 <sup>b</sup>	200.2 ± 4.3 <sup>a</sup>	54.0 ± 0.7 <sup>b</sup>	32.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	

The generally accepted parameter indicating the level of stress in plants is the maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm). In plants under optimal conditions, the maximum quantum yield is ~0.8 [44]. The maximum quantum yield of PSII was significantly different between experimental years, vegetation phases, and cultures. The higher Fv/Fm value was in the 65 BBCH phases and from monitored cultivars, the cultivar KM-72-18 with blue aleurone had a higher Fv/Fm ratio. Significant differences in Fv/Fm were determined between the monitored variants of stimulants application (Table 2). Peripolli et al. [45] report an increase in Fv/Fm and the electron transport rate after biostimulator application.

In 2019, during the developmental phase 65 BBCH, the Fv/Fm ratio in both cultivars ranged from 0.791 to 0.817. It can be considered the optimal state [44], while there were no significant differences among applied preparations (Figure 3). These results can be related to the higher amount of precipitation in May, and that the measurement itself took place after the day of the precipitation. During the developmental phase of 73 BBCH, there was a decrease in Fv/Fm. In the KM-72-18 cultivar with blue aleurone, T5 treatment significantly increased the Fv/Fm ratio compared to the control. The decrease in Fv/Fm values suggests that some of the reaction centres of the PSII photosystem are damaged or inactivated. This phenomenon is commonly observed in stressed plants [40]. In addition to the current water and temperature stress in this period, the decrease in these values may also be related to the accelerated leaf senescence, because of which the Fv/Fm decreases [41,46,47]. It is known that many different species can speed up their post-anthesis development in conditions of terminal drought [48].

# The Effect of the Application of Stimulants on the Photosynthetic Apparatus and the Yield of Winter Wheat



**Figure 3.** The maximum quantum yield of PS II ( $F_v/F_m$ ) in the cultivar with blue aleurone KM-72-18 (A) and a multi-row spike KM-94-18 (B) in the development phases 65 and 73 BBCH at single treatments of the stand (T1–T6). Means  $\pm$  SE;  $n = 5$ ; LSD post hoc test. For each period and cultivars, the columns with the symbol \* are significantly different at  $p < 0.05$  compared to the control treatment (T1).

In 2020, during the developmental phases 65 and 73 BBCH, the  $F_v/F_m$  ratio for both cultivars ranged from 0.757 to 0.802. In the development phase 65 BBCH of the KM-72-18 cultivar with blue aleurone, T4–T6 treatments significantly increased the  $F_v/F_m$  ratio compared to the control (T1). It is evident that with sufficient precipitation, when the month of June was significantly above normal precipitation, there was no significant decrease in the  $F_v/F_m$  ratio in the period of grain pouring. The stimulating effect of the applied preparations also was not manifested. According to Zivcak et al. [49], the  $F_v/F_m$  values are extremely stable, starting to decline at a dehydration level that is lethal for typical leaves. If drought stress persists under field conditions for a longer period of time (days), the decrease in the  $F_v/F_m$  values can be dramatic. The increase in sugar biosynthesis in biostimulant-treated plants has been found in several species, and it is associated with the increase in chlorophyll content, pure photosynthesis, and the quantum efficiency of the photosystem II [50,51].

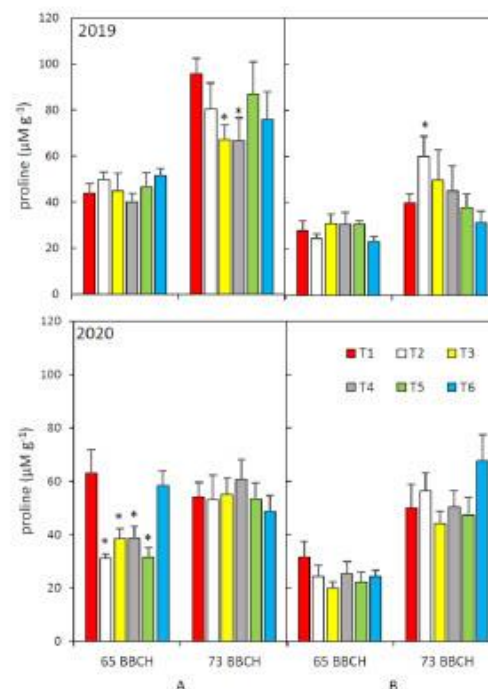
### 3.3. Proline Content

The amino acid proline is increasingly synthesised in plants under conditions of water deficit, low temperature, UV radiation, in the presence of heavy metals, etc. (see Kaur et al. [52]). After the stress subsides, the proline is broken down and can be used as an energy source for plant regeneration after stress [45].

# The Effect of the Application of Stimulants on the Photosynthetic Apparatus and the Yield of Winter Wheat

There were significant differences in proline content between experimental years, vegetation phases, and cultivars (Table 2). The higher proline content was in phase 73 BBCH. Of the cultivars monitored, the proline content was higher in KM-72-18 with blue aleurone. Higher accumulation of proline has an important function in protection against complex stress factors [53]. Proline protects plants by contributing to osmotic adaptation inside cells, stabilising membranes and enzymes, and scavenging free radicals [54]. Furthermore, colour-grained genotypes are expected to be more resistant to abiotic strains due to their higher anthocyanin content [55–57]. Under salinity conditions, genotypes with a higher content of anthocyanins accumulated more proline [22]. Purple wheat cultivars have been shown to have stable yields and can withstand drought stress [58].

Figure 4 shows the proline contents according to individual treatments and cultivars in the monitored years. In 2019, in phase 65 BBCH, there were no significant differences in the proline content between individual treatments of the two cultivars. It can be reconciled with the sufficient precipitation in this period. The higher proline content was determined in phase 73 BBCH. In the cultivar KM-72-18 with blue aleurone, the values of proline were significantly lower in the T3 and T4 treatments. For KM-94-18, the proline content of T2 treatment significantly increased. In 2020, in phase 65 BBCH, the KM-72-18 cultivar with blue aleurone had a lower proline content compared to the control for T2 to T5 treatments. No differences in proline content were determined in phase 73 BBCH and cultivar KM-94-18. We suggest that the increase in proline content is due to the natural accumulation of this osmoprotectant under stress conditions with the precipitation deficit and high temperatures [54,59]. It should also be taken into account that the proline content is a cumulative result not only of the rate of biosynthesis and degradation, but also of transport between cells and organs [60,61].



**Figure 4.** Proline content in the cultivar with blue aleurone KM-72-18 (A) and a multi-row spike KM-94-18 (B) in the development phases 65 and 73 BBCH at single treatments of the stand (T1–T6). Means ± SE;  $n = 5$ ; LSD post hoc test. For each period and cultivars, the columns with the symbol \* are significantly different at  $p < 0.05$  compared to the control treatment (T1).

### 3.4. Yield Parameters

Grain yield and quality is one of the main parameters monitored in field experiments. They are given, among other things, by the course of weather conditions, habitat conditions, agrotechnical measures, genotype selection, etc. (see Pačuta et al. [62]). Yield and thousand-grain weight (TKW) were influenced by the year, cultivar, and applied product (Table 2). Higher yields were achieved in both cultivars in 2020, though yields were higher in the KM-72-18 cultivar with blue aleurone. The application of stimulation preparations significantly increased the yield and was also affected by the TKW. According to Van Oosten et al. [63], the effects of biostimulants consist in an increase in yield and the resistance to biotic and abiotic stress. Other authors also report a positive effect of stimulant application [64]. Optimal precipitation conditions during the grain filling period can affect the yield level. In winter wheat, accelerated ripening occurs under dry conditions during the grain filling period, when the yield and grain quality are subsequently negatively affected [65].

The yield (Table 4) increased for all applications in 2019 compared to T1 (100%). The cultivar KM-72-18 with blue aleurone had the highest yield for T5 treatment (107.0%). This difference was statistically significant. For the KM-94-18 cultivar with a multi-row spike, the highest yield was for the T6 treatment (105.5%). In 2020, KM-72-18 with blue aleurone had the highest yield compared to the control for T4 treatment (102.9%). For T2 and T6 treatments, there was a decrease in the yield compared to the control. Differences with the control (T1) were not statistically significant, except for the T6 treatment. For KM-94-18 with a multi-row spike, the yield was significantly higher for all treatments except for T6, but also for this treatment, the yield was higher compared to the control (T1). The highest yield was for T2 and T3 treatments (108.9%) compared to the T1 control (100%). In 2019, the TKW significantly increased compared to the control in the cultivar KM-72-18 with blue aleurone in the treatment T2 to T5, and in KM-94-18 with a multi-row spike in T3 to T6. In 2020, treatments did not significantly increase TKW.

**Table 4.** Yield and thousand-grain weight (TKW) in cultivar with blue aleurone KM-72-18 (A) and a multi-row spike KM-94-18 (B) in 2019 and 2020 for single treatments of the stand (T1–T6). Means  $\pm$  SE;  $n = 3$ ; LSD post hoc test. Different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

	Treatments	Yield (t ha <sup>-1</sup> )		TKW (g)	
		2019	2020	2019	2020
A	T1	9.01 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	9.51 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	47.33 $\pm$ 0.38 <sup>c</sup>	48.87 $\pm$ 0.41 <sup>ab</sup>
	T2	9.31 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>	9.41 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	49.00 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	49.27 $\pm$ 1.23 <sup>ab</sup>
	T3	9.41 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>	9.69 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	49.67 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	50.46 $\pm$ 1.09 <sup>a</sup>
	T4	9.37 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	9.79 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	48.76 $\pm$ 0.43 <sup>ab</sup>	49.63 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>
	T5	9.64 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	9.67 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	48.53 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	48.00 $\pm$ 1.45 <sup>b</sup>
	T6	9.45 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	8.83 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	47.67 $\pm$ 0.49 <sup>bc</sup>	49.63 $\pm$ 0.78 <sup>ab</sup>
B	T1	7.67 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	8.65 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	37.50 $\pm$ 0.40 <sup>c</sup>	43.20 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>
	T2	8.02 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	9.56 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	38.20 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	43.97 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>
	T3	7.91 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	9.58 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	38.63 $\pm$ 0.30 <sup>ab</sup>	43.30 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>
	T4	7.98 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	9.42 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	39.3 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	43.90 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>
	T5	7.95 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	9.42 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	38.57 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	43.71 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>
	T6	8.09 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	8.89 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	38.73 $\pm$ 0.30 <sup>ab</sup>	44.32 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>

When comparing the yield between the monitored cultivars, a higher yield was achieved with the blue aleurone cultivar in both experimental years. Therefore, the potential for an increase in reproductive organs in the spike and thus an increase in the storage capacity of the spike in the cultivar KM-94-18 with a multi-row spike was not significantly manifested.

Changing climatic conditions, rising temperatures, and, above all, the uneven distribution of precipitation significantly affect the quantity and quality of agricultural products. The response of a plant to a stress factor depends on its developmental phase, genotype, and the size and duration of the stress [66]. The reduction of global yields of wheat by 6.0%,

rice by 3.2%, maize by 7.4%, and soybean by 3.1% is supposed [29]. However, changes in yields are very variable and depend on the conditions of individual regions, technologies used, genotypes [67–71]. Climate change could reduce global crop yields by 3–12% by mid-century and by 11–25% by the century's end, under a vigorous warming scenario [72].

Nowadays, implicating the application of stimulation and support preparations in agrotechnical technologies is up-to-date. As previously mentioned, their contribution to increasing the yield of field and garden crops is documented. The T2 to T6 preparations used include, among others, free amino acids (T2–T5), L-proline (T4), macro and micronutrients (T4–T6), and seaweed and plant extracts (T6). Amino acids, as basic building blocks of proteins, have a multitude of functions in the plant organism, such as anti-stress agents, growth stimulators, a precursor of auxin, a precursor and stimulation of chlorophyll synthesis, and many others [73]. For the increase in yield and improvement of winter wheat quality parameters after the application of amino acid-based preparations and their possible use, see in [74–76]. The effect of exogenous application of proline has been extensively studied, and its effects are described [52]. The individual effects of macro- and microelements on growth, development, and yield generation are generally known [77]. Seaweed extracts also have a positive effect on plant metabolism [78–80].

Due to the different compositions of individual preparations, it is necessary to take into consideration the variable effects on individual physiological and metabolic processes in the plant. This variability was manifested both at the level of individual parameters and between the monitored cultivars and experimental years. The high variability of the influence of factors on the monitored parameters is reported by Pačuta et al. [62]. They think that the degree of stability of applied preparations needs to be increased in the future. Gozzo and Faoro [81] even report that biostimulants show variable efficiency under real field conditions, in contrast to the promising and positive effects observed under controlled laboratory conditions. In addition, it is necessary to focus on increasing the influence of bioactive substances on the quality parameters of cultivated crops [62].

Some authors also deal with the issue of economic efficiency [64]. Calvo et al. [82] confirm that the application of biostimulants increases the productivity and quality of crops while responding to economic and sustainable requirements.

#### 4. Conclusions

Utilising stimulant preparations can have a positive effect on the optimisation of metabolism and photosynthetic apparatus in a period of unfavourable precipitation and temperature. The composition of the products under study varies and it can be assumed that they will have different effects on the various subprocesses within the plant organism. The obtained results were influenced by the year and were based on different temperatures and precipitation. Higher yields were achieved in 2020 with higher total precipitation, especially during the grain filling period. It also seems possible that the stimulatory effect of the applied products may not be applied in periods of high rainfall. There was also no potential to increase the reproductive organs in the spike, and thus increase the storage capacity of the spike in a cultivar with a multi-row spike, which would be reflected in the yield. The use of content substances in cultivars as a natural means of increasing resistance to abiotic and biotic stressors seems to be promising. It follows that for the sustainability of agricultural production in the subsequent period, it is necessary to use all innovative technological procedures, optimal selection of genotypes, suitable mineral nutrition, and stand protection in correlation with economic efficiency.

**Author Contributions:** Conceptualisation, K.K., H.H., P.M. and A.B.; methodology, K.K., A.B., H.H. and P.M.; validation, H.H. and K.K.; formal analysis, H.H., K.K., J.P. and M.L.; writing—original draft preparation, H.H. and K.K.; writing—review and editing, E.H., P.M. and L.K.; supervision, E.H.; project administration, E.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project No. QK 1910343.

**Data Availability Statement:** Data sharing not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Verma, A.K.; Deepthi, S. Abiotic Stress and Crop Improvement: Current Scenario. *Adv. Plants Agric. Res.* **2016**, *4*, 345–346. [CrossRef]
2. Mittler, R. Abiotic Stress, the Field Environment and Stress Combination. *Trends Plant Sci.* **2006**, *11*, 15–19. [CrossRef]
3. Schroeder, E. FAO Forecasts Record Wheat Production in 2021. Available online: <https://www.world-grain.com/articles/14970-fao-forecasts-record-wheat-production-in-2021> (accessed on 24 August 2021).
4. Raza, A.; Razaq, A.; Mehmood, S.S.; Zou, X.; Zhang, X.; Lv, Y.; Xu, J. Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. *Plants* **2019**, *8*, 34. [CrossRef]
5. Bulgari, R.; Franzoni, G.; Ferrante, A. Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. *Agronomy* **2019**, *9*, 306. [CrossRef]
6. Xiong, L.; Schumaker, K.S.; Zhu, J.-K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *Plant Cell* **2002**, *14* (Suppl. 1), 165–183. [CrossRef] [PubMed]
7. Mariani, L.; Ferrante, A. Agronomic Management for Enhancing Plant Tolerance to Abiotic Stresses—Drought, Salinity, Hypoxia, and Lodging. *Horticulturae* **2017**, *3*, 52. [CrossRef]
8. Du Jardin, P. Plant Biostimulants: Definition, Concept, Main Categories and Regulation. *Sci. Hortic.* **2015**, *196*, 3–14. [CrossRef]
9. Roupael, Y.; Colla, G. Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1655. [CrossRef] [PubMed]
10. Shahrajabian, M.H.; Chaski, C.; Polyzos, N.; Petropoulos, S.A. Biostimulants Application: A Low Input Cropping Management Tool for Sustainable Farming of Vegetables. *Biomolecules* **2021**, *11*, 698. [CrossRef]
11. Paul, K.; Sorrentino, M.; Lucini, L.; Roupael, Y.; Cardarelli, M.; Bonini, P.; Reynaud, H.; Canaguier, R.; Trtilek, M.; Panzarová, K.; et al. Understanding the Biostimulant Action of Vegetal-Derived Protein Hydrolysates by High-Throughput Plant Phenotyping and Metabolomics: A Case Study on Tomato. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 47. [CrossRef]
12. Biostimulants Market Size Worth \$4.14 Billion by 2025 | CAGR: 10.2%. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-biostimulants-market> (accessed on 8 March 2019).
13. Wang, Z.; Yin, Z.; He, M.; Cao, H. Source-Sink Manipulation Effects on Postanthesis Photosynthesis and Grain Setting on Spike in Winter Wheat. *Photosynthetica* **1998**, *35*, 453–459. [CrossRef]
14. Miralles, D.; Slafer, G. Sink Limitations to Yield in Wheat: How Could It Be Reduced? *J. Agric. Sci.* **2007**, *145*.
15. Sreenivasulu, N.; Schnurbusch, T. A Genetic Playground for Enhancing Grain Number in Cereals. *Trends Plant Sci.* **2012**, *17*, 91–101. [CrossRef] [PubMed]
16. Reynolds, M.; Pellegrineschi, A.; Skovmand, B. Sink-limitation to Yield and Biomass: A Summary of Some Investigations in Spring Wheat. *Ann. Appl. Biol.* **2005**, *146*, 39–49. [CrossRef]
17. Dobrovolskaya, O.; Martinek, P.; Voylovkov, A.V.; Korzun, V.; Röder, M.S.; Börner, A. Microsatellite Mapping of Genes That Determine Supernumerary Spikelets in Wheat (*T. Aestivum*) and Rye (*S. Cereale*). *Theor. Appl. Genet.* **2009**, *119*, 867–874. [CrossRef]
18. Jiang, W.; Liu, T.; Nan, W.; Jeewani, D.C.; Niu, Y.; Li, C.; Wang, Y.; Shi, X.; Wang, C.; Wang, J.; et al. Two Transcription Factors TaPpm1 and TaPpb1 Co-Regulate Anthocyanin Biosynthesis in Purple Pericarps of Wheat. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 2555–2567. [CrossRef] [PubMed]
19. Hughes, N.M.; Carpenter, K.L.; Cannon, J.G. Estimating Contribution of Anthocyanin Pigments to Osmotic Adjustment during Winter Leaf Reddening. *J. Plant Physiol.* **2013**, *170*, 230–233. [CrossRef]
20. Ma, D.; Sun, D.; Wang, C.; Li, Y.; Guo, T. Expression of Flavonoid Biosynthesis Genes and Accumulation of Flavonoid in Wheat Leaves in Response to Drought Stress. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, *80*, 60–66. [CrossRef]
21. Shoeva (Tereshchenko), O.; Gordeeva, E.; Arbuzova, V.; Börner, A.; Khlestkina, E. The D Genome Carries a Gene Determining Purple Grain Colour in Wheat. *Cereal Res. Commun.* **2012**, *40*, 334–341. [CrossRef]
22. Mbarki, S.; Sytar, O.; Zivcak, M.; Abdelly, C.; Cerda, A.; Brestic, M. Anthocyanins of Coloured Wheat Genotypes in Specific Response to SalStress. *Molecules* **2018**, *23*, 1518. [CrossRef]
23. Burešová, V.; Kopecký, D.; Bartoš, J.; Martinek, P.; Watanabe, N.; Vyhnanek, T.; Doležel, J. Variation in Genome Composition of Blue-Aleurone Wheat. *Theor. Appl. Genet.* **2015**, *128*, 273–282. [CrossRef] [PubMed]
24. Dobrovolskaya, O.; Pont, C.; Sibout, R.; Martinek, P.; Badaeva, E.; Murat, F.; Chossou, A.; Watanabe, N.; Prat, E.; Gautier, N.; et al. Frizzy Panicle Drives Supernumerary Spikelets in Bread Wheat. *Plant Physiol.* **2015**, *167*, 189–199. [CrossRef]
25. Rizwan, M.; Mahboob, W.; Faheem, M.; Shimelis, H.; Hameed, A.; Sial, M.A.; Shokat, S. Can We Exploit Supernumerary Spikelet and Spike Branching Traits to Boost Bread Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Yield? *Appl. Ecol. Environ. Res.* **2020**, *18*, 6243–6258. [CrossRef]

# The Effect of the Application of Stimulants on the Photosynthetic Apparatus and the Yield of Winter Wheat

26. Meier, U. *Growth Stages of Mono- and Dicotyledonous Plants: BBCH Monograph*; Julius Kühn-Institut: Quedlinburg, Germany, 2018; ISBN 978-3-95547-071-5.
27. Porra, R.J.; Thompson, W.A.; Kriedemann, P.E. Determination of Accurate Extinction Coefficients and Simultaneous Equations for Assaying Chlorophylls a and b Extracted with Four Different Solvents: Verification of the Concentration of Chlorophyll Standards by Atomic Absorption Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *975*, 384–394. [[CrossRef](#)]
28. Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies. *Plant Soil* **1973**, *39*, 205–207. [[CrossRef](#)]
29. Zhao, C.; Liu, B.; Piao, S.; Wang, X.; Lobell, D.B.; Huang, Y.; Huang, M.; Yao, Y.; Bassu, S.; Ciais, P.; et al. Temperature Increase Reduces Global Yields of Major Crops in Four Independent Estimates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 9326–9331. [[CrossRef](#)]
30. Kyei-Mensah, C.; Kyerematen, R.; Adu-Acheampong, S. Impact of Rainfall Variability on Crop Production within the Worobong Ecological Area of Fanteakwa District, Ghana. *Adv. Agric.* **2019**, *2019*, e7930127. [[CrossRef](#)]
31. Li, Y.; Guan, K.; Schnitkey, G.D.; DeLucia, E.; Peng, B. Excessive Rainfall Leads to Maize Yield Loss of a Comparable Magnitude to Extreme Drought in the United States. *Glob. Chang. Biol.* **2019**, *25*, 2325–2337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Baslam, M.; Mitsui, T.; Hodges, M.; Priesack, E.; Herritt, M.T.; Aranjuelo, I.; Sanz-Sáez, Á. Photosynthesis in a Changing Global Climate: Scaling Up and Scaling Down in Crops. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 882. [[CrossRef](#)]
33. Dusenke, M.E.; Duarte, A.G.; Way, D.A. Plant Carbon Metabolism and Climate Change: Elevated CO<sub>2</sub> and Temperature Impacts on Photosynthesis, Photorespiration and Respiration. *New Phytol.* **2019**, *221*, 32–49. [[CrossRef](#)]
34. Moore, C.E.; Meacham-Hensold, K.; Lemonnier, P.; Slattery, R.A.; Benjamin, C.; Bernacchi, C.J.; Lawson, T.; Cavanagh, A.P. The Effect of Increasing Temperature on Crop Photosynthesis: From Enzymes to Ecosystems. *J. Exp. Bot.* **2021**, *72*, 2822–2844. [[CrossRef](#)]
35. Pinheiro, C.; Chaves, M.M. Photosynthesis and Drought: Can We Make Metabolic Connections from Available Data? *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 869–882. [[CrossRef](#)]
36. Santos, E.F.; Zanchim, B.J.; Campos, A.G.; Garrone, R.F.; Lavres Junior, J. Photosynthesis Rate, Chlorophyll Content and Initial Development of Physic Nut without Micronutrient Fertilization. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* **2013**, *37*, 1334–1342. [[CrossRef](#)]
37. Glanz-Idan, N.; Wolf, S. Upregulation of Photosynthesis in Mineral Nutrition-Deficient Tomato Plants by Reduced Source-to-Sink Ratio. *Plant Signal Behav.* **2020**, *15*, 1712543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ashraf, M.; Harris, P.J.C. Photosynthesis under Stressful Environments: An Overview. *Photosynthetica* **2013**, *51*, 163–190. [[CrossRef](#)]
39. Li, Y.; He, N.; Hou, J.; Xu, L.; Liu, C.; Zhang, J.; Wang, Q.; Zhang, X.; Wu, X. Factors Influencing Leaf Chlorophyll Content in Natural Forests at the Biome Scale. *Front. Ecol. Evol.* **2018**, *6*, 64. [[CrossRef](#)]
40. Croft, H.; Chen, J.M.; Luo, X.; Bartlett, P.; Chen, B.; Staebler, R.M. Leaf Chlorophyll Content as a Proxy for Leaf Photosynthetic Capacity. *Glob. Chang. Biol.* **2017**, *23*, 3513–3524. [[CrossRef](#)]
41. Del Pozo, A.; Méndez-Espinoza, A.M.; Romero-Bravo, S.; Garriga, M.; Estrada, E.; Alcaíno, M.; Camargo-Rodríguez, A.V.; Corke, E.M.K.; Doonan, J.H.; Lobos, G.A. Genotypic Variations in Leaf and Whole-Plant Water Use Efficiencies Are Closely Related in Bread Wheat Genotypes under Well-Watered and Water-Limited Conditions during Grain Filling. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 460. [[CrossRef](#)]
42. Gergersen, P.L.; Holm, P.B. Transcriptome Analysis of Senescence in the Flag Leaf of Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Plant Biotechnol. J.* **2007**, *5*, 192–206. [[CrossRef](#)]
43. Liu, B.; Asseng, S.; Wang, A.; Wang, S.; Tang, L.; Cao, W.; Zhu, Y.; Liu, L. Modelling the Effects of Post-Heading Heat Stress on Biomass Growth of Winter Wheat. *Agric. Forest Meteorol.* **2017**, *247*, 476–490. [[CrossRef](#)]
44. Maxwell, K.; Johnson, G.N. Chlorophyll Fluorescence—A Practical Guide. *J. Exp. Bot.* **2000**, *51*, 659–668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Peripolli, M.; Dormelles, S.H.B.; Lopes, S.J.; Tabaldi, L.A.; Trivisoli, V.S.; Rubert, J. Application of Biostimulants in Tomato Subjected to Water Deficit: Physiological, Enzymatic and Production Responses. *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.* **2021**, *25*, 90–95. [[CrossRef](#)]
46. Desotgiu, R.; Pollastrini, M.; Cascio, C.; Gerosa, G.; Marzuoli, R.; Bussotti, F. Chlorophyll a Fluorescence Analysis along a Vertical Gradient of the Crown in a Poplar (Oxford Clone) Subjected to Ozone and Water Stress. *Tree Physiol.* **2012**, *32*, 976–986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kotakis, C.; Kyzeridou, A.; Manetas, Y. Photosynthetic Electron Flow during Leaf Senescence: Evidence for a Preferential Maintenance of Photosystem I Activity and Increased Cyclic Electron Flow. *Photosynthetica* **2014**, *52*, 413–420. [[CrossRef](#)]
48. Kottmann, L.; Wilde, P.; Schittenhelm, S. How Do Timing, Duration, and Intensity of Drought Stress Affect the Agronomic Performance of Winter Rye? *Eur. J. Agron.* **2016**, *75*, 25–32. [[CrossRef](#)]
49. Zivcak, M.; Brestic, M.; Olsowska, K. Application of Photosynthetic Parameters in the Screening of Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Genotypes for Improved Drought and High Temperature Tolerance. In *Photosynthesis. Energy from the Sun*; Allen, J.E., Gantt, E., Golbeck, J.H., Osmond, B., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2008; pp. 1247–1250. ISBN 978-1-4020-6707-5.
50. Ertani, A.; Nardi, S.; Altissimo, A. Review: Long-Term Research Activity on the Biostimulant Properties of Natural Origin Compounds. *Acta Hort.* **2013**, 181–187. [[CrossRef](#)]
51. Amada, A.; Ferrante, A.; Valagussa, M.; Piaggese, A. Effect of Biostimulants on Quality of Baby Leaf Lettuce Grown under Plastic Tunnel. *Acta Hort.* **2009**, 407–412. [[CrossRef](#)]
52. Kaur, G.; Ashthir, B. Proline: A Key Player in Plant Abiotic Stress Tolerance. *Biol. Plant.* **2015**, *59*, 609–619. [[CrossRef](#)]

# The Effect of the Application of Stimulants on the Photosynthetic Apparatus and the Yield of Winter Wheat

53. Liang, X.; Zhang, L.; Natarajan, S.K.; Becker, D.F. Proline Mechanisms of Stress Survival. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 998–1011. [[CrossRef](#)]
54. Nahar, K.; Hasanuzzaman, M.; Fujita, M. Roles of Osmolytes in Plant Adaptation to Drought and Salinity. In *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*; Springer: New Delhi, India, 2016; pp. 37–68. ISBN 978-81-322-2615-4.
55. Gould, K.S.; Jay-Allemand, C.; Logan, B.A.; Baissac, Y.; Bidet, L.P.R. When Are Foliar Anthocyanins Useful to Plants? Re-Evaluation of the Photoprotection Hypothesis Using Arabidopsis Thaliana Mutants That Differ in Anthocyanin Accumulation. *Environ. Exp. Bot.* **2018**, *154*, 11–22. [[CrossRef](#)]
56. Pietrini, F.; Iannelli, M.A.; Massacci, A. Anthocyanin Accumulation in the Illuminated Surface of Maize Leaves Enhances Protection from Photo-Inhibitory Risks at Low Temperature, without Further Limitation to Photosynthesis. *Plant Cell Environ.* **2002**, *25*, 1251–1259. [[CrossRef](#)]
57. Steyn, W.J.; Ward, S.J.E.; Holcroft, D.M.; Jacobs, G. Anthocyanins in Vegetative Tissues: A Proposed Unified Function in Photoprotection. *New Phytol.* **2002**, *155*, 349–361. [[CrossRef](#)]
58. Li, X.; Lü, X.; Wang, X.; Peng, Q.; Zhang, M.; Ren, M. Biotic and Abiotic Stress-Responsive Genes Are Stimulated to Resist Drought Stress in Purple Wheat. *J. Integr. Agric.* **2020**, *19*, 33–50. [[CrossRef](#)]
59. Kishor, P.B.K.; Sreenivasulu, N. Is Proline Accumulation per Se Correlated with Stress Tolerance or is Proline Homeostasis a More Critical Issue? *Plant Cell Environ.* **2014**, *37*, 300–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Lehmann, S.; Funck, D.; Szabados, L.; Rentsch, D. Proline Metabolism and Transport in Plant Development. *Amino Acids* **2010**, *39*, 949–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Yao, X.; Nie, J.; Bai, R.; Sui, X. Amino Acid Transporters in Plants: Identification and Function. *Plants* **2020**, *9*, 972. [[CrossRef](#)]
62. Pačuta, V.; Rašovský, M.; Michalska-Klimczak, B.; Wyszryński, Z. Grain Yield and Quality Traits of Durum Wheat (Triticum Durum Desf.) Treated with Seaweed- and Humic Acid-Based Biostimulants. *Agronomy* **2021**, *11*, 1270. [[CrossRef](#)]
63. Van Oosten, M.J.; Pepe, O.; De Pascale, S.; Silletti, S.; Maggio, A. The Role of Biostimulants and Bioeffectors as Alleviators of Abiotic Stress in Crop Plants. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2017**, *4*, 5. [[CrossRef](#)]
64. Kocira, S.; Szparaga, A.; Hara, P.; Treder, K.; Findura, P.; Bartoš, P.; Filip, M. Biochemical and Economical Effect of Application Biostimulants Containing Seaweed Extracts and Amino Acids as an Element of Agroecological Management of Bean Cultivation. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17759. [[CrossRef](#)]
65. Balla, K.; Karsai, I.; Bónis, P.; Kiss, T.; Berkó, Z.; Horváth, Á.; Mayer, M.; Bencze, S.; Veisz, O. Heat Stress Responses in a Large Set of Winter Wheat Cultivars (Triticum Aestivum L.) Depend on the Timing and Duration of Stress. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0222639. [[CrossRef](#)]
66. Beltrano, J.; Ronco, M.G. Improved Tolerance of Wheat Plants (Triticum Aestivum L.) to Drought Stress and Rewatering by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Glomus Claroideum: Effect on Growth and Cell Membrane Stability. *Braz. J. Plant Physiol.* **2008**, *20*, 29–37. [[CrossRef](#)]
67. Kukul, M.S.; Irmak, S. Climate-Driven Crop Yield and Yield Variability and Climate Change Impacts on the U.S. Great Plains Agricultural Production. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3450. [[CrossRef](#)]
68. Shew, A.M.; Tack, J.B.; Nalley, L.L.; Chaminuka, P. Yield Reduction under Climate Warming Varies among Wheat Cultivars in South Africa. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4408. [[CrossRef](#)]
69. Liliane, T.N.; Charles, M.S. *Factors Affecting Yield of Crops*; IntechOpen: London, UK, 2020; ISBN 978-1-83881-223-2.
70. Ray, D.K.; West, P.C.; Clark, M.; Gerber, J.S.; Prishchepov, A.V.; Chatterjee, S. Climate Change Has Likely already Affected Global Food Production. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0217148. [[CrossRef](#)]
71. He, W.; Yang, J.Y.; Qian, B.; Drury, C.F.; Hoogenboom, G.; He, P.; Lapein, D.; Zhou, W. Climate Change Impacts on Crop Yield, Soil Water Balance and Nitrate Leaching in the Semiarid and Humid Regions of Canada. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0207370. [[CrossRef](#)]
72. Wing, I.S.; De Cian, E.; Mistry, M.N. Global Vulnerability of Crop Yields to Climate Change. *J. Environ. Econ. Manag.* **2021**, *109*, 102462. [[CrossRef](#)]
73. Paleckienė, R.; Šviklas, A.; Šlinkšienė, R. Physicochemical Properties of a Microelement Fertilizer with Amino Acids. *Russ. J. Appl. Chem.* **2007**, *80*, 352–357. [[CrossRef](#)]
74. Popko, M.; Michalak, I.; Wilk, R.; Gramza, M.; Chojnacka, K.; Górecki, H. Effect of the New Plant Growth Biostimulants Based on Amino Acids on Yield and Grain Quality of Winter Wheat. *Molecules* **2018**, *23*, 470. [[CrossRef](#)]
75. Schmidt, C.; Mrnka, L.; Frantik, T.; Bárnai, M.; Vosátka, M.; Švecová, E. Impact of Protein Hydrolysate Biostimulants on Growth of Barley and Wheat and Their Interaction with Symbionts and Pathogens. *Agric. Food Sci.* **2020**, *29*. [[CrossRef](#)]
76. Colla, G.; Hoagland, L.; Ruzzi, M.; Cardarelli, M.; Bonini, P.; Canaguier, R.; Roupheal, Y. Biostimulant Action of Protein Hydrolysates: Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 2202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Pandey, P.; Irulappan, V.; Bagavathiannan, M.V.; Senthil-Kumar, M. Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-Morphological Traits. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Sharma, H.S.S.; Fleming, C.; Selby, C.; Rao, J.R.; Martin, T. Plant Biostimulants: A Review on the Processing of Macroalgae and Use of Extracts for Crop Management to Reduce Abiotic and Biotic Stresses. *J. Appl. Phycol.* **2014**, *26*, 465–490. [[CrossRef](#)]
79. Tarakhovskaya, E.R.; Maslov, Y.I.; Shishova, M.F. Phytohormones in Algae. *Russ. J. Plant Physiol.* **2007**, *54*, 163–170. [[CrossRef](#)]



# The Effect of the Application of Stimulants on the Photosynthetic Apparatus and the Yield of Winter Wheat

80. Kumar, R.; Trivedi, K.; Anand, K.G.V.; Ghosh, A. Science behind Biostimulant Action of Seaweed Extract on Growth and Crop Yield: Insights into Transcriptional Changes in Roots of Maize Treated with *Kappaphycus Alvarezii* Seaweed Extract under Soil Moisture Stressed Conditions. *J. Appl. Phycol.* **2020**, *32*, 599–613. [[CrossRef](#)]
81. Gozzo, F.; Faoro, F. Systemic Acquired Resistance (50 Years after Discovery): Moving from the Lab to the Field. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 12473–12491. [[CrossRef](#)]
82. Calvo, P.; Nelson, L.; Kloepper, J.W. Agricultural Uses of Plant Biostimulants. *Plant Soil* **2014**, *383*, 3–41. [[CrossRef](#)]

# Biochar in manure can suppress water stress of sugar beet (*Beta vulgaris*) and increase sucrose content in tubers

Science of the Total Environment 814 (2022) 152772



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)



## Biochar in manure can suppress water stress of sugar beet (*Beta vulgaris*) and increase sucrose content in tubers



Manhattan Lebrun<sup>a,b</sup>, Jiří Bouček<sup>c,d</sup>, Kateřina Berchová Bímová<sup>c</sup>, Kamil Kraus<sup>e</sup>, Daniel Haisel<sup>f</sup>, Martin Kulhánek<sup>g</sup>, Carol Omara-Ojunga<sup>b</sup>, Samar Seyedsadr<sup>b</sup>, Luke Beesley<sup>h</sup>, Petr Soudek<sup>f</sup>, Šárka Petrová<sup>f</sup>, Michael Pohořelý<sup>i,j</sup>, Lukáš Trakal<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR EcoSyS, 78850 Thiverval-Grignon, France

<sup>b</sup> Department of Environmental Geosciences, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 16500 Praha 6 Suchbát, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Applied Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 1176, 165 21 Prague 6, Suchbát, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Wood Processing and Biomaterials, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 1176, Praha 6 - Suchbát, 16521, Czech Republic

<sup>e</sup> Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 00 Prague 6, Czech Republic

<sup>f</sup> Institute of Experimental Botany CAS CR, Rozvojeva 263, 165 02 Prague 6, Czech Republic

<sup>g</sup> Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 00 Prague - Suchbát, Czech Republic

<sup>h</sup> The James Hutton Institute, Craigiebuckler, Aberdeen AB15 8QH, UK

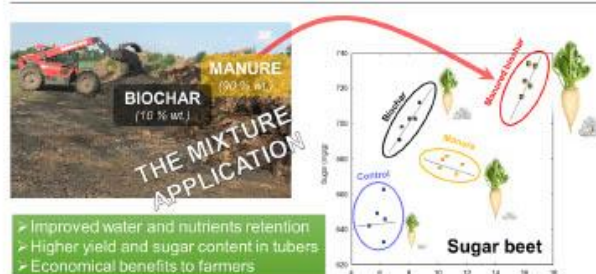
<sup>i</sup> Environmental Process Engineering Laboratory, Institute of Chemical Process Fundamentals, Academy of Sciences of Czech Republic, v. i., Rozvojeva 135, Praha 6, Suchbát 165 02, Czech Republic

<sup>j</sup> Department of Power Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic

### HIGHLIGHTS

- Biochar amendments to a drought prone soil enhanced soil moisture status.
- Nutrient leaching from soil following manure application was mediated by biochar.
- Combined biochar-manure amendment suppressed water stress to sugar beet.
- Increased tuber sucrose content and yield resulted from biochar-manure blend.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 October 2021

Received in revised form 3 December 2021

### ABSTRACT

Increased soil drought events threaten the yields of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and other staples of arable production in central Europe. In this study we evaluated soil moisture and nutrients as impacted by a two and five % (wt) addition of biochar, manure and their blend to a loamy-sand Regosol. Cyclical soil drought was achieved by the controlled

**Abbreviations:** USDA, United State Department of Agriculture; CZE, Czech Republic; CHP, combined heat and power; M, manure; B, biochar; MB, manured biochar; C, Regosol without amendments; M2, Regosol amended with 2% manure; M5, Regosol amended with 5% manure; B2, Regosol amended with 2% biochar; B5, Regosol amended with 5% biochar; MB2, Regosol amended with 2% manured biochar; MB5, Regosol amended with 5% manured biochar; E, leaf transpiration rate; Gs, leaf stomatal conductance; ci, leaf internal CO<sub>2</sub> concentration; A, leaf net CO<sub>2</sub> assimilation; WUEi, instantaneous water use efficiency; PAR, photosynthetically active radiation; EC, electrical conductivity; HPLC, high-performance liquid chromatography; DW, dry weight; DEPS, xanthophyll de-epoxidation state index; Z, zeaxanthin; A, antheraxanthin; V, violaxanthin; SPW, soil pore water; PCA, principal component analysis.

