

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

DOKTORSKÁ DISERTAČNÍ PRÁCE

2013

Ing. Lenka Němcová

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra botaniky a fyziologie rostlin

Fyziologické adaptační reakce slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) k nízkým teplotám

doktorská disertační práce

Autor: Ing. Lenka Němcová
Školitel: doc. Ing. Václav Hejnák, Ph.D.
Školitelé specialisti: Ing. František Hnilička, Ph.D.
prof. Philippe Grieu, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci na téma „Fyziologické adaptační reakce slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) k nízkým teplotám“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu použité literatury.

V Praze dne:

.....

podpis autora práce

Poděkování

Děkuji především svému školiteli doc. Ing. Václavu Hejnákovi, Ph.D. a dále školitelům specialistům Ing. Františkovi Hniličkovi, Ph.D. a prof. Philippu Grieu, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a konzultace při zpracování této doktorské disertační práce. Dále děkuji všem členům Katedry botaniky a fyziologie rostlin (FAPPZ, ČZU v Praze) a Laboratoire des interactions plantes-microorganismes (INRA, Toulouse) za podporu a pomoc během mého doktorského studia.

ABSTRAKT

Slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) patří díky vysoké kvalitě a dietetické hodnotě oleje mezi celosvětově nejvýznamnější olejninu. Rovněž pěstování slunečnice v České republice má svou tradici a ČR se s průměrným výnosem 2,2 t ha⁻¹ řadí mezi světovou špičku. Ačkoliv je slunečnice přizpůsobivá různým podmínkám prostředí a poměrně suchovzdorná, problematickým je působení vodního stresu v období kvetení, kdy je tato plodina na nedostatek vody nejcitlivější. Vodní stres v období kvetení způsobuje významnou redukci výnosu a olejnatosti nažek. Jedním z řešení je časnější termín výsevu s cílem posunutí celého ontogenetického vývoje a vyhnutí se vodnímu stresu v období kvetení. V úvahu přicházejí dvě možnosti: (i) podzimní výsev (např. Španělsko), (ii) časný jarní výsev (např. Francie a ČR). Pro časnější výsev je však nezbytná odolnost slunečnice k nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu. Cílem této práce je stanovení fyziologické variability souboru genotypů slunečnice roční z hlediska odolnosti k nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu a stanovení nejrelevantnějších fyziologických ukazatelů její odolnosti k nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu. Byly provedeny dva pokusy s různými genotypy slunečnice roční, podmínkami působení stresu mrazovou teplotou, termíny měření a sledovanými fyziologickými charakteristikami. Z výsledků pokusů vyplývají rozdílné reakce genotypů ve fyziologických charakteristikách před a po působení stresu mrazovou teplotou (vliv genotypu). Rovněž se potvrdila rozdílnost reakcí mezi genotypy při působení dvou mrazových teplot i odlišné reakce stejného genotypu na působení těchto mrazových teplot (vliv teploty). Za nejrelevantnější ukazatele pro studium fyziologických reakcí a odolnosti slunečnice roční při působení nízkých teplot na počátku vegetativního růstu lze označit rychlost čisté fotosyntézy (P_N), fluorescenci chlorofylu *a* (F_v/F_M), relativní výtok elektrolytů ($REL_{\%}$) a osmotický potenciál (Ψ_{π}). Za vhodné lze považovat také měření vodivosti průduchů (g_s) a koncentrace chlorofylu *a* a *b* (c_a , c_b). Pouze jako doplňkový ukazatel je možné doporučit měření rychlosti transpirace (E), naopak ukazatelem nevhodným je sledování změn efektivity využití vody (WUE). Výsledky práce mohou přispět k lepšímu pochopení mechanismů odolnosti slunečnice k nízkým teplotám. Je však nezbytné pokračovat v další experimentální činnosti v laboratorních i polních podmínkách. Nejodolnější genotyp nalezený v námi testovaném souboru (PAC2) může být využit jako genetický zdroj při šlechtění slunečnice roční z hlediska odolnosti k nízkým teplotám nebo přímo v agronomické praxi.

Klíčová slova: slunečnice roční, časný výsev, stres nízkou teplotou, fyziologické reakce

SUMMARY

Common sunflower (*Helianthus annuus* L.) is due to high quality and dietetic value of its oil one of the most important oil crops worldwide. Also cultivation of sunflower in the Czech Republic has a tradition and with the average yield of 2.2 t ha⁻¹ belongs among the world leaders. Although sunflower is adaptable to different environmental conditions and relatively drought-resistant, water stress acting during flowering period, when the crop is the most sensitive to water deficit, is problematic. Water stress during flowering period causes significant reduction of yield and achenes oiliness. One of the solutions is an earlier sowing date, when two possibilities can be considered: (i) autumn sowing (e. g. Spain), (ii) early spring sowing (e. g. France and the Czech Republic). However, resistance of sunflower to low temperatures at the beginning of vegetative growth is necessary for the earlier sowing. The objective of this thesis is assessment of physiological variability of the collection of common sunflower genotypes in terms of low temperatures resistance at the beginning of vegetative growth and assessment of the most relevant physiological indicators of its low temperatures resistance at the beginning of vegetative growth. Two experiments were conducted with different genotypes of common sunflower, conditions of freezing temperatures stress treatment, terms of measurements and monitored physiological traits. From the results of the experiments follow different responses of the genotypes in physiological traits before and after the freezing temperature treatment (impact of genotype). Variability of responses among the genotypes during two freezing temperatures treatment and different responses of the same genotype to the freezing temperatures acting were also found (impact of temperature). As the most relevant indicators for study of physiological responses and resistance of common sunflower during low temperatures acting at the beginning of vegetative growth can be described net photosynthesis rate (P_N), chlorophyll *a* fluorescence (F_V/F_M), relative electrolyte leakage (REL%) and osmotic potential (Ψ_π). As suitable can be also considered measurements of stomatal conductance (g_s) and chlorophyll *a* and *b* concentrations (c_a , c_b). Measurement of transpiration rate (*E*) can be recommended only as an additional indicator, on the contrary monitoring of changes of water use efficiency (WUE) is inappropriate indicator. The results of the thesis can contribute to better understanding of resistance mechanisms of sunflower to low temperatures. However, it is necessary to continue further experimental work both in laboratory and field conditions. The most resistant genotype found in our tested collection (PAC2) can be used as a genetic resource for breeding of common sunflower in terms of resistance to low temperatures or directly in the agronomic practice.

Keywords: common sunflower, early sowing, low temperature stress, physiological reactions

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1. Botanická charakteristika, ekologie a rozšíření slunečnice roční (<i>Helianthus annuus</i> L.) v ČR	3
2.2. Pěstování slunečnice roční ve světě, v EU a v ČR	3
2.3. Pěstování slunečnice roční a klimatické změny.....	7
2.4. Obecná charakteristika stresu a stresové reakce	7
2.5. Slunečnice roční a teplota prostředí	10
2.6. Vodní stres a stres vysokou teplotou	11
2.6.1. Ovlivnění výnosu vodním stresem a stresem vysokou teplotou	11
2.6.2. Časnější termín výsevu.....	12
2.7. Stres nízkými teplotami	15
2.7.1. Působení nízkých teplot na rostlinu	15
2.7.1.1. Vliv nízkých teplot na fotosyntézu a fotosyntetický aparát	17
2.7.1.2. Vliv nízkých teplot na vodivost průduchů a transpiraci.....	18
2.7.1.3. Vliv nízkých teplot na efektivitu využití vody	20
2.7.1.4. Vliv nízkých teplot na vlastnosti buněčných membrán.....	21
2.7.1.5. Vliv nízkých teplot na obsah chlorofylu <i>a</i> a <i>b</i>	22
2.7.2. Působení chladu.....	23
2.7.3. Přizpůsobení chladu	24
2.7.4. Působení mrazu	25
2.7.5. Přizpůsobení mrazu.....	28
3. VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	31
3.1. Vědecké hypotézy	31
3.2. Cíle práce	31
4. MATERIÁL A METODY	32
4.1. Pokus 1 (ČR).....	32
4.1.1. Rostlinný materiál	32

4.1.2. Pěstební podmínky	32
4.1.3. Působení mrazových teplot	33
4.1.4. Sledované charakteristiky a termíny jejich měření	33
4.1.5. Metody měření sledovaných charakteristik.....	34
4.1.6. Statistické vyhodnocení získaných dat.....	37
4.2. Pokus 2 (Francie)	37
4.2.1. Rostlinný materiál	37
4.2.2. Pěstební podmínky	38
4.2.3. Působení mrazové teploty	38
4.2.4. Sledované charakteristiky a termíny jejich měření	39
4.2.5. Metody měření sledovaných charakteristik.....	44
4.2.6. Statistické vyhodnocení získaných dat.....	45
5. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	47
5.1. Rychlost čisté fotosyntézy (P_N).....	47
5.2. Rychlost transpirace (E).....	51
5.3. Vodivost průduchů (g_s)	55
5.4. Efektivita využití vody (WUE).....	59
5.5. Fluorescence chlorofylu <i>a</i> : potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_V/F_M)	62
5.6. Relativní výtok elektrolytů ($REL_{\%}$)	67
5.7. Osmotický potenciál (Ψ_{π})	72
5.8. Koncentrace chlorofylu <i>a</i> a <i>b</i> (c_a , c_b)	77
6. ZÁVĚR	84
6.1. Potvrzení stanovených hypotéz a splnění cílů práce	84
6.2. Další rozvoj vědní disciplíny a doporučení pro praxi	86
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	87

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A ZNAČEK

ABA	kyselina abscisová
ANOVA	analýza rozptylu
c	molární koncentrace rozpuštěných osmoticky aktivních látek [mol dm^{-3}]
C	měření 9 hod. před působením mrazové teploty, tj. kontrolní měření (pokus 1 - ČR), termín měření odpovídající 1. dni po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (F_V/F_M , pokus 2 - Francie)
C1	termín měření odpovídající 1. dni po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($REL_{\%}$ a Ψ_{π} , pokus 2 - Francie)
C2	termín měření odpovídající 5. dni regenerace ($REL_{\%}$ a Ψ_{π} , pokus 2 - Francie)
c_a	koncentrace chlorofylu <i>a</i> [mg g^{-1}]
c_b	koncentrace chlorofylu <i>b</i> [mg g^{-1}]
ČR	Česká republika
d	hustota vody při teplotě <i>T</i> [g cm^{-3}]
D	den
E	rychlost transpirace [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
g_s	vodivost průduchů [$\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
HI	Harvest Index, sklizňový index
ISTA	International Seed Testing Association
F_0	základní fluorescence
F_M	maximální fluorescence
F_V	variabilní fluorescence
F_V/F_M	fluorescence chlorofylu <i>a</i> : potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II
LAI	Leaf Area Index
n	počet opakování
N	noc
P_N	rychlost čisté fotosyntézy [$\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
PPFD	fotosyntetická hustota toku fotonů [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]

PS I	fotosystém I
PS II	fotosystém II
R	molární plynová konstanta ($8,31472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
r	koeficient korelace
r^2	koeficient determinace
REL ₁	měření elektrické vodivosti roztoku po 24 hod. od odběru [mS]
REL ₂	měření elektrické vodivosti roztoku po 24 hod. od dosažení maximálního poškození [mS]
REL _%	relativní výtok elektrolytů [%]
ROS	reaktivní formy kyslíku
R _C	kontrolní rostliny (pokus 2 - Francie)
R _S	stresované rostliny (pokus 2 - Francie)
RuBP	ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza, Rubisco
QTL	Quantitative Trait Locus
S1	termín měření 5 hod. po působení mrazové teploty (pokus 1 - ČR), termín měření 1. den ihned po působení teploty $-3 \text{ }^\circ\text{C}$ (pokus 2 - Francie)
S2	termín měření 3. den po působení mrazové teploty, tj. 3. den regenerace (pokus 1 - ČR), termín měření 5. den po působení stresu, tj. 5. den regenerace (pokus 2 - Francie)
S3	termín měření 7. den po působení mrazové teploty, tj. 7. den regenerace (pokus 1 - ČR)
s. e.	standardní chyba
SSD	metoda šlechtění Single Seed Descent
t	teplota [$^\circ\text{C}$]
T	teplota [K]
WUE	efektivita využití vody [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$]
Ψ_L	vodní potenciál listů [MPa]
Ψ_π	osmotický potenciál [MPa]
Φ	relativní vlhkost vzduchu [%]

1. ÚVOD

Slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) je světlomilná, obvykle krátkodenní rostlina s kultivačním optimem v teplých oblastech, původem ze Severní Ameriky. Je pěstována po celém světě; nejlepší výnosy poskytuje na bazických, živinami, zejména dusíkem bohatých, čerstvých půdách a tam, kde je dostatek opylovačů (především včel). Díky vysoké kvalitě a dietetické hodnotě oleje je slunečnice roční jednou z celosvětově nejvýznamnějších olejnin a v celosvětové produkci olejnatých semen jí patří čtvrté místo.

Největší pěstební plochy zaujímá tato plodina např. v Argentině, Rusku, ale i v zemích Evropské unie. Ačkoliv má pěstování slunečnice v České republice tradici, její pěstební plochy se začaly zvyšovat až ve 2. polovině 80. let minulého století. V posledních deseti letech se výměra pěstební plochy v České republice pohybuje v rozmezí 25 až 48 tis. ha.

Nejvyšších a zároveň nejstabilnějších výnosů dosahuje Francie s průměrným výnosem 2,33 t ha⁻¹, dále Itálie (2,21 t ha⁻¹) a Maďarsko (1,94 t ha⁻¹). Od roku 2000 dosahuje průměrný výnos v České republice hodnoty 2,20 t ha⁻¹, což Českou republiku řadí mezi světovou špičku.

Vzhledem k tolik diskutovaným klimatickým změnám a možnému postupnému oteplování planety lze předpokládat rozšíření pěstování slunečnice i do oblastí, kde by dříve bylo její pěstování nemyslitelné. Slunečnice totiž může být díky specifické stavbě orgánů pěstována i v okrajových oblastech a v semi-aridních podmínkách. V některých sušších lokalitách by slunečnice mohla díky svému mohutnému kořenovému systému, který jí umožňuje odolávat suchu a pomáhá jí k lepšímu využití vody a živin z půdy, nahradit i řepku olejku.

Ačkoliv je slunečnice přizpůsobivá různým podmínkám prostředí a poměrně suchovzdorná, problematickým v jejím pěstování zůstává působení vodního stresu v období kvetení (resp. v období začínajícím cca 20 dnů před a končícím cca 20 dnů po kvetení), kdy je tato plodina na nedostatek vody nejcitlivější. Fáze kvetení je obdobím rozhodujícím pro kvalitu a výši výnosu; vodní stres v této fázi vývoje způsobuje nejen redukci výnosu nažek, ale též snížení jejich olejnatosti.

Jedním z možných řešení je časnější termín výsevu s cílem posunutí celého ontogenetického vývoje a vyhnutí se vodnímu stresu v období kvetení. V úvahu přicházejí dvě možnosti: (i) podzimní výsev, kdy semena v nažkách přečkají zimu ve stádiu plně vyvinutých děloh (podzimní výsev byl testován např. ve Španělsku, v Itálii, Maroku a v Pakistánu), (ii) časný jarní výsev, tj. výsev přibližně o 1 měsíc dříve oproti běžné praxi,

který je předmětem výzkumu např. ve Francii, a byl by vhodný i pro pěstební podmínky v České republice. Jelikož je slunečnice roční rostlinným druhem citlivým k nízkým teplotám, je pro časnější výsev nezbytná její odolnost k nízkým teplotám působícím na počátku vegetativního růstu.

Nízká teplota je jedním z nejvýznamnějších faktorů limitujících přežívání, růst a reprodukci rostlinných druhů. Stres nízkou teplotou ovlivňuje řadu fyziologických procesů (např. fotosyntézu), může vést k okamžitému mechanickému poškození (poškození buněčných struktur tvorbou krystalů ledu), k redukcí rychlosti růstu mladých rostlin apod. Odpověď rostliny na působení nízkých teplot pak zahrnuje strukturální a funkční změny na úrovni buněčných organel, buněk, pletiv i celých rostlin, jakými jsou např. změny fyzikálně-chemických vlastností buněčných membrán, akumulace osmoticky aktivních látek, atd.

Cílem této práce je studium fyziologických reakcí souboru genotypů slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) při působení nízkých teplot na počátku vegetativního růstu a stanovení nejrelevantnějších fyziologických ukazatelů odolnosti slunečnice k nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu. V souvislosti s cíli práce byly stanoveny následující hypotézy: (i) mezi vybranými genotypy slunečnice roční se při působení stresu nízkou teplotou na počátku vegetativního růstu projeví rozdílné reakce ve sledovaných fyziologických charakteristikách (vliv genotypu), (ii) vybrané genotypy slunečnice roční budou reagovat rozdílně na působení různých nízkých (resp. mrazových) teplot (vliv teploty) a (iii) lze stanovit relevantní fyziologické ukazatele odolnosti slunečnice roční k nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu.