\* Corresponding author at: Department of Environmental Geosciences, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Praha 6 Suchbát 16500, Czech Republic.

E-mail address: [trakal@fep.czu.cz](mailto:trakal@fep.czu.cz) (L. Trakal).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152772>  
0048-9697/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

# Biochar in manure can suppress water stress of sugar beet (*Beta vulgaris*) and increase sucrose content in tubers

M. Lebrun et al.

Science of the Total Environment 814 (2022) 152772

Accepted 25 December 2021  
Available online 2 January 2022

Editor: Daniel CW Tsang

## Keywords:

Drought  
Sugar beet  
Soil moisture  
Biochar  
Manure  
Water stress response

reduction of watering by 75% in pot experiments. Ongoing soil moisture and nutrient measurements were taken, and physiological parameters of sugar beet plants were analysed three weeks after the induced drought. At the end of the experiment (16 weeks) plants were harvested and their mass assessed, as well as their nutrient, pigment and sugar contents. In contrast to the addition of manure, soil volumetric water contents were two to three times greater after biochar amendment, compared to the control soil. Porewater analysis revealed that nutrient leaching (e.g.,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$ ) from manure addition to soil was reduced when biochar was blended in (by  $\leq 86\%$  compared to manure alone). Crop analysis showed that leaf gas exchanges were moderated during drought following soil amendment, and leaf and tuber yields were increased furthest when combined biochar-manure blends were applied ( $> 2$ -times compared to the control). Perhaps most importantly, the advantageous soil conditions induced by the combined biochar and manure addition also resulted in significantly increased sugar contents in plants (2.4-times) pointing to immediate practical applications of these results in the field.

## 1. Introduction

Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) is a traditional arable crop in Central Europe, with Czech Republic being one of the most prolific producers at 61,000 ha coverage and 63 t/ha yields (data for the years 2015–2017). Indeed, sugar is consumed worldwide with one-fifth derived from beet (Eggleston et al., 2017), which contains approximately 17% sugar. Climate change has had, and will increasingly have, a negative impact on crop yields. For example, since 1982, it is estimated that climate change induced a reduction of 70% in crop yields on average, with few agricultural areas now remaining unaffected by it (Raza et al., 2019). Drought events are one of the most important crop yield decreasing stresses (Ghaffari et al., 2021). This is partially because a reduction in soil moisture has deleterious effects on plant physiology, such as leaf water loss, growth inhibition, decreased photosynthetic activity, damaged organelle structures, induced chlorophyll degradation and even accelerated ageing processes (Fahad et al., 2017). Drought stress is particularly impactful to sugar beet yield and quality (Toscano et al., 2019) as demonstrated by Khaembah et al. (2021), who showed that reduced irrigation decreased sugar beet yield and nitrogen content. Similarly, sugar beet biomass production and pigment concentrations were shown to be reduced after a period of ten days without irrigation (Islam et al., 2020). To overcome water stress, increased irrigation is an increasing feature of modern agriculture to maintain yields. However, this incurs economic and time costs to farmers especially when additional fertilization is required. Over irrigation can induce soil salinization, while over fertilization can degrade soil in the long term, notably through nitrate leaching. Thus, it is important to investigate methods to retain moisture and nutrients in soils, in order to adapt the soil environment to changing climatic conditions.

Improvements in soil moisture holding capacity can be obtained through the application of organic amendments, such as biochars, manures, composts and digestates. Biochar is a carbon-rich material obtained from the thermochemical conversion of biomass under reduced oxygen conditions (Chen et al., 2019; Kumar et al., 2020). Biochar can be made from various lignocellulosic materials, such as plant residues, animal manure, food wastes, sludge etc. (Bolan et al., 2021; Sun et al., 2021), which are transformed into biochar via pyrolysis, hydrothermal carbonization, or gasification (Bolan et al., 2021; Sun et al., 2021). Biochar is frequently characterized by a porous structure, an alkaline pH and a high carbon content (Kumar and Bhattacharya, 2021). Due to these parameters biochars have various soil applications, such as to increase carbon storage and reduce the leaching of nutrients and contaminants (Bolan et al., 2021; Sun et al., 2021) demonstrably improving soil fertility, promoting enhanced microbial activity, plant growth and nutrient uptake (Jien et al., 2021; Rafael et al., 2019). This is due to various soil physicochemical properties being typically modified by biochar amendments, i.e. bulk density, pH, electrical conductivity, cation exchange capacity, organic carbon, nutrient availability, soil moisture, and enzyme activity (Abideen et al., 2020; Adekiya et al., 2019; Agbede et al., 2020; Latini et al., 2019; Rafael et al., 2019; Rollon et al., 2020). The combined improvements in one or more soil properties have been shown to improve, for example, durum wheat, *Phragmites karka*, cocoyam and corn growth (Abideen et al., 2020; Agbede et al., 2020; Latini et al., 2019; Rollon et al., 2020). Some negative impacts on crop growth as a result of biochar application to soils have

also been noted, such as decreased nutrient availability, due to biochars' high sorption capacity (Brtnicky et al., 2021; Zhao et al., 2019). For example, a study comparing three biochars showed that 1) pinewood biochar did not improve maize growth and, in fact, negatively affected nitrogen availability; 2) coconut husk biochar improved maize growth and had a reduced fertilizing quality; 3) orange bagasse biochar was able to improve maize growth and efficiently regulate nitrogen and phosphorus availability (Gonzaga et al., 2018). Similarly, Reed et al. (2017) found that biochar did not improve the growth and nutrient uptake of ryegrass one year after soil application. Likewise, out of four biochars produced from farmyard manure, poultry manure, wood chips and kitchen waste, their sole application to soil did not improve wheat yield and nitrogen uptake in all but one case, the poultry manure biochar (Sadaf et al., 2017). It also follows that, although biochars contain nutrients, largely governed by the source feedstock used to produce it, those nutrients may not be available to plants due to the biochar high stability (Galinato et al., 2011).

In contrast to biochars, manures inherently contain high amounts of labile nutrients, which are readily available to the plants. When amended into soils, manures can modify soil porosity, reduce bulk density, which increase soil available water content, increase organic matter content in soil, which, together with nutrients and soil structure improvement, increases crop yields (Wang et al., 2017). These materials can also be mixed and work synergistically for better outcomes when applied to soils. For instance, Banik et al. (2021) demonstrated that the application of biochar combined to manure could stabilize phosphorus and nitrogen released from manure, reducing leaching, concluding that biochar could act in a regulatory capacity to nutrients from manure. Similarly, Adekiya et al. (2019) applied a hardwood biochar and a poultry manure, either alone or combined, and observed that there were significant interactive effects between biochar and manure for the improvement of soil physical and chemical properties, i.e. bulk density, soil moisture, pH, organic matter and nutrient contents, and for nutrient uptake by plants. Finally, Bohara et al. (2019) showed that applying a combination of poultry litter and biochar to a very fine sandy loam soil improved the capacity of ryegrass to withstand drought stress. Despite its advantageous soil impacts, manures can contain pollutants, such as metals and metalloids (Zhang et al., 2012), which can be supplanted to soil following repeat amendments. Biochars have been shown to immobilize such potentially toxic elements emanating from other soil amendments if applied in tandem (Chen et al., 2019).

The aim of this study was to find the most advantageous soil amendment combinations from biochar and manure that could achieve a reduction in drought stress on sugar beet yield and quality. Specifically, it was hypothesised that combining biochar and manure could most significantly; (i) enhance soil moisture, (ii) regulate nutrient leaching from manure and (iii) maintain or enhance sugar beet physiology and yield during an induced soil drought.

## 2. Material and methods

### 2.1. Soil and bio-additives

An agricultural Regosol, with low-organic matter content from a drought-prone location was chosen for this study because a high amount

# Biochar in manure can suppress water stress of sugar beet (*Beta vulgaris*) and increase sucrose content in tubers

M. Lebrun et al.

Science of the Total Environment 814 (2022) 152772

of water depletion and leaching of organic matter has been shown to impede sugar beet production in this type of soil. The soil was collected in the proximity of Zvěřinek village, in Czech Republic (CZE) (50°149'N, 15°026'E) from the arable horizon (<35 cm). The average bulk density of the original intact Regosol was 1.59 g cm<sup>-3</sup>, the total porosity was 41.1% and according to the particle size analyses, a high fraction of this Regosol is sand (0.05–2 mm) 85.5%. Furthermore, silt (0.002–0.05 mm) represents 5.5%, and clay (< 0.002 mm) 9.0%. The percentages indicated above are the mean values and they were determined for soil particles <2 mm using the standard hydrometer method (CEN ISO/TS 17892-4 2004, 2004). According to the United State Department of Agriculture (USDA), the soil was classified as loamy sand.

Two amendments were used: 1) manure, a conventional organic fertilizer; and 2) biochar which is a registered soil additive (Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, CZE). Fresh manure (M) was collected from a farm in Zvěřinek (Czech Republic) and was a mix of cow faeces and bedding straw. Biochar (B) was produced by gasification from dry raw wooden chips, having a high initial moisture (40–60% wt. on a wet basis) before being heated for 6 h between 500 and 600 °C. The gasification was carried out at a combined heat and power (CHP) plant in a fixed-bed multi-stage gasifier (GP750) (Brynda et al., 2020). To create an experimental blend of both biochar and manure the two amendments were mixed together, with 90% manure and 10% biochar (w/w on a dry weight basis) and left to equilibrate for one month in ambient conditions. Thereafter this blended treatment (manured biochar) (MB) together with manure (M) and biochar (B) were dried and sieved (through <2 mm) for their consequent usage.

The soil as well as the three amendments, i.e. M, B and MB, were characterized, in duplicate, for the main proximate physico-chemical properties (Table 1).

## 2.2. Pot experiment

A pot experiment was established in an air-conditioned greenhouse where a single sugar beet (*Beta vulgaris*) variety was selected as the agricultural drought-sensitive crop. Seven soil treatments were tested: control (C – Regosol soil without additives), and the soil mixed with the different amendments (Biochar - B, Manure - M or their combination MB) at two different doses (2 and 5 wt%). Hereafter, treatments are referred to using the following abbreviations C, B2, B5, M2, M5, MB2 and MB5, respectively. The mixtures were put into 1 L pots, each in five replicates. The experiment was performed using a randomized design. Inside of each pot, five seeds of sugar beet were subsequently placed, and plants were reduced to two after germination. An FDR 5TM moisture sensor (Decagon, USA) was placed in each pot, in order to monitor soil moisture. During a total sixteen-week duration, three watering phases were set up: (i) regular watering during the first nine weeks, with 100 mL poured in each pot twice a week; (ii) drought during the following three weeks, with a reduction of watering to 25 mL; and (iii) rehydration during the last four weeks, with an augmentation of the watering to 75 mL.

**Table 1**  
Physical and chemical properties of the input materials. All parameters were measured in duplicate.

Parameter	M	B	MB	Soil
pH <sub>1:2.5</sub> (–)	8.50	11.12	10.1	4.80
EC (µS/cm)	4210	1400	4300	318
N <sub>tot</sub> (g/kg)	2.50	5.80	1.60	0.54
C <sub>tot</sub> (g/kg)	39.0	817	53.4	9.33
C/N (–)	18.2	140	38.9	17.3
S <sub>tot</sub> (g/kg)	0.40	0.34	0.30	0.24
P <sub>tot</sub> (g/kg)	7.48	0.89	5.62	0.41
Ca <sub>tot</sub> (g/kg)	19.1	16.4	16.0	1.10
Mg <sub>tot</sub> (g/kg)	4.90	2.85	4.44	0.22
K <sub>tot</sub> (g/kg)	36.0	3.90	36.0	8.49

M = manure, B = biochar, MB = manure + biochar.

## 2.3. Plant collection

At the end of the rehydration period, sugar beet plants were harvested. Plants were washed with distilled water to remove any soil particles and leaves were separated from the tubers. Leaf and tuber fresh weights were determined for each plant individually. Material was then lyophilized and properly stored until biochemical analysis.

## 2.4. Analysis of the soil and plants

### 2.4.1. Physiological analysis of the plants during drought

At the end of the drought period, i.e. on week 12, transpiration rate (E), stomatal conductance (Gs), internal CO<sub>2</sub> concentration (c<sub>i</sub>), net CO<sub>2</sub> assimilation (A) and instantaneous water use efficiency (WUEi) were measured *in situ* using a portable LCpro + gas exchange system (ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK). Details of the leaf gas exchange measurements are given in Supplementary material (SM1.1.).

### 2.4.2. Soil chemical analysis

The soil solution was collected before stress induction using rhizon samplers (Eijkelkamp Agrisearch equipment, NED) evacuated via a syringe. The soil solutions were analysed for pH and electrical conductivity (EC), using a pH meter and a multimeter (pH 7310 and Multi 3420 respectively, WTW, Germany).

In addition, total N and C contents were measured using a Vario MACRO CHN elemental analysis unit (CHNS Elemental Analytical Systems GmbH, Germany), while dissolved organic carbon was determined using a total organic carbon analyzer TOC-L a (CPH/CPN, Shimadzu), TNM-L segment flow analyzer (Shimadzu). Nitrate (NO<sub>3</sub>), phosphate (PO<sub>4</sub>) and sulphate (SO<sub>4</sub>) concentrations were determined with a Dionex ICS-5000 ion chromatography system (Dionex, USA). Finally, the concentrations of the macronutrients K, Mg, Na and Ca were measured by ICP-OES (720 ES, Varian Inc., CA, USA).

### 2.4.3. Plant chemical analysis

After the harvest, leaves and tubers were analysed for nutrient contents (N, P, K, Na, S, Mg, Ca, and C), pigment and sugar contents. Further detailed analytical procedures are provided in Supplementary Materials (SM1.2.).

## 2.5. Statistical analysis

Multivariate and univariate statistical analyses were performed in this work. Briefly, multivariate methods were employed for two purposes: (1) to describe the variability between treatments in soil characteristics as experiment inputs (data are in Table SMI a,b); and (2) to analyse plant responses under water stress and particular soil treatments (results). Univariate methods were employed for a detailed description of plant responses to treatments; measured characteristics (physiological parameters, macronutrients and sugar contents) were used as response variables and treatments were used as predictors in ANOVA models. The responses were approximated by normal distribution or transformed to meet the normality. Tukey HSD test and Dunnett's test were used for multiple comparisons. Statistica 13.5 and R 4.0.1 were employed. Further details are provided in Supplementary Materials (SM1.3.).

## 3. Results

### 3.1. Soil parameters

#### 3.1.1. Soil moisture changes

During the first phase of regular watering (first nine weeks), treatment B5 had the highest volumetric water content (around 0.30–0.45 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>) followed by B2 (around 0.25–0.35 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>) and the other treatments (around 0.15–0.25 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>; Fig. 1). When drought stress was induced (blue section in Fig. 1), soil water content dropped, though B2 and B5 maintained values up to 0.15 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>, which were higher than the other

# Biochar in manure can suppress water stress of sugar beet (*Beta vulgaris*) and increase sucrose content in tubers

M. Lebrun et al.

Science of the Total Environment 814 (2022) 152772

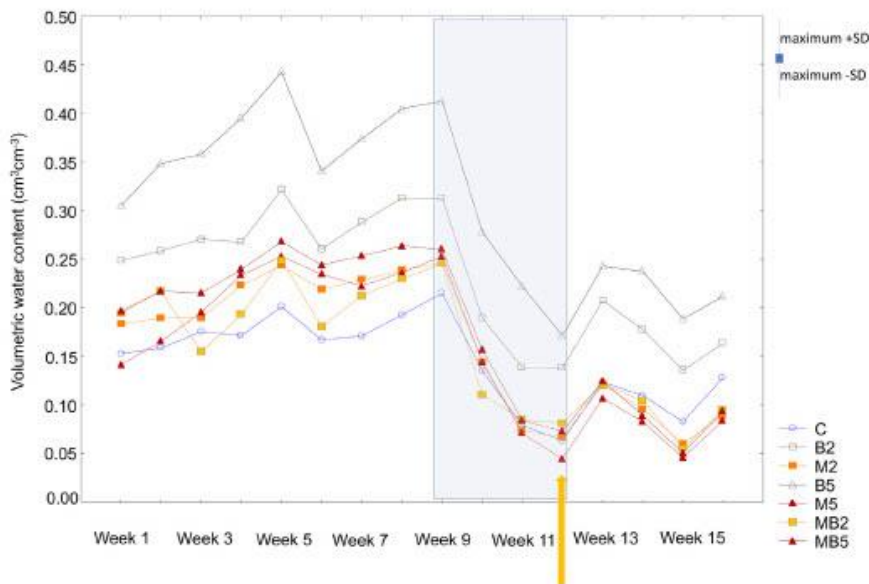


Fig. 1. Soil moisture over the experiment time course for the different treatments. The blue zone indicates the drought period (25% of watering) and the arrow indicates when the physiological analysis on the plants was carried out. Data shown are means from 5 replicates; each week-point shows the mean value of all 10-mins data continuously recorded during the week for each treatment.

treatments. The decrease in water content continued over the entire drought period until rehydration started (week 12) and soil water content stabilised or began to increase. No treatments including manure increased water content in soil compared to control over the entire experiment period.

### 3.1.2. Soil pore water chemical composition

Soil solution was sampled before the induction of the water stress to obtain enough sample to evaluate the impacts of the amendments on chemical properties (Table SM1a). Results showed that amendment application increased pH, EC,  $\text{SO}_4^{2-}$  and Na concentration. The biochar without manure treatments decreased total labile N content, nitrate concentration,  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration, total soil solution C content, DOC content, and  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations, while treatments containing manure increased these parameters.

In addition, a PCA was performed to understand how treatments differed based on soil properties (Fig. SM1), showing that amended treatments differed from the control. Treatments containing manure differed from treatments containing only biochar along the first axis. Amended treatments were separated in three groups: (i) biochar treatments without manure (B2, B5) were characterized by the highest pH values and a reduction in  $\text{PO}_4^{3-}$ , TC, DOC,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  contents, (ii) treatments with manure at 5% (M5 and MB5) were characterized by the highest values in EC, TN,  $\text{PO}_4^{3-}$ , TC, DOC,  $\text{K}^+$  and Na contents, and (iii) treatments with 2% manure (M2 and MB2) were characterized by intermediate values. Finally, there was no difference between the two application rates of biochar while 5% manure had higher values of the measured parameters than 2%, and the additional application of biochar had no effect (no difference between M2 and MB2 and between M5 and MB5).

## 3.2. Plant response to water stress and amendments

### 3.2.1. Physiological response during drought period

Drought affects plant physiology and particularly gas exchanges between the atmosphere and the leaf. Therefore, to quantify stress levels

inside the plant, leaf gas exchange was measured. The measurements were made in the middle of the drought period and showed that amendments affected leaf physiological response to water deficiency. In particular, internal  $\text{CO}_2$  concentration ( $c_i$ ) was reduced by 19% with the addition of 5% manure, compared to the control, while the other treatments had no effect on  $c_i$  (Table 2). In all amended conditions, transpiration rate (E) was higher than in the control treatment and no difference was found between amendment treatments. Stomatal conductance ( $G_s$ ) increased only when biochar and manure were applied separately while their association had no effect. An increase in  $G_s$  was the same between biochar and manure, and application rate had no effect;  $G_s$  increase was calculated between 13% and 18%. Net  $\text{CO}_2$  assimilation rate (A) was negative in all cases, showing that, in the testing conditions, respiration was higher than gross photosynthesis. Assimilation was only affected by the application of 2% biochar, with more negative value. Finally, the intrinsic water use efficiency (WUE) showed fewer negative values only in plants grown on M5 ( $-337.94$ ) than control plants ( $-442.47$ ).

### 3.2.2. Physiological response of plants at the end of the experiment

Pigments contained in sugar beet leaves were measured at the end of the experiment, after rehydration. In general, the application of amendments increased chlorophyll contents in leaves, while it decreased xanthophyll cycle pigments. A detailed description of the effects of amendment supply on pigment concentration is given in Supplementary Materials (SM2.1.).

## 3.3. Harvest parameters

In case of biomass weight, biochar, manure and their combination increased the fresh biomass production, compared to the untreated control soil. For more detailed results see Supplementary Materials (SM2.2. and Fig. SM4).

The contents of nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), carbon (C), calcium (Ca), sulphur (S), magnesium (Mg) and sodium (Na) were determined in tubers and leaves, separately. In all cases, concentrations were

# Biochar in manure can suppress water stress of sugar beet (*Beta vulgaris*) and increase sucrose content in tubers

M. Lebrun et al.

Science of the Total Environment 814 (2022) 152772

Table 2

Leaf gas exchange of sugar beet plants grown on the different substrates: A – assimilation ( $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ ); E - transpiration rate ( $\text{mmol H}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{s}$ );  $c_i$  - atmospheric  $\text{CO}_2$  concentration/intracellular  $\text{CO}_2$  concentration ( $\text{mol}/\text{m}^3$ ); Gs - stomatal conductance ( $\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ); WUEI - actual water efficiency; means  $\pm$  SD are shown for particular parameters. The same letters show homogenous groups in (ANOVA, Tukey test,  $p < 0.05$ ).

Variant	$c_i$	E	Gs	A	WUEI
C	911.8 $\pm$ 50.7 <sup>ab</sup>	1.60 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.066 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	-31.56 $\pm$ 1.93 <sup>ab</sup>	-442.47 $\pm$ 28.58 <sup>ab</sup>
B2	1005.7 $\pm$ 36.2 <sup>a</sup>	1.83 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.075 $\pm$ 0.002 <sup>bc</sup>	-39.52 $\pm$ 1.76 <sup>c</sup>	-485.64 $\pm$ 21.88 <sup>a</sup>
B5	805.7 $\pm$ 38.4 <sup>bc</sup>	1.91 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.078 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup>	-31.77 $\pm$ 1.65 <sup>abc</sup>	-399.15 $\pm$ 21.80 <sup>abc</sup>
M2	902.0 $\pm$ 38.1 <sup>ab</sup>	1.90 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.078 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup>	-37.12 $\pm$ 1.78 <sup>bc</sup>	-425.98 $\pm$ 21.98 <sup>abc</sup>
M5	739.2 $\pm$ 30.2 <sup>c</sup>	1.88 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.078 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup>	-30.29 $\pm$ 1.63 <sup>c</sup>	-337.94 $\pm$ 18.5 <sup>c</sup>
MB2	948.4 $\pm$ 39.1 <sup>ab</sup>	1.66 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.065 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	-33.60 $\pm$ 1.88 <sup>bc</sup>	-449.86 $\pm$ 22.51 <sup>ab</sup>
MB5	725.5 $\pm$ 33.9 <sup>c</sup>	1.76 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.067 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	-25.59 $\pm$ 1.51 <sup>a</sup>	-355.76 $\pm$ 19.85 <sup>bc</sup>

higher in the leaves than in tubers. For more detailed results, see Fig. 2 and Supplementary Materials (SM2.3. and Table SM3).

Concerning the sugar content, in the control soil, concentrations of sucrose were 646 mg/g, 15 mg/g fructose and 44 mg/g glucose. In all of the amended conditions, sucrose tuber concentrations were higher compared to the control. For more detailed results see Supplementary Materials (SM2.4. and Table SM4).

## 4. Discussion

### 4.1. Soil response to the amendments

In our study, which induced drought conditions, biochar applied alone increased soil moisture to a greater extent than in the other treatments (manure, and biochar-manure blend). The macro and micro-porous structure of biochars have previously been shown to advantageously impact soil moisture retention (Wang et al., 2019). For example Adekiya et al. (2019) observed that the application of a hardwood biochar (25 or 50 t/ha) in a field experiment had exactly this effect. Kammann et al. (2011), tested a peanut hull biochar applied to a sandy soil, showing an increase in the soil water holding capacity after amendment. Indeed, Jačka et al. (2018)

observed an increase in soil water holding capacity with biochar addition to soil. Here infrared analysis revealed that biochar surfaces had OH and C-O-H functional groups, on which water bonded directly through polar interaction. In addition, biochar can indirectly increase soil water content by improving soil structure, through bulk density reduction and aggregation stability improvement (Adekiya et al., 2019; Bohara et al., 2019; Wang et al., 2019), as well as the addition of organic carbon, which is known to increase soil water retention (Jačka et al., 2018). Our study showed that manure and the combination of manure plus biochar were not able to improve soil water content. This lack of synergistic effect of biochar in combination with manure could be related to a clogging of biochar pores by manure particles since biochar formed only 10% of the biochar-manure mixture.

Soil pore waters (SPWs) were sampled and analysed before the induction of the drought stress to evaluate amendment effects on soil chemical properties

All of the amendment treatments, i.e. biochar, manure and biochar plus manure, increased SPW pH and EC, with biochar leading to a greater pH increase and manure to a greater EC increase.

Biochar and manure are known to induce increased soil pH following their application, especially if the soil is acidic, and to increase soil EC, as

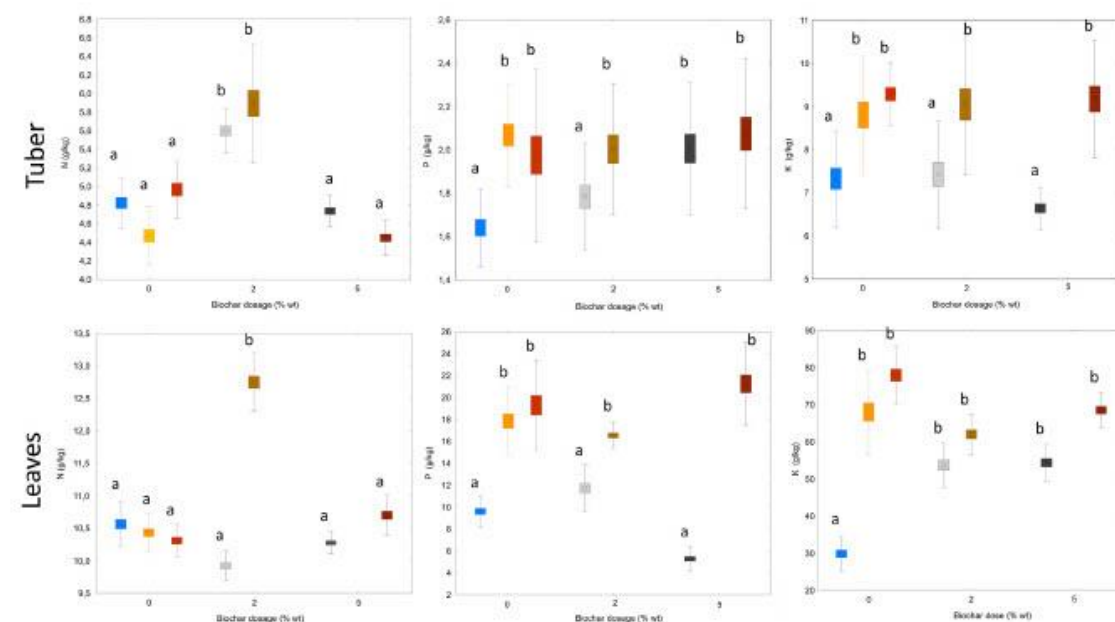


Fig. 2. N, P and K nutrient contents in sugar beet (tubers and leaves separately), different letters indicate statistically significant difference in Dunnetts test ( $\alpha < 0.05$ ). C – control (blue), B2-2% biochar (grey), B5-5% biochar (dark grey), M2-2% manure (yellow), M5-5% manure (brown), MB2-2% manured biochar mix (dashed yellow), MB5-5% manured biochar mix (dashed brown).

# Biochar in manure can suppress water stress of sugar beet (*Beta vulgaris*) and increase sucrose content in tubers

M. Lebrun et al.

Science of the Total Environment 814 (2022) 152772

demonstrated in the studies of Adekiya et al. (2019) and Song et al. (2018). The first explanation for this is straightforward; the amendments have higher pH and EC values compared to the soil (Table 1; Rafael et al., 2019). The functional groups on the surfaces of the biochar can consume  $H^+$ , after which biochar carbonates are released into the soil, increasing pH (Meng et al., 2018). Similarly, manure contains basic cations such as  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ , which can raise soil pH (Adekiya et al., 2019). These elements released by the amendments can also increase soil EC (Song et al., 2018).

The measure of the nutrient contents in the soil pore water showed that, in general, manure increased soil nutrients while biochar decreased them, except  $NO_3^-$  (when biochar was applied at 2%),  $SO_4^{2-}$  and  $Na^+$ . When biochar was added to the manure, the increase in nutrient content was generally lower than with manure alone. All the amendments, B, M and MB, contained higher concentrations of nutrients than the soil (Table 1) and could therefore reasonably be expected to enhance nutrient content through their addition to the soil (Agbede et al., 2020). However, only manure increased soil nutrition status. The fact that biochar reduced nutrients in the soil pore water could be related to its sorption capacity. Indeed, biochar was shown to be able to sorb nutrients such as nitrate, ammonium, phosphorus, potassium etc. (Rens et al., 2018). This immobilization of nutrient, especially nitrogen and phosphorus, was predicted through the calculation of the C/N and C/P ratio: the C/N ratio of the biochar was 140 and the C/P ratio was 918. When C/N is above 32 and C/P above 200, organic amendments are assumed to immobilize N and P (Peiris et al., 2019). In addition, the microbial communities, which are known to be affected by amendment applications, can affect nutrient cycling, making them more or less mobile or available to plants (Pan et al., 2021). Based on soil pore water nutrient content measured, it was expected that manure would improve sugar beet growth further than biochar. In addition, the reduction in soil pore water nitrate concentration does not only reduce leaching but could also lower  $N_2O$  emissions, another environmental issue in agriculture (Pan et al., 2021).

## 4.2. Sugar beet responses to water stress

Frequent drought episodes negatively affected crop yields, through impairments in plant growth, physiology and reproduction, which can be assessed by measuring nutrient uptake, gas exchange, photosynthesis and assimilate partitioning (Fahad et al., 2017).

The physiological analyses performed on the leaves during drought stress showed that amendment application improved leaf gas exchange, i.e. decrease  $c_i$ , increase transpiration, stomatal conductance and WUEi.

The effects of drought stress on plant physiology has been much studied, showing that leaf  $c_i$  increased while transpiration,  $CO_2$  assimilation and stomatal conductance decrease in response to drought stress (Baccari et al., 2020; Baraldi et al., 2019; Leufen et al., 2016; Santos et al., 2021). Indeed, one of the first responses of plants to drought is the closure of their stomata, which reduces transpiration rate and thus permits the plants to maintain water content. The closure of stomata also reduces  $CO_2$  assimilation, and thus net photosynthesis (Leufen et al., 2016).

The measured increase in gas exchanges following amendment application was consistent with previous observations (Yang et al., 2020; Zhang et al., 2020), and could be related to improved plant nutrition and soil water content (Tanure et al., 2019; Yang et al., 2020). Biochar increased soil water content in our study, while biochar and manure alone and combined improved soil and plant nutrient content. Under optimum water and nutritional status, plants open their stomata, which increase transpiration and  $CO_2$  assimilation (Tanure et al., 2019). Such observations showed that biochar and manure amendment, through their effects on soil moisture and nutrient status, could alleviate drought stress to the photosynthetic apparatus of sugar beet plants (Zhang et al., 2020), especially the treatment M5 which showed a decrease in  $c_i$  together with an increase in transpiration, stomatal conductance and water use efficiency.

In addition to leaf gas exchange impairment, drought stress also affects plant growth, as demonstrated in the studies of Mouradi et al. (2016) and

Santos et al. (2021), and which is related to photosynthesis reduction (Mouradi et al., 2016). The addition of manure and biochar increased leaf and tuber biomass production. Other studies have noted similar results when drought stress was induced, with faba bean (Abd El-Mageed et al., 2021) and quinoa (Yang et al., 2020). In addition, the positive effects of biochar on crops have been reviewed in previous papers (Agegnehu et al., 2017; Chen et al., 2019; Yu et al., 2019) and the mechanisms involved have been intensively discussed in the paper of Jeffery et al. (2011): briefly, (i) high porosity of biochar reduces soil bulk density, which consequently reduce soil resistance to root penetration (Adekiya et al., 2019); (ii) high porosity of biochar also improves soil moisture retention (Yang et al., 2020); and (iii) biochar can improve nutrient availability due to nutrient retention and modification of soil physicochemical properties (Abd El-Mageed et al., 2021). Although soil pore water analysis in our study showed that biochar retained nutrients, this could still be available for plants 'mining' biochar's highly porous surfaces. Indeed, nutrient retention by biochar was not associated with a decrease in nutrient content in sugar beet plant, attesting to the fact that biochar did not negatively affect plant nutrition. Therefore, it can be hypothesised that nutrients retained by biochar are easily released and available to be up taken by plant roots, such as demonstrated in the study of Rens et al. (2018). An incubation study of biochar with manure also showed that biochar could regulate potassium release for plants (Banik et al., 2021). Similarly, manure improved soil moisture and soil nutrient contents, which could explain the improvement of sugar beet biomass (Rollon et al., 2020). Moreover, although it was not measured in this study, biochar and manure amendments are known to be a source of organic matter (Arthur et al., 2015). Such addition of easily degradable organic matter to soil is beneficial for soil micro- and meso-fauna (Adekiya et al., 2019), which in return have a great role in organic matter and nutrient cycling (Pan et al., 2021) as well as soil structure (Dai et al., 2019). For instance, the application of maize straw biochars increased the activity of enzymes related to nitrogen, in two previous studies (Song et al., 2019, 2018). The authors explained such observation by a modification of the soil properties, as well as to the high carbon content of biochar, and thus the accelerated mineralization of N to compensate for such elevated carbon content. A similarly finding and explanation was given by Khadem and Raiesi (2017) in their study using corn biochars on calcareous soils. In two saline soil contexts, biochar was shown to increase soil microbial activity, leading to better plant growth in such stressed conditions (Bhaduri et al., 2016; Fgamberdieva et al., 2021). These studies demonstrated the potential of biochar to improve soil microbial activity and thus overall quality under regular and stressed conditions, allowing better plant growth. When comparing the single amendment application, manure induced a higher biomass improvement than biochar, which could be related to the higher nutrient content of manure. Similarly, adding the amendments at 5% was more efficient than 2%, which again can be due to more nutrients added to the soil. Finally, when biochar was added to manure, it resulted to a greater biomass increase than the single application of biochar or manure, and such positive interactions between biochar and manure on plant growth have been observed in previous studies (Adekiya et al., 2020, 2019). Due to its sorption capacity, biochar could have retained manure nutrients and released them slowly during plant growth, while manure alone released its nutrients more quickly (Adekiya et al., 2020), with potential leaching.

Drought stress has been shown to decrease photosynthetic pigments (Kiani et al., 2020; Leufen et al., 2016). Indeed, water deficit damages the photosynthetic apparatus and is reducing the pigment synthesis (Kiani et al., 2020). The loss of photosynthetic pigments is one of the protective mechanisms initiated by the plant to reduce the amount of energy absorbed by the leaf when the plant is under drought (Liu et al., 2017). Under water deficit, the application of manure and biochar increased leaf chlorophyll content, which was in accordance with previous studies (Abd El-Mageed et al., 2021; Zhang et al., 2020). Such pigment increase can be related to the enhanced nutritional status of the plants, such as N, P and K (Mubarak et al., 2016) and testify to a better resistance to drought stress in presence of amendments (Abideen et al., 2020).

# Biochar in manure can suppress water stress of sugar beet (*Beta vulgaris*) and increase sucrose content in tubers

Contrary to the photosynthetic chlorophyll content, the total content of xanthophyll cycle pigments has been shown to be increased under drought stress (Baccari et al., 2020; Baraldi et al., 2019). This is important in plant protection upon stress exposure. Particularly, under drought, violaxanthin is de-epoxidized to antheraxanthin, then zeaxanthin. This allows the dissipation of excess light energy, for which zeaxanthin is more efficient than violaxanthin (Baccari et al., 2020). The decrease in total xanthophyll cycle pigments and DEPS with the amendments testify of the reduction of stress encountered by plants when grown on amended soil compared to control, in concordance with the measured reduction in chlorophyll content.

The nutritious status of crops is an important parameter to assess in agriculture. If sugar beet being grown for sugar production, then the effect of amendment on sugar content is crucial to assess. The content of the three main sugars, fructose, galactose and sucrose, increased with all amendment treatments. The fact that nutrient contents increased following biochar amendment, although biochar decreased the concentrations of these elements in soil pore water, can be attributed to the fact that the nutrients were still available to the plants, despite biochar's sorptive tendencies. The increased nutritious status and sucrose content in plants following manure and biochar amendments has been observed in previous studies (Abd El-Mageed et al., 2021; Adekiya et al., 2019; Yang et al., 2020; Zhang et al., 2020). Such effects may be at least partially explained by an increase of soil nutrient content, which was observed in the case of manure, and general enhancement of soil chemical properties, and of the soil microbial activity (Abd El-Mageed et al., 2021; Adekiya et al., 2019). The decrease in Na concentration measured in our study, in amended soils, is another decreased the stress in plants, since an increase in Na concentration in plants is one indicator of stress.

### 4.3. Relationships between plant parameters

Principal component analysis (PCA) was performed in order to evaluate the correlation between the physiological response of the plants and soil

moisture. Soil moisture is one of the most important soil factors affecting plant development and physiology (Yan et al., 2017). Results showed that transpiration rate and stomatal conductance were negatively correlated with soil moisture (Fig. SM2). Previous studies have demonstrated that CO<sub>2</sub> assimilation, stomatal conductance and transpiration correlated with each other (Naidoo and Naidoo, 2018; Yan et al., 2017). However, these studies showed that those three parameters were positively correlated with soil moisture, i.e. their values increased with increasing soil moisture. Such discrepancies show that the amendments that improved soil moisture further were not the ones inducing the best transpiration and stomatal conductance, i.e. gas exchange. As leaf gas exchange can be affected by other factors, it is possible that the amendments improved it through their influence on the other parameters. For instance, K ions intervene in the stomatal closure, thus regulating leaf gas exchange (Hasanuzzaman et al., 2018). Similarly, WUEi had a negative correlation with soil moisture. Therefore, it can be stated that WUEi was affected by soil moisture and other soil properties not evaluated in this analysis.

Another PCA was used to discriminate treatments based on the plant biomass, nutrient contents and sugar contents in tubers of each particular treatment (Fig. 3). This biplot showed a separation of treatments along the first two axes, which explained 72% of the variance. In this biplot, a first group was formed with the control, the two biochar alone treatments and M2, characterized by high concentrations in Mg, S, Na and Ca, while the second group contained the treatment M5 and the combination treatments, which had higher biomass, N, P, K, glucose, fructose and sucrose contents. This showed that the treatments inducing the highest N, P and K accumulation in plants (M5, MB2 and MB5) were the ones also inducing the highest sugar production in tubers. In addition, these treatments were negatively correlated with Mg, S, Na, and Ca tuber contents, which are considered impurities in the sugar industry (Altay and Aksu, 2020; Campbell, 2002). A higher nutrient plant content, generally induced by additional fertilization, has been shown to be correlated to a higher sugar production in

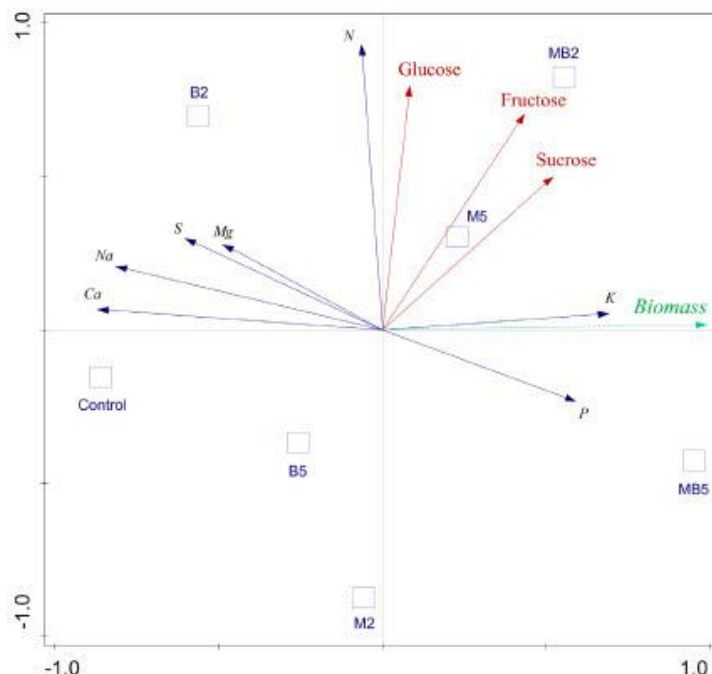


Fig. 3. Biplot with the first two PCA axes, with projected centroids of particular treatments (blue squares). Macronutrients and sugar contents (black and red full arrow) and plant wet biomass (dashed green arrow) are shown. The first two axes explain 72% of the total variance.



# Biochar in manure can suppress water stress of sugar beet (*Beta vulgaris*) and increase sucrose content in tubers

M. Lebrun et al.

Science of the Total Environment 814 (2022) 152772

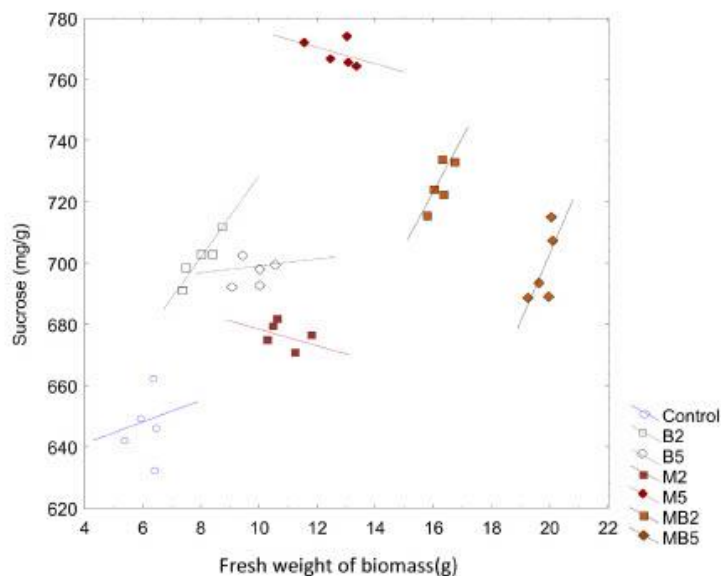


Fig. 4. Sucrose content in particular treatments in relation to tuber biomass (g). Linear trends are shown for particular treatments; C:  $y = 628.9 + 0.118x$ ,  $R^2 = 0.001$ ,  $p = 0.85$ ; B2:  $604.2 + 0.929x$ ,  $R^2 = 0.82$ ,  $p = 0.02$ ; B5:  $y = 683.2 + 0.078x$ ,  $R^2 = 0.06$ ,  $p = 0.90$ ; M2:  $703.4 - 0.350x$ ,  $R^2 = 0.23$ ,  $p = 0.56$ ; M5:  $y = 804.1 - 0.470x$ ,  $R^2 = 0.22$ ,  $p = 0.42$ ; MB2:  $y = 449.18 + 0.780x$ ,  $R^2 = 0.61$ ,  $p = 0.03$ ; MB5:  $y = 255.9 + 0.678x$ ,  $R^2 = 0.46$ ,  $p = 0.06$ .

plants, especially regarding potassium (Hasanuzzaman et al., 2018; Hoffmann, 2010; Mubarak et al., 2016). For instance, Altay and Aksu, (2020) observed that potassium application increased sugar content and found that a high potassium plant concentration increased carbohydrate synthesis and sugar content in sugar beet. Thus, potassium was shown to have a role in sugar production and accumulation, through the support of phloem loading and carbohydrate synthesis. Moreover, a study performed by Shen et al. (2017) revealed that K addition to soil increased leaf and fruit K concentration and sugar content, and explained that the higher sugar content in fruit was related to the induction of specific genes involved in sucrose metabolism by potassium. Based on these studies, it can be hypothesised that in our study, the different amendment treatments, and especially M5, MB2 and MB5, increased soil nutrient content, and thus induced a higher accumulation of these nutrients in sugar beet.

Finally, the improvement of sugar yield is often impaired by the negative relationship between root yield and root sugar concentration (Campbell, 2002). Therefore, the correlations between sucrose content and biomass production for each treatment was performed (Fig. 4). Three different correlations patterns can be identified. The treatments control, M2 and M5 showed a negative correlation between sucrose content and fresh biomass, while the treatment B5 showed a neutral correlation. Finally, the treatments B2, MB2 and MB5 showed a positive correlation between fresh weight and sucrose content. This demonstrated that for the treatments C, M2 and M5, plants do not produce more sucrose with an increase in biomass production while plants grown on B5 and the combined treatments produced more sucrose with more biomass. Thus, these last three treatments seem to be more suitable for sugar yield under drought stress, which could be related to the higher nutrients, especially K, in plants, as demonstrated by the previous correlation analysis. These treatments were also the ones negatively correlated with impurities, and thus with a higher sugar quality.

## 5. Conclusions and practical implications of this study

From the results of this study, biochar alone proved most advantageous to increase soil moisture retention and reduce the leaching of nitrate otherwise a consequence of manure addition to soil. Holistically, further

considering the impacts to crop growth and quality, the application of 2% (wt.) biochar manure blend achieved increased sugar beet yield under experimentally induced water stress (drought) conditions, compared to soil without amendment. This blend of two soil amendments also bolstered beet sugar content. With increasing recognition of the cumulative impacts of soil drought events to farmers and other land managers, the results of this study suggest that blending biochars with traditional on-farm fertilizers could provide a win-win measure to improve soil moisture and nutrient retention in coarse textured soils. The direct economic implications are evident, through improved crop yield and maintained or enhanced crop quality. The practicalities of blending these soil amendments in bulk and applying them to soils will now be explored further in the field in longer-term studies.

## CRedit authorship contribution statement

Manhattan Lebrun: writing – draft and editing, revising the manuscript. Jiří Bouček: management of the experiments, laboratory analysis. Kateřina Berchová Bímová: data treating and statistics, visualization, consultations of the results. Kamil Kraus: physiological parameters measuring and data providing. Daniel Haisel: chlorophyll and carotenoids data measuring and evaluation. Martin Kulháněk: plant nutrition data evaluation, discussion and commenting on the manuscript. Carol Omara-Ojungu: laboratory analysis and samples collection. Samar Seyedsadr: laboratory analysis and samples collection. Luke Beesley: Manuscript writing and editing. Petr Soudek: co-management of the experiments, consultations of the results. Šárka Petrová: consultations of the results, laboratory analysis. Michael Pohůřelý: biochar and organic amendments providing including their analysis. Lukáš Trkal: Conceptualization, discussion and commenting on the manuscript.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



# Biochar in manure can suppress water stress of sugar beet (*Beta vulgaris*) and increase sucrose content in tubers

M. Lebrun et al.

Science of the Total Environment 814 (2022) 152772

- Mouradi, M., Farisá, M., Bouzigren, A., Makoudi, B., Kabbadj, A., Vary, A.-A., Senteruc, H., Qaddourya, A., Ghoulam, C., 2016. Effects of water deficit on growth, nodulation and physiological and biochemical processes in *Medicago sativa*-rhizobia symbiotic association. *Arid Land Res. Manag.* 30, 193–208. <https://doi.org/10.1080/15324982.2015.1073194>.
- Mubarak, M.U., Zahir, M., Ahmad, S., Wakeel, A., 2016. Sugar beet yield and industrial sugar contents improved by potassium fertilization under scarce and adequate moisture conditions. *J. Integr. Agric.* 15, 2620–2626. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61252-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61252-7).
- Naidoo, G., Naidoo, K.K., 2018. Drought stress effects on gas exchange and water relations of the invasive weed *Chromolaena odorata*. *Flora* 248, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.08.008>.
- Pan, S.-Y., Dong, C.-D., Su, J.-F., Wang, P.-Y., Chen, C.-W., Chang, J.-S., Kim, H., Huang, C.-P., Hung, C.-M., 2021. The role of biochar in regulating the carbon, phosphorus, and nitrogen cycles exemplified by soil systems. *Sustainability* 13, 5612. <https://doi.org/10.3390/su13105612>.
- Peiris, C., Gunatilake, S.R., Wewahela, J.J., Vithanage, M., 2019. Biochar for sustainable agriculture. *Biochar From Biomass and Waste*. Elsevier, pp. 211–224. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811729-3.00011-X>.
- Rafael, R.B.A., Fernández-Marcos, M.L., Cocco, S., Ruello, M.L., Fornasier, F., Corti, G., 2019. Benefits of biochars and NPK fertilizers for soil quality and growth of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in an acid arenosol. *Pedosphere* 29, 311–333. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60805-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60805-2).
- Raza, A., Razaq, A., Mehmood, S., Zou, X., Zhang, X., Lv, Y., Xu, J., 2019. Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: a review. *Plants* 8, 34. <https://doi.org/10.3390/plants8020034>.
- Reed, E.Y., Chadwick, D.R., Hill, P.W., Jones, D.L., 2017. Critical comparison of the impact of biochar and wood ash on soil organic matter cycling and grassland productivity. *Soil Biol. Biochem.* 110, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.03.012>.
- Rens, H., Bera, T., Alva, A.K., 2018. Effects of biochar and bio-solid on adsorption of nitrogen, phosphorus, and potassium in two soils. *Water Air Soil Pollut.* 229, 281. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-9325-8>.
- Rollon, R.J.C., Malignon, P.L.B., Guindang, P.R., Dolorito, R.V., 2020. Corn (*Zea mays* L.) growth, nutrient uptake and soil fertility improvement of strongly acidic soil applied with biochar and animal manure. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 8, 35–40. <https://doi.org/10.7924/JABB.2020.80206>.
- Sadaf, J., Shah, G.A., Shahzad, K., Ali, N., Shahid, M., Ali, S., Hussain, R.A., Ahmed, Z.I., Trapore, B., Ismail, I.M.I., Rashid, M.I., 2017. Improvements in wheat productivity and soil quality can accomplish by co-application of biochars and chemical fertilizers. *Sci. Total Environ.* 607–608, 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.178>.
- Santos, E.F., Mateus, N.S., Rosário, M.O., Garcez, T.B., Mazzafra, P., Lavres, J., 2021. Enhancing potassium content in leaves and stems improves drought tolerance of eucalyptus clones. *Physiol. Plant.* 172, 552–563. <https://doi.org/10.1111/pp1.13228>.
- Shen, C., Wang, J., Jin, X., Liu, N., Fan, X., Dong, C., Shen, Q., Xu, Y., 2017. Potassium enhances the sugar assimilation in leaves and fruit by regulating the expression of key genes involved in sugar metabolism of asian pears. *Plant Growth Regul.* 83, 287–300. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0294-z>.
- Song, D., Tang, J., Xi, X., Zhang, S., Liang, G., Zhou, W., Wang, X., 2018. Responses of soil nutrients and microbial activities to additions of maize straw biochar and chemical fertilization in a calcareous soil. *Eur. J. Soil Biol.* 84, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2017.11.003>.
- Song, D., Xi, X., Zheng, Q., Liang, G., Zhou, W., Wang, X., 2019. Soil nutrient and microbial activity responses to two years after maize straw biochar application in a calcareous soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 180, 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.073>.
- Sun, Y., Xiong, X., He, M., Xu, Z., Hou, D., Zhang, W., Ok, Y.S., Rinklebe, J., Wang, L., Tsang, D.C.W., 2021. Roles of biochar-derived dissolved organic matter in soil amendment and environmental remediation: a critical review. *Chem. Eng. J.* 424, 130387. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130387>.
- Tanure, M.M.C., da Costa, L.M., Huiz, H.A., Fernandes, R.B.A., Cecon, P.R., Pereira Junior, J.D., da Luz, J.M.R., 2019. Soil water retention, physiological characteristics, and growth of maize plants in response to biochar application in soil. *Soil Tillage Res.* 192, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.05.007>.
- Toscano, S., Ferrante, A., Romano, D., 2019. Response of Mediterranean ornamental plants to drought stress. *Horticulturae* 5, 6. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5010006>.
- Wang, X., Ren, Y., Zhang, S., Chen, Y., Wang, N., 2017. Applications of organic manure increased maize (*Zea mays* L.) yield and water productivity in a semi-arid region. *Agric. Water Manag.* 187, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.03.017>.
- Wang, D., Li, C., Parikh, S.J., Seow, K.M., 2019. Impact of biochar on water retention of two agricultural soils – a multi-scale analysis. *Geoderma* 340, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.01.012>.
- Yan, W., Zhong, Y., Shangquan, Z., 2017. Responses of different physiological parameter thresholds to soil water availability in four plant species during prolonged drought. *Agric. For. Meteorol.* 247, 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.08.017>.
- Yang, A., Akhtar, S.S., Li, L., Fu, Q., Li, Q., Naeem, M.A., He, X., Zhang, Z., Jacobsen, S.-E., 2020. Biochar mitigates combined effects of drought and salinity stress in quinoa. *Agronomy* 10, 912. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060912>.
- Yu, H., Zou, W., Chen, J., Chen, H., Yu, Z., Huang, J., Tang, H., Wei, X., Gao, B., 2019. Biochar amendment improves crop production in problem soils: a review. *J. Environ. Manag.* 232, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.117>.
- Zhang, F., Li, Y., Yang, M., Li, W., 2012. Content of heavy metals in animal feeds and manures from farms of different scales in Northeast China. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9, 2658–2668. <https://doi.org/10.3390/ijerph9082658>.
- Zhang, P., Yang, F., Zhang, H., Liu, L., Liu, X., Chen, J., Wang, X., Wang, Y., Li, C., 2020. Beneficial effects of biochar-based organic fertilizer on nitrogen assimilation, antioxidant capacities, and photosynthesis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under saline-alkaline stress. *Agronomy* 10, 1562. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101562>.
- Zhao, J., Shen, X.-L., Domene, X., Alcañiz, J.-M., Liao, X., Palot, C., 2019. Comparison of biochar derived from different types of feedstock and their potential for heavy metal removal in multiple-metal solutions. *Sci. Rep.* 9, 9869. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46234-4>.

The effect of drought on the physiological state of sugar beet and the possibility of using adjuvants

**Působení sucha na fyziologický stav cukrové řepy a možnosti využití pomocných prostředků**

THE EFFECT OF DROUGHT ON THE PHYSIOLOGICAL STATE OF SUGAR BEET AND THE POSSIBILITY OF USING ADJUVANTS

Kamil Kraus, Helena Hmiličková, Martin Zelený a František Hnilička, Česká zemědělská univerzita v Praze

V důsledku změny klimatu se očekává snížení výnosů polních plodin. Spolu s nárůstem světové populace, kdy odhady k roku 2050 jsou 9 až 10 miliard lidí, je zřejmé, že zajistit dostatek zdrojů potravy pro lidi a hospodářská zvířata bude stále náročnější úkol ve všech oblastech zemědělské produkce (1). Globální oteplování, srážkové anomálie, degradace půdotvorných procesů, minerální disbalance, zasolování a řada dalších vyvolává u rostlin komplex abiotických stresů.

**Působení vodního stresu na fyziologické procesy u cukrové řepy**

Cukrová řepa (*Beta vulgaris* L.) patří mezi relativně tolerantní k horkým, suchým a mírně slaným podmínkám. Přesto je její produkce často omezena podmínkami prostředí, které ovlivňují rychlost fotosyntézy, zapojení porostu, růst kořenů a akumulaci sacharózy. Mezi tyto podmínky patří nedostatečné množství vody, teplo, chlad, zasolení, těžké kovy a UV záření (2,3). Délka expozice suchu a jeho závažnost v závislosti na genotypu může snížit u cukrovky výnos o 15 až 20 % (4). Dopad změn klimatu byl již prokázán v posunu fenologických fází a agrotechnických termínů pěstování cukrové řepy v podmínkách ČR (5).

Primární reakcí rostlin vystavených stresu ze sucha je zastavení růstu v důsledku ztráty buněčného turgoru a omezení prodlužovacího růstu buněk (6). V raných fázích vývoje cukrové řepy vodní stres snižuje asimilační plochu (7) a u starších listů dochází k rychlejšímu stárnutí a opadu (8). Snížení listové plochy omezuje ztráty vody transpirací, ale zároveň vede k omezení výnosu v důsledku nižší fotosyntézy (9). Limitace fotosyntézy bývá rozlišována na stomatální a nestomatální. V důsledku sucha klesá asimilace CO<sub>2</sub> kvůli uzavírání průduchů. Výsledkem je, že se snižuje koncentrace CO<sub>2</sub> v chloroplastech, což má za důsledek: (a) snížení fotochemického výtěžku reakčních center fotosystému II (PSII) a následně zvýšení tepelné disipace excitovaných elektronů zachycených v PSII; (b) pokles aktivity některých enzymů, např. sacharózy fosfát syntázy a nitrát reduktázy; (c) zvýšení oxygenační aktivity RUBISKO a snížení obsahu ribulosity 1,5-bisfosfátu (10). V řadě prací se uvádí vliv deficitu vody na fotosyntézu a obsah chlorofylu u cukrové řepy (4,9,11). Fotosyntetický aparát řepy vykazuje

## The effect of drought on the physiological state of sugar beet and the possibility of using adjuvants

vysokou míru tolerance k fotoinhibici díky ochranného mechanismu spojeného s nefotochemickým zhášením. Těžká dehydratace snižuje efektivní kvantový výtěžek fotosystému PSII v důsledku poruch v přenosu energie a poškození reakčních center fotosystému (4,12).

Během deficitu vody dochází ke kumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS). Molekuly ROS vyvolávají oxidační stres a zároveň fungují jako významné signální molekuly zapojující se do aklimatizačních procesů během stresu (13). ROS způsobují peroxidaci lipidů, která ovlivňuje fotosyntézu a propustnost membrán, poškozují nukleové kyseliny a inhibují enzymy. Rostliny proto vyvinuly sofistikovaný systém vychytávání ROS využívající jak neenzymatické (prolin, glycin betain), tak enzymatické prostředky (např. superoxiddismutáza, kataláza a peroxidázy)(14). Vyšší akumulace ROS a aktivita antioxidantních enzymů v reakci na sucho a zasolení byla prokázána rovněž u cukrové řepy (3,9,11).

V reakci na stres rostliny aktivují mechanismy obraných reakcí, jako jsou morfologické a strukturální změny, exprese genů, syntéza hormonů a osmoticky aktivních látek ke zmírnění dopadů stresu (15). Významnou roli mají právě osmoticky aktivní látky (kompatibilní soluty), jejichž jednou z funkcí je prostřednictvím osmoregulace udržet turgor v rostlinách a optimalizovat příjem vody. Akumulace osmoprotektantů prolinu a glycin betainu koreluje s vodním režimem cukrové řepy (9).

Jako indikátorem stresu funguje aminokyselina prolin, k jejíž mnohanásobné akumulaci dochází při suchu. U řepy byl pozorován nárůst prolinu až o 2600 %. U genotypů se zvýšenou akumulací prolinu je pozorována vyšší tolerance k suchu (11). Prolin působí zejména jako vynikající osmolyt, chelátor kovů, antioxidantní a signální molekula, stabilizuje membrány, napomáhá udržovat homeostázu ROS a při regeneraci po stresu je zdrojem energie (16). Jak uvádí Choluj a kol. (17) v jednotlivých orgánech řepy dochází k rozdílné akumulaci osmoprotektantů během dlouhodobého sucha. V nejmladších listech se akumuluje především glycin betain a sacharóza, ve starších listech sacharóza, prolin a betain a v kořenech rozpustné cukry.

### **Biostimulátory**

V současné době je velmi aktuální otázka, jak omezit dopady působení stresorů na porosty polních plodin. Od šlechtění tolerantních kultivarů, zavádění nových druhů až po optimalizaci agrotechnických postupů. Jednou možností ze souboru všech využívaných opatření je aplikace podpůrných stimulačních přípravků (18). Ty mají obvykle různorodé chemické složení, kdy jejich účinek je důsledkem synergického působení různých bioaktivních molekul. Jedná se obvykle o produkty získané z různých organismů či mikroorganismů,

případně i o anorganické látky, které jsou schopny zlepšit růst rostlin, produktivitu a zmírnit negativní účinky stresu (19,20). Mezi nejznámější komponenty patří minerální prvky, vitamíny, aminokyseliny a poly- a oligosacharidy, stopy přírodních rostlinných hormonů, huminové kyseliny, chitosan, fosfity, biouhel a rostlinné extrakty, včetně extraktů z řas a různých částí rostlin (21). Mohou působit přímo na fyziologii a metabolismus rostliny, umožňují zlepšit efektivitu využití vody a živin u plodin, stimulovat vývoj zvýšením primárního a sekundárního metabolismu (20). Bylo prokázáno, že biostimulanty na rostlinné bázi zlepšují růst díky přítomnosti různých fytohormonů a dalších sekundárních metabolitů, vitamínů, antioxidantů a anorganických živin v extraktu, které mohou přímo ovlivnit růst a produkci rostlin zlepšením tolerance rostlin proti abiotickým stresům (22). Souhrnné znázornění účinku stimulačních přípravků na různých úrovních je zobrazeno na obrázku 1.

#### **Působení biostimulátorů a účinných látek u cukrové řepy**

U cukrové řepy byl prokázán vliv aplikace biostimulačních přípravků, ročníku a genotypu na výnos a cukernatost řepy (23). Existuje řada pozorování vlivu foliární aplikace a primingu semen stimulačními přípravky na různé bázi či jednotlivými účinnými látkami u cukrové řepy.

Biostimulátory na bázi huminových kyselin (HK) se zvýšeným podílem aminokyselin nebo s obsahem půdních bakterií pozitivně ovlivnily výnos, kvalitu a index listové plochy (LAI) cukrové řepy. Tento efekt se projevil i v roce s nepříznivými povětrnostními podmínkami (24). Exogenně aplikované huminové kyseliny a regulátory růstu jako kyselina salicylová, kyselina gibberelová a kyselina askorbová zvyšují obsah cukru, obsah chlorofylů, optimalizují vodní režim zvýšením relativního obsahu vody (RWC) v cukrové řepě. Zároveň zvyšují aktivitu antioxidantních enzymů a akumulaci neenzymatických antioxidantů jako je prolin a glycin betain, čímž přispívají k toleranci cukrové řepy k suchu (9).

Aplikace prolinu a křemíku jednotlivě nebo v kombinaci průkazně zvýšila výnos a cukernatost, obsah chlorofylů a RWC. Pozitivně byla ovlivněna antioxidantní aktivita a snížena peroxidace lipidů (25). V podmínkách zasolení, kdy se kombinuje vodní, osmotický a iontový stres byl sledován efekt aplikace melatoninu, který je považován za růstový regulátor. Bylo prokázáno zvýšení antioxidantní aktivity, snížení akumulace ROS a zvýšení fotosyntézy (26). Aplikací chitosanu u řepy, došlo k pozitivnímu ovlivnění morfologických znaků a obsahu chlorofylu (27). Další příklady použití stimulačních přípravků u cukrové řepy jsou uvedeny v tabulce I.

Výzkum působení různých účinných látek a jejich kombinací napříč pěstovanými druhy plodin je velmi na vzestupu. Jejich účinky zejména ovlivňují aktivitu antioxidantních enzymů,

## The effect of drought on the physiological state of sugar beet and the possibility of using adjuvants

funkci fotosyntetického aparátu, hormonální metabolismus, optimalizují vodní režim, udržují homeostázu vnitřního prostředí a stabilizují buněčné struktury. Z výše uvedených příkladů vyplývá významný potenciál v boji proti dopadům sucha prostřednictvím stimulačních prostředků na různé bázi. Kombinace vhodných genotypů, optimálních agrotechnických zásahů, včetně výživy, ochrany a využívání pomocných přípravků může být jednou z cest jak i v složitých podmínkách prostředí docílit optimální produkce.

### **Souhrn**

Mění se klima významně ovlivňuje zemědělskou produkci. Sucho zhoršuje fyziologický a metabolický stav cukrové řepy a tím negativně ovlivňuje kvantitativní a kvalitativní faktory produkce. Citlivě je zasažen fotosyntetický proces, dochází k oxidačnímu stresu, narušen je vodní režim a růst rostliny. Působení stimulačních prostředků různého původu pomáhá rostlinám překonat období stresu. Jejich působení zasahuje do obranných mechanismů rostlin, ovlivňuje aktivitu antioxidantních enzymů, funkci fotosyntetického aparátu, hormonální metabolismus a optimalizují vodní režim. Kombinace vhodných genotypů, optimálních agrotechnických zásahů, včetně výživy, ochrany a využívání pomocných přípravků může být jednou z cest jak i v složitých podmínkách prostředí docílit optimální produkce.

**Klíčová slova:** vodní stres, *Beta vulgaris* L., fotosyntéza, osmoregulace, stimulace

**Kraus K., Hniličková H., Zelený M., Hnilička F.: The effect of drought on the physiological state of sugar beet and the possibility of using adjuvants**

The changing climate has a significant impact on agricultural production. Drought worsens the physiological and metabolic state of sugar beet and thus negatively affects the quantitative and qualitative factors of production. The photosynthetic process is affected, oxidative stress occurs, the water regime and plant growth are impaired. The action of stimulants of various origins helps plants to overcome periods of stress. Their action interferes with plant defence mechanisms, influences the activity of antioxidant enzymes, the function of the photosynthetic apparatus, hormonal metabolism and optimises the water regime. The combination of suitable genotypes, optimal agrotechnical interventions, including nutrition, protection and the use of auxiliary products can be one of the ways to achieve optimal production even under difficult environmental conditions.

**Keywords:** water stress, *Beta vulgaris* L., photosynthesis, osmoregulation, stimulation

**Kontaktní adresa – Contact address:**

# The effect of drought on the physiological state of sugar beet and the possibility of using adjuvants

Ing. Kamil Kraus, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, Praha – Suchbátka, 165 00, Česká republika,  
e-mail: krausk@af.czu.cz

**Poděkování:** Tento příspěvek vznikl za finanční podpory projektu SV22-3-21110.

## Literatura

1. Godoy, F. et al.: Abiotic Stress in Crop Species: Improving Tolerance by Applying Plant Metabolites. *Plants*, 10, 2021(2), s. 186.
2. Ober, E.S.; Rajabi, A.: Abiotic Stress in Sugar Beet. *Sugar Tech.*, 12, 2010(3), s.294–298.
3. Yolcu, S. et al.: An Insight into the Abiotic Stress Responses of Cultivated Beets (*Beta vulgaris* L.). *Plants*, 11, 2022(1), s. 12.
4. Chohuj, D. et al.: Assessment of the physiological responses to drought in different sugar beet genotypes in connection with their genetic distance. *J Plant Physiol.*, 171, 2014(14), s. 1221–1230.
5. Hájková, L. et al.: Vliv klimatické změny na termíny setí, vzházení a sklizně cukrové řepy. *Listy cukrov. řepář.*, 136, 2020(7-8), s. 256–261.
6. Imadi, S.R. et al.: Water stress: types, causes and impact on plant growth and development. In: Ahmad, P. ed. *Water Stress and Crop Plants*. 1th ed., Chichester, UK, John Wiley & Sons, Ltd., 2016, s. 343–355, ISBN 978-1-119-05445-0.
7. Chohuj, D. et al.: Growth and dry matter partitioning in sugar beet plants (*Beta vulgaris* L.) under moderate drought. *Plant Soil Environ.*, 50, 2004(6), s. 265–272.
8. Ober, E.S. et al.: Evaluation of physiological traits as indirect selection criteria for drought tolerance in sugar beet. *Field Crops Res.*, 91, 2005(2), s. 231–249.
9. Khodadadi, S. et al.: Influence of Foliar-Applied Humic Acid and Some Key Growth Regulators on Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Under Drought Stress: Antioxidant Defense System, Photosynthetic Characteristics and Sugar Yield. *Sugar Tech.*, 22, 2020(5), s. 765–772.
10. Cornic, G.; Massacci, A.: Leaf Photosynthesis Under Drought Stress. In: Baker, N.R. ed. *Photosynthesis and the Environment. Advances in Photosynthesis and Respiration.*, 5 vol., Dordrecht, Springer Netherlands, 1996, s. 347–366, ISBN 978-0-306-48135-2.
11. Islam, M.J. et al.: Physiological and Biochemical Changes in Sugar Beet Seedlings to Confer Stress Adaptability under Drought Condition. *Plants*, 9, 2020(11), s. 1511.
12. Wilhelm, C.; Selmar, D.: Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. *J Plant Physiol.*, 168, 2011(2), s. 79–87.
13. Choudhury, F.K.: Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J Cell Mol Biol.*, 90, 2017(5), s. 856–867.
14. Foyer, C.H.; Shigeoka, S.: Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. *Plant Physiol.*, 155, 2011(1), s. 93–100.
15. Yang, X. et al.: Response Mechanism of Plants to Drought Stress. *Horticulturae*, 7, 2021(3), s. 50.
16. Kaur, G.; Asthir, B.: Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol Plant.*, 59, 2015(4), s. 609–619.
17. Chohuj, D. et al.: Influence of long-term drought stress on osmolyte accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. *Acta Physiol Plant.*, 30, 2008(5), s. 679–687.
18. Bulgari, R.; Franzoni, G.; Ferrante, A.: Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. *Agronomy*, 9, 2019(6), s. 306.
19. Roupael, Y.; Colla, G.: Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front Plant Sci.*, 9, 2018, s. 1655.



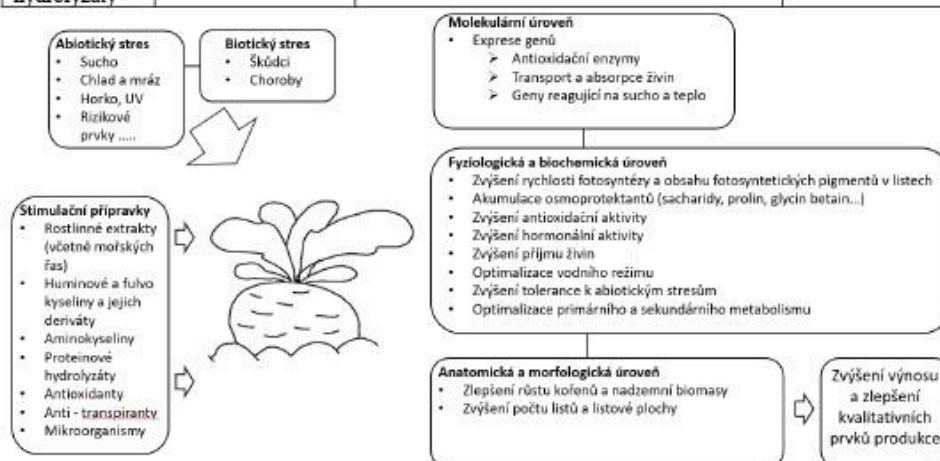
The effect of drought on the physiological state of sugar beet and the possibility of using adjuvants

20. Shahrajabian, M.H. et al.: Biostimulants Application: A Low Input Cropping Management Tool for Sustainable Farming of Vegetables. *Biomolecules* (2021) 11:698. doi: 10.3390/biom11050698
21. Paul, K. et al.: Understanding the Biostimulant Action of Vegetal-Derived Protein Hydrolysates by High-Throughput Plant Phenotyping and Metabolomics: A Case Study on Tomato. *Front Plant Sci.*, 10, 2019, s. 47.
22. Ali, Q. et al.: Plant-Based Biostimulants and Plant Stress Responses., In: Hasanuzzaman, M. ed. *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives I: General Consequences and Plant Responses*. Singapore, Springer, 2020, s. 625–661, ISBN 9789811521560.
23. Ernst, D. et al.: Úroda a cukomatost' repy cukrovej vplyvom ročníka, odrôd a biostimulátorov. *Listy cukrov řepář.*, 138, 2022(11), s. 364-368.
24. Rašovský, M. et al.: Quantity and Quality Changes in Sugar Beet (*Beta vulgaris* Provar. Altissima Doel) Induced by Different Sources of Biostimulants. *Plants*, 11, 2022(17), s. 2222.
25. AlKahtani, M.D.F. et al.: Evaluation of Silicon and Proline Application on the Oxidative Machinery in Drought-Stressed Sugar Beet. *Antioxidants*, 10, 2021(3), s. 398.
26. Liu, L. et al.: Exogenous application of melatonin improves salt tolerance of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings. *Acta Physiol Plant.*, 44, 2022(6), s. 57.
27. Warqa, Al-Sheikh, A.M.S.: The Effect of Exogenous Application of Chitosan in Beta Vulgaris (Beet) Drought Stressed Plants. *J Pharm Negat Results*, 13, 2022(3), s. 703–708.
28. Braziene, Z. et al.: The influence of fulvic acid on spring cereals and sugar beets seed germination and plant productivity. *Environmental Research*, 195, 2021, s. 110824.
29. Artyszak, A.; Gozdowski, D.: Influence of Various Forms of Foliar Application on Root Yield and Technological Quality of Sugar Beet. *Agriculture*, 11, 2021(8), s. 693.
30. Wilczewski, E. et al.: Response of sugar beet to humic substances and foliar fertilization with potassium. *JCEA*, 19, 2018(1), s. 153–165.
31. Barone, V. et al.: Molecular and Morphological Changes Induced by Leonardite-based Biostimulant in *Beta vulgaris* L. *Plants*, 8, 2019(6), s. 181.
32. Borišev, M. et al.: Drought Impact Is Alleviated in Sugar Beets (*Beta vulgaris* L.) by Foliar Application of Fullerene Nanoparticles. *PLOS ONE*, 11, 2016(11), s. 0166248.
33. Jolayemi, O.L. et al.: Protein-Based Biostimulants to Enhance Plant Growth—State-of-the-Art and Future Direction with Sugar Beet as an Example. *Agronomy*, 12, 2022(12), s. 3211.
34. Baltazar, M. et al.: Recent Advances in the Molecular Effects of Biostimulants in Plants: An Overview. *Biomolecules*, 11, 2021(8), s. 1096.

The effect of drought on the physiological state of sugar beet and the possibility of using adjuvants

Tab. I.: Příklady účinků některých stimulačních přípravků u cukrové řepy za různých podmínek.

Ošetření	Pěstební podmínky	Účinek	Zdroj
Prolin a křemík (Si)	Závlaha a snížená závlaha na 50 % polní kapacity	Zvýšení a aktivity antioxidantních enzymů, výnos kořenů a cukru, % sacharózy, obsah chlorofylů a fenolických sloučenin, snížila RWC, MDA a EL.	AlKahtani a kol. (25).
Fulvo kyseliny	Bez simulace stresu	Zlepšené parametry klíčení; zvýšená velikost kořenů, výnos a obsah rozpustného cukru.	Braziene a kol. (28).
Různé formy křemíku (Si)	Bez simulace stresu	Zvýšení výnosu a cukernatosti	Artyszak a Gozdowski (29)
Humínové a fulvo kyseliny	Bez simulace stresu	Zvýšení intenzity růstu, výnosu a cukernatosti	Wilczewski a kol. (30).
Humínové kyseliny	Bez simulace stresu	Zlepšení morfologie kořenu	Barone a kol. (31).
Fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$	Stres suchem	Snížení účinků oxidačního stresu	Borišev a kol. (32).
Proteinové hydrolyzáty	Bez simulace stresu	Zvýšení intenzity růstu	Jolayemi et al. (33).



Obr. 1.: Účinky stimulačních přípravků na různých úrovních (zdroj: Baltazar a kol. (34); upraveno).