Výsledky práce mohou přispět k lepšímu pochopení mechanismů odolnosti vůči nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu u studovaných genotypů slunečnice roční, mohou být použity pro další navazující experimenty a také k optimalizaci šlechtění slunečnice z hlediska odolnosti k nízkým teplotám, a to díky znalosti genetiky klíčových faktorů této odolnosti. K nízkým teplotám odolné genotypy slunečnice roční by pak bylo možné v podmínkách České republiky využít přímo v agronomické praxi, a to nejen k realizaci časnějšího jarního výsevu, ale rovněž k rozšíření jejího pěstování do chladnějších oblastí.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Botanická charakteristika, ekologie a rozšíření slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) v ČR

Slunečnice roční je jednoletá bylina. Hlavní kořen je tlustý, hluboce kořenící, s četnými postranními kořeny; lodyha je přímá, jednoduchá nebo velmi řídce v horní části větvená, (0,4) 1,0 až 2,5 (4,2) m dlouhá, tuhá, obvykle 3 až 7 (22) cm tlustá, světle zelená, zvláště v horní části odstále drsně bíle chlupatá. Listy jsou střídavé, dva dolní obvykle vstřícné, dlouze řapíkaté, čepel je srdčitě vejčitá až široce trojúhelníkovitá, 15 až 35 cm dlouhá, 10 až 30 cm široká, na vrcholu špičatá, na okrajích nepravidelně pilovitá, s výraznými třemi hlavními žilkami, světle až sytě zelená, oboustranně drsně chlupatá. Úbory jsou jednotlivé, koncové, v počtu 1 (4), obvykle mohutné 15 až 30 (65) cm v průměru, zákrovní listeny střechovitě uspořádané, volně přitisklé nebo mírně odstálé, vejčité až vejčité kopinaté, 6 až 12 (15) mm široké, zašpičatělé, odstále bíle štětinatě chlupaté. Květy jsou jazykovité, žluté, v počtu 20 až 70, květy terče jsou četné, s korunou trubkovitou, zprvu téměř černou, v plném květu žlutou s červenajícími cípy nebo celou hnědo-purpurovou. Nažky jsou z částí obaleny plevkami, zploštělé, v obrysu obvejčité s klínovou bází, 5 až 12 (15) cm dlouhé, 2,5 až 12 (15) mm široké, šedavé až téměř černé (Kirschner a Šída, 2004).

Slunečnice roční je světlomilná, obvykle krátkodenní rostlina s kultivačním optimem v teplých oblastech, existují i odrůdy snášející chladnější podmínky. Původem je tento druh ze Severní Ameriky. Slunečnice roční je pěstována po celém světě, jako zplanělá byla zaznamenána kromě Severní a Jižní Ameriky také v mnoha zemích Evropy, Asie, v Jižní Africe a v Austrálii. Nejlepší výnosy poskytuje na bazických, živinami, zejména dusíkem bohatých, čerstvých půdách a tam, kde je dostatek opylovačů (především včel). Je to rostlina často pěstovaná, převážně v nížinách a nejteplejších pahorkatinách, nezřídka přechodně zplaňuje, obvykle na rumišťích a skládkách či v intravilánech obcí (Kirschner a Šída, 2004).

2.2. Pěstování slunečnice roční ve světě, v EU a v ČR

Slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) je díky vynikající kvalitě oleje jednou z celosvětově nejvýznamnějších olejnin (Baydar and Erbas, 2005). Semena slunečnice obsahují cca 42 % vysoce kvalitního oleje, který obsahuje vysoký podíl kyseliny linolové a je také dobrým zdrojem vápníku, fosforu a vitamínů E a B₃ (Wani et al., 2010). V celosvětové

produkci olejnatých semen patří slunečnici čtvrté místo. Největší pěstební plochy zaujímá tato plodina v Rusku, na Ukrajině a v Argentině (Kováčik, 2007), mezi nejvýznamnější olejniny patří také v řadě dalších zemí, jako např. v USA, Austrálii, Jižní Africe, Číně, Indii a Turecku (Wani et al., 2010).

Pěstování slunečnice má významné postavení i v zemích Evropské unie, kde se její pěstební plochy v posledních dvaceti letech významně rozšiřují (Kováčik, 2007) a pohybují se na hranici cca 3,6 mil. ha. Málek (2007a) uvádí, že nejvyšších a zároveň nejstabilnějších výnosů dosahuje Francie s průměrným výnosem 2,33 t ha⁻¹, dále Itálie (2,21 t ha⁻¹) a Maďarsko (1,94 t ha⁻¹). Od roku 2000 dosahuje průměrný výnos v ČR hodnoty 2,20 t ha⁻¹, což právem řadí ČR mezi světovou špičku (Hezký, 2008).

Pěstování slunečnice v podmínkách České republiky má svou tradici a můžeme říci dokonce i historii. První větší plochy slunečnice byly zasety již v 50. letech 20. stol., ale novodobé dějiny pěstování slunečnice v ČR se začaly psát až od roku 1985, kdy bylo zaseto zhruba 80 hektarů pro zpracování na olej. Od této doby se pěstování slunečnice u nás rozšířilo nejdříve do nejteplejších a postupně v tomto tisíciletí i do okrajových oblastí (Málek, 2007b). Základem pro pěstování slunečnice se v ČR staly dva kraje: Jihomoravský a Středočeský kraj. V pořadí druhou významnou a perspektivní oblastí jsou kraje Ústecký, Pardubický a Zlínský. Třetí oblast tvoří kraje Plzeňský, Moravskoslezský, Královéhradecký, Olomoucký a Vysočina. Do poslední, čtvrté skupiny, se řadí kraje, které experimentují a sledují vhodnost svých klimaticko-půdních podmínek pro pěstování slunečnice. Jsou to kraje Jihočeský, Liberecký, Karlovarský a hl. m. Praha (Kováčik, 2007).

Průměrná výměra sklizňové plochy v České republice odpovídá zastoupení na orné půdě přibližně do 1 %, proto právem můžeme o slunečnici říci, že je v podmínkách České republiky olejinou sice minoritní, ale s ohledem na vhodnost pěstování a dosahované výsledky a kvalitu nažek, tedy i oleje, je plodinou s velkou perspektivou (Málek et al., 2005).

Od roku 1990 se průměrná pěstební plocha slunečnice pohybuje průměrně okolo 24 tisíc ha, od roku 1998 je to dokonce 32 tisíc ha (Hezký, 2008). V některých letech se u nás pěstební plocha slunečnice pohybovala až kolem 45 tisíc ha. V případě zvýšeného zájmu zpracovatelů však ani tato velikost nemusí být konečná, protože ČR má ještě dostatečné půdní rezervy pro pěstování této plodiny (Kováčik, 2007).

V posledních šesti letech se osevní plochy slunečnice drží s určitými výkyvy na poměrně stabilní úrovni kolem 25 tisíc ha. Dosud největší osevní plocha slunečnice byla 48 tisíc ha v roce 2003/2004 a 47 tisíc ha v roce 2006/2007, kdy tato plodina nahrazovala

ozimé obilniny po jejich zaorávkách, případně cukrovku. V marketingovém roce 2012/2013 bylo v České republice oseto slunečnicí 24,6 tisíc ha, tj. o 3921 ha méně než v roce předchozím. Celková produkce slunečnicového semene dosáhla výše 56,9 tisíc t při výnosu 2,31 t ha⁻¹. Příčinu v porovnání s jinými roky nižšího výnosu a návazně i produkce v tomto sklizňovém roce můžeme hledat především v extrémním nedostatku srážek v hlavní pěstitelské oblasti slunečnice na jižní Moravě. Určitý negativní vliv měly i pozdní jarní mrazíky, v jejichž důsledku bylo nutné některé plochy zaorat a znovu přesít (Potměšilová, 2013).

Osevní plochy, hektarové výnosy a produkce slunečnice v České republice v letech 1990 až 2013 znázorňuje tab. 1.

Slunečnice je v České republice významnou exportní komoditou, která je vyvážena na trh ostatních zemí EU, ale i do třetích zemí a zároveň je o něco větší objem dovážen pro zpracování v domácím potravinářském průmyslu. Nejvýznamnější země českého zahraničního obchodu při dovozu slunečnicového semene jsou v posledních letech Slovensko, Německo, Rakousko a Maďarsko. Při vývozu jsou hlavními odběratelskými zeměmi Německo, Slovensko a Polsko (Potměšilová, 2013).

Tab. 1. Osevní a sklizňové plochy, hektarové výnosy a produkce slunečnice roční v České republice v letech 1990 až 2012.

Marketingový rok	Osevní plocha [ha]	Výnos [t ha⁻¹]	Produkce celkem [t]
1990/91 ¹⁾	11 625	2,70	29 160
1991/92 ¹⁾	10 750	2,24	20 970
1992/93 ¹⁾	11 022	2,45	26 689
1993/94 ¹⁾	12 000	2,50	29 500
1994/95 ¹⁾	16 160	1,90	30 589
1995/96 ¹⁾	19 476	1,66	32 180
1996/97 ¹⁾	19 816	1,93	38 065
1997/98 ¹⁾	11 055	2,09	22 801
1998/99 ¹⁾	17 326	2,11	36 475
1999/00 ¹⁾	28 500	2,22	63 228
2000/01 ¹⁾	30 757	2,14	65 421
2001/02 ¹⁾	28 583	1,99	56 717
2002/03 ¹⁾	24 242	2,25	54 581
2003/04 ¹⁾	48 705	2,35	114 508
2004/05 ¹⁾	39 393	2,16	84 906
2005/06 ¹⁾	39 648	2,39	94 820
2006/07 ¹⁾	47 068	2,15	100 973
2007/08 ¹⁾	24 425	2,13	52 000
2008/09 ¹⁾	24 468	2,49	60 933
2009/10 ²⁾	25 621	2,38	61 031
2010/11 ²⁾	27 172	2,11	57 358
2011/12 ²⁾	28 554	2,48	70 900
2012/13 ²⁾	24 634	2,31	56 943

Zdroj: ¹⁾ Potměšilová a Adamec (2009), ²⁾ Anon. (2013).

2.3. Pěstování slunečnice roční a klimatické změny

S postupným oteplováním planety se bude pěstování slunečnice roční přesouvat do vláhově jistějších oblastí (Mottl, 2008). Slunečnice však může být díky specifické stavbě orgánů pěstována i v okrajových oblastech a v semi-aridních podmínkách (Dragan, 2009; Wani et al., 2010) a některé hybridy lze úspěšně pěstovat i v pěstebních oblastech, kde by pěstování slunečnice dříve bylo nemyslitelné (Poláková, 2007).

V podmínkách České republiky se slunečnice stala vhodnou alternativou ozimé řepky olejky (Poláková, 2007). Ozimá řepka se stává v suchých lokalitách neekonomickou a na těchto místech ji úspěšně nahrazuje právě slunečnice. Hluboké a intenzivní prokořenění půdy umožňuje rostlinám slunečnice odolávat suchu a pomáhá lepšímu využití vody a živin z půdy (Venclová, 2008).

Výnos slunečnice roční silně závisí na počasí během životního cyklu rostliny (Baydar and Erbas, 2005). Česká republika je svou pěstivelskou polohou na severní hranici vhodnosti pěstování. Slunečnice je však biologicky velice plastická a přizpůsobivá různým klimatickým podmínkám. Určujícím klimatickým faktorem pro pěstování slunečnice je doba nástupu jarního počasí umožňující výsev (duben) a doba nástupu podzimního počasí (září) umožňující ještě dobrý průběh sklizně. Nepříznivými faktory jsou časté výkyvy počasí (především velká sucha a vysoké teploty v období kvetení, v jiných letech naopak chlad), což snižuje výnos nažek a obsah oleje. Problémem se většinou stává i dlouhá doba dozrávání a přechod chorob z úboru do semen. Desikace je s výjimkou nejteplejších roků nezbytná (Kováčik, 2007).

2.4. Obecná charakteristika stresu a stresová reakce

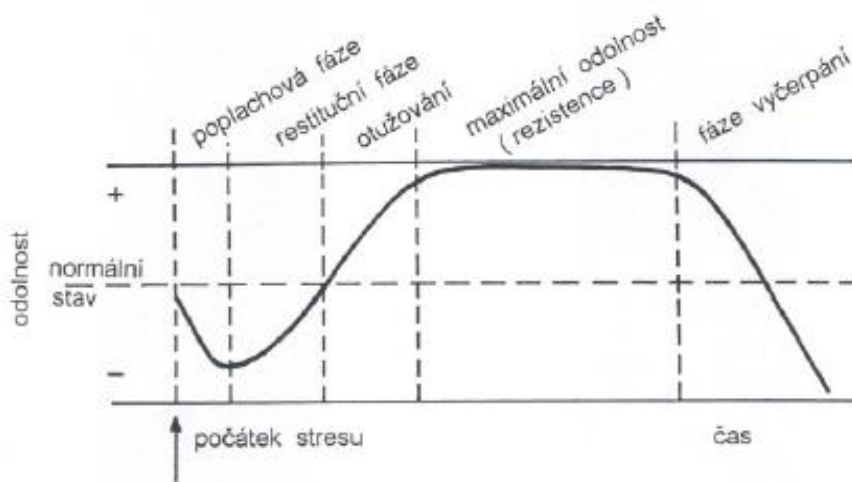
Rostliny čelí různým formám environmentálního stresu, jakými je např. sucho, nízká nebo vysoká teplota a zasolení půdy. Ačkoliv rostliny postupně vyvinuly schopnosti, jak se se stresem vyrovnat, přesto stres zůstává celosvětově primární příčinou významných ztrát na výnosech (Agarwal and Jha, 2010).

V terminologii fyziologie stresu je nutné rozlišovat pojmy *stress*, *strain* a *stressor*, jejichž význam se dle různých pojetí může lišit. Levitt (1980) vysvětluje pojem *stress* jako jakýkoliv vnější faktor prostředí, který je nepříznivý pro život organismu. Pojem *strain* pak dle Levitta (1982) představuje fyziologickou změnu, která je reakcí na působení environmentálního stresu. Taková reakce však nemusí nezbytně vést k redukci růstu nebo reprodukce rostliny.

Orcutt and Nilsen (2000) však termín *stress* používají pro souhrnné označení stavu, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem působení *stressoru*, což je biotický či abiotický faktor prostředí schopný způsobit poškození organismu, chorobu či fyziologickou změnu, tj. vyvolat *stress*.

Dle Gaspara et al. (2002) lze termín stres chápat dokonce ve třech významech: (i) stresor, tj. faktor prostředí, který je schopný způsobit poranění či onemocnění, (ii) poplachová reakce na výjimečné, nepříznivé podmínky (např. vadnutí), (iii) fyziologický stav, který vykazuje změny životních funkcí.

Larcher (1987) a Atwell et al. (1999) rozdělují stresovou reakci do několika fází. Bezprostředně po začátku působení stresoru dochází k narušení buněčných struktur a funkcí (*poplachová fáze*). Pokud intenzita působení stresového faktoru nepřekročí letální úroveň, dochází k mobilizaci kompenzačních mechanismů (*restituční fáze*), která směřuje ke zvýšení odolnosti vůči působícímu stresu (*fáze rezistence*). Při dlouhodobějším působení stresu může dojít k vyčerpání rostlinného organismu (*fáze vyčerpání*) a posléze až k odumření rostliny, jak je patrné z obr. 1.



Obr. 1. Schéma průběhu stresové reakce (upraveno dle Larchera, 1995).

Mechanismy, které umožňují organismu přežití a toleranci či vyhnoutí se stresu, jsou označovány jako *resistance* (rezistence, odolnost). Fyziologické odpovědi na působení stresoru mohou být členěny do tří kategorií: (i) *stress tolerance* (tolerance stresu), kdy má rostlina mechanismy k udržení vysoké metabolické aktivity (obdobné úrovni metabolické aktivity bez působení stresoru) při nízké úrovni stresu a redukované aktivity při vysoké úrovni stresu. Naproti tomu (ii) *stress avoidance* (mechanismus vyhnoutí se stresu) zahrnuje redukcii

metabolické aktivity vedoucí k navození dormantního stavu při působení extrémního stresu (Osmond et al., 1987). Z obecného úhlu pohledu se dá pojem *stress avoidance* vysvětlit jako zabránění či omezení proniknutí stresu do rostlinného pletiva (Orcut and Nilsen, 2000), nebo jako omezení vlivu stresu, ačkoliv je rostlina v prostředí, kde stres působí. Příkladem jsou rostliny tolíce seté (*Medicago sativa* L.), které zabraňují působení vodního stresu na suchých stanovištích tak, že aktivují růst kořenů do větších hloubek a dosáhnou tak zdroje vody (Hopkins and Hüner, 2004). Běžně mají rostliny několik mechanismů tolerance a vyhnutí se stresu nebo kombinují oba způsoby. Poslední možností reakce rostlin na působení stresu je (iii) okamžité nebo později se projevující poškození, které může vést ke smrti formou nekrózy či apoptózy (Gaspar et al., 2002).

Intenzitu stresu nelze jednoduše kvantifikovat. Úroveň stresu může být nízká, kdy vznikají suboptimální podmínky s předpokládaným malým efektem. Avšak pokud takový stres působí delší dobu, stává se stresem chronickým a fyziologické reakce jsou ovlivněny výrazněji. Naopak akutní stres způsobuje významné změny v krátkém časovém úseku. Závažné důsledky tedy může vyvolat jak působení krátkého intenzivního stresu, tak mírný, avšak dlouhodobý stres (Gaspar et al., 2002).

Ve stresové fyziologii rostlin je nezbytné rozlišit rovněž termíny *adaptace* a *aklimace*. Dle Gaspara et al. (2002) se pojmem *adaptace* rozumí vznik výhodných kombinací genů v rostlině, které postupně ve stresovém prostředí převládají, tj. genetické změny na úrovni populací uskutečňující se po mnoho generací. Genotypy s výhodnou kombinací genů (takových, které nesou schopnost přežít a rozmnožovat se) se ve stresových podmínkách lépe uplatní a stávají se v populaci dominantními. *Aklimace* je pak definována Nilsenem and Orcuttem (1996) jako fenotypové přizpůsobení se různým podmínkám prostředí. Fenotypová plasticita je zároveň indexem rozsahu aklimace možné v rámci jednoho genotypu.