Article

# Salinity Stress Affects Photosynthesis, Malondialdehyde Formation, and Proline Content in *Portulaca oleracea* L.

Helena Hnilickova \*, Kamil Kraus, Pavla Vachova \* and Frantisek Hnilicka

Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, 165 00 Prague, Czech Republic; krausk@af.czu.cz (K.K.); hnilicka@af.czu.cz (F.H.)

\* Correspondence: hnilickova@af.czu.cz (H.H.); vachovap@af.czu.cz (P.V.)

**Abstract:** In this investigation, the effect of salt stress on *Portulaca oleracea* L. was monitored at salinity levels of 100 and 300 mM NaCl. At a concentration of 100 mM NaCl there was a decrease in stomatal conductance ( $g_s$ ) simultaneously with an increase in  $CO_2$  assimilation (A) at the beginning of salt exposure (day 3). However, the leaf water potential ( $\psi_w$ ), the substomatal concentration of  $CO_2$  (Ci), the maximum quantum yield of photosystem II (Fv/Fm), and the proline and malondialdehyde (MDA) content remained unchanged. Exposure to 300 mM NaCl caused a decrease in  $g_s$  from day 3 and a decrease in water potential,  $CO_2$  assimilation, and Fv/Fm from day 9. There was a large increase in proline content and a significantly higher MDA concentration on days 6 and 9 of salt stress compared to the control group. After 22 days of exposure to 300 mM NaCl, there was a transition from the C4 cycle to crassulacean acid metabolism (CAM), manifested by a rapid increase in substomatal  $CO_2$  concentration and negative  $CO_2$  assimilation values. These results document the tolerance of *P. oleracea* to a lower level of salt stress and the possibility of its use in saline localities.

**Keywords:** purslane; salinity; gas exchange; proline; salt stress



**Citation:** Hnilickova, H.; Kraus, K.; Vachova, P.; Hnilicka, F. Salinity Stress Affects Photosynthesis, Malondialdehyde Formation, and Proline Content in *Portulaca oleracea* L. *Plants* 2021, 10, 845. <https://doi.org/10.3390/plants10050845>

**Academic Editors:**  
Pasqualina Woodrow and Lorenzana Filomena Ciarniello

Received: 22 March 2021  
Accepted: 20 April 2021  
Published: 22 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Most crops are sensitive to high salt concentrations in the soil and salinization is one of the most serious environmental factors that can limit crop productivity [1,2]. It has been stated that 20% of the total cultivated and 33% of the irrigated agricultural land worldwide is affected by high salinity and the saline area increases by 10% every year. The yield of most crops is significantly reduced when the electrical conductivity (EC) of the soil reaches  $4 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$  (equivalent to 40 mM NaCl) [3]. There are a number of different adaptations that allow certain crop cultivars to continue to grow and produce a harvestable yield under moderate soil salinity [4–6].

The adverse effects of salinity are the result of complex interactions among morphological, physiological, and biochemical processes involved in seed germination, plant growth, and water and nutrient uptake [7–9]. High concentrations of salt impose both osmotic and ionic stresses on plants [10]. Photosynthesis in all its phases is affected by stress factors, including salinity. The mechanism of photosynthesis involves several components and damage by a stress factor at any level may reduce a plant's overall photosynthetic capacity [11]. Exposure to salinity leads to closure of the stomata, which acts to limit photosynthesis [12]. Salt-induced osmotic effects can also adversely affect the activities of a number of stomatal enzymes involved in carbon dioxide ( $CO_2$ ) reduction [13]. The effects of salinity on photosynthesis may involve inhibition of electron transport and inactivation of the photosystem II (PSII) reaction centers [14], destroying the oxygen-evolving complex (OEC), and impairing the electron transfer capacity on the donor side of PSII [15]. Increased levels of  $Na^+$  and  $Cl^-$  in the non-stomatal leaf tissues can also significantly affect metabolic processes that limit photosynthesis [16].

Osmotic stress impairs the ability of plant cells to detoxify reactive oxygen species (ROS). Under normal growth conditions, there is little ROS production in cells. When a plant's cellular homeostasis is disrupted by some stress factor; however, there is a significant increase in the concentration of ROS [17], producing.

Harmful effects through lipid peroxidation in cellular membranes, DNA damage, protein denaturation, carbohydrate oxidation, pigment breakdown, and impairment of enzymatic activity [18,19].

The preservation of the osmotic gradient through maintaining an appropriate level of compatible osmolytes is also very important [4]. The solutes that accumulate during osmotic changes include amino acids such as proline and quaternary amines like glycine betaine. A dramatic accumulation of proline is a common physiological response in plants exposed to various abiotic stresses [20].

The importance of proline lies in its capability of stabilizing proteins, membranes, and subcellular structures, and protecting them from damage by scavenging ROS [21]. Some researchers have shown that there is a higher proline content in saline tolerant genotypes, such as *Solanum tuberosum* L. [22] and *Cucumis melo* L. [23]. De la Torre-Gonzales et al. [24] stated that when *Solanum lycopersicum* L. plants are grown under saline conditions, the magnitude of proline increase corresponded to improvement in its tolerance to salt stress. On the contrary, other authors provided evidence that proline was a stress indicator but did not increase tolerance to salt stress [25,26].

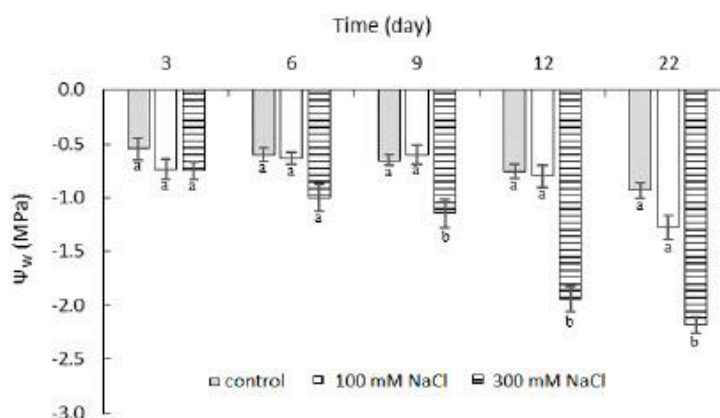
Common purslane (*Portulaca oleracea* L.) is found across the globe and has been used in folk medicine since ancient times. In Chinese medicine *P. oleracea* possesses a wide spectrum of medicinal uses as a neuroprotective, antimicrobial, antidiabetic, antioxidant, and anticancer agent [27]. *P. oleracea* is an annual with good drought and salt tolerance, and its responses to abiotic stresses, such as elevated temperature, drought, and high salinity have been studied [28–31].

Addressing the problems of salinity will be necessary in the future, given the growing population of the planet and the ever-increasing demand for food. At the current rate of world population growth, it will be necessary to produce 70% more food by 2050 than is being produced today [32]. In addition, the changing climatic conditions and their effects on farming threaten the stability of agricultural production. Both research and practice are pursuing a number of ways to address these problems, and improvement in our understanding of the responses of crops to salinity is one of the necessary prerequisites for that. Increased cultivation of halophytic species and their use for phytoremediation could contribute to solving the problem of salinization. The aim of this research was to evaluate the effects of salt stress on the content of free proline and MDA in *Portulaca* and the parameters of gas exchange and chlorophyll fluorescence.

## 2. Results

### 2.1. Effect of NaCl Concentration and Salt Stress Exposure Time on Leaf Water Potential

Salinity reduced the leaf water potential in both experimental treatments (Figure 1). For the 300 mM NaCl treatment, the water potential values ranged from  $-0.75$  to  $-2.18$  MPa. The reduction in leaf water potential was observable from the sixth day of salt stress exposure and was statistically significant relative to control from the ninth day of salt treatment. The water potential decreased rapidly between the 9th and 12th day of salt exposure. For the 100 mM NaCl treatment, the water potential decreased at the end of the experiment, but throughout the experiment, the water potential values were not significantly different from the control.



**Figure 1.** Leaf water potential ( $\psi_w$ ) in leaves of *P. oleracea* exposed to 100 mM or 300 mM NaCl. Means  $\pm$  SE;  $n = 3$ ; one-way ANOVA with Tukey's post hoc test;  $F_{(8, 128)} = 8.092$ ;  $p = 0.0001$ . For each time point, the columns with different letters were significantly different ( $p < 0.05$ ).

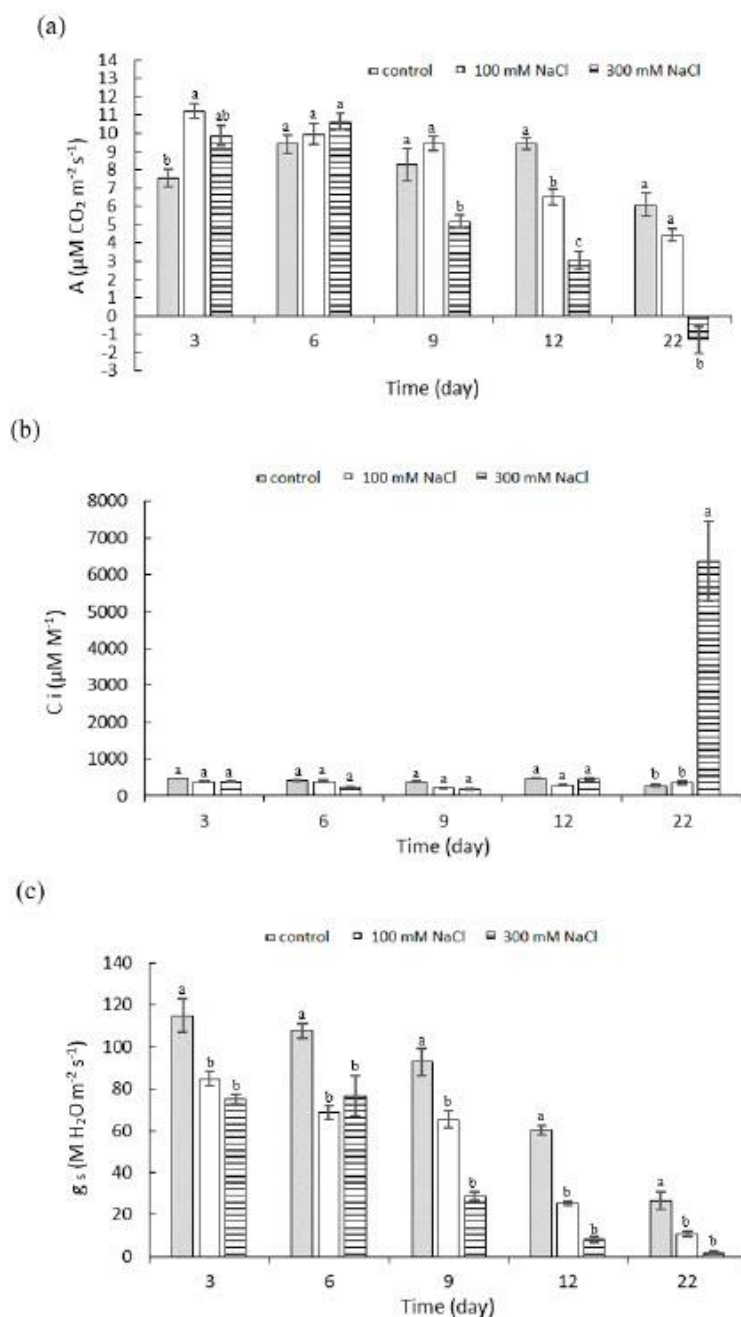
### 2.2. Effect of NaCl Concentration and Salt Stress Exposure Time on Leaf Gas Exchange Parameters

Changes in  $\text{CO}_2$  assimilation were measured after all treatments (Figure 2a). On the third day of saline stress exposure, the rate of photosynthesis was significantly increased with 100 mM NaCl compared to control, from  $7.58$  to  $11.21 \mu\text{M CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . A significant decrease in photosynthetic  $\text{CO}_2$  assimilation of 38% under 300 mM NaCl treatment was measured from day 9 of stress, in comparison to the control. In the final stages of the experiment (stress day 22), negative values of  $\text{CO}_2$  assimilation ( $-1.29 \mu\text{M CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) were measured. At a salinity of 100 mM NaCl, the  $\text{CO}_2$  assimilation was significantly reduced on stress day 12 compared to control; at the end of the experiment; however, there was no significant difference between control and 100 mM NaCl exposure.

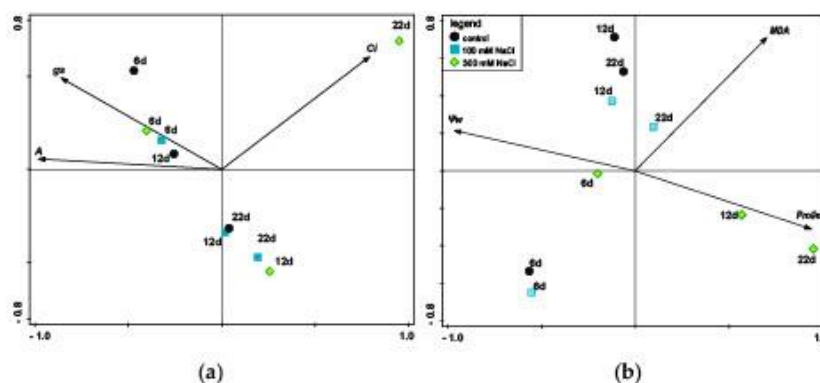
The values of the substomatal  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) concentration at the 100 mM NaCl concentration were stable and comparable to the control throughout the experiment. The same applied to the 300 mM NaCl treatment, with the exception of day 22, when there was a rapid increase in the  $C_i$  values ( $6382.53 \mu\text{M M}^{-1}$ ). This increase in the substomatal  $\text{CO}_2$  concentration was almost 23 times higher than the control (Figure 2b). This sharp increase in  $C_i$  values was also documented by principle component analysis (PCA) (Figure 3a).

The stomatal conductance was significantly lower than the control for both 100 and 300 mM NaCl, from the third day of stress exposure ( $84.6$  and  $75.2 \text{ M H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectively). Differences between the two saline treatments were not significant (Figure 2c). There was a significant decrease in the stomatal conductance values with 300 mM NaCl on days 6 and 9 of stress exposure ( $76.6$  and  $28.8 \text{ M H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectively) and at 100 mM NaCl on days 9 and 12 of stress exposure ( $65.4$  and  $25.5 \text{ M H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectively). According to the PCA, there was a clear trend of reduction in  $\text{CO}_2$  assimilation over time and also in the dependence on NaCl concentration, where a high salt concentration reduced the  $\text{CO}_2$  assimilation. The stomatal regulation was already noticeable at the beginning of the experiment (Figure 3a).

Salinity Stress Affects Photosynthesis, Malondialdehyde Formation, and Proline Content in *Portulaca oleracea* L.



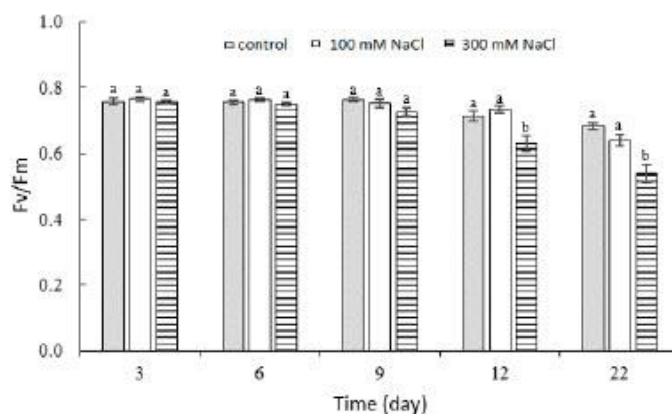
**Figure 2.** (a) Photosynthetic assimilation of CO<sub>2</sub> (A); (b) Substomatal concentration of CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) and (c) stomatal conductance (g<sub>s</sub>) of *P. oleracea* under treatment with 100 mM and 300 mM NaCl. Means  $\pm$  SE;  $n = 3$ ; one-way ANOVA with Tukey's post hoc test; (a)  $F_{(8, 207)} = 44.276$ ;  $p = 0.0001$ ; (b)  $F_{(8, 207)} = 44.276$ ;  $p = 0.0001$ ; (c)  $F_{(8, 207)} = 44.276$ ;  $p = 0.0001$ . For each time point, the columns with different letters indicate significant difference at  $p < 0.05$ .



**Figure 3.** Principal component analysis (PCA) ordination diagram. The biplot displays the treatments (samples) at various times (6 d—day 6, 12 d—day 12, 22 d—day 22) with measurements of (a) photosynthetic assimilation of CO<sub>2</sub> (A), substomatal concentration of CO<sub>2</sub> (Ci) and stomatal conductance (gs); the first axis accounts for 77.7% of the variance and the second axis shows 20.4% of the variance; (b) proline and MDA content in leaves of *P. oleracea* and leaf water potential ( $\psi_w$ ); the first axis accounts for 76.8% of the variance and the second axis is responsible for 21.7% of the variance. The treatments are indicated by the colors of the shapes: black circles, control; light blue squares, 100 mM NaCl; green diamonds, 300 mM NaCl.

### 2.3. Effect of NaCl Concentration and Salt Stress Exposure Time on Chlorophyll Fluorescence

For the 100 and 300 mM NaCl treatments, no significant differences were measured in the values of the maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm), compared to the control at up to day 9 of stress. A progressive decrease in the maximum quantum yield of the PSII photosystem occurred from day 9 (0.73) until the end of the experiment (0.54) with 300 mM NaCl exposure. Throughout the experiment, there were no significant differences between the control and 100 mM NaCl (Figure 4).



**Figure 4.** Maximum quantum yield of PS II (Fv/Fm) of *P. oleracea* at different concentrations of NaCl. Means  $\pm$  SE;  $n = 3$ ; one-way ANOVA with Tukey's post hoc test;  $F_{(10, 223)} = 3.396$ ;  $p = 0.0001$ . For each time point, the columns with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

### 2.4. Effect of NaCl Concentration and Salt Stress Exposure Time on Proline and Malondialdehyde Content

By the sixth day of salt stress exposure, no significant differences in the free proline content in the leaves of the experimental samples were seen compared to control. A significant progressive increase in free proline content in the leaves was recorded for

Salinity Stress Affects Photosynthesis, Malondialdehyde Formation, and Proline Content in *Portulaca oleracea* L.

the 300 mM NaCl treatment from exposure on day 9 until the end of the experiment. The free proline content on day 22 of stress exposure at this salinity was  $32.12 \mu\text{M g}^{-1}$  FW (fresh weight), which is almost 11 times higher than the proline content on day 6 ( $3.03 \mu\text{M g}^{-1}$  FW). The content of free proline in the 100 mM NaCl variant ranged from 2.54 to  $7.24 \mu\text{M g}^{-1}$  FW throughout the experiment and there was no significant difference relative to control (Figure 5a).

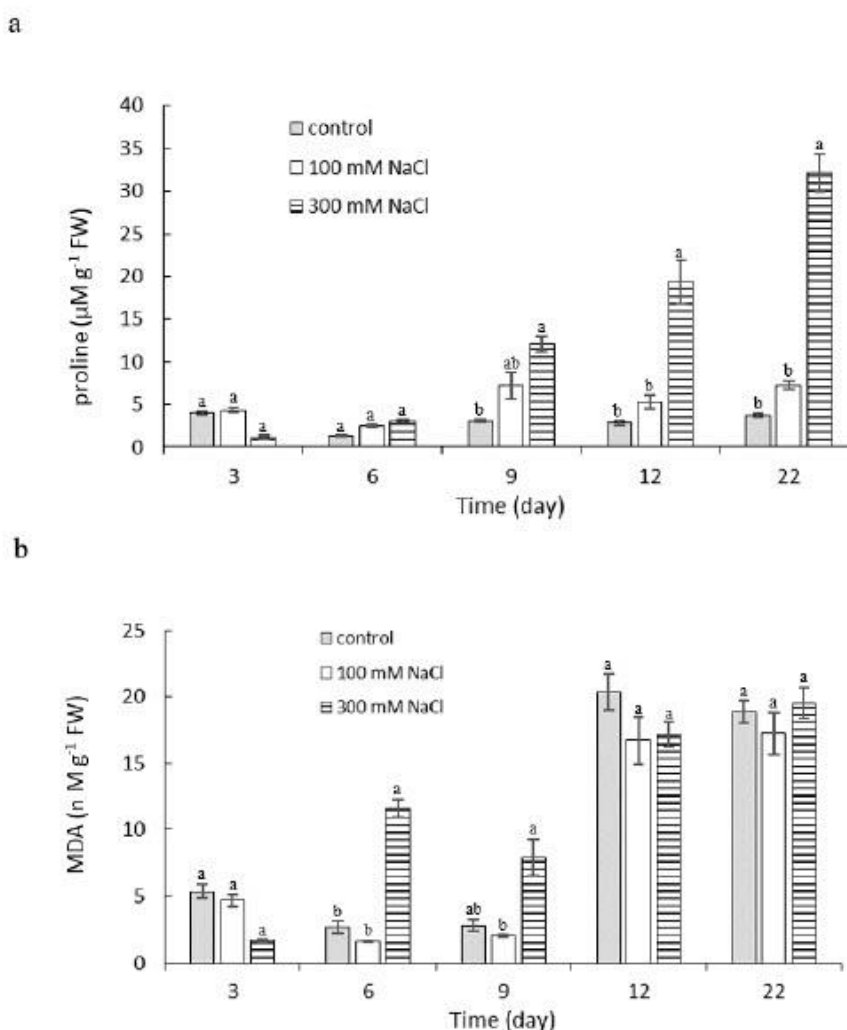


Figure 5. (a) Proline and (b) MDA content in leaves of *P. oleracea* under salt stress with 100 mM or 300 mM NaCl. Means  $\pm$  SE;  $n = 3$ ; one-way ANOVA with Tukey's post hoc test; (a)  $F_{(8, 20)} = 44.276$ ;  $p = 0.0001$ ; (b)  $F_{(12, 81)} = 6.220$ ;  $p = 0.0001$ . For each time point, the columns with different letters indicate significant difference at  $p < 0.05$ .

At the initial stages of stress exposure, the differences in MDA level between the salinity treatments were inconclusive. A significantly higher MDA content compared to the control group was seen with the 300 mM NaCl treatment on days 6 and 9 of stress exposure ( $11.62$  and  $7.89 \text{ nM g}^{-1}$  FW, respectively). For the rest of the experiment, no significant differences between the saline treatments were seen. A common trend for



all treatments was an increase in MDA at the end of the experiment (Figure 5b). The PCA results (Figure 3b) showed a close relationship between proline content and high salt concentration, as well as a negative correlation between proline content and water potential ( $r = 0.938$ ).

### 3. Discussion

As carbon dioxide assimilation increases or decreases, the photosynthetic absorption of solar energy, CO<sub>2</sub> fixation, and glucose formation are likewise altered. The rate of photosynthesis can be affected by environmental factors at all levels, and many researchers have reported a reduction in the rate of photosynthesis due to salinity [3,33,34]. In this study, the plants treated with the lower concentration of salt (100 mM NaCl), showed a higher assimilation of CO<sub>2</sub> in the initial phases of salt stress (48% more than control), although it is possible to observe a demonstrable decrease in stomatal conductance already in this phase of salt exposure. The stomatal regulation of vapor loss is extremely sensitive to short-term salt stress [35]. Closing of the pores is one of the adaptive mechanisms to prevent loss of cell turgor from limited water supply. The salinity causes a decrease in stomatal conductance, but the rates of photosynthesis per leaf area unit sometimes remain unchanged [3]. In *Arthrocnemum macrostachyum*, which is considered to be extremely well adapted to salinity, an increase in net photosynthesis up to a concentration of 510 mM NaCl has been observed [36]. A reduction of the photosynthesis rate and an increase in intercellular CO<sub>2</sub> concentration after 14 days of treatment with 100, 150, and 200 mM NaCl was reported by [37]. Tang et al. [38] showed that with increasing NaCl concentration, the intercellular CO<sub>2</sub> concentration of purslane and the values of chlorophyll a/b increased, while the transpiration rate, net photosynthesis rate, stomatal conductivity and chlorophyll content decreased.

In this study, a significant reduction in CO<sub>2</sub> assimilation and stomatal conductance with 300 mM NaCl occurred on day 9 of stress exposure. Reducing the stomatal conductance, leads to a reduction in intercellular CO<sub>2</sub>, which decreases the activity of several enzymes including RUBISCO [39], thus limiting carboxylation and reducing the net photosynthetic rate. After 22 days of exposure to 300 mM NaCl, negative values of CO<sub>2</sub> assimilation and high substomatal CO<sub>2</sub> concentrations were measured. The *Portulacaceae* is a plant family with remarkable diversity in photosynthetic pathways. This lineage not only has species with different C4 biochemistry (NADP-ME and NAD-ME types) and C3–C4 intermediacy, but also displays different anatomical leaf configurations [40]. *P. oleracea* is characterized by a leaf type with Kranz anatomy and an NAD-malic enzyme (NAD-ME)-type C4 cycle [41]. The genus *Portulaca* contains the only known example of a C4 plant which can switch to crassulacean acid metabolism (CAM) under drought stress [42,43]. Salinity reduced the gas exchange and induced CAM metabolism, thus conferring higher water-use efficiency in *Talinum triangulare* [44].

The CAM gas exchange process has been described in four phases. The nocturnal uptake of CO<sub>2</sub> via open stomata, fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and vacuolar storage of CO<sub>2</sub> in the form of organic acids, mainly malic acid comprise phase I. Daytime remobilization of vacuolar organic acids, decarboxylation and refixation plus assimilation of CO<sub>2</sub> with closed stomata in the Calvin cycle is defined as phase III. Between these two phases there are transitions when the stomata remain open for CO<sub>2</sub> uptake for a short time during the very early light period (phase II) and reopen again during the late light period for CO<sub>2</sub> uptake with the direct assimilation to carbohydrate, when the vacuolar organic acid is exhausted (phase IV) [45]. The results obtained at a concentration of 300 mM NaCl in the final phase of the experiment, primarily the negative CO<sub>2</sub> assimilation, high Ci values, and closed stomata data, can be related to the transition of the C4 cycle of photosynthesis to the CAM cycle. These results correspond with those of Ferrari et al. [46] who stated that CAM was completely reversible and environmentally controlled in *P. oleracea* leaves. An elevated measurement of internal CO<sub>2</sub> concentration was related to the daily malate decarboxylation (phase III), when the stomatal resistance

values were high (stomatal conductivity values were low) [47,48]. High internal CO<sub>2</sub> concentrations during phase III of CAM and closed stomata allow optimal utilization of light energy [49]. The transition from C4 to CAM under drought conditions and a return to C4 metabolism after subsequent rehydration was reported by [43]. The fixation of CO<sub>2</sub> in the dark, although representing only 10% of the control plants' fixation [43] or the reassimilation of CO<sub>2</sub> from respiration, helped to bridge water deficit periods caused by drought or salinity, and thus helped to maintain a positive CO<sub>2</sub> balance [50]. The induction of CAM was also demonstrated after 21 to 23 days of drought stress in the C4 plant, *P. oleracea*, in terms of changes in CO<sub>2</sub> exchange profile, malic acid content and in titratable acidity during the day/night cycle [51].

At the 100 mM NaCl concentration, there was no transition to the CAM cycle, although the net assimilation of CO<sub>2</sub> and stomatal conductance decreased during the experiment. These parameters also decreased in the control plants. One of the possible causes is leaf senescence, as *P. oleracea* has a brief growing season and the CO<sub>2</sub> assimilation decreases during senescence, which can be considered a form of stress for the plants [52]. Karkanis and Petropoulos [53] reported a decrease in photosynthesis and stomatal conductance in a set of *P. oleracea* genotypes forty days after sowing and attributed it to exposure to a high temperature (40 °C).

The ratio of Fv/Fm is a very important plant characteristic because it indicates how efficiently the light reaction is proceeding, and it is widely used when studying the impact of stress on plants. An Fv/Fm in the range of 0.79 to 0.84 is a normal value in a number of species [54]. Salt stress of 300 mM NaCl significantly reduced Fv/Fm on day 12 of exposure. The lower value indicated that a percentage of the PSII reaction centers were damaged or inactivated, a phenomenon commonly observed in plants under stress [55]. Salinity blocked electron transfer from the primary acceptor, plastoquinone (QA) to the secondary acceptor, plastoquinone (QB) at the acceptor side of PSII, which led to a decrease in Fv/Fm [56]. A decrease in the maximum quantum yield of PSII in response to salt was also reported for *Raphanus sativus* L. [57], *Brassica napus* L. [58], and *Eruca sativa* L. [12]. The 100 mM NaCl concentration did not significantly affect Fv/Fm initially compared to the control, but a decrease in the Fv/Fm was observed at both NaCl concentrations in the final phase of the experiment. The ratio of Fv/Fm at 100 mM NaCl was slightly increased compared to 300 mM NaCl [59].

Due to the reduced availability and fixation of CO<sub>2</sub>, an imbalance between electron excitation and utilization by photosynthesis can occur leading to the production of ROS, especially superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [60], which can damage cellular structures [61]. ROS detoxification pathways play a protective role in responding to salt stress by removing toxic radicals generated from the mitochondrial and chloroplast electron transport chains. The antioxidant defense systems include both enzymatic (superoxide dismutase, catalase, and ascorbate peroxidase) and non-enzymatic components (carotenoids and glutathione) [62]. In response to salinity, a large number of compatible solutes may accumulate, especially proline. Glycine betaine [63], sugars, and sugar alcohols [64] also play an important role in osmoregulation. A rapid increase in free proline in leaves occurred in the second half of the experiment in plants treated with 300 mM NaCl, while the water potential of their leaves decreased. Proline provides stress protection to the plants by maintaining osmoregulation and detoxifying ROS, which preserves membrane integrity and stabilizes enzymes and other proteins [65,66]. The increase in proline content after 21 days in two *P. oleracea* genotypes, T-16 and WI-9, with 200 mM NaCl salt stress was reported by [67]. Yazici et al. [68] found a threefold increase in proline content in *P. oleracea* plants treated with 140 mM NaCl for 30 days, and stable values for plants treated with 70 mM NaCl for 18 and 30 days. These results are comparable to our data, where plants treated with 100 mM NaCl did not show an increase in free proline content throughout the experiment compared to controls, demonstrating *portulaca's* tolerance to salinity at this salt level. The increase in free proline in *Portulaca* was reported to be 4.6-fold in comparison with control [53].

Malondialdehyde (MDA) is a natural product of lipid peroxidation and is traditionally used as an indicator of the degree of damage caused by stress to cells [69]. Plants exposed to salinity of 100 mM NaCl did not show a significant increase in lipid peroxidation due to stress compared to control. The common phenomenon in our studied plants was an increased content of MDA due to leaf senescence and an increased rate of lipid peroxidation due to oxidative stress [70]. Similar results were reported by Yazici et al. [68]. In their experiments, the MDA content of the control plants increased by 39% during the trial, but 70 mM NaCl exposure did not increase MDA compared to control. After 30 days of exposure to 140 mM NaCl, however, there was a clear increase in MDA compared to control. Different results were reported by Xing et al. [37] for treatment with 100, 150, and 200 mM NaCl, which increased MDA- and  $O_2^-$  production and resulted in damage to cell membrane integrity and protein activity. They stated that long-term exposure to high salinity might destroy some cell membranes, leading to lower SOD, POD, and CAT activities. On the contrary, lipid peroxidation from oxidative stress could not occur within a short period (five weeks) of applied stress [71]. The tolerance of purslane to salinity might be related to an increased capacity of the antioxidant system to scavenge ROS, thus suppressing the level of lipid peroxidation, and inducing the accumulation of osmoprotectant proline under saline conditions [38].

The plants treated with 300 mM NaCl showed an increase in MDA compared to the control groups on days 6 and 9 of the experiment, but in the subsequent phases of stress exposure, the differences were non-significant. An activation of the defense and adaptation mechanisms associated with increased activity of the antioxidant system, limited the formation of ROS, and suppressed the level of lipid peroxidation. These mechanisms are manifested by a rapid increase in proline content and osmotic adaptation, which are closely related to salinity tolerance and the ability of the antioxidant system to scavenge free radicals, suppress lipid peroxidation, and promote the accumulation of osmoprotective agents such as proline.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Experimental Design and Salinity Treatments

The experimental plants of purslane, *Portulaca oleracea* L., cv. Grene, were grown in containers (13 cm × 13 cm) in a garden substrate (pH 5–6.5, nutrient content: N 80–120 mg L<sup>-1</sup>, P 22–44 mg L<sup>-1</sup>, K 83–124 mg L<sup>-1</sup>; 80% white peat, 20% black peat, 20 kg of clay m<sup>-3</sup>; structure 0–10 mm). The plants were grown in the growth room with the following controlled conditions: air temperature of 25 ± 2/18 ± 2 °C day/night, relative humidity 65–75%, light intensity 450 ± 50 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, and photoperiod 12 h light and 12 h dark. Salinity treatments were started on 25-day-old plants with 0 (deionized water, control), 100 and 300 mM NaCl. Measurements of the monitored physiological parameters and the chemical analyses were performed on days 3, 6, 9, 12, and 22 of salt stress.

##### 4.2. Leaf Water Potential

Leaf samples for the determination of leaf water potential ( $\psi_w$ ; MPa) were placed into a 5 mL syringe, sealed with Parafilm, and frozen at -24 °C. Prior to the measurements, the samples were kept at laboratory temperature until the tissue was completely defrosted. The water potential was determined by putting several drops of the cells sap upon targets of Whatman #1 filter paper (1.5 cm in diameter) and measured using a WP 4C Dew Point Potentiometer (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA). The measurements were performed with three repetitions of the five plant samples.

##### 4.3. Leaf Gas Exchange

The net CO<sub>2</sub> assimilation ( $A$ ; μM CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), stomatal conductance ( $g_s$ ; M H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) and substomatal concentration of CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ; μM M<sup>-1</sup>), were measured in situ when the 4th or 5th fully expanded leaves appeared, using a portable gas exchange system LCI Portable Photosynthesis System (ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, Great Britain). The

gas exchange was measured from 9:00 a.m. to 11:00 a.m. The irradiance was  $450 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of photosynthetically active radiation (PAR). With a normal concentration of  $\text{CO}_2$ , the temperature in the measurement chamber was  $23^\circ\text{C}$ , and the duration of the measurement of each sample was about 15 min, after the establishment of steady-state conditions inside the measurement chamber. The measurements of these parameters took place on single leaves from three different plants.

#### 4.4. Chlorophyll Fluorescence

The minimum chlorophyll fluorescence ( $F_0$ ) and the maximum chlorophyll fluorescence ( $F_m$ ) were also measured in situ with a portable fluorometer OS5p+ (ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, Great Britain) with 1s excitation pulse (660 nm) and a saturation intensity of  $3000 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Measurements were made when the 4th or 5th fully expanded leaves appeared after a 20 min dark adaptation period between 9:00 and 11:00 (local solar time) using leaf-clips which were put on the adaxial leaf blades away from the leaf vein. Dark adaptation time was the time needed to obtain a steady value of  $F_v/F_m$ . The maximum quantum yield of PSII was calculated using the formula:  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ . These parameters were measured with three repetitions on five plants.

#### 4.5. Proline Content

The content of free proline was determined using the method of Bates et al. [72] with modifications. A sample of leaves (0.5 g) was homogenized in 10 mL of 3% sulfosalicylic acid using a mortar and pestle and the homogenate was filtered through filter paper. Aliquots of 1 mL of the filtrate were mixed with 1 mL of acid ninhydrin solution and 1 mL of acetic acid and placed on a shaker for 20 minutes. The samples were then heated at  $90^\circ\text{C}$  for 30 minutes, cooled in ice water, thoroughly mixed with 3 mL of toluene, and incubated 20 min at room temperature. The samples were held for 24 hours at  $4^\circ\text{C}$ , after which the upper layer of the separation mixture was used for measurement of absorbance at 520 nm (UV-Vis, Evolution 210, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Five plants were used as independent samples for each treatment. The proline concentration was determined using a calibration curve for proline as  $\mu\text{M g}^{-1}$  FW (fresh weight).

#### 4.6. Malondialdehyde (MDA)

The content of malondialdehyde (MDA) was measured based on a modified thiobarbituric acid (TBA) method [73]. Samples of leaves (0.4 g) were homogenized with liquid nitrogen and 80% ethanol and centrifuged in 2 mL microcentrifuge tubes for 5 min and at 6000 rpm. Aliquots of 0.7 mL of each supernatant were mixed with 0.7 mL of 0.65% TBA in 20% TCA (trichloroacetic acid) and 0.01% BHT (butylated hydroxytoluene) and a second set of 0.7 mL samples was mixed with 0.7 mL 20% TCA and 0.01% BHT. The microcentrifuge tubes were incubated at  $95^\circ\text{C}$  for 25 minutes and after cooling, they were centrifuged for 5 minutes at 6000 rpm. The absorbance at 440 nm, 532 nm, and 600 nm was read on a UV-Vis spectrophotometer (Evolution 210, Thermo Scientific) and the concentration of MDA ( $\text{nM g}^{-1}$  FW) was calculated using an extinction coefficient of  $157 \text{ mM cm}^{-1}$ .

#### 4.7. Statistical Analysis

One-way ANOVA was used to evaluate the variables from the treatments. After obtaining significant results ( $p < 0.05$ ), multiple comparisons using the Tukey HSD test were applied to identify significant differences between treatments. All analyses were performed using Statistica 13.5 software (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Program Canoco 5 [74] was used for PCA (principal component analysis). This analysis was appropriate for finding the differences in reactions of *P. oleracea* to the salinity treatments on individual days.