Adaptace (na úrovni populace) a *aklimace* (na úrovni jedince) se projevují kombinací morfologických, anatomických, fyziologických a biochemických změn závislých na procesech na molekulární úrovni (Gaspar et al., 2002).

Vliv stresových podmínek na rostliny je obvykle hodnocen vystavením rostlin jednomu typu stresu, např. suchu nebo vysoké teplotě. Avšak v polních podmínkách se často vyskytuje více typů stresu, jako suchu a vysoké teploty současně (Mittler, 2006), přičemž různé stresy mohou vyvolat protichůdné reakce. Např. během stresu vysokou teplotou rostliny otvírají průduchy, aby ochladily listy transpirací. Pokud je však vysoká teplota spojena se suchem, rostliny nejsou schopné průduchy otevřít a teplota listu tak zůstává vysoká (Rizhsky

et al., 2002). Rostliny tedy reagují odlišně na jednotlivé typy stresu ve srovnání s kombinací různých typů stresu (Rizhsky et al., 2002; Mittler, 2006; Shulaeva et al., 2008).

2.5. Slunečnice roční a teplota prostředí

Rostliny patří mezi poikilotermní organismy, které nemají stálou vnitřní teplotu a jejich teplota se blíží teplotě okolního prostředí (Prášil et al., 2010). Teplota je tak jedním z nejvýznamnějších environmentálních faktorů, který ovlivňuje rostliny (Hallgren and Öquist, 1990; Foyer et al., 2002), určuje rychlost růstu a vývoje (Qadir et al., 2007), limituje jejich geografické rozšíření a výrazně se podílí na redukci výnosu významných plodin (Alcázar et al., 2011). Každá rostlina má své individuální teplotní požadavky pro růst a vývoj. Existuje teplotní optimum, v němž rostlina roste a vyvíjí se nejefektivněji, a horní a dolní hranice. Jakmile teplota dosáhne hranic, růst rostliny je redukován a při překročení hranic se růst zcela zastavuje (Hopkins and Hüner, 2004).

Slunečnice roční je plodinou teplé části mírného pásma a Česká republika téměř dosahuje jejího severního okraje pro pěstování na olej. Nažky slunečnice klíčí již při teplotě půdy 4 °C, avšak optimální půdní teplota pro klíčení je 8 až 10 °C v hloubce povrchové vrstvy půdy 5 cm (Málek et al., 2005). Dle Špaldona (1986) je optimální teplota vzduchu ke klíčení 20 až 25 °C a suma efektivních teplot po dobu vzcházení 140 až 160 °C. V období tvorby úborů má slunečnice větší nároky na teplo, v této době vyžaduje teplotu 15 až 25 °C v závislosti na hybridu. Při teplotách nad 30 °C však rostliny slunečnice vadnou a při 40 °C končí prorůstání pylových zrn. V této fázi vývoje ale slunečnice roční není citlivá pouze k vysokým teplotám vzduchu, ale rovněž k mrazovým teplotám, kdy teploty -1 až -2 °C poškozují kvetoucí úbory. Bradlow (1990) také pozoroval do jisté míry omezený růst mladých rostlin slunečnice, pokud byly vystaveny suboptimálním teplotám.

Díky značné schopnosti přizpůsobit se širokému spektru klimatických podmínek, maximální fotosyntetické kapacitě a stomatální vodivosti, dokáže být slunečnice roční vysoce produktivní v různých typech prostředí (Kaleem et al., 2009), dobře roste v teplých oblastech, ale je citlivá k nízkým teplotám (Brouder and Volenec, 2008).

2.6. Vodní stres a stres vysokou teplotou

2.6.1. Ovlivnění výnosu vodním stresem a stresem vysokou teplotou

Lidská populace se neustále zvětšuje, naopak produkce potravin klesá v důsledku působení různých abiotických stresů, jako je chlad, zasolení, sucho (Mahajan and Tuteja, 2005) a další. Trvající změny teplot a srážkových úhrnů mohou mít dramatický vliv na dostupnost povrchové vody pro zemědělskou produkci a lidskou spotřebu (Brouder and Volenc, 2008). Pro splnění potravinové potřeby se tak pěstování plodin musí přizpůsobit klimatické variabilitě (Tallec et al., 2013).

Jedním z předpovídaných následků globálních klimatických změn je prohloubení sucha např. v oblasti Středomoří, kde je již v současnosti limitujícím faktorem pro pěstování plodin dostupnost vody (Ruiz-Sanchez et al., 2007). Vodní stres je považován za jeden z nejvýznamnějších faktorů prostředí, který silně limituje růst a vývoj rostlin (Chaves et al., 2003). Zlepšení zemědělského managementu dostupnosti vody se tak stalo jednou z hlavních celosvětových otázek (Tallec et al., 2013). Změny v dostupnosti vody ovlivňují řadu fyziologických procesů v rostlinách (Tezara et al., 2002). Sucho může např. redukovat úroveň fotosyntézy stomatální i non-stomatální limitací (tj. poškozením membránových struktur fotosyntetického aparátu) a ovlivněním transportu asimilátů z listů (Chaves, 1991; Gabriel, 2000).

Reakce rostlin na změny teploty pak záleží na teplotním optimu pro fotosyntézu, růst a výnos, přičemž teplotní optimum pro tyto složky se může lišit (Conroy et al., 1994). Pokud je teplota nižší, než je teplotní optimum pro fotosyntézu, i malé zvýšení teploty může významně stimulovat růst. Opačný vztah platí, pokud se teplota pohybuje při horní hranici teplotního optima pro výnos. Tehdy může i malé zvýšení teploty výnos výrazně snížit (Baker and Allen, 1993). Zvyšující se teplota také urychluje zrání plodin, jelikož se posouvá celé vegetační období v důsledku dřívějšího nástupu minimálních teplot pro jednotlivé etapy vývoje (Porter, 2005).

Vysoká teplota může redukovat fotosyntézu např. během fáze plnění semen, a to jak urychlením senescence listů, tak poškozením fotosyntetického aparátu (Chauhan et al., 2009), ovlivněním (poklesem) stomatální vodivosti (Farquhar and Sharkey, 1982) nebo snížením aktivity RuBP karboxylázy (Kobza and Edwards, 1987). Rovněž prudké zvýšení rychlosti transpirace za horkých slunečných dnů může být velmi významné a může způsobit ztrátu turgoru buněk mladých listů, zejména na suchých stanovištích. Tím však dojde k uzavírání

průduchů vedoucí k redukci fotosyntézy, tedy i růstu (Woo et al., 2004) a v konečném důsledku i samotného výnosu. Vysoká teplota je běžným omezením během fáze kvetení a plnění semen např. u pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) a vede ke značným ztrátám na výnosu. Již při mírném stresu vysokou teplotou výnos pšenice klesá přibližně o 3 až 4 % při zvýšení teploty o 1 °C oproti průměrné teplotě 15 °C v laboratorních i polních podmínkách (Wardlaw and Wrigley, 1994).

Rovněž u rostlin slunečnice roční, ačkoliv je tato plodina přizpůsobivá různým podmínkám prostředí (Beard and Geng, 1982) a poměrně suchu odolná (Elzebroek and Wind, 2008; Wani et al., 2010), byl zaznamenán snížený výnos v případech, kdy byly rostliny vystaveny vodnímu stresu v období vývoje a zrání nažek (Kaleem et al., 2010), nebo u pozdějších termínů výsevu (Bange et al., 1998; de la Vega and Hall, 2002a). Vodní stres, ale také teplota přesahující kritickou hodnotu teplotního optima slunečnice, tak může mít negativní (resp. redukční) vliv na agronomické charakteristiky rostliny, jako je výška rostliny, počet nažek v úboru a hmotnost nažek, což následně vede k snížení výše výnosu (Kaleem et al., 2010).

2.6.2. Časnější termín výsevu

Jedním z hlavních cílů šlechtitelů slunečnice roční je maximalizovat dobu vegetačního období s cílem dosažení nejvyššího možného výnosu (Hewezi et al., 2006). Jednou z možností je použití raných genotypů. To má význam pouze v podmínkách s intenzivním a pravidelně se dostavujícím stresem v závěru vegetace, což značně znevýhodňuje využívání pozdních odrůd (Sadras et al., 1993). V oblastech, pro něž jsou charakteristické velice proměnlivé povětrnostní podmínky, nebo které nejsou příliš často postiženy nedostatkem vláh, není volba odrůd s krátkým vegetačním cyklem vždy tou nejlepší strategií, chceme-li dosáhnout pravidelného, maximálního výnosu (Debaeke et al., 2000).

Jinou možností, jak dosáhnout toho, aby doba květu nespadala do období vodních deficitů (a teplotního stresu), a tím se prodloužil vegetační cyklus a období akumulace biomasy, je časnější termín výsevu (Grieu et al., 2008a). Časný výsev by umožnil vyhnout se období vodního stresu, které se často vyskytuje v kritickém období vývoje rostliny (Hewezi et al., 2006), tj. v období začínajícím cca 20 dnů před a končícím cca 20 dnů po kvetení (Pasda and Diepenbrock, 1991), kdy je slunečnice na nedostatek vody nejcitlivější (Grieu et al., 2008a). Vodní stres vyskytující se během fáze kvetení způsobuje sterilitu pylu, odumírání pestíků a embryí a redukci LAI (Leaf Area Index). V důsledku těchto změn je redukován

počet fertálních nažek i celkový počet nažek v květenství a hmotnost 100 nažek (Baldini and Vannozzi, 1999; Reddy et al., 2003).

V případě časnějšího výsevu lze vzít v úvahu dvě možnosti: (i) podzimní výsev, kdy semena v nažkách přečkají zimu ve stádiu plně vyvinutých děloh, (ii) časný jarní výsev přibližně o 1 měsíc dříve místo v současnosti ve Francii i v České republice běžném termínu duben (až květen). Časný jarní výsev může být prováděn např. v jižní Itálii (Anastasi et al., 2000), Španělsku (Soriano et al., 2004), Francii (Grieu et al., 2008a), na jihu USA, v Jižní Americe (Paraguay, Uruguay, část Brazílie a Argentina) (Sojka et al., 1989) a v Iránu (Mirshekari et al., 2012).

Např. ve středomořské oblasti (střed a jih Španělska, jih Itálie, Portugalsko), ale také v Maroku či Pakistánu, bylo v 80. až 90. letech 20. stol. vypracováno několik studií za účelem posouzení možností podzimního výsevu slunečnice roční (např. Gimeno et al., 1989; Boujghagh, 1993; Gosset and Vear, 1995; Anastasi et al., 2000; Barros et al., 2004). Ve Španělsku se při podzimním výsevu zvýšil výnos až o 20 %. Při podzimním výsevu se rovněž zvyšuje výtěžnost oleje (Soriano et al., 2004). Zvýšení výnosu je v případě podzimního výsevu vázáno na prodloužení vegetační doby a na vyhnutí se vodnímu a teplotnímu stresu ke konci vegetace. Vodní režim slunečnice se výrazně zlepšil především z těchto důvodů: (i) zlepšení celkové evapotranspirace vázané na delší vegetační dobu a delší dobu trvání aktivity asimilačního aparátu, na vyšší celkové množství naměřených srážek v době vegetace a na účinnější zakořenění, (ii) zlepšení poměru transpirace/výparu vody vázané na lepší ochranu půdy v době výrazného přebytku vody, (iii) zlepšení účinnosti dýchání vázané na nižší požadavek evapotranspirace a (iv) zlepšení sklizňového indexu (Harvest Index, HI) v důsledku eliminace vodního deficitu v době po odkvětu (Orgaz et al., 1990).

Naopak s pozdním termínem výsevu se zpomaluje vývoj, jelikož se rostliny potýkají s vysokými teplotami během vegetativního růstu (Cirilo and Andrade, 1994) a přesušením horní vrstvy půdy. Porosty nejednotně klíčí, vzházejí, kvetou a v konečném důsledku i dozrávají (Málek et al., 2005). Zkrácení vegetační doby pak snižuje množství záření přijatého během vegetativního růstu, a tím i celkový obsah sušiny v době sklizně (Andrade, 1995; Sunderman et al., 1997; de la Vega and Hall, 2002a; de la Vega and Hall, 2002b). Zvýšená variabilita výnosu při pozdních termínech výsevu je důsledkem nižší dostupnosti vody v půdě během kvetení a zrání semen, což je období rozhodující pro zakládání výnosu a nedostatek vody v tomto období snižuje zásobu asimilátů pro růst reprodukčních orgánů a následně i pro výnos plodiny (Andriani et al., 1991; de Carvalho et al., 1991; Cirilo and Andrade 1994;

Andrade, 1995). V důsledku vodního stresu se rovněž snižuje účinnost půdních herbicidů, která je přímo závislá na vlhkosti půdy, a zvyšuje se tak zaplevelení porostu. Převažuje růst vegetativních orgánů nad generativními (vytvářejí se menší úbory), u pozdě dozrávajících porostů se zvyšuje pravděpodobnost napadení porostu houbovými chorobami v době dozrávání a rovněž nutnost porost desikovat (Málek et al., 2005).

Např. Andrade (1995) zaznamenal u slunečnice při pozdním termínu výsevu značnou redukci výnosu způsobenou snížením počtu semen na m^2 a hmotnosti semen. Naopak časný jarní výsev vede u slunečnice k větší produkci nažek a ke zvýšení jejich hmotnosti (José et al., 2004). Rovněž Mirshekari et al. (2012) zjistili při časném jarním výsevu slunečnice v Íránu (o 2 až 4 týdny dříve) nárůst hmotnosti a počtu nažek, větší výšku rostliny a průměr úboru, a tak i celkově vyšší výnos, což bylo způsobeno uniknutím (resp. vyhnutím se) vodnímu stresu ve fázi kvetení a plnění semen.

Také v podmínkách ČR je u časných termínů výsevů předpoklad dosažení vyšších výnosů. Naopak čím později se seje, tím jsou relativně nižší výnosy, vyšší slupkatost nažek, nižší olejnatost a větší problémy se sklizní (Kováčik, 2007). Rozdíl ve výnosu mezi raným a pozdním výsevem se může pohybovat v rozmezí od 0,1 do 0,5 t ha^{-1} . V pěstitelsky nepříznivých podmínkách jsou však výnosové rozdíly ještě vyšší (Málek, 2007c).

Allinne (2010) uvádí, že ve Francii vede výsev slunečnice časnější o 1 měsíc oproti tradičnímu termínu výsevu (duben v jižní Francii) ke snížení teploty o 5 až 10 °C během prvních stádií vývoje této plodiny. Nevýhoda nízkých teplot při časných termínech výsevu a následném zpoždění vzcházení plodiny je však kompenzována zvýšenou pravděpodobností příznivějších vláhových podmínek, které jsou důležité pro rychlý a jednotný růst rostlin (Barros et al., 2004). El Midaoui et al. (2003) testovali časný jarní výsev (polovina ledna až polovina února) slunečnice v Maroku, jehož cílem bylo vyhnout se vodnímu stresu během období kvetení a zrání semen na jaře a v létě. Nízké teploty působící v zimě však výrazně zvýšily riziko špatného vzcházení rostlin slunečnice. Neschopnost dobrého (resp. rychlého a jednotného) vzcházení následně způsobilo vystavení rostlin vodnímu stresu během období kvetení, což vážně redukovalo výši výnosu.

Aby byl časný jarní výsev slunečnice s cílem dosažení maximální délky vegetačního období a zároveň vyhnutí se rostlin vodnímu stresu možný, je tedy velmi důležitá její odolnost a zlepšení tolerance vůči nízkým teplotám (Uemura et al., 1995; Hewezi et al., 2006) na počátku vegetativního růstu (Hewezi et al., 2006; Fernandez et al., 2008; Dragan, 2009).

Právě období klíčení a vzházení je totiž nejcitlivějším stádiem v životním cyklu jednoletých rostlin (Mercer et al., 2011), mezi něž patří i slunečnice roční.

Vzhledem k již výše zmíněné možnosti rozšiřování pěstování slunečnice do okrajových (aridních) oblastí (např. oblasti Středomoří, Severní Ameriky, Indie nebo Argentiny), je v současnosti jedním z hlavních limitujících faktorů tolerance rostlin slunečnice k abiotickým stresům, jako je sucho, nízké teploty či zasolení. Zejména tolerance k vodnímu stresu a stresu zasolením je významně zohledněna v šlechtitelských programech. V oblasti šlechtění slunečnice byl tak doposud zaznamenán větší pokrok ve šlechtění na odolnost vůči vodnímu stresu, zasolení (Hewezi et al., 2006; Fernandez et al., 2008) a vysokým teplotám, než na odolnost k teplotám nízkým (Dragan, 2009).

Tolerance k nízkým teplotám je však pro rostlinnou produkci obecně velmi důležitá, protože schopnost rostliny snést pozdní jarní či brzké podzimní mrazíky může rozhodnout o výši výnosu (Hopkins and Hüner, 2004). V několika posledních desetiletích byla věnována pozornost studiu mechanismu reakcí vyšších rostlin na vliv teploty z důvodu agronomických požadavků zdokonalit toleranci ke stresu nízkými a vysokými teplotami (Wahid et al., 2007). Pochopení podstaty aklimace a tolerance k nízkým teplotám je zásadní pro udržení a zvýšení produktivity rostlin a pro zajištění produkce potravin, paliv a dalších zemědělských produktů k uspokojení vzrůstajících požadavků lidské populace (Dumlao et al., 2012). Schopnost rostlin slunečnice získat toleranci k mrazovým teplotám po vystavení nízkým teplotám ale není dostatečně známa (Hewezi et al., 2006). Jelikož je slunečnice rostlina citlivá k nízkým teplotám (Carpenter and Crowe, 1988; Hewezi et al., 2006; Brouder and Volenec, 2008), je pro testování vlivu nízkých teplot vhodnou modelovou plodinou.

2.7. Stres nízkými teplotami

2.7.1. Působení nízkých teplot na rostlinu

Nízká teplota představuje významný abiotický faktor, který má zásadní vliv jak na rozšíření planých rostlin, tak na pěstování zemědělsky významných plodin v různých oblastech planety (Prášil et al., 2010). Jedná se o jeden z nejvýznamnějších faktorů limitující přežívání, růst a reprodukci rostlinných druhů (Boyer, 1982; Annicchiarico et al., 2001).

Podle citlivosti a reakcí rostlin k nízkým teplotám lze rozlišovat dvě teplotní oblasti: (i) chlad (*chilling stress*), který zahrnuje nízké teploty nad bodem mrazu (obecně se udává

teplotní rozmezí 0 až 15 °C) a (ii) mráz (*frost*), resp. zmrznutí (*freezing*), které souvisejí s působením nízké teploty pod bodem mrazu. Z hlediska způsobu poškození, ale i mechanismu odolnosti rostlin, jsou oba typy stresu, tj. chlad a mráz, odlišné. Poškození chladem obecně souvisí se snížením rychlosti metabolických pochodů rostliny, zatímco poškození mrazem závisí především na mraznutí vody v pletivech rostlin, které je spojeno s dehydratací a růstem ledových krystalů. Dehydratace může nastat již při působení chladu, kdy je snížena rychlost příjmu vody kořeny a současně dochází ke ztrátě vody transpirací. U chladu hraje roli nejen samotná výše teploty, ale také délka jejího působení. Čím delší je totiž doba působení chladu, tím se stávají příslušné změny nevratnějšími. Poškození chladem se často projevuje s delším odstupem od jeho působení a také závisí na teplotě v období po působení stresu. Naopak mrazové poškození se může projevit ihned po roztátí ledu, poškozené části jsou vodnaté, ztrácejí turgor, krouť se, za sucha uvadají, za vlhka černají (Prášil et al., 2010).

Rostliny vykazují široký rozsah citlivosti k teplotním extrémům. Některé jsou poškozeny nebo odumírají již vlivem mírného chladu, zatímco jiné, řádně aklimatizované, dokážou přežít mrazové teploty desítky stupňů pod 0 °C. Stres mrazovými teplotami je obzvláště problematický, jestliže se objeví během vegetačního období, kdy je rostlina fyziologicky aktivní (Davis et al., 1999).

Stres nízkou teplotou, stejně jako další environmentální stresy, však působí na rostliny samostatně velice zřídka. Existuje řada dalších faktorů, jako intenzita světla, relativní vzdušná vlhkost a vrozená citlivost rostliny k chladovým teplotám, které působí současně s nízkou teplotou. Interakce těchto faktorů může zvýšit jejich dopad na rostlinu, nebo naopak působí jako ochrana pře poškozením. Čím déle je rostlina vystavena nízké teplotě, tím větší a nevratnější je její poškození. Stejně jako u dalších faktorů působících na rostlinu, zotavení rostliny z poškození chladovými teplotami je závislé na rostlinném druhu a pravděpodobně souvisí s vrozenou citlivostí k chladu (Kratsch and Wise, 2000).

Stres nízkou teplotou ovlivňuje řadu fyziologických procesů (Xin and Browse, 2000; Karimzadeh et al., 2005; Liang et al., 2007). Působení nízkých teplot může vést k okamžitému mechanickému poškození (Xiong et al., 2002) a ovlivňuje např. rychlost růstu mladých rostlin (Wolfe, 1991; Venema et al. 2000). Nízká teplota také zpomaluje metabolické procesy, čímž se tvoří volné radikály a vzniká oxidativní stres opožděnou spotřebou energie z fotosyntézy (Vogg et al., 1998). Odpověď rostliny na působení nízkých teplot zahrnuje strukturální a funkční změny na úrovni buněčných organel, buněk, pletiv i

celých rostlin (Hallgren and Öquist, 1990; Foyer et al., 2002), ale také změny genové exprese (Gusta and Wisniewski, 2012). Vnější známky poškození nízkou teplotou mohou mít řadu podob v závislosti na rostlinném druhu a stáří rostliny a délky působení nízké teploty. Pro mladé rostliny jsou typickými znaky omezený růst listů, vadnutí, chlorózy (Hopkins and Hüner, 2004) a redukovaný vývoj chloroplastů (Marocco et al., 2005). V krajních případech se může projevit hnědnutí a objevují se nekrózy a/nebo odumírají celé rostliny (Hopkins and Hüner, 2004). K dalším makroskopickým projevům poškození rostlin nízkými teplotami patří tvorba deformací a zrychlená senescence (Prášil et al., 2010).

2.7.1.1. Vliv nízkých teplot na fotosyntézu a fotosyntetický aparát

Obvykle prvním procesem ovlivněným nízkými teplotami (a stresem obecně) je fotosyntéza (Hallgren and Öquist, 1990; Foyer et al., 2002; Hikosaka et al., 2006), kdy rychlost fotosyntézy klesá se stoupající intenzitou stresu (Sultana et al., 1999; Koyro, 2006; Wei et al., 2006). Např. Winner (1994) zjistil pokles rychlosti fotosyntézy při stresu ozónem a Qin et al. (2010) pozorovali u listů rostlin *Shepherdia argentea* (Pursh) Nutt. zjevný pokles rychlosti fotosyntézy s rostoucí úrovní zasolení. Významné snížení fotosyntézy bylo u řady rostlinných druhů, např. u čiroku obecného (*Sorghum vulgare* L.) (Pasternak and Wilson, 1972), rýže seté (*Oryza sativa* L.) (Kishitani and Tsunoda, 1974) a tollice seté (*Medicago sativa* L.) (Peoples and Koch, 1978) zaznamenáno rovněž po působení nočních chladových teplot. Ovlivnění nízkými teplotami může přetrvávat i několik dní, ačkoliv jsou rostliny navraceny do optimálních teplotních podmínek (Martin et al., 1981).

Nízká teplota je tedy také jedním z faktorů, které značně ovlivňují fotosyntetickou kapacitu (Nie et al., 1992; Haldimann, 1995; Yamori et al., 2006) a modifikují lipidy a další složky membrán chloroplastů. Tyto změny pak vedou k tuhnutí a následným změnám funkce membrán (Long et al., 1983; Kościelniak et al., 1996). Ovšem hlavním vlivem nízkých teplot na fotosyntetickou aktivitu je pokles fixace CO₂ jako následek snížení aktivity enzymů (Greer and Hardacre, 1989; Sonoike, 1999; Aroca et al., 2001; Lidon et al., 2001). Při působení nízkých teplot je aktivita enzymů účastnících se fixace CO₂ výrazně inhibována (Kingston-Smith and Foyer, 2000) a zvětšuje se podíl zachycené energie, která nemůže být využita pro fotosyntézu. Výsledkem je zvýšení množství nadbytečné energie v anténách fotosystému II (PS II), která je uvolněna ve formě tepla (Andrews et al., 1995), a s tím spojený pokles fluorescence chlorofylu *a* (Špulák a Martinová, 2006). Degradace fotosyntetických enzymů, jako je Rubisco, může způsobit redukcii obsahu rozpustných

proteinů, přičemž jeho množství může tvořit přibližně polovinu těchto proteinů (Miller and Huffaker, 1982; Pell et al., 1994). Farquhar et al. (1980) uvádějí, že rychlost regenerace Rubisca je hlavním faktorem limitujícím fotosyntézu. Všechny tyto změny jsou doprovázeny reorganizací fotosystémů I a II (PS I a PS II) během ozáření, které vedou k fotoinhibici, ke změnám v uspořádání pigment-proteinových komplexů, k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) a k celkové redukci aktivity řetězce elektronového transportu (Greer and Hardacre, 1989; Sonoike, 1999; Aroca et al., 2001; Lidon et al., 2001). Fotoinhibice je vysvětlena jako následek hromadění nadbytečné energie (zejména při vysoké úrovni záření) vlivem redukce fotosyntézy (Hovenden and Warre, 1998; Feng and Cao, 2005). PS II je ve srovnání s PS I výrazně citlivější k nízkým teplotám. PS I není poškozen během působení nízké teploty, ale poškození se projeví až při navrácení rostliny do normální teploty pro růst nebo během procesu regenerace (Rapacz, 2007). Nízká teplota však působí na fotosyntézu kromě redukce aktivity fotosyntetických enzymů také ovlivněním vodivosti průduchů (Liang et al., 2004) a genové exprese (Martino-Catt and Ort, 1992).

2.7.1.2. Vliv nízkých teplot na vodivost průduchů a transpiraci

Rostliny se s nízkou teplotou setkávají v kombinaci se snížením intenzity světelného záření (nízké noční teploty) (Zhou et al., 2009). Ačkoliv kyselina abscisová (ABA) obvykle způsobuje uzavírání průduchů, nízká teplota u k chladu citlivých rostlin (jakou je i slunečnice roční) naopak způsobuje, že průduchy reagují na ABA jejich otevřením. Nízká noční teplota tak indukuje otevírání průduchů v noci (Honour et al., 1995), což může vést k nižšímu vodnímu potenciálu listů (Ψ_L) před svítáním a k omezení vodivosti průduchů později během dne (Allen et al., 2000). Naopak některé k chladu tolerantní rostlinné druhy reagují na nízkou teplotu uzavíráním průduchů, aby tak zabránily ztrátám vody transpirací (Cornic and Ghashghaie, 1991).

Dle Pardossiho et al. (1992) se u k chladu citlivých rostlin často objevuje vadnutí a/nebo nízký vodní potenciál listů (Ψ_L), což může omezit nejen růst a fotosyntetickou aktivitu, ale dokonce samotné přežití rostliny. K chladu odolné rostlinné druhy dokáží udržet dostatečnou hodnotu vodního potenciálu uzavřením průduchů a zabráněním ztrát vody transpirací (Cornic and Ghashghaie, 1991), zatímco citlivé rostlinné druhy při působení nízkých teplot často průduchy ponechávají otevřené (Lee et al., 1993). Např. v pokusech Wilkinsonové et al. (2001) bylo u chladuvzdorného druhu křížatka obecná (*Commelina communis* L.) zjištěno uzavření průduchů během 1 hodiny po snížení teploty z 27 na 7 °C,

u k chladu citlivých rostlin tabáku selského (*Nicotiana rustica* L.) došlo k uzavření průduchů až při počátku vadnutí listů.

Rychlé uzavření průduchů při nízké teplotě tedy brání dehydrataci listů, kdy je příjem vody kořeny omezen nízkou teplotou (Davies et al., 1982). Uzavírání průduchů při působení nízké teploty jako následek redukce hydraulické vodivosti kořenů potvrzuje také (Bassirirad et al., 1993). Chladem indukované uzavírání průduchů se však může projevit i jako přímý efekt nízké teploty na samotné svěrací buňky průduchu (Honour et al., 1995), kdy nízká teplota ovlivňuje enzymy a iontové kanálky zodpovědné za aktivní udržení osmotického potenciálu svěracích buněk (Ilan et al., 1995).

Dle Ohsumiho et al. (2007) hraje funkce průduchů významnou roli při transpiraci a fotosyntéze. Vodivost průduchů pro výměnu plynů a transpiraci těsně koreluje s procesem fotosyntézy, jak bylo zjištěno např. u rýže seté (*Oryza sativa* L.) (Kuroda and Kumura, 1990; Kanemura et al., 2005). Z prací Flexase et al. (1999), Allena et al. (2000) a Fenga and Caoa (2005) vyplývá, že nízká teplota působí na fotosyntézu právě ovlivněním vodivosti průduchů, ale také fotosyntetických enzymů (Liang et al., 2004) a genové exprese (Martino-Catt and Ort, 1992). De Lucia et al. (1991) uvádějí, že uzavírání průduchů bylo dominantním faktorem limitujícím rychlost čisté fotosyntézy u rostlin borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) při nízké teplotě půdy.

Hodnota vodivosti průduchů je určena několika vlastnostmi, jako je hustota, velikost a míra otevřenosti průduchů (Ohsumi et al., 2007). Vodivost průduchů (g_s) je úměrná hustotě průduchů a průměrné velikosti průduchové štěrbiny a nepřímo úměrná délce difúzní cesty determinované hloubkou průduchové štěrbiny (Meidner and Mansfield, 1968).

Man and Lieffers (1997) v pokusech se semenáčky smrku sivého [*Picea glauca* (Moench.) Voss.] zjistili zvyšování hodnot rychlosti transpirace a naopak pokles hodnot WUE (efektivita využití vody) s rostoucí teplotou jehlic při měření na jaře, v létě i na podzim.

Klesající rychlost transpirace při působení nízkých teplot vzduchu může být spojena rovněž s vlivem nízké teploty půdy. Clements and Martin (1934) testovali vliv nízké půdní teploty na transpiraci u slunečnice roční. S klesající teplotou půdy z 37 na 13 °C klesala pozvolna i úroveň transpirace. Při teplotě pod 13 °C nastal prudký pokles této charakteristiky. Rostliny začaly vadnout při 4,5 °C, při 3 °C byla rychlost transpirace redukována o polovinu a při teplotě půdy 1 °C byly rostliny zcela zvadlé. Opětovným zvýšením půdní teploty však rostliny velmi rychle regenerovaly. Rovněž Kramer (1940) zaznamenal pokles transpirace u rostlin slunečnice při postupném poklesu půdní teploty. Při teplotě půdy 1 °C se transpirace

snížila na 20 až 25 % oproti kontrolním rostlinám (půdní teplota 25 °C). Pokles transpirace vysvětluje Mellander et al. (2004) jako důsledek snížené vodivosti průduchů a poklesu propustnosti kořenů způsobené nízkou teplotou půdy. Ovšem nízká půdní teplota není jediným faktorem limitující transpiraci. Jde spíš o kombinaci nízké půdní teploty a nadzemních podmínek, jako teplota vzduchu a délka dne.

2.7.1.3. Vliv nízkých teplot na efektivitu využití vody

Efektivita využití vody (WUE) může být definována několika způsoby, avšak vždy jako spotřeba vody na jednotku produkce. Ve fyziologii rostlin jsou základní jednotkou produkce moly uhlíku získaného fotosyntézou (P_N) v poměru k množství vody vydané transpirací (E), tedy: $WUE = P_N/E$ (Condon et al., 2004). Tato charakteristika se nejčastěji využívá při studiu vodního stresu (Blum, 2005; Aranda et al., 2007, Sun et al., 2012) či stresu zasolením (Radwan et al., 2000), ale i při sledování změn vyvolaných dalšími faktory, jako např. srovnání WUE u Bt a konvenční linie rýže seté (*Oryza sativa* L.) (Guo et al., 2011). Sledování vlivu nízké teploty na WUE však doposud nebylo dostatečně studováno.

Navarrete-Campos et al. (2012) ve svých pokusech předpokládali, že genotypy rostlin druhu *Eucalyptus globulus* Labill. a hybridy druhů *E. globulus* Labill. a *E. nitens* Deane and Maiden, které budou vykazovat vyšší hodnotu WUE po působení stresu suchem, mají větší odolnost k suchu, k suchem indukované fotoinhibici a také ke stresu mrazovými teplotami. Poté, co byly pokusné rostliny vystaveny suchu a následně mrazovým teplotám od -3 do -15 °C, bylo u genotypů, které byly schopné zvýšit hodnotu WUE, zjištěno rovněž zvýšení tolerance k mrazovým teplotám. Je známo, že vodní stres může indukovat podobné metabolické a fyziologické reakce, jako se objevují během chladové aklimace (Coopman et al., 2010). Typickou reakcí je akumulace dehydrinů (Bravo et al., 2003), osmotické přizpůsobení a aktivace antioxidantních systémů (Shvaleva et al., 2006). Ovšem z pokusů Navarrete-Campos et al. (2012) vyplývá, že ačkoliv se zabývali tolerancí k mrazovým teplotám indukovanou vodním stresem, nevyužili sledování změn WUE k přímému hodnocení vlivu mrazové teploty, ale k hodnocení vodního stresu. Přesto uvádějí, že WUE může být vhodným nástrojem pro stanovení mrazové tolerance.

Efektivita využití vody je získána jako poměr rychlostí fotosyntézy a transpirace. Je tedy zřejmé, že hodnoty WUE se mohou měnit v závislosti na změnách těchto charakteristik. Mokotedi (2010) uvádí, že změna rychlosti transpirace může ovlivnit výslednou hodnotu WUE, přičemž rychlost fotosyntézy může být stále vysoká; v pokusech Pipera et al. (2007)

byly rozdíly hodnot WUE ovlivněny redukcí čisté fotosyntézy. Závislost hodnot WUE na rychlosti čisté fotosyntézy a transpirace potvrzují rovněž Ma et al. (2004) a Guo et al. (2011).

2.7.1.4. Vliv nízkých teplot na vlastnosti buněčných membrán

Nízké teploty obecně zpomalují kinetiku chemických reakcí, což se týká i všech enzymaticky katalyzovaných reakcí probíhajících v živých organismech. Zpomalení termálního pohybu molekul způsobuje také významné fyziologické změny, mezi které patří pokles fluidity (tekutosti) buněčných membrán (Prášil et al., 2010), přičemž se jedná o vrtanou fyzikální změnu (Hopkins and Hüner, 2004). Pokles fluidity membrán je jedním z prvních projevů poškození rostlin nízkou teplotou a má významný negativní vliv na průběh mnoha fyziologických dějů lokalizovaných v membránách, jako je selektivní transport molekul, metabolická přeměna látek, transformace energie (respirace, fotosyntéza) či procesy spojené s přenosem informací (signální dráhy) (Prášil et al., 2010).