### 5. Conclusions

The results from the combined salinity effects of osmotic and ionic stress were different at different NaCl concentrations manifesting with specific adaptive responses from the

plants exposed to stress. The lower salt concentration caused only stomatal regulation of water deficit, as one of the primary regulatory factors of water deficit, without the involvement of other biochemical responses to cope with the stress. At the same time, the lower salt concentration increased photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation at the beginning of salt exposure. During the stress exposure, the maximum quantum yield of the PSII was not affected, as the Fv/Fm values were comparable to the control sample. The concentration of free proline and MDA was also similar to the control group, meaning that the level of stress did not require an increased proline synthesis for the protection of cellular structures and scavenging ROS. The osmoregulation was not significant at this level of salinity; only after prolonged salt exposure did the water potential of the leaves decrease. The toxic effect of the Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions and water deficiency at higher NaCl concentrations and a longer exposure elicited a stress response in the form of activation of proline biosynthesis and the accumulation of proline to reduce cellular damage and maintain ROS homeostasis. The limited osmotic availability of water and the necessary stomatal regulation, together with the need for a supply of CO<sub>2</sub>, caused the transition from the C4 CO<sub>2</sub> fixation mechanism to the CAM mechanism. This salinity tolerance allows *Portulaca oleracea* to be cultivated in slightly saline localities, or to be potentially used for other technological measures, such as co-cultivation with sensitive glycophytic species. Given the current knowledge about the behavior of *Portulacaceae* under saline conditions, further research in this area is recommended.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.H. and F.H.; methodology, H.H. and K.K.; software, H.H., P.V., and K.K.; validation, H.H., P.V., and K.K.; formal analysis, H.H., K.K., and P.V.; investigation, H.H.; resources, H.H. and K.K.; data curation, H.H., K.K., and F.H.; writing—original draft preparation, H.H.; writing—review and editing, F.H.; visualization, K.K. and P.V.; supervision, F.H.; project administration, F.H.; funding acquisition, F.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the EU—Project “NutRisk Centre” grant number CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000845.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Shahbaz, M.; Ashraf, M. Improving Salinity Tolerance in Cereals. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2013**, *32*, 237–249. [[CrossRef](#)]
2. Shrivastava, P.; Kumar, R. Soil Salinity: A Serious Environmental Issue and Plant Growth Promoting Bacteria as One of the Tools for Its Alleviation. *Saudi J. Biol. Sci.* **2015**, *22*, 123–131. [[CrossRef](#)]
3. Munns, R.; Tester, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 651–681. [[CrossRef](#)]
4. Munns, R.; Gilliam, M. Salinity Tolerance of Crops—What Is the Cost? *New Phytol.* **2015**, *208*, 668–673. [[CrossRef](#)]
5. Flowers, T.J.; Colmer, T.D. Plant Salt Tolerance: Adaptations in Halophytes. *Ann. Bot.* **2015**, *115*, 327–331. [[CrossRef](#)]
6. Acosta-Motos, J.R.; Ortúño, M.F.; Bernal-Vicente, A.; Diaz-Vivanco, P.; Sanchez-Blanco, M.J.; Hernandez, J.A. Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. *Agronomy* **2017**, *7*, 18. [[CrossRef](#)]
7. Akbarimoghaddam, H.; Galavi, M.; Ghanbari, A.; Panjehkeh, N. Salinity Effects on Seed Germination and Seedling Growth of Bread Wheat Cultivars. *Trakia J. Sci.* **2011**, *9*, 43–50.
8. Negrão, S.; Schmöckel, S.M.; Tester, M. Evaluating Physiological Responses of Plants to Salinity Stress. *Ann. Bot.* **2017**, *119*, 1–11. [[CrossRef](#)]
9. Soltabayeva, A.; Ongaltay, A.; Omondi, J.O.; Shrivastava, S. Morphological, Physiological and Molecular Markers for Salt-Stressed Plants. *Plants* **2021**, *10*, 243. [[CrossRef](#)]
10. Yang, Y.; Guo, Y. Elucidating the Molecular Mechanisms Mediating Plant Salt-Stress Responses. *New Phytol.* **2018**, *217*, 523–539. [[CrossRef](#)]
11. Ashraf, M.; Harris, P.J.C. Photosynthesis under Stressful Environments: An Overview. *Photosynthetica* **2013**, *51*, 163–190. [[CrossRef](#)]

# Salinity Stress Affects Photosynthesis, Malondialdehyde Formation, and Proline Content in *Portulaca oleracea* L.

12. Hnilickova, H.; Hnilicka, F.; Martinkova, J.; Kraus, K. Effects of Salt Stress on Water Status, Photosynthesis and Chlorophyll Fluorescence of Rocket. *Plant Soil Environ.* **2017**, *63*, 362–367. [[CrossRef](#)]
13. Xu, Z.; Zhou, G. Responses of Leaf Stomatal Density to Water Status and Its Relationship with Photosynthesis in a Grass. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 3317–3325. [[CrossRef](#)]
14. Mehta, P.; Jajoo, A.; Mathur, S.; Bharti, S. Chlorophyll a Fluorescence Study Revealing Effects of High Salt Stress on Photosystem II in Wheat Leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **2010**, *48*, 16–20. [[CrossRef](#)]
15. Kalaji, H.M.; Rastogi, A.; Zivcak, M.; Brestic, M.; Daszkowska-Golec, A.; Sitko, K.; Alsharafa, K.Y.; Lotfi, R.; Stypinski, P.; Samborska, I.A.; et al. Prompt Chlorophyll Fluorescence as a Tool for Crop Phenotyping: An Example of Barley Landraces Exposed to Various Abiotic Stress Factors. *Photosynthetica* **2018**, *56*, 953–961. [[CrossRef](#)]
16. Biswal, B.; Joshi, P.N.; Raval, M.K.; Biswal, U.C. Photosynthesis, a Global Sensor of Environmental Stress in Green Plants: Stress Signalling and Adaptation. *Curr. Sci.* **2011**, *101*, 47–56.
17. Hossain, M.S.; Dietz, K.-J. Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 548. [[CrossRef](#)]
18. Noctor, G.; Foyer, C.H. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 249–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Saibi, W.; Feki, K.; Ben Mahmoud, R.; Brini, F. Durum Wheat Dehydrin (DHN-5) Confers Salinity Tolerance to Transgenic Arabidopsis Plants through the Regulation of Proline Metabolism and ROS Scavenging System. *Planta* **2015**, *242*, 1187–1194. [[CrossRef](#)]
20. Kaur, G.; Asthir, B. Proline: A Key Player in Plant Abiotic Stress Tolerance. *Biol. Plant.* **2015**, *59*, 609–619. [[CrossRef](#)]
21. Salinas, R.; Sánchez, E.; Ruiz, J.M.; Lao, M.T.; Romero, L. Proline, Betaine, and Choline Responses to Different Phosphorus Levels in Green Bean. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2013**, *44*, 465–472. [[CrossRef](#)]
22. Jaarstma, R.; de Vries, R.S.M.; de Boer, A.H. Effect of Salt Stress on Growth, Na<sup>+</sup> Accumulation and Proline Metabolism in Potato (*Solanum Tuberosum*) Cultivars. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60183. [[CrossRef](#)]
23. Sarabi, B.; Bolandnazar, S.; Ghaderi, N.; Ghashghaie, J. Genotypic Differences in Physiological and Biochemical Responses to Salinity Stress in Melon (*Cucumis Melo* L.) Plants: Prospects for Selection of Salt Tolerant Landraces. *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *119*, 294–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. De la Torre-González, A.; Montesinos-Pereira, D.; Blasco, B.; Ruiz, J.M. Influence of the Proline Metabolism and Glycine Betaine on Tolerance to Salt Stress in Tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) Commercial Genotypes. *J. Plant Physiol.* **2018**, *231*, 329–336. [[CrossRef](#)]
25. Hannachi, S.; Van Labeke, M.-C. Salt Stress Affects Germination, Seedling Growth and Physiological Responses Differentially in Eggplant Cultivars (*Solanum melongena* L.). *Sci. Hortic.* **2018**, *228*, 56–65. [[CrossRef](#)]
26. Anower, M.R.; Peel, M.D.; Mott, I.W.; Wu, Y. Physiological Processes Associated with Salinity Tolerance in an Alfalfa Half-Sib Family. *J. Agron. Crop Sci.* **2017**, *203*, 506–518. [[CrossRef](#)]
27. Zhou, Y.-X.; Xin, H.-L.; Rahman, K.; Wang, S.-J.; Peng, C.; Zhang, H. *Portulaca Oleracea* L.: A Review of Phytochemistry and Pharmacological Effects. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 925631. [[CrossRef](#)]
28. Kafi, M.; Rahimi, Z. Effect of Salinity and Silicon on Root Characteristics, Growth, Water Status, Proline Content and Ion Accumulation of Purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* **2011**, *57*, 341–347. [[CrossRef](#)]
29. Alam, M.A.; Juraimi, A.S.; Rafiq, M.Y.; Abdul Hamid, A.; Aslani, F. Screening of Purslane (*Portulaca Oleracea* L.) Accessions for High Salt Tolerance. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, e627916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Jin, R.; Wang, Y.; Liu, R.; Gou, J.; Chan, Z. Physiological and Metabolic Changes of Purslane (*Portulaca Oleracea* L.) in Response to Drought, Heat, and Combined Stresses. *Front Plant Sci.* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)]
31. Hnilickova, H.; Hnilicka, F.; Orsak, M.; Hejnak, V. Effect of Salt Stress on Growth, Electrolyte Leakage, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> Content in Selected Plant Species. *Plant Soil Environ.* **2019**, *65*, 90–96. [[CrossRef](#)]
32. FAO. *High Level Expert Forum—How to Feed the World in 2050*; Economic and Social Development, Food and Agricultural Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2009.
33. Joshi, R.; Sahoo, K.K.; Tripathi, A.K.; Kumar, R.; Gupta, B.K.; Pareek, A.; Singla-Pareek, S.L. Knockdown of an Inflorescence Meristem-Specific Cytokinin Oxidase—OsCKX2 in Rice Reduces Yield Penalty under Salinity Stress Condition. *Plant Cell Environ.* **2018**, *41*, 936–946. [[CrossRef](#)]
34. Gupta, B.K.; Sahoo, K.K.; Ghosh, A.; Tripathi, A.K.; Anwar, K.; Das, P.; Singh, A.K.; Pareek, A.; Sopory, S.K.; Singla-Pareek, S.L. Manipulation of Glyoxalase Pathway Confers Tolerance to Multiple Stresses in Rice. *Plant Cell Environ.* **2018**, *41*, 1186–1200. [[CrossRef](#)]
35. Bunce, J.A. How Do Leaf Hydraulics Limit Stomatal Conductance at High Water Vapour Pressure Deficits? *Plant Cell Environ.* **2006**, *29*, 1644–1650. [[CrossRef](#)]
36. Redondo-Gómez, S.; Mateos-Naranjo, E.; Figueroa, M.E.; Davy, A.J. Salt Stimulation of Growth and Photosynthesis in an Extreme Halophyte, *Arthrocnemum Macrostachyum*. *Plant Biol.* **2010**, *12*, 79–87. [[CrossRef](#)]
37. Xing, J.-C.; Dong, J.; Wang, M.-W.; Liu, C.; Zhao, B.-Q.; Wen, Z.-G.; Zhu, X.-M.; Ding, H.-R.; Zhao, X.-H.; Hong, L.-Z. Effects of NaCl Stress on Growth of *Portulaca Oleracea* and Underlying Mechanisms. *Braz. J. Bot.* **2019**, *2*, 217–226. [[CrossRef](#)]
38. Tang, N.; Zhang, B.; Chen, Q.; Yang, P.; Wang, L.; Qian, B. Effect of Salt Stress on Photosynthetic and Antioxidant Characteristics in Purslane (*Portulaca oleracea*). *Int. J. Agric. Biol.* **2020**, *24*, 1309–1314. [[CrossRef](#)]

# Salinity Stress Affects Photosynthesis, Malondialdehyde Formation, and Proline Content in *Portulaca oleracea* L.

39. Chaves, M.M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. Photosynthesis under Drought and Salt Stress: Regulation Mechanisms from Whole Plant to Cell. *Ann. Bot.* **2009**, *103*, 551–560. [[CrossRef](#)]
40. Ocampo, G.; Koteyeva, N.K.; Voznesenskaya, E.V.; Edwards, G.E.; Sage, T.L.; Sage, R.F.; Columbus, J.T. Evolution of Leaf Anatomy and Photosynthetic Pathways in *Portulacaceae*. *Am. J. Bot.* **2013**, *100*, 2388–2402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Voznesenskaya, E.V.; Koteyeva, N.K.; Edwards, G.E.; Ocampo, G. Revealing Diversity in Structural and Biochemical Forms of C4 Photosynthesis and a C3-C4 Intermediate in *Genus portulaca* L. (*Portulacaceae*). *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 3647–3662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Winter, K.; Holtum, J.A.M. Facultative Crassulacean Acid Metabolism (CAM) Plants: Powerful Tools for Unravelling the Functional Elements of CAM Photosynthesis. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 3425–3441. [[CrossRef](#)]
43. D'Andrea, R.M.; Andreo, C.S.; Lara, M.V. Deciphering the Mechanisms Involved in *Portulaca oleracea* (C4) Response to Drought: Metabolic Changes Including Crassulacean Acid-like Metabolism Induction and Reversal upon Re-Watering. *Physiol. Plant* **2014**, *152*, 414–430. [[CrossRef](#)]
44. Montero, E.; Francisco, A.M.; Montes, E.; Herrera, A. Salinity Induction of Recycling Crassulacean Acid Metabolism and Salt Tolerance in Plants of *Talinum triangulare*. *Ann. Bot.* **2018**, *121*, 1333–1342. [[CrossRef](#)]
45. Osmond, C.B. Crassulacean Acid Metabolism: A Curiosity in Context. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1978**, *29*, 379–414. [[CrossRef](#)]
46. Ferrari, R.C.; Bittencourt, P.P.; Rodrigues, M.A.; Moreno-Villena, J.J.; Alves, F.R.R.; Gastaldi, V.D.; Boxall, S.F.; Dever, L.V.; Demarco, D.; Andrade, S.C.S.; et al. C4 and Crassulacean Acid Metabolism within a Single Leaf: Deciphering Key Components behind a Rare Photosynthetic Adaptation. *New Phytol.* **2020**, *225*, 1699–1714. [[CrossRef](#)]
47. Cockburn, W. Stomatal Mechanism as the Basis of the Evolution of CAM and C4 Photosynthesis. *Plant Cell Environ.* **1983**, *6*, 275–279. [[CrossRef](#)]
48. Borland, A.M.; Zambrano, V.A.B.; Ceusters, J.; Shorrocks, K. The Photosynthetic Plasticity of Crassulacean Acid Metabolism: An Evolutionary Innovation for Sustainable Productivity in a Changing World. *New Phytol.* **2011**, *191*, 619–633. [[CrossRef](#)]
49. Franco, A.; Herzog, B.; Hübner, C.; de Mattos, E.; Scarano, F.; Ball, E.; Lüttge, U. Diurnal Changes in Chlorophyll a Fluorescence, CO<sub>2</sub>-Exchange and Organic Acid Decarboxylation in the Tropical CAM Tree *Clusia hilariana*. *Tree Physiol.* **1999**, *19*, 635–644. [[CrossRef](#)]
50. Herrera, A. Crassulacean Acid Metabolism and Fitness under Water Deficit Stress: If Not for Carbon Gain, What Is Facultative CAM Good For? *Ann. Bot.* **2009**, *103*, 645–653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Lara, M.V.; Drincovich, M.F.; Andreo, C.S. Induction of a Crassulacean Acid-like Metabolism in the C4 Succulent Plant, *Portulaca oleracea* L.: Study of Enzymes Involved in Carbon Fixation and Carbohydrate Metabolism. *Plant Cell Physiol.* **2004**, *45*, 618–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Martínez, D.E.; Costa, M.L.; Guiamet, J.J. Senescence-Associated Degradation of Chloroplast Proteins inside and Outside the Organelle. *Plant Biol.* **2008**, *10*, 15–22. [[CrossRef](#)]
53. Karkanis, A.C.; Petropoulos, S.A. Physiological and Growth Responses of Several Genotypes of Common Purslane (*Portulaca oleracea* L.) under Mediterranean Semi-Arid Conditions. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2017**, *45*, 569–575. [[CrossRef](#)]
54. Maxwell, K.; Johnson, G.N. Chlorophyll Fluorescence—A Practical Guide. *J. Exp. Bot.* **2000**, *51*, 659–668. [[CrossRef](#)]
55. Baker, N.R.; Rosenqvist, E. Applications of Chlorophyll Fluorescence Can Improve Crop Production Strategies: An Examination of Future Possibilities. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 1607–1621. [[CrossRef](#)]
56. Shu, S.; Guo, S.-R.; Sun, J.; Yuan, L.-Y. Effects of Salt Stress on the Structure and Function of the Photosynthetic Apparatus in *Cucumis sativus* and Its Protection by Exogenous Putrescine. *Physiol. Plant* **2012**, *146*, 285–296. [[CrossRef](#)]
57. Jamil, M.; Rehman, S.-U.; Lee, K.J.; Kim, J.M.; Kim, H.-S.; Rha, E.S. Salinity Reduced Growth PS2 Photochemistry and Chlorophyll Content in Radish. *Sci. Agric.* **2007**, *64*, 111–118. [[CrossRef](#)]
58. Naeem, M.S.; Jin, Z.L.; Wan, G.L.; Liu, D.; Liu, H.B.; Yoneyama, K.; Zhou, W.J. 5-Aminolevulinic Acid Improves Photosynthetic Gas Exchange Capacity and Ion Uptake under Salinity Stress in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Plant Soil* **2010**, *332*, 405–415. [[CrossRef](#)]
59. Zaman, S.; Shah, S.B.; Jiang, Y.T.; Che, S.Q. Saline Conditions Alter Morpho-Physiological Intensification in Purslane (*Portulaca oleracea* L.). *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2018**, *32*, 635–639.
60. Reddy, A.; Chaitanya, K.V.; Vivekanandan, M. Drought-Induced Responses of Photosynthesis and Antioxidant Metabolism in Higher Plants. *J. Plant Physiol.* **2004**, *161*, 1189–1202. [[CrossRef](#)]
61. Liu, H.; Sultan, M.A.R.F.; Liu, X.-l.; Zhang, J.; Yu, F.; Zhao, H.-x. Physiological and Comparative Proteomic Analysis Reveals Different Drought Responses in Roots and Leaves of Drought-Tolerant Wild Wheat (*Triticum boeoticum*). *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121852. [[CrossRef](#)]
62. Schieber, M.; Chandel, N.S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, R453–R462. [[CrossRef](#)]
63. Annunziata, M.G.; Ciarmiello, L.F.; Woodrow, P.; Dell'Aversana, E.; Carillo, P. Spatial and Temporal Profile of Glycine Betaine Accumulation in Plants Under Abiotic Stresses. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
64. Singh, M.; Kumar, J.; Singh, S.; Singh, D.V.; Prasad, S. Roles of Osmoprotectants in Improving Salinity and Drought Tolerance in Plants: A Review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* **2015**, *14*. [[CrossRef](#)]
65. Ashraf, M.; Foolad, M.R. Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance. *Environ. Exp. Bot.* **2007**, *59*, 206–216. [[CrossRef](#)]
66. Szabados, L.; Savouřé, A. Proline: A Multifunctional Amino Acid. *Trends Plant Sci.* **2010**, *15*, 89–97. [[CrossRef](#)]

# Salinity Stress Affects Photosynthesis, Malondialdehyde Formation, and Proline Content in *Portulaca oleracea* L.

67. Mulry, K.R.; Hanson, B.A.; Dudle, D.A. Alternative Strategies in Response to Saline Stress in Two Varieties of *Portulaca Oleracea* (Purslane). *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138723. [[CrossRef](#)]
68. Yazici, I.; Türkan, I.; Sekmen, A.H.; Demiral, T. Salinity Tolerance of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) Is Achieved by Enhanced Antioxidative System, Lower Level of Lipid Peroxidation and Proline Accumulation. *Environ. Exp. Bot.* **2007**, *61*, 49–57. [[CrossRef](#)]
69. Ma, J.; Du, G.; Li, X.; Zhang, C.; Guo, J. A Major Locus Controlling Malondialdehyde Content under Water Stress Is Associated with Fusarium Crown Rot Resistance in Wheat. *Mol. Genet. Genom.* **2015**, *290*, 1955–1962. [[CrossRef](#)]
70. Jakhar, S.; Mukherjee, D. Chloroplast Pigments, Proteins, Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidative Enzymes during Maturation and Senescence of Leaves and Reproductive Organs of *Cajanus Cajan* L. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **2014**, *20*, 171–180. [[CrossRef](#)]
71. Borsai, O.; Hassan, M.A.; Negruşier, C.; Raigón, M.D.; Boscaiu, M.; Sestras, R.E.; Vicente, O. Responses to Salt Stress in *Portulaca*: Insight into Its Tolerance Mechanisms. *Plants*. **2020**, *9*, 1660. [[CrossRef](#)]
72. Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies. *Plant Soil* **1973**, *39*, 205–207. [[CrossRef](#)]
73. Du, Z.; Bramlage, W.J. Modified Thiobarbituric Acid Assay for Measuring Lipid Oxidation in Sugar-Rich Plant Tissue Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1566–1570. [[CrossRef](#)]
74. Šmilauer, P.; Lepš, J. *Multivariate Analysis of Ecological Data Using CANOCO 5*, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2014; ISBN 978-1-107-69440-8.



## Effects of salt stress on water status, photosynthesis and chlorophyll fluorescence of rocket

HELENA HNILIČKOVÁ\*, FRANTIŠEK HNILIČKA, JAROSLAVA MARTINKOVÁ, KAMIL KRAUS

*Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic*

*\*Corresponding author: hnilickova@af.czu.cz*

### ABSTRACT

Hnilíčková H., Hnilička F., Martinková J., Kraus K. (2017): Effects of salt stress on water status, photosynthesis and chlorophyll fluorescence of rocket. *Plant Soil Environ.*, 63: 362–367.

Salinity is a significant environmental factor affecting physiological processes in plants. This study monitors the effect of salt stress induced by the NaCl solution (0 – deionized water; 50, 100, 200, 300 mmol/L) in rocket (*Eruca sativa* (L.) Mill.) cv. Astro over the course of 50 days. Salt stress significantly affected the monitored parameters. The osmotic potential decreased with increasing NaCl concentrations, while relative water content decrease did not take place until 200 mmol/L NaCl. Compared to the control group, transpiration (E) decreased at the concentration of 50 mmol/L NaCl and stomatal conductance ( $g_s$ ) and net photosynthetic rate ( $P_n$ ) decreased at 100 mmol/L NaCl. Further increase of salt concentrations did not affect  $P_n$  and no significant differences  $g_s$ , E and substomatal concentration  $CO_2$  were measured between the concentrations of 200 and 300 mmol/L NaCl. A decrease of  $F_v/F_m$  took place from the concentration of 100 mmol/L NaCl, while differences between 200 and 300 mmol/L NaCl were also not significant. The obtained results therefore prove the tolerance of the *E. sativa* cv. Astro to salt stress.

**Keywords:** ručola; salinity; gas exchange, osmotic stress; net assimilation; ratio  $F_v/F_m$ ; osmotic adjustment

Salinity is one of the significant factors affecting the productivity of plants. Considerable attention is paid to the study of salt stress effects on the physiological symptoms in various types of plants (Munns and Gilliam 2015, Negrão et al. 2017). High salt concentrations decrease the osmotic potential of soil, which decreases the availability of water and disrupts the transport of water and nutrients to plant roots (Munns 2002, Tester and Davenport 2003). Salinity causes both water stress and osmotic stress in plants and the accumulated salt ions have a toxic effect on plants. Water deficit causes a leaf turgor decrease, further causing stomata closure and decreases of stomatal conductance ( $g_s$ ); one of the factors limiting photosynthesis rates (Chaves et al. 2009). There is also an ion imbalance due to the excessive collection of  $Na^+$  and  $Cl^-$  along with

decreased absorption of other ions such as  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  (Flowers and Colmer 2008).

Photosynthesis is the most significant physiological process and, in all its phases, is affected by stress factors. Ashraf and Harris (2013) state that the mechanism of photosynthesis involves various components, including photosynthetic pigments and photosystems, the electron transport system, and  $CO_2$  reduction pathways. Any damage at any level caused by a stress factor may reduce the overall photosynthetic capacity of a green plant.

Rocket, commonly also known as arugula, roquette and ručola (*Eruca sativa* (L.) Mill.), is an annual species belonging to the mustard family (Brassicaceae), traditionally grown in the Mediterranean region. Thanks to its excellent nutritional properties, it is increasingly becoming important for its content

Supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, S grant.

of glucosides, mineral salts and vitamin C and is therefore considered to be an excellent stomachic stimulant (Alqasoumi et al. 2009, Katsarou et al. 2016). *E. sativa* seed oil has antioxidant and antimicrobial properties (Khoobchandani et al. 2010) and serves to inhibit the proliferation of tumour growth (Azarenko et al. 2014).

According to Ashraf and McNeilly (2004), most of the *Brassica* species have been categorized as moderately salt tolerant, with a significant interspecific and intraspecific variation for salt tolerance. However, contradictory findings exist regarding the reaction of these species to salt stress at different plant developmental stages, while most others indicate that these species maintain their degree of salt tolerance consistently throughout the plant ontogeny. Bianco and Boari (1996) stated that wild rocket seeds show low germinability, but are quite tolerant to salinity, showing a significant germination decrease only for salinity greater than soil solution electrical conductivity 10 dS/m. Santos et al. (2012) stated that increasing salinity levels decreased the fresh biomass. Jesus et al. (2015) reported that, in two rocket cultivars, increasing salinity reduced the fresh and dry mass of the leaves, roots, and protein content, but proline content was increased and a change of enzyme activity took place. Ashraf (1994) stated that salt tolerant plants produced significantly greater dry biomass than the normal population *E. sativa*. The populations did not differ significantly in leaf osmotic potential, relative water content or leaf soluble proteins. They further stated that tolerant *E. sativa* populations accumulated significantly greater amounts of soluble sugars, proline and free amino acids in the leaves compared with the non-tolerant population. This proves that soluble sugars, proline and free amino acids are important components of salt tolerance in *E. sativa*.

The goal of our experiment was to clarify the effects of salt stress, induced by varying concentrations of NaCl, on water management and gas exchange parameters, particularly the photosynthetic assimilation of CO<sub>2</sub> and chlorophyll fluorescence of the PSII in rocket (*Eruca sativa* (L.) Mill.).

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material and experimental conditions.

The experiment focused on monitoring the effects

of salt stress induced by NaCl on the physiological parameters of rocket (*Eruca sativa* (L.) Mill.) cv. Astro. The experiments took place in the greenhouse. They were conducted in semi-controlled conditions (natural light conditions, air temperature 20 ± 2/15 ± 2°C day/night, relative air humidity 65% min and 85% max). The experimental plants were grown in containers 11 × 11 cm in garden substrate (pH 5.0–6.5, nutrient content N 80–120 mg/L, P 22–44 mg/L, K 83–124 mg/L). Salt stress was induced in the BBCH 12 phase (2 fully developed leaves) in concentrations of: 0 (deionized water, control); 50, 100, 200 and 300 mmol/L NaCl. Such watering took place over the course of 50 days in the amount of 50 mL of the solution every other day. The measurement of the monitored parameters was at the end of the experiment.

### Determination of leaf relative water content.

Relative water content (RWC; %) in the leaves was established as  $100 \times (FM - DM) / (SM - DM)$ , where FM represents the fresh mass of 10 leaf discs (diameter 10 mm), SM is the saturated mass of the same discs after their hydration in the dark for 4 h, and DM is the dry mass of these discs after they were oven-dried at 105°C for 48 h. RWC was established in five repetitions.

**Determination of leaf osmotic potential.** Leaf samples were placed into an insulin injection, sealed with Para film and frozen at the temperature of -18°C. Prior to actual measurement, the insulin injections were kept at the laboratory temperature until the tissue completely defrosted. The osmotic potential ( $\psi_{\pi}$ ; MPa) was established based on several drops of the cells upon targets of the Whatman 1 filtration paper of 1.5 cm in diameter and measured using the WP4C Dewpoint Potentiometer (Decagon Devices, Inc., Pullman, USA). The measurement of these parameters took place during five repetitions of three plant samples.

**Leaf gas exchange measurements.** The net photosynthetic rate ( $P_n$ ;  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), rate of transpiration ( $E$ ;  $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ;  $\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) and substomatal concentration CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ;  $\mu\text{mol}/\text{mol}$ ) were measured on the 3<sup>th</sup> or 4<sup>th</sup> fully expanded leaf *in situ*, using the portable gas exchange system LCpro+ (ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK). The gas exchange was measured from 9:00 A.M. to 11:00 A.M., Central European Time. Irradiance was 650  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  of photosynthetically active radiation (PAR), the temperature in the measurement chamber was 23°C and the

doi: 10.17221/398/2017-PSE

duration of the measurement of each sample was a 15 min interval after the establishment of steady-state conditions inside the measurement chamber. The measurements of these parameters took place on a single leaf on three plants.

**Chlorophyll fluorescence measurements.** The minimum chlorophyll fluorescence ( $F_0$ ) and the maximum chlorophyll fluorescence ( $F_m$ ) were also measured *in situ* with the portable fluorometer OSI 1 FL (ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK) with 1 s excitation pulse (660 nm) and saturation intensity 3000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  after 20 min dark adaptation of the 3<sup>th</sup> or 4<sup>th</sup> fully expanded leaf. The maximum quantum efficiency of photosystem II (PS II)  $F_v/F_m$  was calculated as  $F_v/F_m$  ( $F_v = F_m - F_0$ ). The measurement of these parameters took place on five repetitions on three plants.

**Statistical analysis.** A statistical evaluation of the experiment was made using the analysis of variance (ANOVA), with the LSD test, correlation and regression analysis. Statistical analyses were performed using Statistica 9.0 CZ for MS Windows software (Tulsa, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Water status.** In comparison to the control group, the RWC was significantly reduced all the way to the level of 200 and 300 mmol/L NaCl (Table 1), while there was no further significant difference ( $P \leq 0.001$ ) between these two concentrations. In comparison with the control, the RWC decrease at these concentrations was by 27.1% and 22.7%, respectively. There were no significant differences in the RWC between the 0, 50 and 100 mmol/L NaCl, while Al Gehani and Ismail (2016) stated that RWC decrease occurred in rocket due to salt stress already at the concentration of 40 mmol/L NaCl.

The osmotic potential values significantly decreased ( $P \leq 0.001$ ) in comparison with the control, with the increasing concentration of NaCl. The osmotic potential values at the concentration 50 mmol/L, compared to the control, were not significantly different (Table 1). Figure 1 depicts a linear regressive model of the increasing NaCl concentration (independently variable) and the decrease of osmotic potential of the leaf ( $r^2 = 0.9963$ ) and RWC ( $r^2 = 0.9145$ ), as dependent variables. Also a high correlation between RWC and  $\psi_\pi$  was established (Table 2). The decrease of osmotic potential is considered to be an osmotic adaptation and is one of the defense strategies against salt stress (Hajlaoui et al. 2010). Osmotic adjustment involves the net accumulation of solutes in a cell in response to salinity. Pérez-Pérez et al. (2009) stated that, consequently, the osmotic potential decreases, which in turn attracts water into the cell and enables turgor to be maintained.

**Gas exchange.** Generally,  $\text{CO}_2$  exchange was regarded as an important indicator of the growth of plants, because of its direct link to net productivity (Ashraf 2004). It was proven that stomatal conductance, substomatal concentration  $\text{CO}_2$ , transpiration and rate of photosynthesis are all parameters affected by salt stress (Sudhir and Murthy 2004). As apparent from the measured values, a significant limitation of these factors takes place with the increasing concentration of NaCl and there is a correlation between salinity and gas exchange parameters (Figure 2). Stomatal conductance decreased from 0.16  $\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  in the control to 0.03  $\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  in the 300 mmol/L NaCl treatment, representing a reduction by 81.3%. The statistically significant decrease ( $P \leq 0.001$ ) of stomatal conductance, as compared to the control, was measured from the concentration of 100 mmol/L NaCl and higher. The statistically insignificant

Table 1. Relative water content (RWC); leaf osmotic potential ( $\psi_\pi$ ); minimum chlorophyll fluorescence ( $F_0$ ); maximum chlorophyll fluorescence ( $F_m$ ); variable chlorophyll fluorescence ( $F_v$ ) and maximum quantum efficiency of PS II ( $F_v/F_m$ ) of plants in relation to NaCl concentration (means  $\pm$  standard error)

NaCl (mmol/L)	RWC (%)	$\psi_\pi$ (MPa)	$F_0$	$F_m$	$F_v$	$F_v/F_m$
0	75.5 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	-1.2 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	208.2 $\pm$ 7.05 <sup>b</sup>	1076.0 $\pm$ 18.3 <sup>a</sup>	867.8 $\pm$ 17.0 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>
50	74.9 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	-1.6 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	215.7 $\pm$ 16.4 <sup>b</sup>	952.3 $\pm$ 71.0 <sup>a</sup>	736.7 $\pm$ 37.0 <sup>a</sup>	0.77 $\pm$ 0.022 <sup>a</sup>
100	72.9 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	-1.8 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	225.2 $\pm$ 20.9 <sup>b</sup>	701.4 $\pm$ 58.3 <sup>b</sup>	476.2 $\pm$ 37.5 <sup>b</sup>	0.68 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>
200	52.8 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	-2.5 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	220.7 $\pm$ 19.2 <sup>b</sup>	633.0 $\pm$ 35.2 <sup>b</sup>	412.3 $\pm$ 17.7 <sup>b</sup>	0.65 $\pm$ 0.013 <sup>bc</sup>
300	48.4 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>	-3.2 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>	238.2 $\pm$ 24.4 <sup>a</sup>	630.1 $\pm$ 65.2 <sup>b</sup>	391.8 $\pm$ 40.8 <sup>b</sup>	0.62 $\pm$ 0.002 <sup>c</sup>

Values within a column marked with the same letter are not significantly different ( $P \leq 0.001$ )

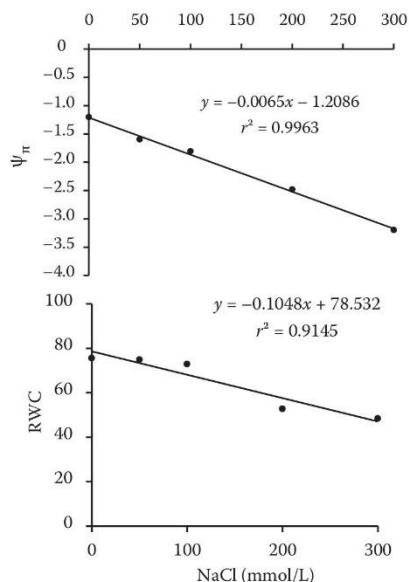


Figure 1. Relationship of leaf osmotic potential ( $\psi_{\pi}$ ) and relative water content (RWC) between NaCl concentration. Regression lines, equations and coefficients of determination ( $r^2$ ) are presented

difference in the stomatal conductance was between concentrations of 200 and 300 mmol/L NaCl.

Stomata closure in response to salinity stress generally occurs due to decreased leaf turgor and atmospheric vapour pressure, along with root-generated chemical signals (Chaves et al. 2009). Many authors, e.g. Dodd (2003), Buckley and Mott (2013) and Matthews et al. (2017) stated that the stomata regulate the exchange of  $\text{CO}_2$  and water vapour between the leaf and the atmosphere. Control of stomatal conductance is essential both to resource  $\text{CO}_2$  acquisition and to prevent desiccation. Significantly ( $P \leq 0.001$ ) lower values were recorded in the substomatal  $\text{CO}_2$  concentration at 200 and 300 mmol/L NaCl. Transpiration rate was significantly lower ( $P \leq 0.001$ ) in a concentration as low as 50 mmol/L NaCl. The greatest decrease of transpiration in comparison to the control treatment took place in the concentrations of 200 and 300 mmol/L NaCl, by 65% on average. The decrease of transpiration rate in cases of salt stress is affected by the reduced stomatal conductance for  $\text{H}_2\text{O}$ , which also corresponds to the very high correlation ( $r = 0.9806$ ;  $P \leq 0.01$ ) between stomatal conductance and transpiration rates (Table 2).

Photosynthetic rates significantly decreased ( $P \leq 0.001$ ) with the increasing concentration of NaCl, beginning with the concentration of 100 mmol/L NaCl, but no significant differences in photosynthetic rates were measured between the concentrations of 100, 200 and 300 mmol/L NaCl. The average decrease of photosynthetic rates in these treatments in comparison with the control was by 43%. The effect of salinity stress on the rate of photosynthesis could be caused by stomatal, nonstomatal or both factors (Saibo et al. 2009). A very high correlation  $r = 0.9107$  ( $P \leq 0.05$ ) was established between stomatal conductance and photosynthetic rate (Table 2). Increased levels of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  in the leaf tissue that can significantly affect the metabolic processes of photosynthesis could be considered as nonstomatal factors of photosynthetic limitation (Biswal et al. 2011). Xu et al. (2008) also stated that the salt-induced, osmotic effect can adversely affect the activities of a number of stroma enzymes involved in  $\text{CO}_2$  reduction.

**Chlorophyll fluorescence.** The values of chlorophyll fluorescence are shown in Table 1. The values of minimum fluorescence ( $F_0$ ) were not significantly different at concentration 50, 100, 200 mmol/L NaCl and control plants. Minimum fluorescence significantly increased ( $P \leq 0.001$ ) only at the concentration of 300 mmol/L NaCl. Maximum fluorescence ( $F_m$ ) was significantly lower in comparison with the control plants at the concentration of 100 mmol/L NaCl and higher. The maximum fluorescence values were not significantly different with the further increase of salt stress at the concentration 100, 200 and 300 mmol/L NaCl. The increase of  $F_0$  and decrease of  $F_m$  with rising salinity corresponds to results from other researchers, for example Li et al. (2010). This

Table 2. Correlation coefficients ( $r$ ) between the monitored parameters of water management and gas exchange parameters

	$\psi_{\pi}$	E	$P_n$	$g_s$
RWC	0.9533*	0.9062*	0.8022	0.9544*
$\psi_{\pi}$	–	0.9236*	0.8626	0.9597**
E	–	–	0.8569	0.9806**
$P_n$	–	–	–	0.9107*

\*\* $P \leq 0.01$ ; \* $P \leq 0.05$ ; RWC – relative water content;  $\psi_{\pi}$  – osmotic potential; E – transpiration;  $P_n$  – net photosynthetic rate;  $g_s$  – stomatal conductance

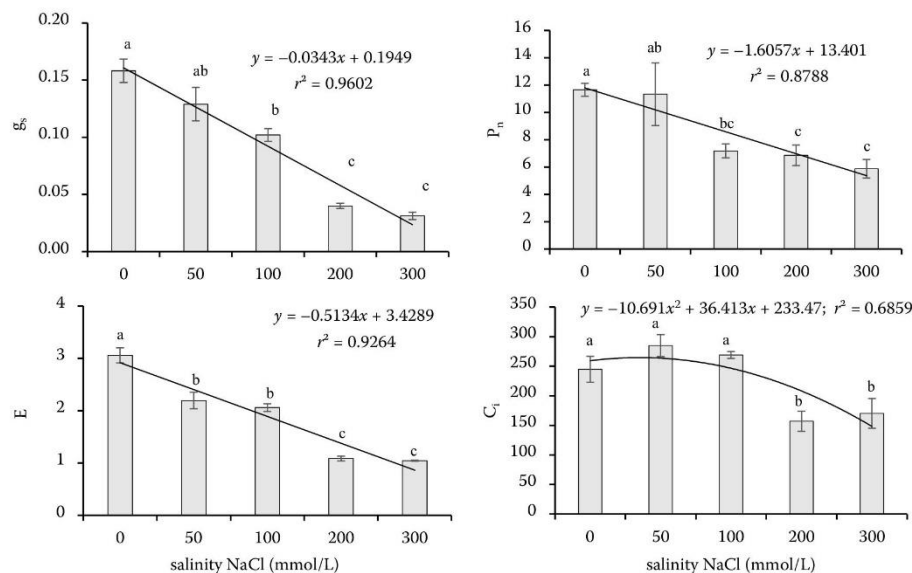


Figure 2. The stomatal conductance ( $g_s$ ); net photosynthetic rate ( $P_n$ ); transpiration (E) and substomatal concentration CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ). Means  $\pm$  standard error, regression lines, equations and coefficients of determination ( $r^2$ ) are presented

condition indicated the impairment of the light-harvesting complex in PSII, which finally reduced  $F_v$ . Reduction of  $F_v$  results in decreasing PSII quantum yield (Fernandez et al. 1997).