Membránové lipidy jsou tvořeny diacylglyceridy, které obsahují 2 mastné kyseliny s 16ti nebo 18ti atomy uhlíku, přičemž některé z nich jsou nenasycené a jiné nasycené. Protože nasycené mastné kyseliny (a lipidy, které je obsahují) tuhnou při vyšších teplotách než nenasycené, má vzájemný poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin rozhodující vliv na polotekutost membrán. K chladu citlivé rostliny mají větší poměr nasycených mastných kyselin, a tedy i vyšší teplotu přechodu membrány z polotekutého stavu do stavu gelu nebo semikrystalického stavu, označovanou jako „teplota fázového přechodu“. Např. pro membránu mitochondrií k chladu citlivé rostliny viny zlaté [*Vigna radiata* (L.) R. Wilcz.] je teplota fázového přechodu 14 °C. Naopak rostliny chladuvzdorné mají menší podíl nasycených mastných kyselin, a proto je i teplota fázového přechodu nižší. Při chladové aklimaci se podíl nenasycených mastných kyselin zvyšuje (tj. dochází k desaturaci membránových lipidů), snižuje se teplota fázového přechodu (Hopkins and Hüner, 2004), a je tak zajištěno zachování fluidity (a tedy i funkčnosti) membrán za nižší teploty (Prášil et al., 2010).

Při přechodu membrány z polotekutého stavu do stavu gelu je porušena integrita membránových kanálků, což vede ke ztrátě kompartmentace a k výtoku látek do okolního prostředí, a tím je narušena funkce bílkovin tvořících dýchací aparát a fotosystémy a dalších membránově založených metabolických procesů. Membrány chladuvzdorných nebo aklimatizovaných rostlin jsou schopny udržet svoji polotekutost při mnohem nižších teplotách, a ochránit tak tyto rozhodující buněčné funkce před poškozením (Hopkins and

Hüner, 2004). Desaturace membránových lipidů je tedy úzce spojena s řadou biologických jevů, jako např. zachování funkce chloroplastů, vývoj pylu a tolerance k chladu (Kodama et al., 1995; McConn and Browse, 1996; Routaboul et al., 2000), ale i s dalšími fyziologickými ději lokalizovanými v membránách (Prášil et al., 2010).

Buněčné membrány jsou rovněž velmi náchylné k poškození mrazem, při jehož výskytu na ně působí mechanická síla rostoucích ledových krystalů (Gusta and Wisniewski, 2012). Kontakt krystalů ledu s biomembránou vede k její desintegraci (Beck et al., 2007).

2.7.1.5. Vliv nízkých teplot na obsah chlorofylu *a* a *b*

Redukce obsahu chlorofylů je jedním ze symptomů poškození širokou škálou stresů (Lawson et al., 2001). Např. v pokusech Baeka and Wooa (2010) byl celkový obsah chlorofylů u dvou druhů stromů *Pterocarpus indicus* Willd. a *Erythrina orientalis* Murr. rostoucích v lokalitách se znečištěným ovzduším průkazně nižší, než u jedinců rostoucích v podmínkách neznečištěného ovzduší. V pokusech Liu and Shi (2010) obsah fotosynteticky aktivních pigmentů prudce klesl při působení kombinace zasolení a alkalického prostředí. Obsahu chlorofylů je také citlivým indikátorem teplotního stresu (Kosmala et al., 2009). Proto je stanovení obsahu chlorofylů v listech užitečným diagnostickým nástrojem (Neufeld et al., 2006).

Chloroplasty patří mezi organely nejdříve a nejsilněji ovlivněné působením nízkých teplot (Murphy and Wilson, 1981; Musser et al., 1984; Wise and Naylor, 1987; Garstka et al., 2005; Sowiński et al., 2005). Mitochondrie, jádro a ostatní organely jsou k chladovým teplotám citlivé méně (Kratsch and Wise, 2000). Mnoho studií zaměřených na studium nadzemních částí rostlin vystavených působení chladu ukázalo, že chloroplasty byly prvními poškozenými organelami a vykazovaly změny v uspořádání a deformace thylakoidní membrány, desintegraci gran, spotřebování škrobu a někdy i roztržení obalu chloroplastu (Musser et al., 1984; Kratsch and Wise, 2000; Garstka et al., 2005). Další environmentální faktory prohlubující poškození chloroplastů jsou ozářenost, vodní stav rostliny a délka působení nízkých teplot (Kratsch and Wise, 2000).

Podle Lascana et al. (2001) a Neufelda et al. (2006) je obsah chlorofylů silně spojený s rychlostí fotosyntézy. Pokles obsahu chlorofylu je nežádoucí, jelikož chlorofyl je nezbytnou složku fotosystému I a II. Vyšší (resp. neredukovaný) obsah chlorofylu zajišťuje lepší zachycování a přenos světelné energie, což zvyšuje efektivitu fotosyntézy (Jaleel et al., 2009). Poškození chloroplastů a redukováný obsah chlorofylů tak nevyhnutelně vede k redukci

fotosyntézy, produkce biomasy a v konečném důsledku i k poklesu výnosu plodiny (Huseynova et al., 2007; Zhao et al., 2007; Jaleel et al., 2009).

2.7.2. Působení chladu

Mezi rostliny citlivé na chlad patří převážně druhy tropického a subtropického původu (Prášil et al., 2010). Kukuřice setá (*Zea mays* L.), rajče jedlé (*Solanum lycopersicum* L.), okurka setá (*Cucumis sativus* L.), sója luštinatá [*Glycine max* (L.) Merrill.], bavlník srstnatý (*Gossypium hirsutum* L.) a banánovník (*Musa* sp.) jsou obzvláště citlivé a vykazují známky poškození při teplotě pod 10 až 15 °C (Hopkins and Hüner, 2004). U některých extrémně citlivých tropických druhů může nastat poškození již při teplotě 22 °C (Prášil et al., 2010). Dokonce rostliny mírného pásma, jako lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) a chřest (*Asparagus* sp.), mohou být poškozeny teplotou nad bodem mrazu (0 až 5 °C) (Hopkins and Hüner, 2004).

Rostlinné druhy mírného pásma jsou však obecně k chladu odolné. Citlivá ale mohou být některá jejich vývojová stádia, jako je klíčení semen a vzcházení rostlin (Prášil et al., 2010). U některých rostlinných druhů je na nízké teploty obzvláště citlivý reprodukční vývoj. Např. u rostlin rýže seté (*Oryza sativa* L.) vystavení chladu v době kvetení způsobilo vznik sterilních květů (Hopkins and Hüner, 2004). Rovněž jednotlivé rostlinné orgány se vyznačují různou citlivostí k chladu. Mezi nejcitlivější patří reprodukční orgány, z vegetativních orgánů pak pletiva rychle rostoucí a silně nasycená vodou (Prášil et al., 2010).

Poškození chladem vykazuje širokou škálu symptomů a metabolických dysfunkcí u k chladu citlivých pletiv včetně narušení proudění protoplazmy, omezení dýchání, fotosyntézy a syntézy bílkovin a rovněž změny vzoru tvorby bílkovin (Hopkins and Hüner, 2004). Rostliny citlivé k chladu také nedokáží zachovat polotekutost biomembrán zvýšením podílu nenasycených mastných kyselin, čímž by se přizpůsobily nižší teplotě. Výsledkem je vyšší propustnost membrán (Verlues et al., 2005), která však může být zvýšena rovněž teplotně závislou deaktivací iontových pump nebo kanálků (Vogg et al., 1998). Hewezi et al. (2006) zaznamenali také nižší rychlost růstu rostlin slunečnice roční pěstovaných při chladových teplotách (7 a 15 °C) ve srovnání s rostlinami rostoucími v kontrolních podmínkách (pěstební teplota 25 °C). Za hlavní faktor způsobující poškození rostlin citlivých k chladu se však považuje narušení metabolismu buněk, poruchy příjmu vody a důležitých látek a postupné vyčerpání rostliny (Prášil et al., 2010).

Marocco et al. (2005) rozděluje stres chladem u kukuřice seté do tří kategorií: (i) mírný stres (12 až 17 °C) za světla: fotosyntéza a růst jsou redukovány a jako reakce na nadměrnou světelnou energii zachycenou chlorofylem jsou indukovány fotoprotektivní mechanismy; (ii) silný stres (2 až 10 °C) za světla: objevuje se chladem indukovaný vodní stres, protože rychlost transpirace přesáhne rychlost příjmu vody kořeny, u kterých je inhibována kořenová hydraulická vodivost a (iii) stres nízkou teplotou za tmy: neprojeví se oxidativní stres u chloroplastů ani vodní stres, avšak mění se genová exprese.

2.7.3. Přizpůsobení chladu

U řady rostlinných druhů je pro rozšíření oblastí jejich pěstování a šlechtění důležité vybrat chladuvzdorné genotypy. Bylo zjištěno, že chladuvzdornost se liší v populacích řady druhů, např. u populací rostlin jetele plazivého (*Trifolium repens* L.) (Annicchiarico et al., 2001), *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Bravo et al., 2007) nebo *Eupatorium adenophorum* Spreng. (Zhang et al., 2009). Z výsledků Zhenga et al. (2009) vyplývá, že populace rostlin dávice černého (*Jatropha curcas* L.) pocházející z větších nadmořských výšek, byla více odolná k nočnímu chladu než populace z menších nadmořských výšek, což odpovídá i výsledkům dalších studií (Taschler and Neuner, 2004; Kalberer et al., 2007). Taschler and Neuner (2004) rovněž zjistili, že s rostoucí nadmořskou výškou stoupá mrazuvzdornost.

Schopnost rostlin přežít působení nízkých teplot není stálá, ale mění se v závislosti na vnějších faktorech, jako je roční období a zejména u rostlin s odolností vůči mrazu je tato schopnost výsledkem geneticky podmíněných fyziologicko-biochemických změn, souhrnně označovaných jako chladová aklimace (*cold acclimation*), tj. otužování (Prášil et al., 2010). Rostlinné druhy se však velmi liší schopností chladové aklimace a snášením mrazových teplot (Gusta and Wisniewski, 2012).

Chladová aklimace je vícesložkový proces, jehož základní podstatou je tvorba cukrů při fotosyntéze, které slouží nejen jako zdroj energie během samotné chladové aklimace, ale mají též kryoprotektivní účinky, zmírňují dehydrataci buňky během působení mrazových teplot a mohou také podporovat regeneraci při mrazem způsobeném poškození (Gusta and Wisniewski, 2012). Kapacita fotosyntézy při působení chladu tak úzce koreluje s rozvojem mrazové tolerance (Öquist et al., 1993) a je rozhodující pro její získání (Kosmala et al., 2009), jelikož (fotosyntézou zajištěná) akumulace cukrů při nízkých teplotách je klíčovým faktorem pro plné rozvinutí mrazové tolerance (Levitt, 1980).

Proces aklimace a chladová tolerance dále zahrnuje mechanismy jako modifikace buněčné stěny a buněčné membrány (složení lipidů), tedy schopnost zachovat polotekutost biomembrán (a tím i funkci membránově vázaných procesů) zvýšením podílu nenasycených mastných kyselin (Verlues et al., 2005). Dochází také k aktivaci ochranných proteinů (vysokomolekulární hydrofilní proteiny) a reparačního systému, které chrání či zajišťují opravu poškozených buněčných struktur (Prášil et al., 2010). Při chladové aklimaci dále nastávají změny v antioxidantním ochranném systému rostliny a změny rychlosti růstu a morfologie, které jsou regulovány širokým spektrem tzv. *cold-induced genů* (McKersie et al., 1999; Wanner and Junttila, 1999; Xin and Browse, 2000; Uemura et al., 2003).

S tolerancí k chladu pak souvisí osmotické přizpůsobení, kdy hromadění látek v buněčné šťávě snižuje osmotický potenciál. Zvýšená koncentrace osmoticky aktivních látek (Thomas and James, 1993; Wanner and Junttila, 1999; Xin and Browse, 2000; Kosová et al., 2007) přispívá k ochraně strukturální celistvosti buněčných membrán a proteinů, ale nemá negativní vliv na metabolismus rostliny ani v případě vysoké koncentrace těchto látek v cytoplasmě (Hare and Cress, 1997; Xin and Browse, 2000; Prášil et al., 2007). Mezi osmoticky aktivní látky patří zejména volné sacharidy, které vznikají hydrolyzou škrobu a jsou známy svým kryoprotektivním účinkem, který je zajištěn udržením nízkého osmotického potenciálu v buňce (Pearce, 2001), ale také další látky, jakými jsou alkaloidy, volné aminokyseliny (např. prolin a betain) aj. (Sharma and Dietz, 2006; Sokhansaj et al., 2006). Jejich fyziologická funkce zahrnuje udržování turgoru buněk, stabilizaci proteinů a buněčných struktur a vázání reaktivních forem kyslíku (Wang et al., 2003). Chladová tolerance však zahrnuje i další faktory, jako je např. větší tloušťka listů (Hekneby et al., 2006; Dumlao et al., 2012) a další změny v jejich anatomii (McCully et al., 2004).

K otužování většinou dochází při postupném snižování teploty prostředí, ale může být iniciováno např. i krátkým dnem či mírným suchem. Naopak v předjaří, s postupným zvyšováním teploty a obnovením růstu a vývoje rostlin, jejich potenciální odolnost k nízkým teplotám klesá (Prášil et al., 2010).

2.7.4. Působení mrazu

Ovlivnění fyziologických procesů stresem mrazovou teplotou se velmi podobá působení chladu s tím rozdílem, že mrazová teplota způsobuje intenzivnější projev změn fyziologických procesů (Nilsen and Orcutt, 1996). Hlavní rozdíl mezi působením chladu a

mrazu pak spočívá v tom, že poškození vlivem mrazu není způsobeno jen samotnou mrazovou teplotou, ale tvorbou krystalů ledu (Hopkins and Hüner, 2004).

Zejména rychlost mrznutí a tání je velmi významným faktorem udávajícím schopnost rostliny tolerovat (*stress tolerance*) nebo vyhnout se (*stress avoidance*) poškození mrazovou teplotou. Rychlost tvorby ledu je také významná ve vztahu k míře poškození rostlinných pletiv (Nilsen and Orcutt, 1996). Rostlinné pletivo dokáže přežít prudké zmrznutí např. použitím tekutého dusíku, které vyvolává tvorbu malých krystalů ledu, jež způsobují pouze minimální nebo žádné poškození buněčných struktur. Ovšem tento typ mrznutí se v přírodě nevyskytuje (Scott, 2008), naopak obecně platí, že čím rychleji se led tvoří, tím závažnější poškození způsobuje (Nilsen and Orcutt, 1996).

Při rychlém mrznutí v laboratorních podmínkách, kdy teplota klesá o 10 °C a více za minutu, dochází k tvorbě ledových krystalů uvnitř protoplastu, tj. intracelulárně (Masarovičová et al., 2002). Intracelulární tvorba ledu je však nežádoucí (Griffith and Yaish, 2004). Led, který se tvoří v intracelulárním prostoru, přitahuje díky svému nižšímu vodnímu potenciálu další vodu z buňky, dokud nedojde k vyrovnání hodnot vodního potenciálu zbývajících koncentrovaného buněčného roztoku a vodního potenciálu extracelulárního ledu. Tvorba ledu uvnitř buňky je tedy škodlivá, protože krystaly ledu nevyužívají hydrofobní síly (jako voda v tekutém stavu), které jsou nezbytné pro zachování lipidové dvojvrstvy. Kontakt krystalů ledu s biomembránou proto vede k její desintegraci (Beck et al., 2007). Pokud je však rychlost tvorby intracelulárního ledu pomalejší, je umožněna tvorba velmi jemně strukturovaných ledových krystalů uvnitř buněk, které nemají letální efekt. Taková tvorba ledu se ale v přirozených podmínkách vyskytuje velmi vzácně (Nilsen and Orcutt, 1996).

K ochraně biomembrán slouží také tzv. *antifreeze proteiny* (Griffith and Yaish, 2004), které byly nalezeny např. v tělech ryb a hmyzu (Duman and Olsen, 1993) a vyskytují se rovněž u celé řady přezimujících rostlin. Spojují se s malými krystaly ledu, tvoří hydrofobní plášť (Antikainen et al., 1993) a mohou tak zmírnit poškození biomembrán způsobené ledovými krystaly, ačkoliv je diskutabilní, jak jsou tyto proteiny exportovány z protoplastu a hromadí se na vnější straně buněčné stěny (Griffith et al., 2003). Antifreeze proteiny ale také inhibují samotný růst ledových krystalů tím, že snižují bod mrznutí (Gusta and Wisniewski, 2012).

V přirozených podmínkách teplota klesá podstatně pomaleji (Masarovičová et al., 2002). Během období výskytu mrazových teplot na jaře a na podzim klesá teplota rychlostí 1 až 2 °C/hod. (Nilsen and Orcutt, 1996). V takovém případě se krystaly ledu začínají tvořit

v mezibuněčných prostorech a v xylému, což pro otuženou rostlinu nemá letální účinek a po roztání ledu rostlinné pletivo plně regeneruje. Růst ledových krystalů v extracelulárním prostoru vyvolává odvádění vody z protoplastu do extracelulárního prostoru, a tedy dehydrataci buňky (Taiz and Zeiger, 2008). Ačkoliv dehydratace způsobuje vadnutí pletiva, zabraňuje také nežádoucí tvorbě ledu v protoplastu (Scott, 2008). Přesto dehydratace protoplastu zůstává hlavní příčinou poškození mrazem (Hale and Orcutt, 1987). Může totiž vyvolat řadu dalších stresů, které jsou příčinou poškození buněk. Mezi tyto faktory patří např. zmenšení objemu protoplastu, změny pH (Prášil et al., 2010), zvýšení koncentrace iontů uvnitř buňky, což může způsobit destabilizaci membrán, ovlivnit strukturu bílkovin a ve výsledku i funkce buňky (Nilsen and Orcutt, 1996).

K dehydrataci může dojít zastavením příjmu vody rostlinou (Markhart et al., 1979) způsobeným inhibicí hydraulické vodivosti kořenů (Marocco et al., 2005) a porušením uzavírání průduchů u k chladu citlivých rostlin (Honour et al., 2005), což vede ke stavu, kdy transpirace převyšuje nad příjmem vody. Ovšem dehydratace je často považována za následek poškození membrán mrazem, kdy membrána ztrácí elasticitu a vykazuje výtok vody (Come, 1992). Mrazuvzdornost rostliny tedy spočívá v extracelulární tvorbě ledu spojené s tolerancí protoplastu k dehydrataci při nízkých teplotách (Beck et al., 2007). U rostlin odolných k mrazu jsou podmínky pro tvorbu ledových krystalů v mezibuněčném prostoru příznivější, jelikož mezibuněčné prostory obsahují tzv. krystalizační jádra (*ice nucleators*), která tvorbu ledu iniciují (Prášil et al., 2010). Krystalizační jádra jsou obvykle přítomny v apoplastu, ale také na povrchu rostliny. Jedná se zejména o prachové částice, bakterie (např. *Pseudomonas syringae* Van Hall a *Erwinia herbicola* Winslow et al.), houby, drobný hmyz, ale i samotné (již vytvořené) ledové krystaly (Nilsen and Orcutt, 1996).

Rychlost tvorby ledu je také závislá na pórovitosti membrán a buněčné stěny. Buněčná stěna a membrány obsahují mikrokapiláry různé velikosti (Ashworth, 1993). Čím menší je velikost a počet mikrokapilár, tím pomaleji voda v nich obsažená mrzne a naopak. Pokud však krystalizační jádra iniciují mrznutí vody, tvorba ledových krystalů začíná v xylému a ve vodivých pletivech (vaskulárním systému) rychlostí cca 60 cm/min. (Chen et al., 1995) a končí až v okamžiku, kdy led narazí na pletivo s vyšší teplotou nebo na bariéru zabraňující další tvorbě ledu (membrána či buněčná stěna) (Nilsen and Orcutt, 1996).

Rozsah a typ poškození způsobeného mrazovou teplotou závisí na mrazové toleranci příslušného rostlinného druhu a jednotlivých pletiv rostliny, na obsahu vody v buňkách, stupni podchlazení - viz kapitola 2.7.5., rychlosti mrznutí a růstu ledových krystalů, délce

doby zmrznutí a dalších faktorech (Gusta and Wisniewski, 2012), jako je např. areál výskytu (Maqbool et al., 2010) a stáří rostliny (Gusta et al., 2009), přičemž rostliny v raných vývojových stádiích jsou citlivější než v pozdějších fázích, kdy jsou již vyvinuty pravé listy (Nilsen and Orcutt, 1996).

Nejvýraznější reakce na krátkodobé působení mrazové teploty se projevuje u teplomilných druhů, kdy se vodní potenciál sníží o 0,3 až 0,4 MPa, rostlina viditelně uvadá, rychlost čisté fotosyntézy je snížena o 60 až 80 % a klesá rovněž vodivost průduchů (Wolfe, 1991). Současně však klesá i osmotický potenciál, jeho výsledný pokles snižuje vnitrobuněčnou teplotu mrznutí a minimalizuje pohyb vody z buňky do extracelulárních prostor a následnou dehydrataci buňky (Thomas and James, 1993; Xin and Browse, 2000; Kosová et al., 2007; Prášil et al., 2007). Pomaleji se projevující poškození pletiv nebo celé rostliny mrazem je pak výsledkem sekundárních procesů, jako je oxidativní stres aj. (McKersie et al., 1999).

2.7.5. Přizpůsobení mrazu

Stejně tak jako v případě stresu chladem se rostliny vzájemně liší mechanismy vyhnutí se a tolerance (*stress avoidance* a *stress tolerance*) stresu mrazem. Některé k nízkým teplotám citlivé rostliny nepřežijí teplotu lehce pod bodem mrazu, zatímco např. obilniny se dokáží přizpůsobit teplotě dosahující $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a plně aklimatizované dřeviny tolerují teplotu až do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Schopnost tolerance nebo vyhnutí se poškození mrazem záleží na několika faktorech, jako je rychlost mrznutí a tání, rychlost a míra aklimace, interakce rostlina-voda-půda, množství živin, morfologické charakteristiky a habitus rostliny. Zejména rychlost mrznutí a tání je velmi významným faktorem (Nilsen and Orcutt, 1996).

Rostliny rostoucí v oblastech mírného klimatu obecně dokáží snášet mrazové teploty buď prostřednictvím mechanismu vyhnutí se, nebo jejich tolerancí. Jedním ze způsobů vyhnutí se je produkce metabolického tepla, kdy rostlina zvýší svou teplotu a nedojde tak k jejímu mrznutí. Tento proces byl zaznamenán např. u některých druhů z čeledi arekovitých (*Arecaceae*) (Bowers, 1994).

Dalším mechanismem vyhnutí se poškození mrazem je proces podchlazení (*supercooling*) (Nilsen and Orcutt, 1996), tj. schopnost snížit teplotu, při které se začínají tvořit ledové krystaly (Hekneby et al. 2006). Podchlazení jsou do určité míry schopny všechny rostliny. Hluboké podchlazení je jedinečná vlastnost zejména řady druhů dřevin, kdy rostlina dokáže udržet vodu v kapalném stavu při teplotě až $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gusta and Wisniewski,

2012). Míra podchlazení se ale liší mezi jednotlivými druhy a je rovněž ovlivněna přítomností krystalizačních jader (Wiesniewski et al., 2002). Podchlazení rostlina dokáže zajistit buď akumulací sacharidů a dalších osmoticky aktivních látek v cytoplazmě nebo odváděním vody z jedné části pletiva/rostliny do jiné, méně citlivé k mrazovým teplotám (Nilsen and Orcutt, 1996). Akumulace osmoticky aktivních látek v buněčné šťávě vede k osmotickému přizpůsobení, ke snížení bodu mrznutí buněk (Gonzales et al., 1990; Tronsmo et al., 1993) a k udržení obsahu vody a turgoru živých buněk (Steponkus, 1984). Pokud však nastane mrazem indukovaná dehydratace a překročí-li hranici tolerance k dehydrataci, dochází k poškození membránových struktur buňky (Uemura and Steponkus, 1994) a ke ztrátě jejich permeability. Proto může být také ochrana buněčných membrán proti mrazové dehydrataci hlavním faktorem tolerance k mrazovým teplotám. Toho je dosaženo jak změnami ve složení membránových lipidů (Collins et al., 2002), tak akumulací osmoticky aktivních látek (sacharidy, prolin, betain apod.) v cytosolu (Xin and Browse, 2000), vedoucí k poklesu hodnoty osmotického potenciálu. Rozklad sacharidů hydrolýzou škrobu pro osmotické přizpůsobení, obnovení a udržení růstu je tak např. dle Ashwortha et al. (1993) a Rosnese et al. (1993) jedním z významných aspektů tolerance k nízkým teplotám.

Ačkoliv pokles osmotického potenciálu snižuje vnitrobuněčnou teplotu mrznutí a minimalizuje pohyb vody z buňky do extracelulárních prostor a následnou dehydrataci buňky (Thomas and James, 1993; Xin and Browse, 2000; Kosová et al., 2007; Prášil et al., 2007), snížení bodu tuhnutí přítomností osmoticky aktivních látek je účinné jen při mírných mrazech. Odolnost k velmi nízkým teplotám je vždy spojena se schopností rostliny snášet silnou dehydrataci buněk. Jedině pevná buněčná stěna je schopna zabránit větším deformacím buněk při tvorbě ledu v apoplastu a při dehydrataci cytosolu, a tím chránit zejména cytoplasmatickou membránu a organely před mechanickým poškozením (Procházka et al., 1998).

Odolnost ke stresu mrazem tedy souvisí i s pevností buněčné stěny. Pevnější buněčná stěna může při vytváření ledových krystalů zajistit menší stlačení protoplastu. Avšak cytoplasmatická membrána je s buněčnou stěnou spojena (Nilsen and Orcutt, 1996) a při působení mrazu dochází k plazmolýze v důsledku odvádění vody ze symplastu do apoplastu, což vede ke zmenšení velikosti plochy povrchu membrány (Gusta and Wisniewski, 2012). Smršťováním cytoplasmatické membrány může dojít až k jejímu odtržení od (pevné) buněčné stěny a k případnému poškození. Naopak při rychlém tání ledu, kdy buněčná stěna dokáže rychle obnovit svůj výchozí tvar, se cytoplasmatická membrána do původního tvaru buňky

vrací pomaleji (Nilsen and Orcutt, 1996), buňka nedokáže produkovat dostatek stavebních látek potřebných pro navrácení membrány do původního stavu (Gusta and Wisniewski, 2012), a tak rovněž může nastat její odtržení od rozpínající se buněčné stěny a následné poškození. Pomalé tání naopak poskytuje cytoplazmatické membráně čas pro obnovu a „růst“ s rozpínající se buněčnou stěnou. Náhlé a rychlé mrznutí objevující se v přirozených podmínkách tak způsobuje nejzávažnější poškození rostlin rostoucích v prostředí s výskytem mrazových teplot (Nilsen and Orcutt, 1996).

Mrazová tolerance dále zahrnuje např. aktivaci antioxidantního systému rostliny redukující oxidativní stres (McKersie et al., 1999) a zejména schopnost tvorby ledu v extracelulárních prostorech (McCully et al., 2004), což pro otuženou rostlinu nemá letální účinek a po roztání ledu rostlinné pletivo plně regeneruje. Taková tvorba ledu je ovšem spojena s dehydratací buňky (Taiz and Zeiger, 2008).

Mechanismy vyhnutí se poškození mrazovou teplotou jsou častější spíše u bylinných druhů, naopak u vytrvalých a stálezelených dřevin převažuje tolerance (Nilsen and Orcutt, 1996). Oba mechanismy se však mohou vyskytovat i ve vzájemné koexistenci (Gaspar et al., 2002). Např. u opadavých dřevin dochází k podchlazení parenchymu (tj. k snížení bodu mrznutí a vyhnutí se tak poškození pletiva krystaly ledu - mechanismus vyhnutí), zároveň se však led vytváří v kůře, která je ale k mrazové teplotě (resp. ke zmrznutí) tolerantní (Nilsen and Orcutt, 1996).

3. VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

3.1. Vědecké hypotézy

V práci byly sledovány fyziologické reakce souboru genotypů slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) při působení nízkých teplot na počátku vegetativního růstu. V souvislosti s řešením projektu byly stanoveny následující hypotézy:

- 1) Mezi vybranými genotypy slunečnice roční se při působení stresu nízkou teplotou na počátku vegetativního růstu projeví rozdílné reakce ve sledovaných fyziologických charakteristikách (vliv genotypu).
- 2) Vybrané genotypy slunečnice roční budou reagovat rozdílně na působení různých nízkých (resp. mrazových) teplot (vliv teploty).
- 3) Lze stanovit relevantní fyziologické ukazatele odolnosti slunečnice roční k nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu.

3.2. Cíle práce

V souvislosti s tématem práce byly stanoveny tyto cíle:

- 1) Stanovení fyziologické variability vybraného souboru genotypů slunečnice roční z hlediska odolnosti k nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu.
- 2) Stanovení nejrelevantnějších fyziologických ukazatelů odolnosti slunečnice roční k nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu.

4. MATERIÁL A METODY

Vzhledem k dlouholeté spolupráci s partnerským pracovištěm INRA/ENSAT-INP Toulouse, Francie byly v této práci provedeny dva experimenty: (i) pokus 1 (ČR) a (ii) pokus 2 (Francie). Pracoviště INRA/ENSAT-INP je zaměřeno na komplexní výzkum slunečnice roční. Předmětem výzkumu je např. studium odolnosti vůči chorobám (As-Sadi et al., 2011), vodního stresu (Haddadi et al., 2011), stresu nízkou teplotou (Allinne et al., 2009) a dalších oblastí, kdy jsou využívány především metody fyziologie a ekofyziologie rostlin (Grieu et al., 2008b) a molekulární biologie a genetiky (Cadic et al., 2013). Ve Francii byl rovněž testován časnější jarní výsev slunečnice (Allinne et al., 2009), který je v současnosti zvažován i pro podmínky České republiky.

4.1. Pokus 1 (ČR)

4.1.1. Rostlinný materiál

Sledované fyziologické charakteristiky byly hodnoceny u genotypů slunečnice roční C120, C124, C148 a PAC2, jejichž genetickou charakteristiku připravilo partnerské pracoviště INRA/ENSAT-INP Toulouse, Francie. Populace rekombinantních imbredních linií C120, C124 a C148 je výsledkem křížení mezi rodičovskými genotypy RHA266 a PAC2. Jedná se o generaci F8 získanou metodou SSD (Single Seed Descent). Genotyp RHA266 je výsledkem křížení plané slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) a odrůdy Peredovik (původem z Ruska). Genotyp PAC2 byl vyšlechtěn ve výzkumném ústavu INRA Toulouse křížením genotypu HA61 a plané slunečnice řapíkaté (*Helianthus petiolaris* Nutt.).

4.1.2. Pěstební podmínky

Nažky byly předklíčeny v termostatu BT120 (Chirana Brno, ČR) na vlhkém filtračním papíru při teplotě 20 °C po dobu 18 hodin dle metodiky ISTA (International Seed Testing Association) a poté byly zasety do pěstebních nádob (rozměr 11x11x11,5 cm) s homogenizovaným pěstebním zahradnickým substrátem A (Rašelina a. s., ČR; pH 5,5 - 6,0, spalitelné látky min. 35 %, částice nad 25 mm max. 5 %, celkový N: 80 - 120 mg l⁻¹, P₂O₅: 50 - 100 mg l⁻¹, K₂O: 100 - 150 mg l⁻¹) a kultivovány v klimatizované komoře Conviron E8 (Conviron, Winnipeg, Canada).

Rostliny byly v klimatizované komoře pěstovány do fáze 2 pravých listů v simulovaném průběhu dne a noci v teplotním rozmezí 10 až 23 °C (noc/den). Relativní vlhkost vzduchu (Φ) v komoře v simulovaném průběhu dne a noci byla nastavena na 65 až 70 % a fotosyntetická hustota toku fotonů (PPFD) se pohybovala v rozmezí 0 až 560 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (noc/den).

Rostliny byly zalévány 3krát týdně, a to v pondělí a středu (75 ml vody/1 pěstební nádoba) a v pátek (100 ml vody/1 pěstební nádoba). Během pokusu nebyly rostliny přihnojovány.

4.1.3. Působení mrazových teplot

Ve fázi 2 pravých listů byly rostliny vystaveny působení mrazové teploty po dobu 10 hod. v temnostní fázi fotoperiody (režim noc). Poté byla teplota opět zvýšena na teplotní rozmezí 10 až 23 °C (noc/den) a rostliny byly ponechány v klimatizované komoře 7 dnů pro regeneraci. Testované mrazové teploty byly -3 a -5 °C; pro každou z těchto teplot byl použit samostatný soubor pokusných rostlin, který zahrnoval u každého genotypu 24 rostlin rozdělených do 12 nádob, vždy po dvou v jedné nádobě.

4.1.4. Sledované charakteristiky a termíny jejich měření

Na pokusných rostlinách byly sledovány následující charakteristiky:

- rychlost čisté fotosyntézy (P_N),
- rychlost transpirace (E),
- vodivost průduchů (g_s),
- efektivita využití vody (WUE),
- fluorescence chlorofylu *a*: potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_v/F_M),
- relativní výtok elektrolytů ($REL_{\%}$),
- osmotický potenciál (Ψ_{π}) a
- koncentrace fotosynteticky aktivních pigmentů - chlorofylu *a* a *b* (c_a , c_b).

Měření vybraných charakteristik bylo prováděno před působením mrazové teploty, tj. kontrolní měření, a po působení mrazové teploty, tj. měření po působení stresu. Celkem byly vybrané charakteristiky měřeny vždy ve 4 termínech:

- 1) 9 hod. před působením mrazové teploty, tj. kontrolní měření (C),

- 2) 5 hod. po působení mrazové teploty (S1),
- 3) 3. den po působení mrazové teploty, tj. 3. den regenerace (S2),
- 4) 7. den po působení mrazové teploty, tj. 7. den regenerace (S3).

Měření sledovaných charakteristik probíhalo vždy od 8 hod. ráno.