The maximum quantum efficiency of PSII photochemistry ( $F_v/F_m$ ) in the salt-stressed treatments was from 0.77 to 0.62. The significant decrease of  $F_v/F_m$  in comparison with the control took place at the concentrations of 100, 200 and 300 mmol/L NaCl. These results correspond with Al Gehani and Ismail (2016), who stated that the influence of 40 mmol/L NaCl concentration on rocket chlorophyll fluorescence is not significant. According to Maxwell and Johnson (2000), the  $F_v/F_m$  ratio in the range of 0.79 to 0.84 is the approximate optimal value for many plant species. Lower values indicate that a proportion of the PSII reaction centres is damaged or inactivated, a phenomenon commonly observed in plants under stress (Baker and Rosenqvist 2004).

Salt stress in rocket affected all monitored parameters. With increasing salt stress, water management was regulated by closing stomata. Stomata closure became particularly evident through limited transpiration rates, occurring at levels of 50 mmol/L NaCl and higher. Osmotic adjustment is also very

important for sustaining tissue hydration. The decrease of osmotic potential enabled sustaining tissue hydration in treatments with lower salt concentrations (50 and 100 mmol/L NaCl), comparable with the level of the control plants. Therefore, the decrease of RWC in rocket leaves took place only in treatments with high concentrations of salt (200 and 300 mmol/L NaCl). Photosynthetic assimilation levels decreased at the concentration of 100 mmol/L NaCl, but a further increase of salt stress did not affect photosynthetic rates. The maximum quantum efficiency of PSII photochemistry ( $F_v/F_m$ ) decreased with rising salinity. Its lowest value was measured at the concentration of 300 mmol/L NaCl. As stated above, the decrease of  $F_v/F_m$  provides evidence of the inhibiting effect of salinity on PSII activity. It is, however, a subject for discussion to what degree the reaction centres of PSII were damaged, given the stable level of photosynthetic assimilation of CO<sub>2</sub> at high salt concentrations. The results obtained therefore proved the tolerance of *Eruca sativa* to salt stress. However, given that the testing was performed on a single genotype of this species, and in regard to findings by other authors, broader research is recommended.

## REFERENCES

- Al Gehani I.A., Ismail T.M. (2016): Effect of soil amendment on growth and physiological processes of rocket (*Eruca sativa* L.) grown under salinity conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 10: 15–20.
- Alqasoumi S., Al-Sohaibani M., Al-Howiriny T., Al-Yahya M., Rafatullah S. (2009): Rocket '*Eruca sativa*': A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. *World Journal of Gastroenterology*, 15: 1958–1965.
- Ashraf M. (1994): Organic substances responsible for salt tolerance in *Eruca sativa*. *Biologia Plantarum*, 36: 255–259.
- Ashraf M. (2004): Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 199: 361–376.
- Ashraf M., McNeilly T. (2004): Salinity tolerance in *Brassica* oilseeds. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23: 157–174.
- Ashraf M., Harris P.J.C. (2013): Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, 51: 163–190.
- Azarenko O., Jordan M.A., Wilson L. (2014): Erucin, the major isothiocyanate in arugula (*Eruca sativa*), inhibits proliferation of MCF7 tumor cells by suppressing microtubule dynamics. *Plos One*, 9: e100599.
- Baker N.R., Rosenqvist E. (2004): Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1607–1621.
- Bianco V.V., Boari F. (1996): Up-to-date developments on wild rocket cultivation. In: Padulosi S., Pignone D. (eds.): *Rocket: A Mediterranean Crop for the World*. Report of a Workshop, Legnaro (Italy) 13–14 December 1996. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 41–49.
- Biswal B., Joshi P.N., Raval M.K., Biswal U.C. (2011): Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: Stress signalling and adaptation. *Current Science*, 101: 47–56.
- Buckley T.N., Mott K.A. (2013): Modelling stomatal conductance in response to environmental factors. *Plant, Cell and Environment*, 36: 1691–1699.
- Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. (2009): Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103: 551–560.
- Dodd I.C. (2003): Hormonal interactions and stomatal responses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22: 32–46.
- Fernandez R.T., Perry R.L., Flore J.A. (1997): Drought response of young apple trees on three rootstocks. II. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, water relations, and leaf abscisic acid. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122: 841–848.
- Flowers T.J., Colmer T.D. (2008): Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179: 945–963.
- Hajlaoui H., El Ayeb N., Garrec J.P., Denden M. (2010): Differential effects of salt stress on osmotic adjustment and solutes allocation on the basis of root and leaf tissue senescence of two silage maize (*Zea mays* L.) varieties. *Industrial Crops and Products*, 31: 122–130.
- Jesus C.G., Silva F.J.Jr., Camara T.R., Silva E.F.F., Willadino L. (2015): Production of rocket under salt stress in hydroponic systems. *Horticultura Brasileira*, 33: 493–497.
- Katsarou D., Omirou M., Liadaki K., Tsikou D., Delis C., Garaqounis C., Krokida A., Zambounis A., Papadopoulou K.K. (2016): Glucosinolate biosynthesis in *Eruca sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109: 452–466.
- Khoobchandani M., Ojeswi B.K., Ganesh N., Srivastava M.M., Gabbani S., Matera R., Iori R., Valgimigli L. (2010): Antimicrobial properties and analytical profile of traditional *Eruca sativa* seed oil: Comparison with various aerial and root plant extracts. *Food Chemistry*, 120: 217–224.
- Li G., Wan S.W., Zhou J., Yang Z.Y., Qin P. (2010): Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels. *Industrial Crops and Products*, 31: 13–19.
- Matthews J.S.A., Viallet-Chabrand S.R.M., Lawson T. (2017): Diurnal variation in gas exchange: The balance between carbon fixation and water loss. *Plant Physiology*, 174: 614–623.
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000): Chlorophyll fluorescence – A practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659–668.
- Munns R. (2002): Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25: 239–250.
- Munns R., Gilliam M. (2015): Salinity tolerance of crops – What is the cost? *New Phytologist*, 208: 668–673.
- Negrão S., Schmöckel S.M., Tester M. (2017): Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*, 119: 1–11.
- Pérez-Pérez J.G., Robles J.M., Tovar J.C., Botía P. (2009): Response to drought and salt stress of lemon 'Fino 49' under field conditions: Water relations, osmotic adjustment and gas exchange. *Scientia Horticulturae*, 122: 83–90.
- Saibo N.J.M., Lourenço T., Oliveira M.M. (2009): Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany*, 103: 609–623.
- Santos R.S.S., Dias N.S., Duarte S.N., Lima C.J.G.S. (2012): Use of brackish water in the production of rocket cultivated in coconut fiber substrate. *Revista Caatinga*, 25: 113–118.
- Sudhir P., Murthy S.D.S. (2004): Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, 42: 481–486.
- Tester M., Davenport R. (2003): Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91: 503–527.
- Xu Z.Z., Zhou G.S. (2008): Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany*, 59: 3317–3325.

Received on June 26, 2017

Accepted on July 26, 2017

Published online on August 23, 2017

## 6 Souhrnná diskuse

Tématem disertační práce byla determinace senzitivních míst fotosyntézy během krátkodobého vodního deficitu po aplikaci osmoticky aktivních látek.

V první části souhrnné diskuse jsou shrnuty poznatky z vědeckých článků, se zaměřením na reakce fotosyntetického aparátu rostlin vystavených vodnímu deficitu. Druhá část souhrnné diskuse je zaměřena na zasolení, jakožto na druhý nejvýznamnější stresor hned po suchu. Zasolení lze chápat jako zdroj dalšího typu osmotické zátěže, při které také vzniká vodní deficit. A poslední třetí část souhrnné diskuse se zaměřuje na látky stimulační povahy (osmoticky aktivní soluty), jako na možnost podpory fotosyntetického aparátu rostlin během vodního deficitu a jako osmoprotektanty rostlin omezující osmotický stres (vodní deficit).

### 6.1 Reakce fotosyntetického aparátu

Primární reakcí rostlin vystavených stresu ze sucha je zastavení růstu v důsledku ztráty buněčného turgoru a omezení prodlužovacího růstu buněk (Imadi et al., 2016). V raných fázích vývoje cukrové řepy vodní stres snižuje asimilační plochu (Choluj et al., 2004) a u starších listů dochází k rychlejšímu stárnutí a opadu (Ober et al., 2005). Snížení listové plochy omezuje ztráty vody transpirací, ale zároveň vede k omezení výnosu v důsledku nižší fotosyntézy (Khodadadi et al., 2020). Limitace fotosyntézy bývá rozlišována na stomatální a nestomatální. V důsledku sucha klesá asimilace CO<sub>2</sub> kvůli uzavírání průduchů.

V rámci experimentu stresu suchem bylo také zaznamenáno ovlivnění růstu rostlin, jak ukázaly studie Mouradi et al. (2016) a Santos et al. (2021), a který souvisí se snížením fotosyntézy (Mouradi et al., 2016). Úprava pěstebního substrátu zvýšila množství listů a produkci biomasy. Podobné výsledky zaznamenaly i další studie při vyvolání stresu suchem u bobu (Abd El-Mageed et al., 2021) a merlíku čilského (Yang et al., 2020). Z prací Agegnehu et al., (2017), Chen et al., (2019), Yu et al., (2019) dále vyplývá, že předpokládaný mechanismus účinku biohlu na rostliny je navýšení pórovitosti další vlastností biohlu je snížení objemové hmotnosti půdy, což následně snižuje odolnost půdy vůči prorůstání kořenů (Adekiya et al., 2019), pórovitost biocharu také zlepšuje zadržování vlhkosti v půdě (Yang et al., 2020).

Působení vodního stresu na cukrovou řepu negativně ovlivňuje její výnos. Snížení výnosu je způsobeno omezením růstu, metabolismu, transportu asimilátů a reprodukci rostlin (Fahad et al.,

2017). Ze získaných analýz listů rostlin rostoucích v podmínkách vodního deficitu vyplývá, že aplikace půdního doplňku zlepšila výměnu plynů v listech, tj. snížení  $ci$ , zvýšení transpirace, stomatální vodivosti a  $WUE_i$ . Vlivem sucha se zvyšuje  $ci$  listů, zatímco transpirace, asimilace  $CO_2$  a stomatální vodivost se snižují (Baccari et al., 2020; Baraldi et al., 2019; Leufen et al., 2016; Santos et al., 2021). Jednou z prvních reakcí rostlin na sucho je uzavření jejich průduchů, což snižuje rychlost transpirace a umožňuje rostlinám udržet si obsah vody. Uzavírání průduchů také snižuje asimilaci  $CO_2$ , a tím i čistou fotosyntézu (Leufen et al., 2016).

Podobně jako u cukrové řepy je i u sledovaných genotypů pšenic fotosyntéza hlavním procesem vedoucím k primární produkci biomasy (Baslam et al., 2020), její rychlost je ovlivňována řadou faktorů např. vysokou teplotou a koncentrací  $CO_2$  (Dusenge et al., 2019; Moore et al., 2021), suchem (Pinheiro and Chaves, 2011), obsahem minerálních látek (Glanz-Idan and Wolf, 2020; Santos et al., 2013) a řadou dalších (Ashraf and Harris, 2013). Naměřené zvýšení výměny plynů po aplikaci doplňku pěstebního substrátu bylo v souladu s předchozími pozorováními (Yang et al., 2020; Zhang et al., 2020) a mohlo by souviset se zlepšením výživy rostlin a půdních podmínek a obsahem vody (Tanure et al., 2019; Yang et al., 2020). Po úpravě substrátu došlo v naší studii ke zvýšení obsahu vody v půdě, zlepšil se obsah živin v půdě i rostlinách. Při optimálním množství vody a živin rostliny otevírají své průduchy, čímž se zvyšuje transpirace a asimilace  $CO_2$  (Tanure et al., 2019). Tato pozorování ukázala, že úprava pěstebního substrátu má přímý vliv na jeho vlhkost a stav živin, který mohl zmírnit stres fotosyntetického aparátu rostlin cukrové řepy způsobený suchem (Zhang et al., 2020). Další vztahy mezi rostlinnými parametry, které byly popsány, rychlost transpirace a stomatální vodivost byly v negativní korelaci s půdní vlhkostí. Bylo prokázáno, že asimilace  $CO_2$ , stomatální vodivost a transpirace korelovaly spolu navzájem (Naidoo and Naidoo, 2018; Yan et al., 2017). Nicméně tyto studie ukázaly, že tyto tři parametry byly pozitivně korelované s půdní vlhkostí, tj. jejich hodnoty se zvyšovaly s rostoucí půdní vlhkostí. Tyto rozpory ukazují, že změny, které zlepšily půdní vlhkost nejdále, nebyly ty, které vyvolávaly nejlepší transpiraci a stomatální vodivost, tedy výměnu plynů. Vzhledem k tomu, že výměna plynů v listech může být ovlivněna i dalšími faktory, je možné, že změny ji zlepšily prostřednictvím svého vlivu na jiné parametry. Například ionty K ovlivňují otevírání a zavírání průduchů, čímž regulují listovou výměnu plynů (Hasanuzzaman et al., 2018). Podobně  $WUE_i$  mělo negativní korelaci s půdní vlhkostí.

Je tedy zřejmé, že deficit vody poškozuje fotosyntetický aparát, a tím následně snižuje i syntézu pigmentů (Kiani et al., 2020; Leufen et al., 2016). Ztráta fotosyntetických pigmentů



je jedním z ochranných mechanismů, které rostlina iniciuje, aby snížila množství absorbované energie listem, když je vystavena suchu (C. Liu et al., 2017). Obsah fotosyntetických pigmentů je významný parametr ovlivňující rychlost fotosyntézy, neboť podle (Croft et al., 2017; Li et al., 2018) je obsah fotosyntetických pigmentů snižován působením stresových faktorů. V obsahu celkových chlorofylů (Chlt) byly stanoveny průkazné rozdíly mezi pokusnými roky, vegetačními fázemi a genotypy (del Pozo et al., 2020). U karotenoidů (Car) byl průkazný rozdíl mezi pokusnými roky a vegetačními fázemi. Vyšší obsah Chlt a Car byl stanoven ve fázi 65 BBCH u pšeníc. Snížení obsahu fotosyntetických pigmentů bylo také stanoveno ve fázi 73 BBCH, což může být způsobeno postupnou senescencí listů (del Pozo et al., 2020) nebo působením stresových faktorů. Snížení obsahu fotosyntetických pigmentů má za následek pokles fotosyntetické aktivity, jak uvádí (Gregersen and Holm, 2007). Uvedený výsledek potvrzuje také získané výsledky u barevných pšeníc.

Ze sledovaných kultivarů měl vyšší obsah Chlt KM-72-18 s modrým aleuronem, u Car nebyly průkazné rozdíly mezi kultivary (Kraus et al., 2021). Obsah chlorofylu v listech cukrové řepy se zvýšil u rostlin vlivem vodního deficitu po úpravě pěstebního substrátu pomocí biouhlu. Uvedený závěr potvrzují také ve svých pracích (Abd El-Mageed et al., 2021; Zhang et al., 2020). Takové zvýšení pigmentu může souviset se zvýšeným stavem výživy rostlin, jako jsou N, P a K, jak uvádí Mubarak et al., (2016) a svědčí o lepší odolnosti vůči stresu ze sucha za využití půdních doplňků (Abideen et al., 2020).

V roce 2019 se projevil pozitivní vliv foliární aplikace stimulačních přípravků u vybraných kultivarů pšeníc. U kultivaru KM-72-18 ve vývojové fázi 65 BBCH došlo k průkaznému navýšení obsahu Chlt v porovnání s kontrolou (T1) při ošetření až o 112 %. Ve fázi 73 BBCH byl průkazný vyšší obsah pigmentů v porovnání s kontrolou u některých variant. V obsahu karotenoidů nebyl zaznamenán průkazný efekt aplikace stimulačních přípravků. U kultivaru KM-72-18 s mnohořadým klasem se pozitivní vliv aplikace stimulačních přípravků projevil až ve vývojové fázi 73 BBCH. V porovnání s kontrolou byl výrazně vyšší obsah pigmentů po ošetření stimulačními přípravky. Rovněž v obsahu karotenoidů se v této vývojové fázi projevil pozitivní efekt aplikace stimulačními přípravky. Červen tohoto roku byl teplý a suchý a tepelný stres během ontogeneze a plnění zrna tak urychlil degradaci obsahu chlorofylu v listech, což má za následek snížení fotosyntetické aktivity listů i konečné biomasy (B. Liu et al., 2017). Zvýšení obsahu pigmentů u KM-72-18 s modrým aleuronem může být způsobeno rovněž ochrannou funkcí antokyanů u rostlin ve stresových podmínkách (Shoeva (Tereshchenko) et al., 2012). V roce 2020 se během sledovaných vývojových

fázích u obou kultivarů neprojevil pozitivní efekt aplikace stimulačních přípravků na obsah Chl<sub>a</sub> a Car mezi pokusnými roky, vegetačními fázemi a kultivary.

Na rozdíl obsahu chlorofylu je celkový obsah xantofylových barviv při suchu zvýšen (Baccari et al., 2020; Baraldi et al., 2019). To je důležité pro ochranu rostlin po působení stresu. Zejména violaxanthin je vlivem sucha depoxidován na antheraxanthin a poté na zeaxanthin. To umožňuje rozptýlení přebytečné světelné energie. Při tomto procesu je podle Baccari et al., (2020) zeaxanthin účinnější než violaxanthin. Pokles celkového množství xantofylových barviv svědčí o snížení stresu, který působí na rostliny pěstované v upraveném substrátu v porovnání s kontrolou, což je v souladu se skutečností, že rostliny mají snížený obsah chlorofylu.

Vlivem změn v obsahu fotosynteticky aktivních pigmentů dochází ke snížení koncentrace CO<sub>2</sub> v chloroplastech, což má za důsledek snížení fotochemického výtěžku reakčních center fotosystému II (PSII) a následně zvýšení tepelné disipace excitovaných elektronů zachycených v PSII. Pokles aktivity některých enzymů, např. sacharózy fosfát syntázy a nitrát reduktázy, nebo zvýšení oxygenační aktivity RUBISCO a snížení obsahu ribulosity 1,5-bisfosfátu (Cornic and Massacci, 1996). V řadě prací (Chołuj et al., 2014; Islam et al., 2020; Khodadadi et al., 2020) se uvádí vliv deficitu vody na fotosyntézu a obsah chlorofylu u cukrové řepy. Z těchto prací vyplývá vysoká míra tolerance k fotoinhibici. Tato míra fotoinhibice je dána ochranným mechanismem spojeného s nefotochemickým zhášením. Silná dehydratace snižuje efektivní kvantový výtěžek fotosystému PSII v důsledku poruch v přenosu energie a poškození reakčních center fotosystému (Chołuj et al., 2014; Wilhelm and Selmar, 2011).

V roce 2019 v období vývojové fáze 65 BBCH se u obou kultivarů *Triticum aestivum* poměr Fv/Fm pohyboval v interval 0,791 - 0,817, což lze považovat za optimální stav (Maxwell and Johnson, 2000), přičemž nebyly průkazné rozdíly mezi aplikovanými přípravky. Tyto výsledky lze dát do souvislosti s vyšším množstvím srážek v květnu a rovněž samotné měření se uskutečnilo po dni se srážkami. V období vývojové fáze 73 BBCH došlo k snížení Fv/Fm. U kultivaru KM-72-18 s modrým aleuronem některá ošetření průkazně v porovnání s kontrolou zvýšila poměr Fv/Fm. Snížení hodnot Fv/Fm naznačuje, že část reakčních center fotosystému PSII byla poškozena nebo deaktivována, což je jev běžně pozorovaný u rostlin ve stresu (del Pozo et al., 2020). Kromě aktuálního vodního a teplotního stresu v tomto období může pokles těchto hodnot souviset i s urychlenou senescencí listů a následné snížení Fv/Fm (del Pozo et al., 2020; Desotgiu et al., 2012; Kotakis et al., 2014). Je známo, že mnoho různých druhů může urychlit svůj ontogenetický vývoj v podmínkách stresu suchem (Kottmann et al., 2016). V roce 2020 v období vývojové fáze

65 a 73 BBCH se u obou kultivarů poměr Fv/Fm pohyboval v interval 0,757 – 0,802 podobně jako v roce 2019. Ve vývojové fázi 65 BBCH u kultivaru KM-72-18 s modrým aleuronem u některých ošetřených variant byl průkazně zvýšen poměr Fv/Fm v porovnání s kontrolou. Z naměřených hodnot je patrné, že při dostatku srážek, nedochází k výraznějšímu poklesu poměru Fv/Fm v období nalévání zrna a rovněž se neprojevil stimulační efekt aplikovaných přípravků. Podle Zivcak et al. (Zivcak et al., 2008) Fv/Fm hodnoty jsou extrémně stabilní a začínají klesat na úrovni dehydratace, která je pro listy letální. Pokud stres ze sucha přetrvává v polních podmínkách po delší dobu, může být pokles hodnot Fv/Fv dramatický.

## 6.2 Osmotické zatížení

Fotosyntéza jako taková je na všech úrovních výrazně ovlivňována působením vnějších faktorů prostředí. Je známo snížení intenzity fotosyntézy zasolením (Gupta et al., 2018; Joshi et al., 2018; Munns and Tester, 2008). Bylo prokázáno, že stomatální vodivosti ( $g_s$ ), intracelulární koncentrace  $CO_2$  ( $C_i$ ), transpirace ( $E$ ) a asimilace  $CO_2$  ( $A$ ) jsou parametry ovlivňovány zasolením (Sudhir and Murthy, 2004). Z naměřených hodnot výše uvedených parametrů vyplývá, že se zvyšující se koncentrací NaCl dochází k průkazné limitaci těchto faktorů a existuje vysoká korelace mezi zasolením a parametry výměny plynů. U rostlin *Portulaca oleracea* došlo k výraznému snížení asimilace  $CO_2$  v případě stomatální vodivosti u varianty 300 mM NaCl devátý den vystavení stresu zasolením. Podobná reakce byla zaznamenána také u intracelulární koncentrace  $CO_2$ . Na základě získaných výsledků je možné konstatovat v souladu s prací (Chaves et al., 2009), že dochází k poklesu aktivity enzymů včetně RUBISCO, čímž se omezí karboxylace a s ní i čistá rychlost fotosyntézy. Po 22denní expozici soli u varianty 300 mM NaCl byly naměřeny záporné hodnoty asimilace  $CO_2$  a zároveň vysoká substomatalní koncentrace  $CO_2$ . Rychlost fotosyntézy se průkazně snížila se zvyšující se koncentrací NaCl (od 100 mmol/L NaCl a výše) také u rostlin *Eruca sativa*. Přičemž mezi koncentracemi 100, 200 a 300 mmol/L NaCl nebyly naměřeny průkazné rozdíly v rychlosti fotosyntézy. Průměrné snížení rychlosti fotosyntézy u těchto variant v porovnání s kontrolou bylo o 42,8 %. Účinek stresu zasolením na rychlost fotosyntézy může být způsoben stomatálními, nestomatálními nebo oběma faktory, jak ve své práci uvádí např. Saibo et al. (2009). Dále byl zaznamenán pokles stomatální vodivosti, a to z hodnoty 0,16 mol  $CO_2/m^2/s$  (kontrola) na 0,03 mol  $CO_2/m^2/s$  (300 mmol/L NaCl), tj. pokles o 81,3 %. Průkazné snížení stomatální vodivosti v porovnání s kontrolou bylo naměřeno již od koncentrace 100 mmol/L NaCl. Průkazný rozdíl nebyl zjištěn mezi koncentracemi 200 a 300 mmol/L NaCl. Uvedený výsledek souvisí se skutečností, že uzavření průduchů vlivem salinity obecně nastává v důsledku sníženého

turgoru listů a atmosférického tlaku par, spolu s chemickými signály kořenů (Chaves et al., 2009). Substomatální koncentrace CO<sub>2</sub> byly průkazně nižší u variant 200 a 300 mmol/L NaCl. Rychlost transpirace byla nižší již od nejnižší koncentrace soli v roztoku -50 mmol/L NaCl. Nejvyšší průkazný pokles transpirace v porovnání s kontrolou byl zaznamenán u koncentrací 200 a 300 mmol/L NaCl. U těchto variant se transpirace v průměru snížila o 65,2 %. Stres zasolením ovlivnil u *Eruca sativa* všechny sledované parametry. S narůstajícím zasolením došlo k regulaci vodního režimu uzavíráním průduchů, které se projevilo zejména omezením rychlosti transpirace, a to již na úrovni 50 mmol/L NaCl.

Dalším významným parametrem ovlivněným zasolením je kvantový výnos PSII. Kdy u rostlin *Portulaca oleracea* stres zasolením (300 mM NaCl) průkazně snížil poměr Fv/Fm při dvanáctidenním stresu. Nižší hodnoty fluorescence naznačují, že část reakčních center PSII je poškozena nebo inaktivována, což je jev pozorovaný u rostlin ve stresu (Baker and Rosenqvist, 2004). Salinita blokuje přenos elektronů z primárního akceptoru, čímž se snižuje poměr Fv/Fm, jak dokládá práce (Shu et al., 2012). Snížení maximálního kvantového výtěžku PSII vlivem zasolení se uvádí u *Raphanus sativus* L. (Jamil et al., 2007), *Brassica napus* L (Naeem et al., 2010) a *Eruca sativa* L. (Hniličková et al., 2017). Nižší koncentrace soli 100 mM NaCl neprůkazně ovlivnila poměr Fv/Fm v porovnání s kontrolní variantou, přesto lze pozorovat pokles poměru Fv/Fm u obou těchto variant v závěru pokusu. Při mírných hladinách stresu solí (100 mM) se poměr Fv/Fm neprůkazně zvýšil ve srovnání s vysokým stresem. Uvedený závěr je v souladu s prací (Zaman et al., 2018). I maximální kvantová účinnost PSII (Fv/Fm) se snižovala se zvyšující se salinitou a nejnižší hodnota byla naměřena u koncentrace 300 mmol/L NaCl. Pokles Fv/Fm jak je uvedeno výše svědčí o inhibičním efektu salinity na aktivitu PSII. Nicméně je diskutabilní, do jaké míry došlo k poškození reakčních center PSII vzhledem k stabilní úrovni fotosyntetické asimilace CO<sub>2</sub> při vysokých koncentracích solí. Získané výsledky tak dokládají toleranci *Eruca sativa* k zasolení. Hodnota minimální fluorescence (F<sub>0</sub>) se průkazně zvyšovala se zvyšující salinitou až od koncentrace 300 mmol/L NaCl a maximální fluorescence (F<sub>m</sub>) byla průkazně nižší již od koncentrace 100 mmol/L NaCl, přičemž s dalším zvyšováním zasolení nebyly mezi jednotlivými variantami průkazné rozdíly. Zvýšení F<sub>0</sub> a pokles F<sub>m</sub> se zvyšující se salinitou koresponduje s výsledky např. Li et al. (2010) a tento stav indikovalo poškození světlosběrného systému v PSII, což nakonec snížilo Fv. Snížení Fv má za následek snížení kvantového výtěžku PSII (Fernandez et al., 1997). Maximální hodnota kvantového výtěžku PSII (Fv/Fm) byla u zasolených variant 0,77 až 0,62. Průkazné snížení Fv/Fm v porovnání s kontrolou bylo zjištěno již u koncentrace 100 mmol/L NaCl

a výše. Získané výsledky jsou v souladu s Al Gehani and Ismail (2016), kteří uvádí u *Eruca sativa* neprůkazný vliv koncentrace 40 mmol/L NaCl na fluorescenci chlorofylu.

Velmi významné pro udržení hydratace pletiv je osmotické přizpůsobení, kdy se jedná o jednu ze strategií obrany proti zasolení (Hajlaoui et al., 2010). Osmotická úprava zahrnuje čistou akumulaci rozpuštěných látek v buňce v reakci na salinitu. Pérez-Pérez et al. (2009) uvádí, že v důsledku toho klesá osmotický potenciál, který následně přitahuje vodu do buňky a umožňuje udržení turgoru. Snížení osmotického potenciálu tedy umožnilo udržet hydrataci pletiv u nižších koncentrací soli na úrovni kontrolních rostlin, k poklesu obsahu vody v listech *Eruca sativa* tak došlo až u vysokých koncentracích soli (200 a 300 mmol/L NaCl). Jak bylo zmíněno jako odezvou na zasolení dochází rovněž k hromadění velkého množství různých kompatibilních solutů, především prolinu. K výraznému zvýšení obsahu volného prolinu došlo v druhé polovině pokusu u rostlin ošetřených 300 mM NaCl, zároveň se snížil vodní potenciál listů. Prolin poskytuje rostlinám ochranu před stresem tím, že přispívá k osmoregulaci, detoxikaci reaktivních forem kyslíku (ROS), ochraně integrity membrán a stabilizaci enzymů a proteinů (Ashraf and Foolad, 2007b; Szabados and Saviouré, 2010). Nárůst obsahu prolinu po 21 dnech u dvou genotypů *P. oleracea* (genotyp T-16 a WI-9) vlivem zasolení na úrovni 200 mM NaCl uvádí Mulry et al. (2015). Rovněž Rahdari et al. (Rahdari et al., 2012) udává zvyšující se hladinu prolinu v listech *Portulaca oleracea* s nárůstem salinity. Yazici et al. (2007) udává trojnásobný nárůst obsahu prolinu u rostlin *P. oleracea* ošetřených 140 mM NaCl po dobu 30 dnů. U rostlin ošetřených 70 mM NaCl po dobu 18 a 30 dnů uvádí stabilní hodnoty. Tyto výsledky jsou srovnatelné se získanými výsledky z našich experimentů, kdy u rostlin ošetřených 100 mM NaCl nebylo zaznamenáno po celou dobu pokusu zvýšení obsahu volného prolinu v porovnání s kontrolními rostlinami, což dokládá toleranci *Portulaca oleracea* k zasolení na této úrovni salinity.

Zvýšení obsahu volného prolinu uvádí u *Portulaca oleracea* také Karakaş et al. (2017). Dalším přirozeným produktem podobně jako prolin při peroxidaci lipidů je malondialdehyd (MDA), využívaný jako indikátor míry poškození buněk stresem (Ma et al., 2015). U rostlin vystavených 300 mM NaCl byl v počátku pokusu zaznamenán nárůst MDA v porovnání s kontrolou, ale v dalších fázích stresu byly rozdíly mezi stresovanými a kontrolními rostlinami neprůkazné. Lze proto předpokládat aktivaci obraných a adaptačních mechanismů spojených se zvýšenou kapacitou antioxidantního systému, který omezuje tvorbu reaktivních forem kyslíku, a tím i potlačuje hladinu peroxidace lipidů.

Projevem těchto mechanismů je výrazný nárůst obsahu prolinu a osmotické přizpůsobení, které úzce souvisí s tolerancí vůči zasolení a se schopností antioxidantního systému zachycovat volné radikály a potlačovat tak úroveň peroxidace lipidů a hromadění osmoprotektivních látek jako je prolin (Yazici et al., 2007). Rostliny vystavené zasolení na úrovni 100 mM NaCl nevykazovaly zvýšenou míru peroxidace lipidů v důsledku působení stresu v porovnání s kontrolou. Společným jevem u sledovaných variant je přirozeně se zvyšující obsah MDA v důsledku senescence listů a zvýšené míry peroxidace lipidů v důsledku oxidativního stresu (Jakhar and Mukherjee, 2014). Rozdílné výsledky uvádí Xing et al. (2019), u variant 100, 150 and 200 mM NaCl, kdy zaznamenali nárůst obsahu MDA a zvyšující se produkci  $O_2$  což vysvětluje poškozením integrity buněčných membrán a proteinové aktivity.

### 6.3 Osmoprotektivní látky

V reakci na stres rostliny aktivují mechanismy obranných reakcí, jako jsou morfologické a strukturální změny, exprese genů, syntéza hormonů a osmoticky aktivních látek ke zmírnění dopadů stresu (Yang et al., 2021). Významnou roli mají právě osmoticky aktivní látky (kompatibilní soluty), jejichž jednou z funkcí je prostřednictvím osmoregulace udržet turgor v rostlinách a optimalizovat příjem vody. Akumulace osmoprotektantů prolinu a glycin betainu koreluje s vodním režimem cukrové řepy (Khodadadi et al., 2020).

V současné době je velmi aktuální otázka, jak omezit dopady působení stresorů na porosty polních plodin. Od šlechtění tolerantních kultivarů, zavádění nových druhů až po optimalizaci agrotechnických postupů. Jednou z možností ze souboru všech využívaných opatření je aplikace podpůrných stimulačních přípravků (Bulgari et al., 2019). Ty mají obvykle různorodé chemické složení, kdy jejich účinek je důsledkem synergického působení různých bioaktivních molekul. Jedná se obvykle o produkty získané z různých organismů či mikroorganismů, případně i o anorganické látky, které jsou schopny zlepšit růst rostlin, produktivitu a zmírnit negativní účinky stresu (Rouphael and Colla, 2018; Shahrajabian et al., 2021). Mezi nejznámější komponenty patří minerální prvky, vitamíny, aminokyseliny a poly- a oligosacharidy, stopy přírodních rostlinných hormonů, huminové kyseliny, chitosan, fosfity, biouhel a rostlinné extrakty, včetně extraktů z řas a různých částí rostlin (Paul et al., 2019). Mohou působit přímo na fyziologii a metabolismus rostliny, umožňují zlepšit efektivitu využití vody a živin u plodin, stimulovat vývoj zvýšením primárního a sekundárního metabolismu (Shahrajabian et al., 2021). Bylo prokázáno, že biostimulanty na rostlinné bázi zlepšují růst díky přítomnosti různých fytohormonů a dalších sekundárních metabolitů, vitamínů, antioxidantů a anorganických živin v extraktu, které mohou

přímo ovlivnit růst a produkci rostlin zlepšením tolerance rostlin proti abiotickým stresům (Ali et al., 2020).

U cukrové řepy byl prokázán vliv aplikace biostimulačních přípravků, ročníku a genotypu na výnos a cukernatost řepy (Ernst et al., 2022). Existuje řada pozorování vlivu foliární aplikace a primingu semen stimulačními přípravky na různé bázi či jednotlivými účinnými látkami u cukrové řepy. Výzkum působení různých účinných látek a jejich kombinací napříč pěstovanými druhy plodin je velmi na vzestupu. Jejich účinky zejména ovlivňují aktivitu antioxidantních enzymů, funkci fotosyntetického aparátu, hormonální metabolismus, optimalizují vodní režim, udržují homeostázu vnitřního prostředí a stabilizují buněčné struktury. Kombinace vhodných genotypů, optimálních agrotechnických zásahů, včetně výživy, ochrany a využívání pomocných přípravků může být jednou z cest, jak i v složitých podmínkách prostředí docílit optimální produkce.

Vzhledem k rozdílnému složení jednotlivých přípravků je nutné vzít v úvahu variabilní působení na jednotlivé fyziologické a metabolické procesy v rostlině. Tato variabilita se projevila jak na úrovni jednotlivých parametrů, tak i mezi sledovanými kultivary a pokusnými ročníky. Vysokou variabilitu vlivu faktorů na sledované parametry uvádí Pačuta et al. (Pačuta et al., 2021), domnívá se, že je do budoucna třeba zvýšit míru stálosti aplikovaných přípravků. Gozzo a Faoro (Gozzo and Faoro, 2013) dokonce uvádí, že biostimulanty vykazují proměnlivou účinnost za skutečných polních podmínek, na rozdíl od slibných a pozitivních účinků pozorovaných v kontrolovaných laboratorních podmínkách. Kromě toho je nutné zaměřit se na zvýšení vlivu bioaktivních látek na parametry kvality pěstovaných plodin (Pačuta et al., 2021). Někteří autoři (Kocira et al., 2020) se zabývají i otázkou ekonomické efektivity. Calvo et al. (Calvo et al., 2014) potvrzují, že aplikace biostimulantů zvyšuje produktivitu a kvalitu plodin a zároveň reaguje na ekonomické a udržitelné požadavky.

Jak již bylo uvedeno, je doložen přínos osmoprotektantů k zvýšení výnosu polních a zahradních plodin. U použitých přípravků v pokusech jsou mimo jiné mezi uvedenými účinnými látkami volné aminokyseliny, L-prolin, makro a mikro nutrient, extrakty z mořských řas a rostlin. Aminokyseliny jako základní stavební jednotky bílkovin a mají v rostlinném organismu řadu funkcí, např. antistresovou, stimulační pro růst, mohou fungovat jako prekurzor auxinu, prekurzor a stimulace syntézy chlorofylu a řady dalších (Paleckiene et al., 2007). Zvýšení výnosu a zlepšení kvalitativních parametrů *Triticum aestivum* po aplikaci přípravků na bázi aminokyselin a jejich možné využití uvádí např. (Colla et al., 2017; Popko et al., 2018; Schmidt et al., 2020). Například efekt exogenní aplikace prolinu na rostliny je rozsáhle prostudován a jeho účinky popsány, jak

vyplývá např. z práce (Kaur and Asthir, 2015). Jednotlivé účinky makro a mikro elementů na růst, vývoj a tvorbu výnosu jsou obecně známy (Pandey et al., 2020). Rovněž extrakty z mořských řas pozitivně ovlivňují metabolismus rostlin (Kumar et al., 2020; Sharma et al., 2014; Tarakhovskaya et al., 2007).