4.1.5. Metody měření sledovaných charakteristik

Rychlost čisté fotosyntézy (P_N), rychlost transpirace (E), vodivost průduchů (g_s) a efektivita využití vody (WUE)

Měření rychlosti čisté fotosyntézy (P_N), rychlosti transpirace (E) a vodivosti průduchů (g_s) se uskutečnilo přenosným gazometrickým infračerveným analyzátozem LCpro+, otevřený systém (ADC Bio Scientific Ltd., Hoddeson, UK). Fotosyntetická hustota toku fotonů (PPFD) a teplota v listové komoře byly nastaveny na $650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $23 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sledované charakteristiky byly stanoveny pomocí následujících výpočtů:

- **Rychlost (intenzita) čisté fotosyntézy (P_N):**

$$P_N = u_s \Delta c \quad [\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}],$$

kde Δc je rozdíl koncentrací CO_2 na vstupu a výstupu do komory [$\mu\text{mol mol}^{-1}$],

u_s je množství - průtok vzduchu na 1 m^2 listové plochy [$\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$].

- **Rychlost (intenzita) transpirace (E):**

$$E = u_s \Delta W \quad [\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}],$$

kde ΔW je rozdíl koncentrací vodní páry [mol mol^{-1}],

u_s je množství - průtok vzduchu na 1 m^2 listové plochy [$\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$].

- **Vodivost průduchů (g_s):**

$$g_s = 1/r_s \quad [\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}],$$

kde r_s jsou stomatální odpory.

- **Efektivita využití vody (WUE)** byla následně vypočítána z naměřených hodnot rychlosti čisté fotosyntézy a transpirace jako jejich vzájemný poměr:

$$\text{WUE} = P_N/E \quad [\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}].$$

Měření bylo v každém termínu prováděno na 3 (jiných) pokusných rostlinách, přičemž na každé rostlině byl měřen 1 intaktní plně vyvinutý list. Po stabilizaci přístroje bylo v intervalu 1 min. zaznamenáno vždy 10 hodnot sledovaných charakteristik.

Fluorescence chlorofylu *a*: potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_V/F_M)

Potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_V/F_M), základní fluorescence (F_0), maximální fluorescence (F_M) a variabilní fluorescence (F_V) byly zaznamenány přenosným fluorometrem s technologií pulzní modulace ADC:OSI 1 FL (ADC Bio Scientific Ltd., Hoddeson, UK).

Variabilní fluorescence (F_V) byla přístrojem stanovena z hodnot základní fluorescence (F_0) a maximální fluorescence (F_M) dle následujícího matematického vztahu:

- $F_V = F_M - F_0$.

Měření bylo při každém termínu prováděno po 20 min. temnostní adaptace za použití listových klipsů na 3 (jiných) pokusných rostlinách, přičemž na každé rostlině byly měřeny 2 intaktní plně vyvinuté listy.

Relativní výtok elektrolytů (REL_%)

Stanovení relativního výtoku elektrolytů bylo prováděno na základě metodiky pokusů Campose et al. (2003) a Allinne (2010) s drobnými modifikacemi.

Z různých částí listové čepele byl odebrán soubor 5 terčíků o průměru 1,3 cm tak, aby terčík neobsahoval centrální žilnatinu. Terčíky byly nejprve promývány destilovanou vodou po dobu 2 min. a poté ponechány 24 hod. ve skleněných zkumavkách (objem 10 ml) v 5 ml destilované vody. Po 24 hod. od odběru bylo provedeno první měření elektrické vodivosti roztoku ve zkumavce (REL₁). Poté byly zkumavky s terčíky vystaveny 20 min. varu ve vodní lázni, čímž bylo dosaženo maximálního poškození buněčných struktur. Druhé měření elektrické vodivosti roztoku bylo provedeno po 24 hod. od dosažení maximálního poškození (REL₂). Míra poškození, tj. relativní výtok elektrolytů (REL_%), byla na základě změny vodivosti roztoku vyjádřena procentuálně jako poměr REL₁ : REL₂. Měření bylo při každém termínu prováděno konduktometrem GRYF 106 L3 (GRYF HB spol. s.r.o., ČR) na 3 (jiných) pokusných rostlinách, přičemž z každé rostliny byl odebrán 1 intaktní plně vyvinutý list.

Osmotický potenciál (Ψ_{π})

Měření osmotického potenciálu bylo prováděno na 3 (jiných) pokusných rostlinách, kdy byl z každé rostliny pro přípravu rostlinného materiálu použit 1 intaktní plně vyvinutý list, z kterého bylo odebráno 0,25 g čerstvé listové hmoty. Listová hmota byla uchovávána lehce stlačená v inzulínové injekční stříkačce (Myjector 1 ml, Terumo, Belgie) utěsněné parafilmem při teplotě -20°C . Před vlastním měřením byla injekční stříkačka s odebraným rostlinným materiálem ponechána při pokojové teplotě až do úplného rozmrazení rostlinného materiálu. Z každé injekční stříkačky bylo poté vytlačeno několik kapek buněčné šťávy do 2 měřicích komůrek tak, aby dno měřicí misky v komůrce bylo zcela pokryto buněčnou šťávou. Následovalo měření po dobu 30 až 40 min. Měření bylo uskutečněno na zařízení PSYPRO (Wescor Inc., Logan, USA), což je mikrovoltmetr s termočlánkem a s Peltierovým senzorem. Principem měření je psychrometrické stanovení rosného bodu ochlazováním uzavřeného prostoru měřicí komůrky. Kdy nastane kondenzace vody na měřicím termočlánku, souvisí s tenzí vodní páry v komůrce. Přístroj vyhodnocuje data na základě výchylky psychrometrické křivky při dosažení rosného bodu matematicky detekcí 50ti bodů.

Koncentrace fotosynteticky aktivních pigmentů - chlorofylu *a* a *b* (c_a a c_b)

K extrakci fotosynteticky aktivních pigmentů bylo použito 0,5 g čerstvé hmotnosti listů. Pigmenty byly převedeny z listů do acetonu *p. a.* dle metodických pokynů Šestáka et al. (1966). Poté byla měřena extinkce (tj. absorbance) acetonového extraktu při vlnových délkách 644 a 663 nm (E_{644} a E_{663}) pomocí spektrofotometru Helios Γ (Chromspec spol. s.r.o., ČR). Pro výpočet koncentrace chlorofylů v acetonovém extraktu byly následně použity matematické vztahy Nyboma (1955):

- $c_a = 9,784 \cdot E_{663} - 0,970 \cdot E_{644}$ [mg l⁻¹]
- $c_b = 21,426 \cdot E_{644} - 4,650 \cdot E_{663}$ [mg l⁻¹]

Výsledné hodnoty koncentrace chlorofylů *a* a *b* v mg l⁻¹ byly na základě známých hodnot celkového objemu acetonového extraktu a navážky převedeny na obsah chlorofylů v mg g⁻¹ čerstvé hmotnosti.

Měření bylo při každém termínu prováděno na 3 (jiných) pokusných rostlinách, přičemž z každé rostliny byl odebrán 1 intaktní plně vyvinutý list.

4.1.6. Statistické vyhodnocení získaných dat

Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí vícefaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) (mrazová teplota - genotyp - termín měření). Statistická významnost rozdílů mezi testovanými variantami byla hodnocena pomocí Tukeyho (HSD) testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Dále byla provedena regresní a korelační analýza stanovující vztah mezi (i) rychlostí čisté fotosyntézy (P_N) a potenciální fotochemickou efektivitou elektronového transportu ve fotosystému II (F_V/F_M), (ii) rychlostí čisté fotosyntézy (P_N) a vodivostí průduchů (g_s) a (iii) rychlostí transpirace (E) a vodivostí průduchů (g_s). Těsnost závislosti mezi uvedenými charakteristikami byla určena z hodnoty získaného koeficientu korelace (r) pomocí následující stupnice:

- $0,0 < |r| \leq 0,3$ slabá závislost
- $0,3 < |r| \leq 0,8$ střední závislost
- $0,8 < |r| \leq 1,0$ silná závislost

Ze stanoveného koeficientu determinace (r^2) pak bylo vyhodnoceno, z kolika % jsou změny závislé charakteristiky vysvětlovány změnami charakteristiky nezávislé.

Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru Statistica 9.0 CZ pro MS Windows.

4.2. Pokus 2 (Francie)

4.2.1. Rostlinný materiál

Sledované fyziologické charakteristiky byly hodnoceny u genotypů slunečnice roční C33, C98, C124, C148 a 2603. Genetickou charakteristiku genotypů C33, C98, C124 a C148 připravilo partnerské pracoviště INRA/ENSAT-INP Toulouse, Francie. Populace rekombinantních imbredních linií C33, C98, C124 a C148 je výsledkem křížení mezi rodičovskými genotypy RHA266 a PAC2. Jedná se o generaci F8 získanou metodou SSD (Single Seed Descent). Genotyp RHA266 je výsledkem křížení plané slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) a odrůdy Peredovik (původem z Ruska). Genotyp PAC2 byl vyšlechtěn ve výzkumném ústavu INRA Toulouse křížením genotypu HA61 a plané slunečnice řapíkaté (*Helianthus petiolaris* Nutt.).

Genotyp 2603 byl zvolen jako genetický zdroj, u něž není popsána bližší genetická charakteristika, a který byl doposud využíván např. pro studium odolnosti slunečnice vůči *Orobanche cumana* Wallr. (Labrousse et al., 2001; Véronési et al., 2005), dědičnosti obsahu kyseliny olejové (Varès et al., 2002) nebo při křížení druhů slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.), slunečnice měkké (*H. mollis* Lam.) a slunečnice vrcholové (*H. orgyalis* AD.) (Faure et al., 2002).

4.2.2. Pěstební podmínky

Nažky byly předklíčeny v termostatu Memmert ICP 800 (Memmert GmbH., Německo) na vlhkém filtračním papíru při teplotě 23 °C po dobu 4 dnů a poté byly zasety do pěstebních nádob (průměr 8 cm, výška 11,7 cm) a kultivovány ve fytotronu do fáze 6 až 8 pravých listů v simulovaném průběhu dne a noci (14/10 hod.) v teplotním rozmezí 18 až 23 °C (noc/den). Relativní vlhkost vzduchu (Φ) ve fytotronu v simulovaném průběhu dne a noci byla nastavena na 63 % a fotosyntetická hustota toku fotonů (PPFD) se pohybovala v rozmezí 0 až 108 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (8000 lx) (noc/den) ve vzdálenosti 40 cm od světelného zdroje. Rostliny byly pěstovány ve směsi zeminy, rašeliny a písku v poměru 5 : 4 : 1.

Rostliny byly zalévány 3krát týdně, a to v pondělí a středu (50 ml vody/1 pěstební nádoba) a v pátek (75 až 100 ml vody/1 pěstební nádoba). Během pokusu nebyly rostliny přihnojovány.

4.2.3. Působení mrazové teploty

Pro stanovení vybraných charakteristik byl použit soubor pokusných rostlin, kdy se celkový počet rostlin a počet rostlin kontrolních jednoho genotypu lišil v závislosti na měřené fyziologické charakteristice. V pokusu 2 (Francie) tak bylo použito celkem 24 (nebo 18) rostlin od každého genotypu, z nichž 12 rostlin bylo vystaveno mrazové teplotě -3 °C (R_S - rostliny stresované) a zbývajících 12 (nebo 6) rostlin byly rostliny kontrolní (R_C - rostliny kontrolní). Kontrolní rostliny (R_C) byly po celou dobu pěstovány ve fytotronu.

Ve fázi 6 až 8 pravých listů bylo 12 rostlin (R_S) přeneseno do klimatizované komory (Snijders Scientific b. v., Nizozemsko), kde byly vystaveny působení mrazové teploty -3 °C po dobu 10 hod. v temnostní fázi fotoperiody. Relativní vlhkost vzduchu (Φ) byla nastavena na 63 % a fotosyntetická hustota toku fotonů (PPFD) na 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Po působení mrazové teploty bylo u 6 rostlin (R_S) provedeno první měření vybraných charakteristik a odebrání vzorků

pro jejich stanovení (S1) a zbývajících 6 rostlin (R_S) bylo přeneseno zpět do fytotronu, kde byly ponechány pro regeneraci. 5. den po působení mrazové teploty u nich bylo provedeno druhé měření a odběr vzorků (S2) - viz kapitola 4.2.4. Schéma pokusu je znázorněno v tab. 2.

Tab. 2. Schéma pokusu 2 (Francie).

Fáze působení mrazové teploty	Umístění rostlin	Počet rostlin/ 1 genotyp	Pěstební podmínky		
			t [°C]	PPFD [μmol m ⁻² s ⁻¹]	Φ [%]
Před působením teploty -3 °C	Fytotron	24/18	18 - 23 (N/D)	0 - 108 (N/D)	63
Při působení teploty -3 °C	Fytotron	12/6 (R _C)	18 (N)	0 (N)	63
	Klimatizovaná komora (-3 °C)	12 (R _S)	-3 (N)	0 (N)	63
Po působení teploty -3 °C	Fytotron	12/6 (R _C)	18 - 23 (N/D)	0 - 108 (N/D)	63
	Fytotron	12 (R _S)	18 - 23 (N/D)	0 - 108 (N/D)	63

Legenda: R_C - varianta kontrola, tj. rostliny nevystavené mrazové teplotě, R_S - varianta stres, tj. rostliny stresované, vystavené mrazové teplotě -3 °C, t - teplota vzduchu, PPFD - fotosyntetická hustota toku fotonů, Φ - relativní vlhkost vzduchu, D - den, N - noc.

4.2.4. Sledované charakteristiky a termíny jejich měření

Na pokusných rostlinách byly sledovány následující charakteristiky:

- fluorescence chlorofylu *a*: potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_v/F_M),
- relativní výtok elektrolytů (REL_%) a
- osmotický potenciál (Ψ_π).

Měření fluorescence chlorofylu *a*: potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_V/F_M) bylo u stresovaných rostlin (R_S) prováděno ve 2 termínech:

- 1) 1. den ihned po působení teploty $-3\text{ }^\circ\text{C}$ (S1) - varianta „stres“,
- 2) 5. den po působení stresu, tj. 5. den regenerace (S2) - varianta „stres“.

U rostlin kontrolních (R_C) bylo měření a odběr rostlinného materiálu pro stanovení fluorescence chlorofylu *a* prováděno v 1 termínu:

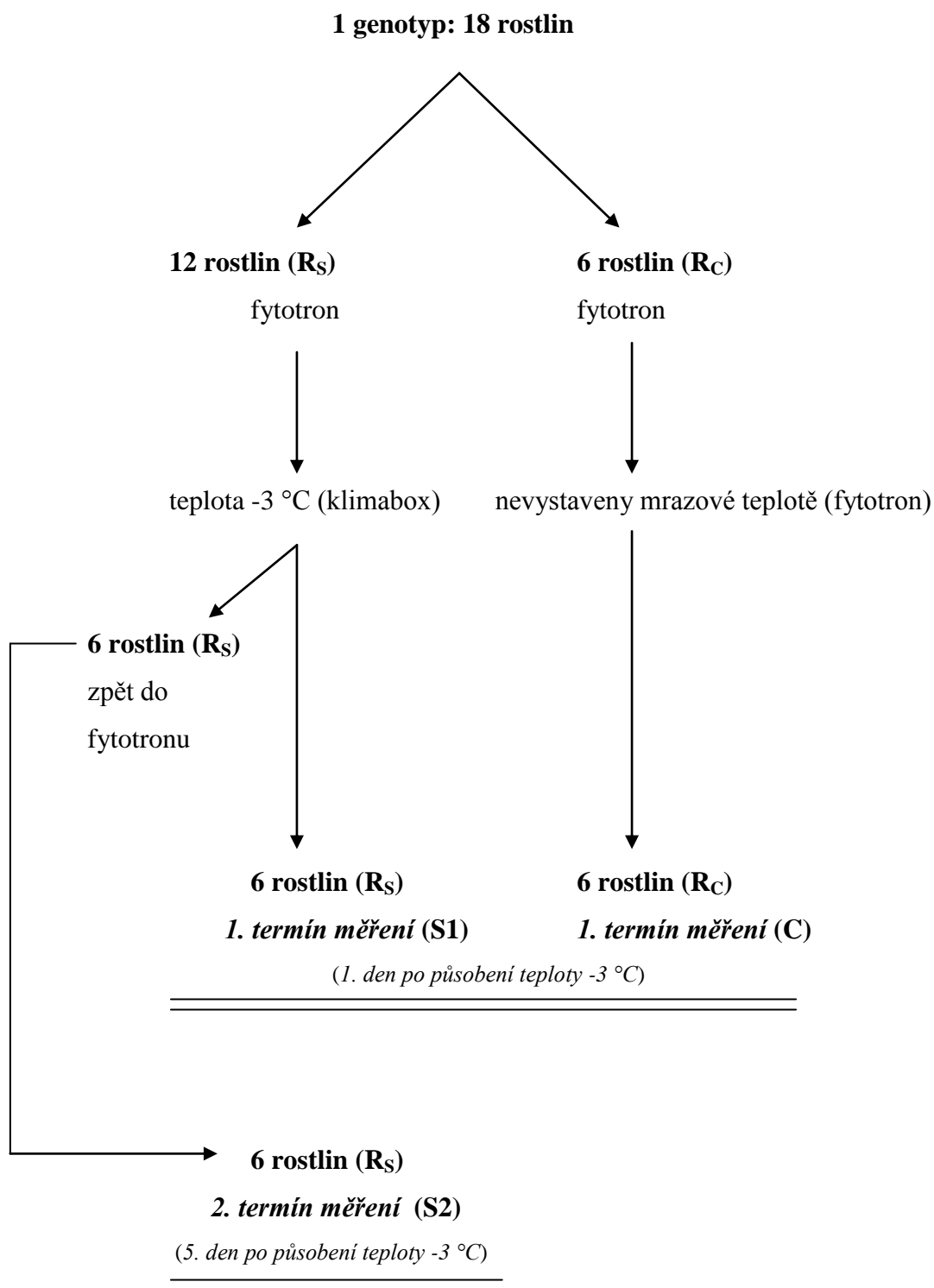
- termín odpovídající 1. dni po působení teploty $-3\text{ }^\circ\text{C}$ (C) - varianta „kontrola“.