## 6.4 Vliv na výnos

Výnos a kvalita zemědělských produktů je hlavní měrnou jednotkou úspěšnosti zemědělských operací. U obilnin je sledována primárně kvalita a výnos zrna. Výnos zrna, včetně jeho kvality je limitován povětrnostními podmínkami, podmínkami stanoviště, agrotechnickými opatřeními, výběrem genotypu apod. (Pačuta et al., 2021). Výše výnosu a hmotnost tisíce semen (HTS) v uvedeném experimentu byla ovlivněna ročníkem, kultivarem i aplikovaným přípravkem. Vyšší výnosy byly u obou kultivarů dosaženy v roce 2020, kdy vyšší výnos byl u kultivaru KM-72-18 s modrým aleuronem.

Aplikace stimulačních přípravků průkazně zvýšila výnos a rovněž byla ovlivněna HTS. kdy v roce 2019 se u všech aplikací zvýšil výnos oproti kontrole o 100 %. Podle Van Oosten et al. (2017) účinky biostimulantů spočívají ve zvýšení výnosu a odolnosti proti biotickému a abiotickému stresu. Rovněž další autoři (Kocira et al., 2020) uvádějí pozitivní efekt aplikace stimulačních přípravků. Optimální srážkové podmínky v období plnění zrna mohou ovlivnit výši výnosu. U *Triticum aestivum* dochází v průběhu vodního deficitu v období plnění zrna k urychlenému dozrávání, kdy je následně negativně ovlivněna výše výnosu a kvalita zrna (Balla et al., 2019). Při porovnání výnosu mezi sledovanými kultivary byl v obou pokusných letech dosažen vyšší výnos u kultivaru s modrým aleuronem. Významně se tak neprojevil potenciál zvýšení reprodukčních orgánů v klase, a tím navýšení úložné kapacity klasu u kultivaru KM-94-18 s mnohořadým klaselem.

Dalším rostlinným druhem, u kterého byla sledována jakost, byly rostliny cukrové řepy. Pokud se *Beta vulgaris* pěstuje za účelem výroby cukru, tak je rozhodující nejenom obsah, ale také podíl melasotvorných látek. Obsah fruktózy, galaktózy a sacharózy se zvýšil při všech typech úpravy substrátu. Skutečnost, že se obsah živin a vody zvýšil po použití biouhlu, přestože biouhel snížil koncentrace těchto prvků v půdní pórové vodě, lze přičíst skutečnosti, že živiny byly pro rostliny stále dostupné v půdním roztoku, a to i přes sorpční tendence biouhlu (Abd El-Mageed et al., 2021; Adekiya et al., 2019; Yang et al., 2020; Zhang et al., 2020).



## 7 Závěr a doporučení

Závěrem je možné konstatovat, že pod vlivem kteréhokoli ze zkoumaných stresových faktorů dochází často již během několika desítek minut k velmi dramatickým změnám v kvantitativním i kvalitativním zastoupení látek v buňkách. Tvorba některých prudce stoupá, u jiných se naopak zastavuje. V hojné míře se však také syntetizují látky, které se nedají za normálních okolností vůbec v buňkách zjistit. Tuto reakci rostlin je možné také označit za osmotické přizpůsobení, které nemusí být vždy primárně negativní, kdy z naší studie na *Eruca sativa* vyplývá, že nízké koncentrace solí v půdním roztoku působily spíše stimulativně na růst rostlin, který je ovlivněn procesem aktivní akumulace solutů v buňce, aby byla minimalizována ztráta vody ve vztahu k hyper či hypotonickému prostředí vně buňky. Tvorba osmoticky aktivních látek společně s dalšími změnami v metabolismu zajišťující vysokou odolnost (např. udržování zvýšené koncentrace osmoticky aktivních látek) bývají často provázány snížením rychlosti získávání nových zdrojů energie, a tedy i snížením rychlosti tvorby biomasy, což se projevuje omezením výnosu.

Pozornost základního i aplikovaného výzkumu se proto věnuje tématům zaměřeným na objasnění a pochopení obranných reakcí rostlin a možnosti využití osmoticky aktivních látek v zemědělské prvovýrobě. Řada těchto látek je již nyní součástí řady komerčně dodávaných produktů. Jak omezit v dnešní době dopady působení stresorů na porosty polních plodin se jeví celá řada možností. A to od šlechtění tolerantních kultivarů jako mohou být například námi testované odrůdy *Triticum aestivum* s obsahem barviv v zrně, které se ukázaly jako přirozeně odolnější vůči stresu suchem, další možností je zavádění nových odrůd jako byla námi testované víceřadá odrůda *Triticum aestivum*, která se však neukázala jako plně vhodná, a to z důvodu neschopnosti navýšit výnos i přes její vysoký výnosový potenciál a samozřejmě neméně významné jsou zásahy do optimalizace agrotechnických postupů, jako na příklad vyplývá z výsledků výše uvedené studie, kdy se jako nejvýhodnější ukázalo užití biouhlu jako půdního doplňku, který zvýšil retenci půdní vlhkosti, a snížit vyplavování dusičnanů v důsledku přidání hnoje do půdy. V důsledku provedené půdní úpravy došlo k pozitivnímu vlivu na růst, výnos a kvalitu *Beta vulgaris*. Další neméně významnou možností ze souboru všech využívaných opatření je aplikace podpůrných stimulačních přípravků, kdy jejich účinek je důsledkem synergického působení různých bioaktivních molekul. Mohou působit přímo na fyziologii a metabolismus rostliny, umožňují zlepšit efektivitu využití vody a živin u plodin, stimulovat vývoj zvýšením primárního a sekundárního metabolismu, které mohou přímo ovlivnit růst a produkci rostlin zlepšením tolerance rostlin proti abiotickým stresům.

Nicméně je třeba konstatovat, že znalosti těchto látek jsou značně omezené zejména v kombinaci se stresem. Z toho důvodu je velmi důležitý další výzkum a rozvoj v poznání chování rostlin ve stresovém prostředí s aplikací podpůrné látky i bez aplikace podpůrné látky.

## 7.1 Závěrečná zhodnocení stanovených cílů a hypotéz

**Cíl 1.** Kvantifikovat změny vodního režimu a fotosyntetických parametrů v závislosti na délce působení vodního deficitu a aplikaci osmoticky aktivních látek.

Cíl byl splněn, viz publikace: Kraus et al. (2021)

**Cíl 2.** Stanovit rozdílnou citlivost sledovaných fyziologických parametrů a jejich význam v toleranci k vodnímu deficitu u C3 a C4 rostlin.

Cíl byl splněn, viz publikace: Hnilickova et al. (2021; 2017), Lebrun et al. (2022), Kraus et al. Listy cukrovarnické a řepařské (early access)

**Cíl 3.** Stanovit fyziologickou odezvu rostlin na působení vodního deficitu a aplikaci osmoticky aktivních látek.

Cíl byl splněn, viz publikace: Kraus et al. (2021)

**Cíl 4.** Kvantifikovat na základě fyziologických parametrů možnost aplikace osmoticky aktivních látek před a v době působení vodního deficitu na rostliny.

Cíl byl splněn, viz publikace: Kraus et al. (2021), Kraus et al. Listy cukrovarnické a řepařské (early access)

**Hypotéza 1.** U vybraných rostlinných druhů dochází při působení vodního deficitu a aplikace osmoticky aktivních látek k ovlivnění sledovaných fyziologických charakteristik.

Hypotéza byla potvrzena, viz publikace: Kraus et al. (2021)

**Hypotéza 2.** Lze stanovit relevantní fyziologické ukazatele odolnosti rostlin k vodnímu deficitu.

Hypotéza byla potvrzena, viz publikace: Kraus et al. Listy cukrovarnické a řepařské (early access)

**Hypotéza 3.** Jsou fyziologické odezvy C3 a C4 rostlin odlišné v podmínkách různého prostředí a působení stresoru.

Hypotéza byla potvrzena, viz publikace: Hnilickova et al. (2021; 2017), Lebrun et al. (2022)

## 8 Seznam použité literatury

- Abd El-Mageed, T.A., Belal, E.E., Rady, M.O.A., Abd El-Mageed, S.A., Mansour, E., Awad, M.F., Semida, W.M., 2021. Acidified Biochar as a Soil Amendment to Drought Stressed (*Vicia faba* L.) Plants: Influences on Growth and Productivity, Nutrient Status, and Water Use Efficiency. *Agronomy* 11, 1290. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071290>
- Abideen, Z., Koyro, H.-W., Huchzermeyer, B., Ansari, R., Zulfiqar, F., Gul, B., 2020. Ameliorating effects of biochar on photosynthetic efficiency and antioxidant defence of *Phragmites karka* under drought stress. *Plant Biol.* 22, 259–266. <https://doi.org/10.1111/plb.13054>
- Abraham, E.M., Meyer, W.A., Bonos, S.A., Huang, B., 2008. Differential Responses of Hybrid Bluegrass and Kentucky Bluegrass to Drought and Heat Stress. *HortScience* 43, 2191–2195. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.7.2191>
- Adekiya, A.O., Agbede, T.M., Aboyeji, C.M., Dunsin, O., Simeon, V.T., 2019. Effects of biochar and poultry manure on soil characteristics and the yield of radish. *Sci. Hortic.* 243, 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.048>
- Agegnehu, G., Srivastava, A.K., Bird, M.I., 2017. The role of biochar and biochar-compost in improving soil quality and crop performance: A review. *Appl. Soil Ecol.* 119, 156–170. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.008>
- Agrios, G.N., 2005. *Plant Pathology*. Elsevier.
- Ahmadi, A., Sio-Se Mardeh, A., 2004. The effect of water stress on soluble carbohydrates, chlorophyll and proline contents of four Iranian wheat cultivars under different moisture regims. *Iran J Agric Sci* 35, 753–763.
- 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 Physiol. Biochem.* 63, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.11.004>
- Ainsworth, E.A., Rogers, A., Leakey, A.D.B., 2008. Targets for Crop Biotechnology in a Future High-CO<sub>2</sub> and High-O<sub>3</sub> World. *Plant Physiol.* 147, 13–19. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117101>
- Akram, N.A., Ashraf, M., 2013. Regulation in Plant Stress Tolerance by a Potential Plant Growth Regulator, 5-Aminolevulinic Acid. *J. Plant Growth Regul.* 32, 663–679. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9325-9>
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.* 24, 1337–1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- Alhdad, G.M., Seal, C.E., Al-Azzawi, M.J., Flowers, T.J., 2013. The effect of combined salinity and waterlogging on the halophyte *Suaeda maritima*: The role of antioxidants. *Environ. Exp. Bot.* 87, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.10.010>

- Ali, Q., Shehzad, F., Waseem, M., Shahid, S., Hussain, A.I., Haider, M.Z., Habib, N., Hussain, S.M., Javed, M.T., Perveen, R., 2020. Plant-Based Biostimulants and Plant Stress Responses, in: Hasanuzzaman, M. (Ed.), *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives I: General Consequences and Plant Responses*. Springer, Singapore, pp. 625–661. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-2156-0\\_22](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2156-0_22)
- Amtmann, A., Troufflard, S., Armengaud, P., 2008. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiol. Plant.* 133, 682–691. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01075.x>
- Anderson, J.P., Badruzaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., Kazan, K., 2004. Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 3460–3479. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025833>
- Andersson, P.B., Perry, V.H., Gordon, S., 1992. Intracerebral injection of proinflammatory cytokines or leukocyte chemotaxins induces minimal myelomonocytic cell recruitment to the parenchyma of the central nervous system. *J. Exp. Med.* 176, 255–259. <https://doi.org/10.1084/jem.176.1.255>
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82, 1227–1238.
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007a. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007b. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>
- Ashraf, M., Harris, P.J.C., 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51, 163–190. <https://doi.org/10.1007/s11099-013-0021-6>
- Ashraf, M.A., Harris, P.J., 2005. *Abiotic stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches*. Food Products Press.
- Babu, R.C., Shashidhar, H.E., Lilley, J.M., Thanh, N.D., Ray, J.D., Sadasivam, S., Sarkarung, S., O'Toole, J.C., Nguyen, H.T., 2001. Variation in root penetration ability, osmotic adjustment and dehydration tolerance among accessions of rice adapted to rainfed lowland and upland ecosystems. *Plant Breed.* 120, 233–238. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00578.x>
- Baccari, S., Elloumi, O., Chaari-Rkhis, A., Fenollosa, E., Morales, M., Drira, N., Ben Abdallah, F., Fki, L., Munné-Bosch, S., 2020. Linking Leaf Water Potential, Photosynthesis and Chlorophyll Loss With Mechanisms of Photo–and Antioxidant Protection in Juvenile Olive Trees Subjected to Severe Drought. *Front. Plant Sci.* 11.
- Baker, N.R., Rosenqvist, E., 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 55, 1607–1621. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh196>

- Balla, K., Karsai, I., Bónis, P., Kiss, T., Berki, Z., Horváth, Á., Mayer, M., Bencze, S., Veisz, O., 2019. Heat stress responses in a large set of winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) depend on the timing and duration of stress. *PLoS ONE* 14, e0222639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222639>
- Bandurska, H., Jozwiak, W., 2010. A comparison of the effects of drought on proline accumulation and peroxidases activity in leaves of *Festuca rubra* L. and *Lolium perenne* L. *Acta Soc. Bot. Pol.* 79, 111–116.
- Baraldi, R., Przybysz, A., Facini, O., Pierdonà, L., Carriero, G., Bertazza, G., Neri, L., 2019. Impact of Drought and Salinity on Sweetgum Tree (*Liquidambar styraciflua* L.): Understanding Tree Ecophysiological Responses in the Urban Context. *Forests* 10, 1032. <https://doi.org/10.3390/f10111032>
- Baslam, M., Mitsui, T., Hodges, M., Priesack, E., Herritt, M.T., Aranjuelo, I., Sanz-Sáez, Á., 2020. Photosynthesis in a Changing Global Climate: Scaling Up and Scaling Down in Crops. *Front. Plant Sci.* 11, 882. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00882>
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Beck, E.H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., Bhattarai, T., 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *J. Biosci.* 32, 501–510. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0049-5>
- Bláha, L., Hnilička, F., 2004. Influence of abiotic stresses on the basic of the root systém, in: *Biologia*. Bratislava, pp. 145–150.
- Bláha, L., Hnilička, F., Hniličková, H., Holubec, V., Möllerová, J., Štolcová, J., Zieglerová, J., 2003. *Rostlina a stres*. VÚRV Praha, Praha.
- Bláha, L., Hnilička, F., Novák, V., Manev, M., 1998. Influence of abiotic stresses on different seed traits, plant development and yield formation, in: *Fifth Congress ESA*. Nitra, Slovenská republika, pp. 331–332.
- Blinka, P., 2002. Metoda hodnocení sucha, in: *XIV. Česko–Slovenská Bioklimatologická Konference „BIOKLIMA–PROSTŘEDÍ–HOSPODÁŘSTVÍ*. Lednice.
- Bowler, C., Fluhr, R., 2000. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci.* 5, 241–246. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01628-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01628-9)
- Boyer, J.S., James, R.A., Munns, R., Condon, T. (A. G.), Passioura, J.B., 2008a. Osmotic adjustment leads to anomalously low estimates of relative water content in wheat and barley. *Funct. Plant Biol.* 35, 1172. <https://doi.org/10.1071/FP08157>
- Boyer, J.S., James, R.A., Munns, R., Condon, T. (A. G.), Passioura, J.B., 2008b. Osmotic adjustment leads to anomalously low estimates of relative water content in wheat and barley. *Funct. Plant Biol.* 35, 1172–1172. <https://doi.org/10.1071/FP08157>
- Brázdil, R. et al., 2015. Sucho v českých zemích: minulost, současnost a budoucnost. Centrum výzkumu globální změny Akademie věd České Republiky, v.v.i., Brno.

- Brestič, M., Olšovská, K., 2001. Vodný stres rastlín: príčiny, dôsledky, perspektívy. Slovenská poľnohospodárska univerzita.
- Brouder, S.M., Volenec, J.J., 2008. Impact of climate change on crop nutrient and water use efficiencies. *Physiol. Plant.* 133, 705–724. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01136.x>
- Buchmann, N., Schulze, E.D., 1999. Net CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O fluxes of terrestrial ecosystems. *Glob. Biogeochem. Cycles* 13, 751–760. <https://doi.org/10.1029/1999GB900016>
- Bulgari, R., Franzoni, G., Ferrante, A., 2019. Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. *Agronomy* 9, 306. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>
- Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W., 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Carriquí, M. et al., 2015. Diffusional limitations explain the lower photosynthetic capacity of ferns as compared with angiosperms in a common garden study. *Plant Cell Environ.* 38, 448–460. <https://doi.org/10.1111/pce.12402>
- Castagna, A., Di Baccio, D., Ranieri, A.M., Sebastiani, L., Tognetti, R., 2015. Effects of combined ozone and cadmium stresses on leaf traits in two poplar clones. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 2064–2075. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3481-8>
- Cauchy, A.L., 1821. Cours d'analyse de l'Ecole royale polytechnique; par m. Augustin-Louis Cauchy ... 1.re partie. Analyse algébrique. de l'Imprimerie royale.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103, 551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Chen, H., Jiang, J.G., 2010. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environ. Rev.* 18, 309–319. <https://doi.org/10.1139/A10-014>
- Chen, W., Meng, J., Han, X., Lan, Y., Zhang, W., 2019. Past, present, and future of biochar. *Biochar* 1, 75–87. <https://doi.org/10.1007/s42773-019-00008-3>
- Cherif, J., Mediouni, C., Ammar, W.B., Jemal, F., 2011. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *J. Environ. Sci.* 23, 837–844. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60415-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60415-9)
- Chimenti, C.A., Marcantonio, M., Hall, A.J., 2006. Divergent selection for osmotic adjustment results in improved drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) in both early growth and flowering phases. *Field Crops Res.* 95, 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.04.003>
- Chimenti, C.A., Pearson, J., Hall, A.J., 2002. Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crops Res.* 75, 235–246. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(02\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(02)00029-1)

- Chinnusamy, V., Zhu, J.-K., 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr. Opin. Plant Biol., Genome Studies and Molecular Genetics* 12, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.006>
- Choluj, D., Karwowska, R., Jasińska, M., Haber, G., 2004. Growth and dry matter partitioning in sugar beet plants (*Beta vulgaris* L.) under moderate drought. *Plant Soil Environ.* 50, 265–272. <https://doi.org/10.17221/4031-PSE>
- Chołuj, D., Wiśniewska, A., Szafranski, K.M., Cebula, J., Gozdowski, D., Podlaski, S., 2014. Assessment of the physiological responses to drought in different sugar beet genotypes in connection with their genetic distance. *J. Plant Physiol.* 171, 1221–1230. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.04.016>
- Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R., Roupheal, Y., 2017. Biostimulant Action of Protein Hydrolysates: Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome. *Front. Plant Sci.* 8, 2202. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02202>
- Cornic, G., Massacci, A., 1996. Leaf Photosynthesis Under Drought Stress, in: Baker, N.R. (Ed.), *Photosynthesis and the Environment, Pokroky ve Fotosyntéze a Dýchání*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 347–366. [https://doi.org/10.1007/0-306-48135-9\\_14](https://doi.org/10.1007/0-306-48135-9_14)
- Critchfield, H.J., 1985. Sources of information on climate change since 1850 in Washington State, in: *Third Conference on Climate Variations and Symposium on Contemporary Climate: 1850-2100*. American Meteorological Society, Los Angeles, California, p. 156.
- Croft, H., Chen, J.M., Luo, X., Bartlett, P., Chen, B., Staebler, R.M., 2017. Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. *Glob. Change Biol.* 23, 3513–3524. <https://doi.org/10.1111/gcb.13599>
- Da Silva, J.M., Arrabaça, M.C., 2004. Contributions of soluble carbohydrates to the osmotic adjustment in the C4 grass *Setaria sphacelata*: A comparison between rapidly and slowly imposed water stress. *J. Plant Physiol.* 161, 551–555. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01109>
- Daliakopoulos, I.N., Tsanis, I.K., Koutroulis, A., Kourgialas, N.N., Varouchakis, A.E., Karatzas, G.P., Ritsema, C.J., 2016. The threat of soil salinity: A European scale review. *Sci. Total Environ.* 573, 727–739.
- del Pozo, A., Méndez-Espinoza, A.M., Romero-Bravo, S., Garriga, M., Estrada, F., Alcaíno, M., Camargo-Rodriguez, A.V., Corke, F.M.K., Doonan, J.H., Lobos, G.A., 2020. Genotypic variations in leaf and whole-plant water use efficiencies are closely related in bread wheat genotypes under well-watered and water-limited conditions during grain filling. *Sci. Rep.* 10, 460. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57116-0>
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W., Heber, U., Neimanis, S., Winter, K., Krüger, A., Czygan, F.C., Bilger, W., Björkman, O., 1990. Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. *Plant Physiol.* 92, 293–301. <https://doi.org/10.1104/pp.92.2.293>

- Denby, K., Gehring, C., 2005. Engineering drought and salinity tolerance in plants: lessons from genome-wide expression profiling in *Arabidopsis*. *Trends Biotechnol.* 23, 547–552. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.09.001>
- Desotgiu, R., Pollastrini, M., Cascio, C., Gerosa, G., Marzuoli, R., Bussotti, F., 2012. Chlorophyll a fluorescence analysis along a vertical gradient of the crown in a poplar (Oxford clone) subjected to ozone and water stress. *Tree Physiol.* 32, 976–986. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps062>
- Dusenge, M.E., Duarte, A.G., Way, D.A., 2019. Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO<sub>2</sub> and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration. *New Phytol.* 221, 32–49. <https://doi.org/10.1111/nph.15283>
- Eppel, A., Keren, N., Salomon, E., Volis, S., Rachmilevitch, S., 2013. The response of *Hordeum spontaneum* desert ecotype to drought and excessive light intensity is characterized by induction of O<sub>2</sub> dependent photochemical activity and anthocyanin accumulation. *Plant Sci.* 201–202, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.12.002>
- Erice, G., Irigoyen, J.J., Pérez, P., Martínez-Carrasco, R., Sánchez-Díaz, M., 2006. Effect of elevated CO<sub>2</sub>, temperature and drought on dry matter partitioning and photosynthesis before and after cutting of nodulated alfalfa. *Plant Sci.* 170, 1059–1067. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.018>
- Ernst, D., Černý, I., Pačuta, V., Vician, T., Zapletalová, A., Rašovský, M., 2022. Úroda a cukornatosť repy cukrovej vplyvom ročníka, odrôd a biostimulátorov. *LISTY Cukrov. Řepář.* 5.
- Fahad, S., Bajwa, A.A., Nazir, U., Anjum, S.A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., Saud, S., Ihsan, M.Z., Alharby, H., Wu, C., Wang, D., Huang, J., 2017. Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. *Front. Plant Sci.* 8.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A., 2009. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management, in: *Sustainable Agriculture*. Springer Netherlands, pp. 153–188. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_12)
- Fedina, I.S., Georgieva, K., Grigorova, I., 2002. Light-dark changes in proline content of barley leaves under salt stress. *Biol. Plant.* 45, 59–63. <https://doi.org/10.1023/A:1015175802847>
- Fernandez, R.T., Perry, R.L., Flore, J.A., 1997. Drought response of young apple trees on three rootstocks. II. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, water relations, and leaf abscisic acid. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 122, 841–848.
- Flexas, J. et al., 2012. Mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub>: An unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Sci.* 193–194, 70–84. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.05.009>
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28, 1056–1071. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x>



- Frye, M.A., Tsai, G.E., Huggins, T., Coyle, J.T., Post, R.M., 2007. Low Cerebrospinal Fluid Glutamate and Glycine in Refractory Affective Disorder. *Biol. Psychiatry* 61, 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.01.024>
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F., Dommes, J., 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regul.* 37, 263–285. <https://doi.org/10.1023/A:1020835304842>
- Gehani, I.A.A., Ismail, T.M., 2016. Effect of Soil Amendment on Growth and Physiological Processes of Rocket (*Eruca Sativa* L.) Grown Under Salinity Conditions. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*
- Ghannoum, O., 2009. C4 photosynthesis and water stress. *Ann. Bot.* 103, 635–644. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn093>
- Ghorbani, M., Movahedi, Z., Kheiri, A., Rostami, M., 2018. Effect of salinity stress on some morpho-physiological traits and quantity and quality of essential oils in Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Environ. Stress. Crop Sci.* 11, 413–420.
- Gilliham, M., Able, J.A., Roy, S.J., 2017. Translating knowledge about abiotic stress tolerance to breeding programmes. *Plant J.* 90, 898–917. <https://doi.org/10.1111/tpj.13456>
- Giraud, E., Ho, L.H.M., Clifton, R., Carroll, A., Estavillo, G., Tan, Y.-F., Howell, K.A., Ivanova, A., Pogson, B.J., Millar, A.H., Whelan, J., 2008. The Absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in Arabidopsis Results in Acute Sensitivity to Combined Light and Drought Stress. *Plant Physiol.* 147, 595–610. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115121>
- Gitelson, A.A., Buschmann, C., Lichtenthaler, H.K., 1999. The Chlorophyll Fluorescence Ratio F735/F700 as an Accurate Measure of the Chlorophyll Content in Plants. *Remote Sens. Environ.* 69, 296–302. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(99\)00023-1](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(99)00023-1)
- Glanz-Idan, N., Wolf, S., 2020. Upregulation of photosynthesis in mineral nutrition-deficient tomato plants by reduced source-to-sink ratio. *Plant Signal. Behav.* 15, 1712543. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1712543>
- Gonzalez, A., Bermejo, V., Gimeno, B.S., 2010. Effect of different physiological traits on grain yield in barley grown under irrigated and terminal water deficit conditions. *J. Agric. Sci.* <https://doi.org/10.1017/S0021859610000031>
- Goufo, P., Moutinho-Pereira, J.M., Jorge, T.F., Correia, C.M., Oliveira, M.R., Rosa, E.A.S., António, C., Trindade, H., 2017. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Metabolomics: Osmoprotection as a Physiological Strategy for Drought Stress Resistance and Improved Yield. *Front. Plant Sci.* 8, 586. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00586>
- Gozzo, F., Faoro, F., 2013. Systemic Acquired Resistance (50 Years after Discovery): Moving from the Lab to the Field. *J. Agric. Food Chem.* 61, 12473–12491. <https://doi.org/10.1021/jf404156x>
- Gregersen, P.L., Holm, P.B., 2007. Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol. J.* 5, 192–206. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00232.x>

- Guilioni, L., Wéry, J., Lecoœur, J., 2003. High temperature and water deficit may reduce seed number in field pea purely by decreasing plant growth rate. *Funct. Plant Biol.* 30, 1151–1164. <https://doi.org/10.1071/FP03105>
- Gupta, B., Huang, B., 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int. J. Genomics* 2014.
- Gupta, B.K., Sahoo, K.K., Ghosh, A., Tripathi, A.K., Anwar, K., Das, P., Singh, A.K., Pareek, A., Sopory, S.K., Singla-Pareek, S.L., 2018. Manipulation of glyoxalase pathway confers tolerance to multiple stresses in rice. *Plant Cell Environ.* 41, 1186–1200. <https://doi.org/10.1111/pce.12968>
- Haberle, J., Trčková, M., Růžek, P., 2008. Příčiny nepříznivého působení sucha a dalších abiotických faktorů na příjem a využití živin obilninami a možnosti jeho omezení. *Metod. Praxi VURV*.
- Haghjou, M.M., Shariati, M., Smirnov, N., 2009. The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate–glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains. *Physiol. Plant.* 135, 272–280. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01193.x>
- Hajlaoui, H., Ayeb, N.E., Garrec, J.P., Denden, M., 2010. Differential effects of salt stress on osmotic adjustment and solutes allocation on the basis of root and leaf tissue senescence of two silage maize (*Zea mays* L.) varieties. *Ind. Crops Prod.* 31, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.09.007>
- Hale, M.G., Orcutt, D.M., 1987. The physiology of plants under stress. *Physiol. Plants Stress*.
- Hartikainen, K., Nerg, A., Kivimäenpää, M., Kontunen-soppela, S., Mäenpää, M., Oksanen, E., Rousi, M., Holopainen, T., 2009. Emissions of volatile organic compounds and leaf structural characteristics of European aspen (*Populus tremula*) grown under elevated ozone and temperature. *Tree Physiol.* 29, 1163–1173. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpp033>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Nahar, K., Hossain, M.S., Mahmud, J.A., Hossen, M.S., Masud, A.A.C., Moumita, Fujita, M., 2018. Potassium: A Vital Regulator of Plant Responses and Tolerance to Abiotic Stresses. *Agronomy* 8, 31. <https://doi.org/10.3390/agronomy8030031>
- Hejnák, V., 2003. Využití izotopové metody (<sup>15</sup>N) spalné kalorimetrie a azometrie v produkční fyziologii ječmene jarního a špenátu setého. *Power Print, ČZU AF., Praha*, p. 152.
- Hessini, K., Issaoui, K., Ferchichi, S., Saif, T., Abdelly, C., Siddique, K.H.M., Cruz, C., 2019. Interactive effects of salinity and nitrogen forms on plant growth, photosynthesis and osmotic adjustment in maize. *Plant Physiol. Biochem.* 139, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.03.005>
- Hessini, K., Martínez, J.P., Gandour, M., Albouchi, A., Soltani, A., Abdelly, C., 2009. Effect of water stress on growth, osmotic adjustment, cell wall elasticity and water-use efficiency in *Spartina alterniflora*. *Environ. Exp. Bot.* 67, 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.010>

- Hewezi, T., Léger, M., Gentzbittel, L., 2008. A Comprehensive Analysis of the Combined Effects of High Light and High Temperature Stresses on Gene Expression in Sunflower. *Ann. Bot.* 102, 127–140. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn071>
- Heyne, E.G., Brunson, A.M., 1940. Genetic studies of heat and drought tolerance in maize. *J. Am. Soc. Agron.* 32, 803–14.
- Hnilička, F., Hniličková, H., Holá, D., Kočová, M., Rothová, O., 2008. Vliv půdního sucha na obsah energie v juvenilních rostlinách kukuřice, in: 30. Mezinárodní Český a Slovenský Kalorimetrický Seminář. Univerzita Pardubice, Pardubice, pp. 133–136.
- Hnilička, F., Hniličková, H., Martinková, J., Bláha, L., 2007. The influence of drought and the application of 24-epibrassinolide on the formation of dry matter and yield in wheat. *Cereal Res. Commun.* 35, 457–460. <https://doi.org/10.1556/crc.35.2007.2.73>
- Hnilička, F., Hniličková, H., Martinková, J., Bláha, L., Kadlec, P., 2009a. Impact of 24-epibrassinolide on chemical structure and energy content in wheat grain. *Vagos* 17–22.
- Hnilička, F., Holá, D., Hniličková, H., Rothová, O., Kočová, M., 2009b. Vliv postupného vodního deficitu na obsah energie v biomase juvenilních rostlin kukuřice, in: 31. Mezinárodní Slovenský a Český Kalorimetrický Seminář. Univerzita Pardubice, Pardubice, pp. 51–54.
- Hniličková, H., Hnilička, F., Martinková, J., Kraus, K., 2017. Effects of salt stress on water status, photosynthesis and chlorophyll fluorescence of rocket. *Plant Soil Environ.* 63, 362–367. <https://doi.org/10.17221/398/2017-PSE>
- Hnilickova, H., Kraus, K., Vachova, P., Hnilicka, F., 2021. Salinity Stress Affects Photosynthesis, Malondialdehyde Formation, and Proline Content in *Portulaca oleracea* L. *Plants* 10, 845. <https://doi.org/10.3390/plants10050845>
- Hniličková, H., Novák, V., 2000. Accumulation of energy by non-irrigated and irrigated hop plants (*Humulus lupulus* L.). *Rostl. Výroba* 46, 465–469.
- Holá, D., Benešová, M., Haisel, D., Hnilička, F., Hniličková, H., Honnerová, J., Kočová, M., Kučera, T., Rothová, O., Procházková, D., Šonská, A., Willhelmová, N., 2009. Fyziologické a biochemické parametry inbredních a hybridních genotypů kukuřice vystavených vodnímu deficitu. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha, Praha, pp. 130–134.
- Hsiao, T.C., 1973. Plant Responses to Water Stress. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24, 519–570. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.002511>
- Imadi, S.R., Gul, A., Dikilitas, M., Karakas, S., Sharma, I., Ahmad, P., 2016. Water stress, in: *Water Stress and Crop Plants*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 343–355. <https://doi.org/10.1002/9781119054450.ch21>
- Islam, M.J., Kim, J.W., Begum, M.K., Soheli, M.A.T., Lim, Y.-S., 2020. Physiological and Biochemical Changes in Sugar Beet Seedlings to Confer Stress Adaptability under Drought Condition. *Plants* 9, 1511. <https://doi.org/10.3390/plants9111511>
- Ivanov, A.G., Rosso, D., Savitch, L. V., Stachula, P., Rosembert, M., Oquist, G., Hurry, V., Hüner, N.P.A., 2012. Implications of alternative electron sinks in increased resistance of PSII and

- PSI photochemistry to high light stress in cold-acclimated *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth. Res.* 113, 191–206. <https://doi.org/10.1007/s11120-012-9769-y>
- Ivanov, A.G., Sane, P. V., Hurry, V., Öquist, G., Huner, N.P.A., 2008. Photosystem II reaction centre quenching: Mechanisms and physiological role. *Photosynth. Res.* 98, 565–574. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9365-3>
- 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 Environ.* 36, 706–720. <https://doi.org/10.1111/pce.12008>
- Jakhar, S., Mukherjee, D., 2014. Chloroplast pigments, proteins, lipid peroxidation and activities of antioxidative enzymes during maturation and senescence of leaves and reproductive organs of *Cajanus cajan* L. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 20, 171–180. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0219-x>
- Jamil, M., Rehman, S. ur, Lee, K.J., Kim, J.M., Kim, H.-S., Rha, E.S., 2007. Salinity reduced growth PS2 photochemistry and chlorophyll content in radish. *Sci. Agric.* 64, 111–118. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162007000200002>
- Jiang, Y., Huang, B., 2001. Drought and Heat Stress Injury to Two Cool-Season Turfgrasses in Relation to Antioxidant Metabolism and Lipid Peroxidation. *Crop Sci.* 41, 436–442. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.412436x>
- Johnson, M.P., Goral, T.K., Duffy, C.D.P., Brain, A.P.R., Mullineaux, C.W., Ruban, A. V., 2011. Photoprotective energy dissipation involves the reorganization of photosystem II light-harvesting complexes in the grana membranes of spinach chloroplasts. *Plant Cell* 23, 1468–1479. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081646>
- Jones, H.G., Flowers, T.J., Jones, M.B., 2008. *Plants under stress: biochemistry, physiology and ecology and their application to plant improvement*. Cambridge University Press.
- Joshi, R., Sahoo, K.K., Tripathi, A.K., Kumar, R., Gupta, B.K., Pareek, A., Singla-Pareek, S.L., 2018. Knockdown of an inflorescence meristem-specific cytokinin oxidase – OsCKX2 in rice reduces yield penalty under salinity stress condition. *Plant Cell Environ.* 41, 936–946. <https://doi.org/10.1111/pce.12947>
- Karakaş, S., Çullu, M., Dikilitaş, M., 2017. Comparison of two halophyte species (*Salsola soda* and *Portulaca oleracea*) for salt removal potential under different soil salinity conditions. *Turk. J. Agric. For.* 41, 183–190. <https://doi.org/10.3906/tar-1611-82>
- Kaur, G., Asthir, B., 2015. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol. Plant.* 59, 609–619. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0549-3>
- 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 Environ.* 37, 300–311. <https://doi.org/10.1111/pce.12157>
- Keleş, Y., Öncel, I., 2002. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Sci.* 163, 783–790. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00213-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00213-3)

- Khodadadi, S., Chegini, M.A., Soltani, A., Ajam Norouzi, H., Sadeghzadeh Hemayati, S., 2020. Influence of Foliar-Applied Humic Acid and Some Key Growth Regulators on Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Under Drought Stress: Antioxidant Defense System, Photosynthetic Characteristics and Sugar Yield. Springer India.
- Kiani, R., Nazeri, V., Shokrpour, M., Hano, C., 2020. Morphological, Physiological, and Biochemical Impacts of Different Levels of Long-Term Water Deficit Stress on *Linum album* Ky. ex Boiss. Accessions. *Agronomy* 10, 1966. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121966>
- Kirchhoff, H., 2014. Structural changes of the thylakoid membrane network induced by high light stress in plant chloroplasts. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130225. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0225>
- Kirkham, M.B., 2005. Principles of soil and plant water relations. Elsevier, Burlington, MA.
- Kishor, P.B.K., Hima Kumari, P., Sunita, M.S.L., Sreenivasulu, N., 2015. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front. Plant Sci.* 6, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00544>
- Kocira, S., Szparaga, A., Hara, P., Treder, K., Findura, P., Bartoš, P., Filip, M., 2020. Biochemical and economical effect of application biostimulants containing seaweed extracts and amino acids as an element of agroecological management of bean cultivation. *Sci. Rep.* 10, 17759. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74959-0>
- Kotakis, C., Kyzeridou, A., Manetas, Y., 2014. Photosynthetic electron flow during leaf senescence: Evidence for a preferential maintenance of photosystem I activity and increased cyclic electron flow. *Photosynthetica* 52, 413–420. <https://doi.org/10.1007/s11099-014-0046-5>
- Kottmann, L., Wilde, P., Schittenhelm, S., 2016. How do timing, duration, and intensity of drought stress affect the agronomic performance of winter rye? *Eur. J. Agron.* 75, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.12.010>
- Koussevitzky, S., Suzuki, N., Huntington, S., Armijo, L., Sha, W., Cortes, D., Shulaev, V., Mittler, R., 2008. Ascorbate Peroxidase 1 Plays a Key Role in the Response of *Arabidopsis thaliana* to Stress Combination \*. *J. Biol. Chem.* 283, 34197–34203. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806337200>
- Koyro, H.W., Ahmad, P., Geissler, N., 2012. Abiotic stress responses in plants: An overview, in: *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Springer New York, pp. 1–28. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4_1)
- Kozłowski, T.T., Pallardy, S.G., 2002. Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *Bot. Rev.* 68, 270–334. [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2002\)068\[0270:AAAROW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2002)068[0270:AAAROW]2.0.CO;2)
- Kramer, P.J., Boyer, J.S., 1995. *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press.
- Kranner, I., Minibayeva, F.V., Beckett, R.P., Seal, C.E., 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol.* 188, 655–673. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x>

- Kraus, K., Hnilickova, H., Pecka, J., Lhotska, M., Bezdickova, A., Martinek, P., Kucirkova, L., Hnilicka, F., 2021. The Effect of the Application of Stimulants on the Photosynthetic Apparatus and the Yield of Winter Wheat. *Agronomy* 12, 78. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010078>
- Kříž, H., 1966. Výpar v povodí Moravy a horní Odry, in: Sborník Prací Hydrometeorologického Ústavu Československé Socialistické Republiky. HMÚ, Praha, pp. 34–58.
- Kumar, M.A., Chaturvedi, S., Söll, D., 1999. Selective inhibition of hema gene expression by photooxidation in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 51, 847–851. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00114-4)
- Kumar, R., Trivedi, K., Anand, K.G.V., Ghosh, A., 2020. Science behind biostimulant action of seaweed extract on growth and crop yield: insights into transcriptional changes in roots of maize treated with *Kappaphycus alvarezii* seaweed extract under soil moisture stressed conditions. *J. Appl. Phycol.* 32, 599–613. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01938-y>
- Kusaka, M., Lalusin, A.G., Fujimura, T., 2005a. The maintenance of growth and turgor in pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L.] Leeke) cultivars with different root structures and osmoregulation under drought stress. *Plant Sci.* 168, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.06.021>
- Kusaka, M., Ohta, M., Fujimura, T., 2005b. Contribution of inorganic components to osmotic adjustment and leaf folding for drought tolerance in pearl millet. *Physiol. Plant.* 125, 474–489. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00578.x>
- Lambers, H., Chapin III, F.S., Pons, T.L., 2008. *Plant physiological ecology*., (Springer: New York).
- Larcher, W., 2003. *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. Springer Science & Business Media.
- Larcher, W., 1994. *Ökophysiologie der pflanzen*. Eugen Ulmer Stuttgart.
- Läuchli, A., Grattan, S.R., 2007. Plant Growth And Development Under Salinity Stress, in: Jenks, M.A., Hasegawa, P.M., Jain, S.M. (Eds.), *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–32. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5578-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5578-2_1)
- Lawlor, D., 1995. Photosynthesis, productivity and environment. *Artic. J. Exp. Bot.* [https://doi.org/10.1093/jxb/46.special\\_issue.1449](https://doi.org/10.1093/jxb/46.special_issue.1449)
- Lawlor, DW., Uprety, DC., 1993. Effects of Water Stress on Photosynthesis of Crops and the Biochemical Mechanism, in: *Photosynthesis: Photoreactions to Plant Productivity*. Springer Netherlands, pp. 419–449. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2708-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2708-0_17)
- Lebrun, M., Bouček, J., Bímová, K.B., Kraus, K., Haisel, D., Kulhánek, M., Omara-Ojunga, C., Seyedsadr, S., Beesley, L., Soudek, P., Petrová, Š., Pohořelý, M., Trakal, L., 2022. Biochar in manure can suppress water stress of sugar beet (*Beta vulgaris*) and increase sucrose content in tubers. *Sci. Total Environ.* 814, 152772. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152772>

- Leufen, G., Noga, G., Hunsche, M., 2016. Drought Stress Memory in Sugar Beet: Mismatch Between Biochemical and Physiological Parameters. *J. Plant Growth Regul.* 35, 680–689. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9571-8>
- Levitt, J., 1980. Responses of Plants to Environmental Stress, 2nd Edition, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses., Responses of Plants to Environmental Stress, 2nd Edition, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. Academic Press.
- Li, G., Wan, S., Zhou, J., Yang, Z., Qin, P., 2010. Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels. *Ind. Crops Prod.* 31, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.07.015>
- Li, Y., He, N., Hou, J., Xu, L., Liu, C., Zhang, J., Wang, Q., Zhang, X., Wu, X., 2018. Factors Influencing Leaf Chlorophyll Content in Natural Forests at the Biome Scale. *Front. Ecol. Evol.* 6, 64. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00064>
- Lichtenthaler, H.K., 1998. The stress concept in plants: An introduction, in: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc., pp. 187–198. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x>
- Lichtenthaler, H.K., 1996. Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *J. Plant Physiol.* 148, 4–14. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80287-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80287-2)
- Liu, B., Asseng, S., Wang, A., Wang, S., Tang, L., Cao, W., Zhu, Y., Liu, L., 2017. Modelling the effects of post-heading heat stress on biomass growth of winter wheat. *Agric. For. Meteorol.* 247, 476–490. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.08.018>
- Liu, C., Wang, Y., Pan, K., Wang, Q., Liang, J., Jin, Y., Tariq, A., 2017. The Synergistic Responses of Different Photoprotective Pathways in Dwarf Bamboo (*Fargesia rufa*) to Drought and Subsequent Rewatering. *Front. Plant Sci.* 8.
- Löw, M., Herbinger, K., Nunn, A.J., Häberle, K.-H., Leuchner, M., Heerdt, C., Werner, H., Wipfler, P., Pretzsch, H., Tausz, M., Matyssek, R., 2006. Extraordinary drought of 2003 overrules ozone impact on adult beech trees (*Fagus sylvatica*). *Trees* 20, 539–548. <https://doi.org/10.1007/s00468-006-0069-z>
- Ludlow, M.M., Chu, A.C.P., Clements, R.J., Kerslake, R.G., 1983. Adaptation of species of *Centrosema* to water stress (*Macroptilium atropurpureum*). *Aust. J. Plant Physiol.* 10, 119–130. <https://doi.org/10.1071/PP9830119>
- Lynch, J.P., Brown, K.M., 2012. New roots for agriculture: exploiting the root phenome. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 1598–1604. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0243>
- Ma, J., Du, G., Li, X., Zhang, C., Guo, J., 2015. A major locus controlling malondialdehyde content under water stress is associated with Fusarium crown rot resistance in wheat. *Mol. Genet. Genomics* 290, 1955–1962. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1053-3>
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P., Sohrabi, Y., 2011. Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *Aust. J. Crop Sci.* 5, 1255–1260.

- Mafakheri, A., Siosemardeh, A.F., Bahramnejad, B., Struik, P.C., Sohrabi, Y., 2010. Effect of Drought Stress on Yield, Proline and Chlorophyll Contents in Three Chickpea Cultivars. *Aust. J. Crop Sci.* 4, 580–585.
- Manivannan, P., Jaleel, C.A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Lakshmanan, G.M.A., Panneerselvam, R., 2007. Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 59, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.05.002>
- Maroco, J.P., Breia, E., Faria, T., Pereira, J.S., Chaves, M.M., 2002a. Effects of long-term exposure to elevated CO<sub>2</sub> and N fertilization on the development of photosynthetic capacity and biomass accumulation in *Quercus suber* L. *Plant Cell Environ.* 25, 105–113. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00800.x>
- Maroco, J.P., Rodrigues, M.L., Lopes, C., Chaves, M.M., 2002b. Limitations to leaf photosynthesis in field-grown grapevine under drought - Metabolic and modelling approaches. *Funct. Plant Biol.* 29, 451–459. <https://doi.org/10.1071/PP01040>
- Martinková, J., Hejník, V., Hnilička, F., 2007. The effect of the aridisation of a habitat on the accumulation capability of sink in selected varieties of spring barley. *Cereal Res. Commun.* 35, 1305–1308. <https://doi.org/10.1556/crc.35.2007.2.285>
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- McNeil, S.D., Nuccio, M.L., Hanson, A.D., 1999. Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* 120, 945–949. <https://doi.org/10.1104/pp.120.4.945>
- Meloni, D.A., Gulotta, M.R., Martínez, C.A., Oliva, M.A., 2004. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. *Braz. J. Plant Physiol.* 16, 39–46. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202004000100006>
- Meng, Y., Yin, C., Zhou, Z., Meng, F., 2018. Increased salinity triggers significant changes in the functional proteins of ANAMMOX bacteria within a biofilm community. *Chemosphere* 207, 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.076>
- Meyer, S., de Kouchkovsky, Y., 1992. ATPase state and activity in thylakoids from normal and water-stressed lupin. *FEBS Lett.* 303, 233–236. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80527-N](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80527-N)
- Mittler, R., 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 11, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002>
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Mittler, R., Blumwald, E., 2010. Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 443–62. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112116>



- Mittler, R., Merquiol, E., Hallak-Herr, E., Rachmilevitch, S., Kaplan, A., Cohen, M., 2001. Living under a 'dormant' canopy: a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetam*. *Plant J.* 25, 407–416. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00975.x>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490–498.
- Mokronosov, A.T., Borzenkova, R.A., 1978. Procedure of quantitative estimation of the structure and functional activity of photosynthesizing tissues and organs. *Tr. Po Prikl. Bot. Genet. Sel.*
- Moore, C.E., Meacham-Hensold, K., Lemonnier, P., Slattery, R.A., Benjamin, C., Bernacchi, C.J., Lawson, T., Cavanagh, A.P., 2021. The effect of increasing temperature on crop photosynthesis: from enzymes to ecosystems. *J. Exp. Bot.* 72, 2822–2844. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab090>
- Morgan, J.M., 2000. Increases in grain yield of wheat by breeding for an osmoregulation gene: Relationship to water supply and evaporative demand. *Aust. J. Agric. Res.* 51, 971–978. <https://doi.org/10.1071/AR00062>
- Morgan, J.M., 1984. Osmoregulation and Water Stress in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 299–319. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001503>
- Mot'ková, K., Podlipná, R., Vaněk, T., Kafka, Z., 2014. Halofytní rostliny a jejich možné využití ve fytořemediacích. *Chem. Listy* 108, 586–591.
- Mouradi, M., Farissi, M., Bouizgaren, A., Makoudi, B., Kabbadj, A., Very, A.-A., Sentenac, H., Qaddourya, A., Ghoulam, C., 2016. Effects of water deficit on growth, nodulation and physiological and biochemical processes in *Medicago sativa*-rhizobia symbiotic association. *Arid Land Res. Manag.* 30, 193–208. <https://doi.org/10.1080/15324982.2015.1073194>
- Mubarak, M.U., Zahir, M., Ahmad, S., Wakeel, A., 2016. Sugar beet yield and industrial sugar contents improved by potassium fertilization under scarce and adequate moisture conditions. *J. Integr. Agric.* 15, 2620–2626. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61252-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61252-7)
- Müller, P., Li, X.P., Niyogi, K.K., 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125, 1558–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>
- Mulry, K.R., Hanson, B.A., Dudle, D.A., 2015. Alternative Strategies in Response to Saline Stress in Two Varieties of *Portulaca oleracea* (Purslane). *PLOS ONE* 10, e0138723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138723>
- Munns, R., 1988. Why measure osmotic adjustment? *Aust. J. Plant Physiol.* 15, 717–726. <https://doi.org/10.1071/PP9880717>
- Munns, R., Gilliham, M., 2015. Salinity tolerance of crops—what is the cost? *New Phytol.* 208, 668–673.
- Munns, R., King, R.W., 1988. Abscisic Acid Is Not the Only Stomatal Inhibitor in the Transpiration Stream of Wheat Plants. *Plant Physiol.* 88, 703–708. <https://doi.org/10.1104/pp.88.3.703>

- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Naeem, M.S., Jin, Z.L., Wan, G.L., Liu, D., Liu, H.B., Yoneyama, K., Zhou, W.J., 2010. 5-Aminolevulinic acid improves photosynthetic gas exchange capacity and ion uptake under salinity stress in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Soil* 332, 405–415. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0306-5>
- Naeem, M.S., Warusawitharana, H., Liu, H., Liu, D., Ahmad, R., Waraich, E.A., Xu, L., Zhou, W., 2012. 5-Aminolevulinic acid alleviates the salinity-induced changes in *Brassica napus* as revealed by the ultrastructural study of chloroplast. *Plant Physiol. Biochem.* 57, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.018>
- Naidoo, G., Naidoo, K.K., 2018. Drought stress effects on gas exchange and water relations of the invasive weed *Chromolaena odorata*. *Flora* 248, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.08.008>
- Nayyar, H., Gupta, D., 2006. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. *Environ. Exp. Bot.* 58, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.06.021>
- Nelson, D.M., Hu, F.S., Michener, R.H., 2006. Stable-carbon isotope composition of Poaceae pollen: an assessment for reconstructing C3 and C4 grass abundance. *The Holocene* 16, 819–825. <https://doi.org/10.1191/0959683606hol974rp>
- Nguyen, N.T. et al., 2010. Effect of Salinity on Growth, Mineral Composition, Photosynthesis and Water Relations of Two Vegetable Crops; New Zealand Spinach (*Tetragonia tetragonioides*) and Water Spinach (*Ipomoea aquatica*). *Int. J. Agric. Biol. J Agric Biol* 12, 211–216.
- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M., 1996. *Physiology of plants under stress. Abiotic factors.*, Physiology of plants under stress. Abiotic factors. John Wiley and Sons, New York, USA.
- Niu, G., Cabrera, R.I., 2010. Growth and physiological responses of landscape plants to saline water irrigation: A review. *HortScience* 45, 1605–1609.
- Ober, E.S., Bloa, M.L., Clark, C.J.A., Royal, A., Jaggard, K.W., Pidgeon, J.D., 2005. Evaluation of physiological traits as indirect selection criteria for drought tolerance in sugar beet. *Field Crops Res.* 91, 231–249. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.07.012>
- Pääkkönen, E., Vahala, J., Pohjola, M., Holopainen, T., Kärenlampi, L., 1998. Physiological, stomatal and ultrastructural ozone responses in birch (*Betula pendula* Roth.) are modified by water stress. *Plant Cell Environ.* 21, 671–684. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00303.x>
- Pačuta, V., Rašovský, M., Michalska-Klimczak, B., Wyszyński, Z., 2021. Grain Yield and Quality Traits of Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) Treated with Seaweed- and Humic Acid-Based Biostimulants. *Agronomy* 11, 1270. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071270>
- Paleckiene, R., Sviklas, A., Šlinkšiene, R., 2007. Physicochemical properties of a microelement fertilizer with amino acids. *Russ. J. Appl. Chem.* 80, 352–357. <https://doi.org/10.1134/S1070427207030020>

- Pandey, M., Shrestha, J., Subedi, S., Shah, K.K., 2020. ROLE OF NUTRIENTS IN WHEAT: A REVIEW. *Trop. Agrobiodiversity* 1, 18–23. <https://doi.org/10.26480/trab.01.2020.18.23>
- Paul, K., Sorrentino, M., Lucini, L., Roupshael, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., Reynaud, H., Canaguier, R., Trtílek, M., Panzarová, K., Colla, G., 2019. Understanding the Biostimulant Action of Vegetal-Derived Protein Hydrolysates by High-Throughput Plant Phenotyping and Metabolomics: A Case Study on Tomato. *Front. Plant Sci.* 10, 47. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00047>
- Peltzer, D., Dreyer, E., Polle, A., 2002. Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 141–150. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01352-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01352-3)
- Peng, S., Krieg, D.R., 1992. Gas Exchange Traits and Their Relationship to Water Use Efficiency of Grain Sorghum. *Crop Sci.* 32, 386–391. <https://doi.org/10.2135/cropsci1992.0011183x003200020022x>
- Pérez-Pérez, J.G., Robles, J.M., Tovar, J.C., Botía, P., 2009. Response to drought and salt stress of lemon ‘Fino 49’ under field conditions: Water relations, osmotic adjustment and gas exchange. *Sci. Hortic.* 122, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.04.009>
- Perl, A., Perl-Treves, R., Galili, S., Aviv, D., Shalgi, E., Malkin, S., Galun, E., 1993. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu,Zn superoxide dismutases. *Theor. Appl. Genet.* 85, 568–576. <https://doi.org/10.1007/BF00220915>
- Pinheiro, C., Chaves, M.M., 2011. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *J. Exp. Bot.* 62, 869–882. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq340>
- Piterková, J., Tománková, I., Luhová, L., Pet, M., 2005. OXIDATIVNÍ STRES: LOKALIZACE TVORBY AKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU A JEJICH DEGRADACE V ROSTLINNÉM ORGANISMU. *Chem Listy*.
- Pitman, M.G., Läuchli, A., 2002. Global Impact of Salinity and Agricultural Ecosystems, in: Läuchli, A., Lüttge, U. (Eds.), *Salinity: Environment - Plants - Molecules*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 3–20. [https://doi.org/10.1007/0-306-48155-3\\_1](https://doi.org/10.1007/0-306-48155-3_1)
- Pnueli, L., Hallak-Herr, E., Rozenberg, M., Cohen, M., Goloubinoff, P., Kaplan, A., Mittler, R., 2002. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J.* 31, 319–330.
- Popko, M., Michalak, I., Wilk, R., Gramza, M., Chojnacka, K., Górecki, H., 2018. Effect of the New Plant Growth Biostimulants Based on Amino Acids on Yield and Grain Quality of Winter Wheat. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* 23, 470. <https://doi.org/10.3390/molecules23020470>
- Pradet, A., Raymond, P., 1983. Adenine Nucleotide Ratios and Adenylate Energy Charge in Energy Metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34, 199–224. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.34.060183.001215>

- Qayyum, A., Razzaq, A., Ahmad, M., Jenks, M.A., 2011. Water stress causes differential effects on germination indices, total soluble sugar and proline content in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 14038–14045. <https://doi.org/10.5897/ajb11.2220>
- Quirk, J.P., 1986. Soil permeability in relation to sodicity and salinity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.* 316, 297–317.
- Rahdari, P., Hosseini, S.M., Tavakoli, S., 2012. The studying effect of drought stress on germination, proline, sugar, lipid, protein and chlorophyll content in purslane (*Portulaca oleracea* L.) leaves. *J Med Plants Res* 6, 1539–1547.
- Ranieri, A., Castagna, A., Baldan, B., Soldatini, G.F., 2001. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *J. Exp. Bot.* 52, 25–35. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.354.25>
- Redillas, M.C.F.R., Jeong, J.S., Kim, Y.S., Jung, H., Bang, S.W., Choi, Y.D., Ha, S.H., Reuzeau, C., Kim, J.K., 2012a. The overexpression of OsNAC9 alters the root architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. *Plant Biotechnol. J.* 10, 792–805. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00697.x>
- Redillas, M.C.F.R., Park, S.H., Lee, J.W., Kim, Y.S., Jeong, J.S., Jung, H., Bang, S.W., Hahn, T.R., Kim, J.K., 2012b. Accumulation of trehalose increases soluble sugar contents in rice plants conferring tolerance to drought and salt stress. *Plant Biotechnol. Rep.* 6, 89–96. <https://doi.org/10.1007/s11816-011-0210-3>
- Rengasamy, P., 2010. Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Funct. Plant Biol.* 37, 613–620.
- Rhodes, D., Hanson, A.D., 1993. Quaternary Ammonium and Tertiary Sulfonium Compounds in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 357–384. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.44.060193.002041>
- 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 Environ.* 37, 1059–1073. <https://doi.org/10.1111/pce.12199>
- Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R., 2002. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiol.* 130, 1143–1151. <https://doi.org/10.1104/pp.006858>
- 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 Physiol.* 134, 1683–1696. <https://doi.org/10.1104/pp.103.033431>
- Rontein, D., Basset, G., Hanson, A.D., 2002. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab. Eng.* 4, 49–56. <https://doi.org/10.1006/mben.2001.0208>
- Rouphael, Y., Colla, G., 2018. Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* 9, 1655. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01655>

- Rožnovský, J., Chuchma, F., Fiala, R., 2018. Základní vláhové bilance na území ČR v suchých letech, in: Vplyv Antropogénnej Činnosti Na Vodný Režim Nížinného Územia. Presented at the Zemplínská šírava 22.5. – 24.5.2018, Ústav hydrológie SAV Bratislava, Bratislava, pp. 223–232.
- Sage, R.F., Sharkey, T.D., Seemann, J.R., 1989. Acclimation of Photosynthesis to Elevated CO<sub>2</sub> in Five C<sub>3</sub> Species. *Plant Physiol.* 89, 590–596. <https://doi.org/10.1104/pp.89.2.590>
- Saibo, N.J.M., Lourenço, T., Oliveira, M.M., 2009. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Ann. Bot.* 103, 609–623. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn227>
- Sakamoto, A., Murata, N., 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: Clues from transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 25, 163–171. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00790.x>
- Sales, C.R.G., Ribeiro, R.V., Silveira, J.A.G., Machado, E.C., Martins, M.O., Lagôa, A.M.M.A., 2013. Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. *Plant Physiol. Biochem.* 73, 326–336. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.10.012>
- Saliendra, N.Z., Meinzer, F.C., 1991. Symplast volume, turgor, stomatal conductance and growth in relation to osmotic and elastic adjustment in droughted sugarcane. *J. Exp. Bot.* 42, 1251–1259. <https://doi.org/10.1093/jxb/42.10.1251>
- Salisbury, F.B., Ross, C.W., 1992. *Plant physiology*. Belmont, Calif. Wadsworth Pub. Co.
- Sandermann, H., 2004. Molecular Ecotoxicology: From Man-Made Pollutants to Multiple Environmental Stresses, in: Sandermann, Heinrich (Ed.), *Molecular Ecotoxicology of Plants, Ecological Studies*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–16. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-08818-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-08818-0_1)
- Santos, E.F. dos, Zanchim, B.J., Campos, A.G. de, Garrone, R.F., Lavres Junior, J., 2013. Photosynthesis rate, chlorophyll content and initial development of physic nut without micronutrient fertilization. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 37, 1334–1342. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832013000500022>
- Santos, E.F., Mateus, N.S., Rosário, M.O., Garcez, T.B., Mazzafera, P., Lavres, J., 2021. Enhancing potassium content in leaves and stems improves drought tolerance of eucalyptus clones. *Physiol. Plant.* 172, 552–563. <https://doi.org/10.1111/ppl.13228>
- Šarapatka, B., Dlapa, P., Bedrna, Z., 2002. Kvalita a degradace půdy. Univerzita Palackého.
- Savage, D.A., Jacobson, L.A., 1935. The Killing Effect of Heat and Drought on Buffalo Grass and Blue Grama Grass at Hays, Kansas. *Agron. J.* 27, 566–582. <https://doi.org/10.2134/agronj1935.00021962002700070010x>
- Savin, R., Nicolas, M.E., 1996. Effects of Short Periods of Drought and High Temperature on Grain Growth and Starch Accumulation of Two Malting Barley Cultivars. *Funct. Plant Biol.* 23, 201–210. <https://doi.org/10.1071/pp9960201>

- Scheuermann, R., Biehler, K., Stuhlfauth, T., Fock, H.P., 1991. Simultaneous gas exchange and fluorescence measurements indicate differences in the response of sunflower, bean and maize to water stress. *Photosynth. Res.* 27, 189–197. <https://doi.org/10.1007/BF00035840>
- Schmidt, C., Mrnka, L., Frantík, T., Bárnét, M., Vosátka, M., Švecová, E., 2020. Impact of protein hydrolysate biostimulants on growth of barley and wheat and their interaction with symbionts and pathogens. *Agric. Food Sci.* 29. <https://doi.org/10.23986/afsci.84790>
- Schulze, E., Beck, E., Müller-Hohenstein, K., 2005. Environment as stress factor: stress physiology of plants. *Plant Ecol.* 702, 7–11.
- Scott, P., 2008. *Physiology and Behaviour of Plants*. John Wiley and Sons, New York, USA.
- Selye, H., 1973. The Evolution of the Stress Concept. *Am. Sci.* 61, 692–699.
- Shahrajabian, M.H., Chaski, C., Polyzos, N., Petropoulos, S.A., 2021. Biostimulants Application: A Low Input Cropping Management Tool for Sustainable Farming of Vegetables. *Biomolecules* 11, 698. <https://doi.org/10.3390/biom11050698>
- Shao, H., Wang, H., Tang, X., 2015. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Front. Plant Sci.* 6.
- Shao, H.-B., Guo, Q.-J., Chu, L.-Y., Zhao, X.-N., Su, Z.-L., Hu, Y.-C., Cheng, J.-F., 2007a. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 54, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.07.002>
- Shao, H.-B., Jiang, S.-Y., Li, F.-M., Chu, L.-Y., Zhao, C.-X., Shao, M.-A., Zhao, X.-N., Li, F., 2007b. Some advances in plant stress physiology and their implications in the systems biology era. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 54, 33–36. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.05.011>
- Sharma, H.S.S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J.R., Martin, T., 2014. Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *J. Appl. Phycol.* 26, 465–490. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0101-9>
- Shoeva (Tereshchenko), O., Gordeeva, E., V.S, A., Börner, A., Khlestkina, E., 2012. The D Genome Carries a Gene Determining Purple Grain Colour in Wheat. *Cereal Res. Commun.* 40, 334–341. <https://doi.org/10.1556/CRC.40.2012.3.2>
- Siahpoosh, M.R., Dehghanian, E., 2012. Water Use Efficiency, Transpiration Efficiency, and Uptake Efficiency of Wheat during Drought. *Agron. J.* 104, 1238–1243. <https://doi.org/10.2134/agronj2011.0320>
- Silva, S.F., Miranda, M.T., Cunha, C.P., Domingues-Jr, A.P., Aricetti, J.A., Caldana, C., Machado, E.C., Ribeiro, R.V., 2023. Metabolic profiling of drought tolerance: Revealing how citrus rootstocks modulate plant metabolism under varying water availability. *Environ. Exp. Bot.* 206, 105169. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105169>
- Slama, I., Messedi, D., Ghnaya, T., Savoure, A., Abdelly, C., 2006. Effects of water deficit on growth and proline metabolism in *Sesuvium portulacastrum*. *Environ. Exp. Bot.* 56, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.02.007>

- Slatyer, R.O., Markus, D.K., 1968. Plant-water relationships. *Soil Sci.* 106, 478.
- Sourour, A., Afef, O., Mounir, R., Younes Mongi, B., 2017. A review: Morphological, physiological, biochemical and molecular plant responses to water deficit stress. *Int. J. Eng. Sci.* 6, 1–4. <https://doi.org/10.9790/1813-0601010104>
- Sperry, J.S., Hacke, U.G., Oren, R., Comstock, J.P., 2002. Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant Cell Environ.* 25, 251–263. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00799.x>
- Srivastava, G., Kumar, S., Dubey, G., Mishra, V., Prasad, S.M., 2012. Nickel and Ultraviolet-B Stresses Induce Differential Growth and Photosynthetic Responses in *Pisum sativum* L. Seedlings. *Biol. Trace Elem. Res.* 149, 86–96. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9406-9>
- Středa, T., Dostál, V., Horáková, V., Chloupek, O., 2012. Effective use of water by wheat varieties with different root system sizes in rain-fed experiments in Central Europe. *Agric. Water Manag.* 104, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2011.12.018>
- Subbarao, G.V., Nam, N.H., Chauhan, Y.S., Johansen, C., 2000. Osmotic adjustment, water relations and carbohydrate remobilization in pigeonpea under water deficits. *J. Plant Physiol.* 157, 651–659. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80008-5)
- Sudhir, P., Murthy, S.D.S., 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* 42, 481–486. <https://doi.org/10.1007/S11099-005-0001-6>
- Sullivan, J.H., Teramura, A.H., 1990. Field Study of the Interaction between Solar Ultraviolet-B Radiation and Drought on Photosynthesis and Growth in Soybean 1. *Plant Physiol.* 92, 141–146. <https://doi.org/10.1104/pp.92.1.141>
- Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R., 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol.* 203, 32–43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>
- Szabados, L., Savouré, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
- Takele, A., Farrant, J., 2013. Water relations, gas exchange characteristics and water use efficiency in maize and sorghum after exposure to and recovery from pre and post-flowering dehydration. *Afr. J. Agric. Res.* 8, 6468–6478. <https://doi.org/10.5897/AJAR09.588>
- Tanaka, A., Tanaka, Y., Tsuji, H., 1993. Preferential accumulation of apoproteins of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex in greening barley leaves treated with 5-aminolevulinic acid. *Planta* 192, 92–97. <https://doi.org/10.1007/BF00198697>
- Tanaka, Y., Tanaka, A., Tsuji, H., 1993. Effects of 5-Aminolevulinic Acid on the Accumulation of Chlorophyll b and Apoproteins of the Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Protein Complex of Photosystem II. *Plant Cell Physiol.* 34, 465–472. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078441>
- Tanaka, Y., Tanaka, A., Tsuji, H., 1992. Stabilization of apoproteins of light-harvesting chlorophyll-a/b protein complex by feeding 5-aminolevulinic acid under intermittent illumination. *Plant Physiol. Biochem. Paris* 30, 365–370.

- Tang, H., Vasconcelos, A.C., Ma, J., Berkowitz, G.A., 1998. In vivo expression pattern of a plant K<sup>+</sup> channel  $\beta$  subunit protein. *Plant Sci.* 134, 117–128. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00063-6)
- Tangpremsri, T., Fukai, S., Fischer, K.S., 1995. Growth and yield of sorghum lines extracted from a population for differences in osmotic adjustment. *Aust. J. Agric. Res.* 46, 61–74. <https://doi.org/10.1071/AR9950061>
- Tangpremsri, T., Fukai, S., Fischer, K.S., Henzell, R.G., 1991a. Genotypic variation in osmotic adjustment in grain sorghum. I.\* Development of variation in osmotic adjustment under water-limited conditions. *Aust. J. Agric. Res.* 42, 747–757. <https://doi.org/10.1071/AR9910747>
- Tangpremsri, T., Fukai, S., Fischer, K.S., Henzell, R.G., 1991b. Genotypic variation in osmotic adjustment in grain sorghum. II.\* Relation with some growth attributes. *Aust. J. Agric. Res.* 42, 759–767. <https://doi.org/10.1071/AR9910759>
- Tanure, M.M.C., da Costa, L.M., Huiz, H.A., Fernandes, R.B.A., Cecon, P.R., Pereira Junior, J.D., da Luz, J.M.R., 2019. Soil water retention, physiological characteristics, and growth of maize plants in response to biochar application to soil. *Soil Tillage Res.* 192, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.05.007>
- Tarakhovskaya, E.R., Maslov, Yu.I., Shishova, M.F., 2007. Phytohormones in algae. *Russ. J. Plant Physiol.* 54, 163–170. <https://doi.org/10.1134/S1021443707020021>
- Ton, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 14, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.006>
- Van Oosten, M.J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S., Maggio, A., 2017. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4, 5. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
- Verslues, P.E., Bailey-Serres, J., Brodersen, C., Buckley, T.N., Conti, L., Christmann, A., Dinneny, J.R., Grill, E., Hayes, S., Heckman, R.W., Hsu, P.-K., Juenger, T.E., Mas, P., Munnik, T., Nelissen, H., Sack, L., Schroeder, J.I., Testerink, C., Tyerman, S.D., Umezawa, T., Wigge, P.A., 2023. Burning questions for a warming and changing world: 15 unknowns in plant abiotic stress. *Plant Cell* 35, 67–108. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac263>
- Verslues, P.E., Zhu, J.-K., 2007. New developments in abscisic acid perception and metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol., Cell Signalling and Gene Regulation* 10, 447–452. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.004>
- Voronin, P.Y., Rakhmankulova, Z.F., Maevskaia, S.N., Nikolaeva, M.K., Shuiskaya, E. V., 2014. Changes in photosynthesis caused by adaptation of maize seedlings to short-term drought. *Russ. J. Plant Physiol.* 61, 131–135. <https://doi.org/10.1134/S1021443714010178>
- Wang, L., Jiang, W.-B., Liu, H., Liu, W.-Q., Kang, L., Hou, X.-L., 2005. Promotion by 5-Aminolevulinic Acid of Germination of Pakchoi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* Tsen et Lee) Seeds Under Salt Stress. *J. Integr. Plant Biol.* 47, 1084–1091. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00150.x>



- Wang, L.J., Jiang, W.B., Huang, B.J., 2004. Promotion of 5-aminolevulinic acid on photosynthesis of melon (*Cucumis melo*) seedlings under low light and chilling stress conditions. *Physiol. Plant.* 121, 258–264. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00319.x>
- Wang, X., Li, Y., Lu, H., Wang, S., 2016. Combined effects of elevated temperature and CO<sub>2</sub> concentration on Cd and Zn accumulation dynamics in *Triticum aestivum* L. *J. Environ. Sci.* 47, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.11.029>
- Ward, JoY.K., Tissue, D.T., Thomas, R.B., and, ., Strain, BoyD.R., 1999. Comparative responses of model C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants to drought in low and elevated CO<sub>2</sub>. *Glob. Change Biol.* 5, 857–867. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.1999.00270.x>
- Weinstein, D.A., Beloin, R.M., Yanai, R.D., 1991. Modeling changes in red spruce carbon balance and allocation in response to interacting ozone and nutrient stresses<sup>1</sup>. *Tree Physiol.* 9, 127–146. <https://doi.org/10.1093/treephys/9.1-2.127>
- Wen, X., Qiu, N., Lu, Q., Lu, C., 2005. Enhanced thermotolerance of photosystem II in salt-adapted plants of the halophyte *Artemisia anethifolia*. *Planta* 220, 486–497.
- Wenkert, W., Lemon, E.R., Sinclair, T.R., 1978a. Changes in Water Potential During Pressure Bomb Measurement<sup>1</sup>. *Agron. J.* 70, 353–355. <https://doi.org/10.2134/agronj1978.00021962007000020033x>
- Wenkert, W., Lemon, E.R., Sinclair, T.R., 1978b. Water Content-Potential Relationship in Soya Bean: Changes in Component Potentials for Mature and Immature Leaves under Field Conditions\*. *Ann. Bot.* 42, 295–307. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a085460>
- Wenkert, W., Lemon, E.R., Sinclair, T.R., 1978c. Leaf Elongation and Turgor Pressure in Field-grown Soybean<sup>1</sup>. *Agron. J.* 70, 761–764. <https://doi.org/10.2134/agronj1978.00021962007000050016x>
- Wilhelm, C., Selmar, D., 2011. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 168, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.07.012>
- Wilhite, D., 2000. Chapter 1 Drought as a Natural Hazard: Concepts and Definitions. *Drought Mitig. Cent. Fac. Publ.*
- Wilhite, D.A., 2005. *Drought and water crises: science, technology, and management issues*. Crc Press.
- Wilhite, D.A., 1991. Drought, in: *Encyclopedia of Earth System Science*. Academic Press, W.A. Nierenberg, pp. 81–92.
- Wilkinson, S., Davies, W.J., 2009. Ozone suppresses soil drying - and abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure via an ethylene-dependent mechanism. *Plant Cell Environ.* 32, 949–959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01970.x>
- Xing, J.-C., Dong, J., Wang, M.-W., Liu, C., Zhao, B.-Q., Wen, Z.-G., Zhu, X.-M., Ding, H.-R., Zhao, X.-H., Hong, L.-Z., 2019. Effects of NaCl stress on growth of *Portulaca oleracea* and underlying mechanisms. *Braz. J. Bot.* 42, 217–226. <https://doi.org/10.1007/s40415-019-00526-1>

- Yan, C., Shen, H., Li, Q., He, Z., 2006. A novel ABA-hypersensitive mutant in *Arabidopsis* defines a genetic locus that confers tolerance to xerothermic stress. *Planta* 224, 889–899. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0272-6>
- Yan, W., Zhong, Y., Shangguan, Z., 2017. Responses of different physiological parameter thresholds to soil water availability in four plant species during prolonged drought. *Agric. For. Meteorol.* 247, 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.08.017>
- Yancey, P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* 208, 2819–2830. <https://doi.org/10.1242/jeb.01730>
- Yancey, P.H., 1994. Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation, in: Strange, K. (Ed.), *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. CRC Press, pp. 81–109.
- Yang, A., Akhtar, S.S., Li, L., Fu, Q., Li, Q., Naeem, M.A., He, X., Zhang, Z., Jacobsen, S.-E., 2020. Biochar Mitigates Combined Effects of Drought and Salinity Stress in Quinoa. *Agronomy* 10, 912. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060912>
- Yang, X., Lu, M., Wang, Yufei, Wang, Yiran, Liu, Z., Chen, S., 2021. Response Mechanism of Plants to Drought Stress. *Horticulturae* 7, 50. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030050>
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., Yoshida, S., Nakashita, H., 2008. Antagonistic Interaction between Systemic Acquired Resistance and the Abscisic Acid–Mediated Abiotic Stress Response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 1678–1692. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054296>
- Yazici, I., Türkan, I., Sekmen, A.H., Demiral, T., 2007. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Environ. Exp. Bot.* 61, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.02.010>
- Yu, H., Zou, W., Chen, J., Chen, H., Yu, Z., Huang, J., Tang, H., Wei, X., Gao, B., 2019. Biochar amendment improves crop production in problem soils: A review. *J. Environ. Manage.* 232, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.117>
- Zaman, S., Shah, S., Jiang, Y., Che, S., 2018. Saline conditions alter morpho-physiological intensification in purslane (*Portulaca oleracea* l.). *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 32, 635–639.
- Zhang, J., Li, D., Gao, Y., Yu, B., Xia, C., Bai, J., 2012. Pretreatment with 5-aminolevulinic acid mitigates heat stress of cucumber leaves. *Biol. Plant.* 56, 780–784. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0136-9>
- Zhang, P., Yang, F., Zhang, H., Liu, L., Liu, X., Chen, J., Wang, X., Wang, Y., Li, C., 2020. Beneficial Effects of Biochar-Based Organic Fertilizer on Nitrogen Assimilation, Antioxidant Capacities, and Photosynthesis of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) under Saline-Alkaline Stress. *Agronomy* 10, 1562. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101562>

- Zhang, W., Wang, Y., Luo, G., Zhang, J., He, C., Wu, X., Gai, J., Chen, S., 2004. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. *Theor Appl Genet* 108, 1131–1139. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1527-2>
- Zhang, Z., Li, H., Zhou, W., Takeuchi, Y., Yoneyama, K., 2006. Effect of 5-aminolevulinic acid on development and salt tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers in vitro. *Plant Growth Regul.* 49, 27–34. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-0011-9>
- Zivcak, M., Brestic, M., Balatova, Z., Drevenakova, P., Olsovska, K., Kalaji, H.M., Yang, X., Allakhverdiev, S.I., 2013. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. *Photosynth. Res.* 117, 529–546. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9885-3>
- Zivcak, M., Brestic, M., Olsovska, K., 2008. Application of Photosynthetic Parameters in the Screening of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes for Improved Drought and High Temperature Tolerance, in: Allen, J.F., Gantt, E., Golbeck, J.H., Osmond, B. (Eds.), *Photosynthesis. Energy from the Sun*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1247–1250. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6709-9\\_269](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6709-9_269)