Pro první termín měření (S1 a C) byl použit samostatný soubor 6 stresovaných (R_S) a 6 kontrolních (R_C) rostlin od každého genotypu, pro druhý termín měření (S2) byl použit pouze soubor 6 stresovaných rostlin (R_S), kontrolní měření v tomto termínu prováděno nebylo. Měření a odběr rostlinného materiálu pro stanovení fluorescence chlorofylu *a* probíhalo vždy od 8 hod. ráno. Přehled termínů měření fluorescence chlorofylu *a*: potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_V/F_M) je znázorněn v tab. 3. a obr. 2.

Tab. 3. Termíny měření fluorescence chlorofylu *a*: potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_V/F_M) - pokus 2 (Francie).

Termín měření	Varianta (Kontrola/Stres)	Počet rostlin/ 1 genotyp
1) 1. den ihned po působení teploty $-3\text{ }^\circ\text{C}$	S1	6 (R_S)
	C	6 (R_C)
2) 5. den regenerace	S2	6 (R_S)

Legenda: S1 - měření varianty „stres“ 1. den ihned po působení teploty $-3\text{ }^\circ\text{C}$, C - měření varianty „kontrola“ odpovídající 1. dni po působení teploty $-3\text{ }^\circ\text{C}$, S2 - měření varianty „stres“ 5. den po působení teploty $-3\text{ }^\circ\text{C}$, tj. 5. den regenerace, R_C - rostliny kontrolní, R_S - rostliny stresované.



Obr. 2. Schéma termínů měření fluorescence chlorofylu *a*: potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_V/F_M) - pokus 2 (Francie).

Legenda: S1 - měření stresovaných rostlin 1. den ihned po působení teploty -3 °C, C - měření kontrolních rostlin odpovídající 1. dni po působení teploty -3 °C, S2 - měření stresovaných rostlin 5. den po působení teploty -3 °C, tj. 5. den regenerace, R_C - rostliny kontrolní, R_S - rostliny stresované.

Měření a odběr rostlinného materiálu pro stanovení relativního výtoku elektrolytů ($REL_{\%}$) a osmotického potenciálu (Ψ_{π}) bylo u stresovaných rostlin (R_S) prováděno ve 2 termínech:

- 1) 1. den ihned po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (S1) - varianta „stres“,
- 2) 5. den po působení stresu, tj. 5. den regenerace (S2) - varianta „stres“.

U rostlin kontrolních (R_C) bylo měření a odběr rostlinného materiálu pro stanovení uvedených charakteristik prováděno v termínech:

- 1) termín odpovídající 1. dni po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (C1) - varianta „kontrola“,
- 2) termín odpovídající 5. dni regenerace (C2) - varianta „kontrola“.

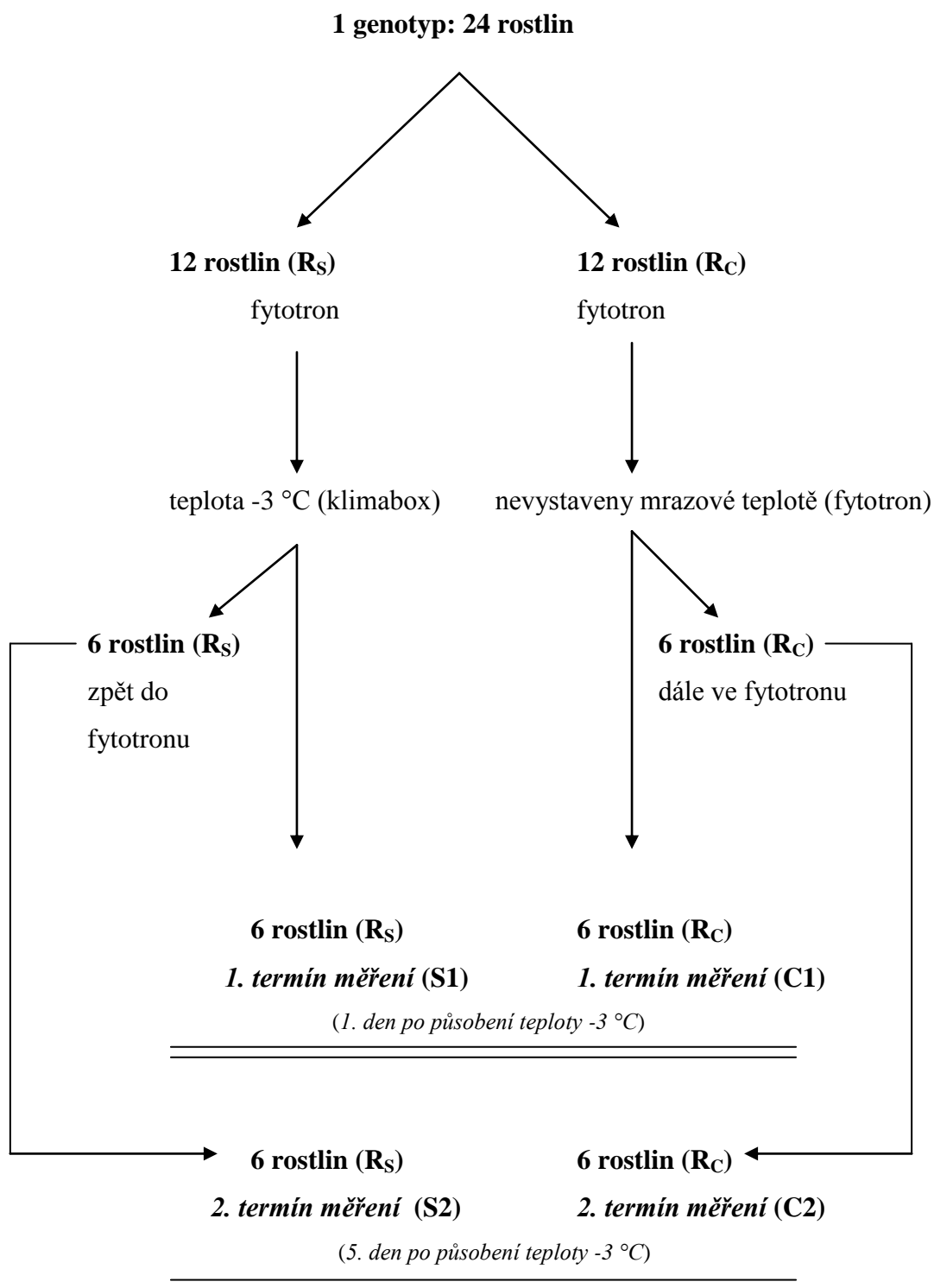
Pro každý termín měření byl použit samostatný soubor 6 stresovaných (R_S) a 6 kontrolních (R_C) rostlin od každého genotypu. Měření a odběr rostlinného materiálu pro stanovení uvedených charakteristik probíhalo vždy od 8 hod. ráno.

Přehled termínů měření či odběrů rostlinného materiálu pro stanovení relativního výtoku elektrolytů ($REL_{\%}$) a osmotického potenciálu (Ψ_{π}) je znázorněn v tab. 4. a obr. 3.

Tab. 4. Termíny měření a odběrů rostlinného materiálu pro stanovení relativního výtoku elektrolytů ($REL_{\%}$) a osmotického potenciálu (Ψ_{π}) - pokus 2 (Francie).

Termín měření	Varianta (Kontrola/Stres)	Počet rostlin/ 1 genotyp
1) 1. den ihned po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$	S1	6 (R_S)
	C1	6 (R_C)
2) 5. den regenerace	S2	6 (R_S)
	C2	6 (R_C)

Legenda: S1 - měření varianty „stres“ 1. den ihned po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, C1 - měření varianty „kontrola“ odpovídající 1. dni po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, S2 - měření varianty „stres“ 5. den po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, tj. 5. den regenerace, C2 - měření varianty „kontrola“ odpovídající 5. dni po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, R_C - rostliny kontrolní, R_S - rostliny stresované.



Obr. 3. Schéma termínů měření a odběrů rostlinného materiálu pro stanovení relativního výtoku elektrolytů ($REL_{\%}$) a osmotického potenciálu (Ψ_{π}) - pokus 2 (Francie).

Legenda: S1 - měření stresovaných rostlin 1. den ihned po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, C1 - měření kontrolních rostlin odpovídající 1. dni po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, S2 - měření stresovaných rostlin 5. den po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, tj. 5. den regenerace, C2 - měření kontrolních rostlin odpovídající 5. dni po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, R_C - rostliny kontrolní, R_S - rostliny stresované.

4.2.5. Metody měření sledovaných charakteristik

Fluorescence chlorofylu *a*: potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_V/F_M)

Fluorescence chlorofylu *a*: potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_V/F_M) byla stanovena pomocí přenosného fluorometru (PAM-2000, Heinz Walz GmbH., Německo) využívající metodu krátkých světelných saturačních pulzů. Měření bylo prováděno na 1 plně vyvinutém listu 3. nebo 4. páru listů v temnostním režimu fotoperiody ve fytotronu či v klimatizované komoře. Délka působení světelného saturačního pulzu byla 1 s a fotosyntetická hustota toku fotonů (PPFD) $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Pro měření v prvním termínu (S1 a C) byl použit samostatný soubor 6 stresovaných (R_S) a 6 kontrolních (R_C) rostlin od každého genotypu, pro měření ve druhém termínu (S2) byl použit pouze soubor 6 stresovaných (R_S) rostlin, kontrolní měření v tomto termínu prováděno nebylo.

Relativní výtok elektrolytů ($REL_{\%}$)

Stanovení relativního výtoku elektrolytů bylo prováděno na základě metodiky pokusů Allinne (2010).

Z každé rostliny byl odebrán 1 terčík o průměru 2 cm z 1 plně vyvinutého intaktního listu 3. nebo 4. páru listů tak, aby terčík neobsahoval centrální žilnatinu. Terčíky byly promývány destilovanou vodou po dobu 2 min. a poté ponechány 24. hod. v plastových zkumavkách (objem 30 ml) uzavřených víčkem v 10 ml destilované vody. Po 24 hod. od odběru bylo provedeno první měření elektrické vodivosti roztoku ve zkumavce (REL_1). Poté byly zkumavky s terčíky umístěny do autoklávu (20 min., $121 \text{ }^\circ\text{C}$), čímž bylo dosaženo maximálního poškození buněčných struktur. Druhé měření elektrické vodivosti roztoku (REL_2) bylo provedeno po 24 hod. od dosažení maximálního poškození. Míra poškození ($REL_{\%}$) byla na základě změny vodivosti roztoku vyjádřena procentuálně jako poměr $REL_1 : REL_2$.

Pro měření elektrické vodivosti roztoku byl použit konduktometr WTW LF 95, typ sondy Tetra Con 96 (WTW GmbH. & Co. KG., Německo). Měření bylo v každém termínu prováděno na samostatném souboru 6 rostlin stresovaných (R_S) a 6 rostlin kontrolních (R_C).

Osmotický potenciál (Ψ_{π})

Pro měření osmotického potenciálu bylo odebráno přibližně 0,25 g čerstvé listové hmoty z každé pokusné rostliny. Listová hmota byla umístěna do plastových zkumavek (objem 5 ml) s 5 ml destilované vody a ponechána 24 hod. ve tmě při teplotě 4 °C k plnému nasycení vodou. Poté byla listová hmota lehce osušena filtračním papírem, přenesena do inzulínových injekčních stříkaček (Myjector U-100 INSULIN, Terumo Europe N. V., Belgie) a uchovávána při teplotě -15 °C až do vlastního měření osmotického potenciálu.

Před vlastním měřením byly injekční stříkačky s odebraným rostlinným materiálem ponechány při pokojové teplotě až do úplného rozmrazení odebraného rostlinného materiálu. Z každé injekční stříkačky poté bylo vytlačeno několik kapek buněčné šťávy do mikrozkušavky typ Eppendorf (objem 5 ml) a pipetou bylo přeneseno 10 μ l buněčné šťávy na terčík z filtračního papíru (Sample Discs SS-033, Wescor, INC., Logan, Utah, USA, průměr 6 mm) umístěný na dně mističky v měřicí komůrce.

Měření bylo prováděno na osmometru VAPRO[®] 5520 (Wescor, INC., Logan, Utah, USA) po předchozí kalibraci roztoky NaCl o koncentracích 100, 290 a 1000 mmol kg⁻¹ (Opti-Mole Osmolality Standards, Wescor, INC., Logan, Utah, USA). Osmometr stanovil hodnoty osmotického potenciálu (Ψ_{π}) v mmol kg⁻¹ dle vztahu Van 't Hoffa:

- $\Psi_{\pi} = - R \cdot T \cdot d \cdot c$,

kde R je molární plynová konstanta (8,31472 J K⁻¹ mol⁻¹),

T je teplota [K],

d je hustota vody při teplotě T [g cm⁻³] a

c je molární koncentrace rozpuštěných osmoticky aktivních látek [mol dm⁻³].

Stanovené hodnoty v mmol kg⁻¹ byly poté převedeny na hodnoty v MPa dle přepočtu:

- $\Psi_{\pi(\text{MPa})} = - [0,0083143 \cdot 0,298 \cdot \Psi_{\pi(1\text{mmol kg}^{-1})}]$ (Allinne, 2010).

Měření bylo v každém termínu prováděno na samostatném souboru 6 rostlin stresovaných (R_S) a 6 rostlin kontrolních (R_C).

4.2.6. Statistické vyhodnocení získaných dat

Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí vícefaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) (genotyp - termín měření). Statistická významnost rozdílů mezi testovanými variantami byla hodnocena pomocí Tukeyho (HSD) testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru Statistica 9.0 CZ pro MS Windows.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Rostliny se s nízkou teplotou často setkávají v kombinaci se sníženou úrovní světelného záření (nízké noční teploty) (Hu et al., 2006; Weng et al., 2008; Zhou et al., 2009). Této skutečnosti byla přizpůsobena metodika pokusu, kdy mrazové teploty působily na rostliny slunečnice roční během simulovaného režimu noci.

5.1. Rychlost čisté fotosyntézy (P_N)

Jak je patrné z obr. 4., všechny testované genotypy slunečnice roční reagovaly v pokusu 1 (ČR) na působení mrazových teplot -3 a -5 °C redukcí rychlosti čisté fotosyntézy (P_N). Stanovený průkazný pokles P_N vlivem stresu nízkou (resp. mrazovou) teplotou je v souladu např. s výsledky Zhenga et al. (2009), kteří zaznamenali u rostlin dávivce černého (*Jatropha curcas* L.) po nočním působení chladu pokles P_N , přičemž uvedené výsledky a závěry potvrzují také práce Flexase et al. (1999), Allena et al. (2000) a Fenga and Caoa (2005). Rovněž Fracheboud et al. (1999) zjistili průkazný pokles rychlosti fotosyntézy při snížení teploty z 25 na 15 °C u různých linií kukuřice seté (*Zea mays* L.). Liu and Osborne (2008) vystavili 6 druhů C3 a C4 mongolských stepních druhů trav, jako např. kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.) a *Pennisetum clandestinum* (Hochst. ex Chiov.), 20 dnům chladové teploty ($15/5$ °C den/noc) v laboratorních podmínkách. Vlivem působení nízké teploty byla u rostlin zjištěna významná redukce fotosyntézy, kterou autoři vysvětlují jako důsledek snížení aktivity Rubisca.

Nízké noční teploty mají výrazně redukční vliv na fixaci CO_2 , který se projeví až následující den po působení mrazové teploty (Martin et al., 1981). Výrazný pokles fixace CO_2 v den následující po působení nízké noční teploty potvrzují také Fernandez et al. (2008). Hüner et al. (1993) doplňují, že fotosyntetická odpověď rostlin na působení nízké teploty je závislá nejen na délce vystavení této teplotě, podmínkách při růstu rostlin, ale i na rostlinném druhu a odrůdě. Např. Nie et al. (1992) zaznamenali u listů rostlin kukuřice seté, která je citlivá k nízkým teplotám, rostoucích při teplotě 15 °C a méně, velmi nízkou fotosyntetickou kapacitu.

Genotypy C120 a C148 reagovaly v pokusu 1 (ČR) statisticky průkazným poklesem P_N ve srovnání s kontrolou (C) ve všech termínech měření po působení teplot -3 a -5 °C (S1 až S3), přičemž snížení hodnot P_N bylo patrnější u druhé zmíněné teploty. Genotyp C148 vykazoval u teploty -3 °C největší pokles P_N v termínu měření S3, tj. 7. den regenerace ($12,38 \mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). U teploty -5 °C byl naopak nejvýraznější pokles P_N zjištěn u obou

genotypů v termínu měření S1, tj. 5. hod. po vystavení rostlin mrazové teplotě (C120: 1,59 a C148: 5,0 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

U genotypu C124 byl zaznamenán statisticky významný pokles P_N ve srovnání s kontrolou pouze v termínu měření S1 po vystavení mrazové teplotě -5°C . Tato teplota výrazně redukovala hodnotu P_N (2,72 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). V ostatních termínech měření po působení teploty -5°C a ve všech termínech měření po působení teploty -3°C byly pozorovány pouze neprůkazné rozdíly oproti kontrolnímu měření.

Genotyp PAC2 reagoval statisticky významnou redukcí hodnot P_N v porovnání s kontrolou v termínech S1 až S3 při teplotě -3°C . Rovněž při teplotě -5°C byl zjištěn statisticky významný pokles P_N v termínu měření S3 (10,01 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

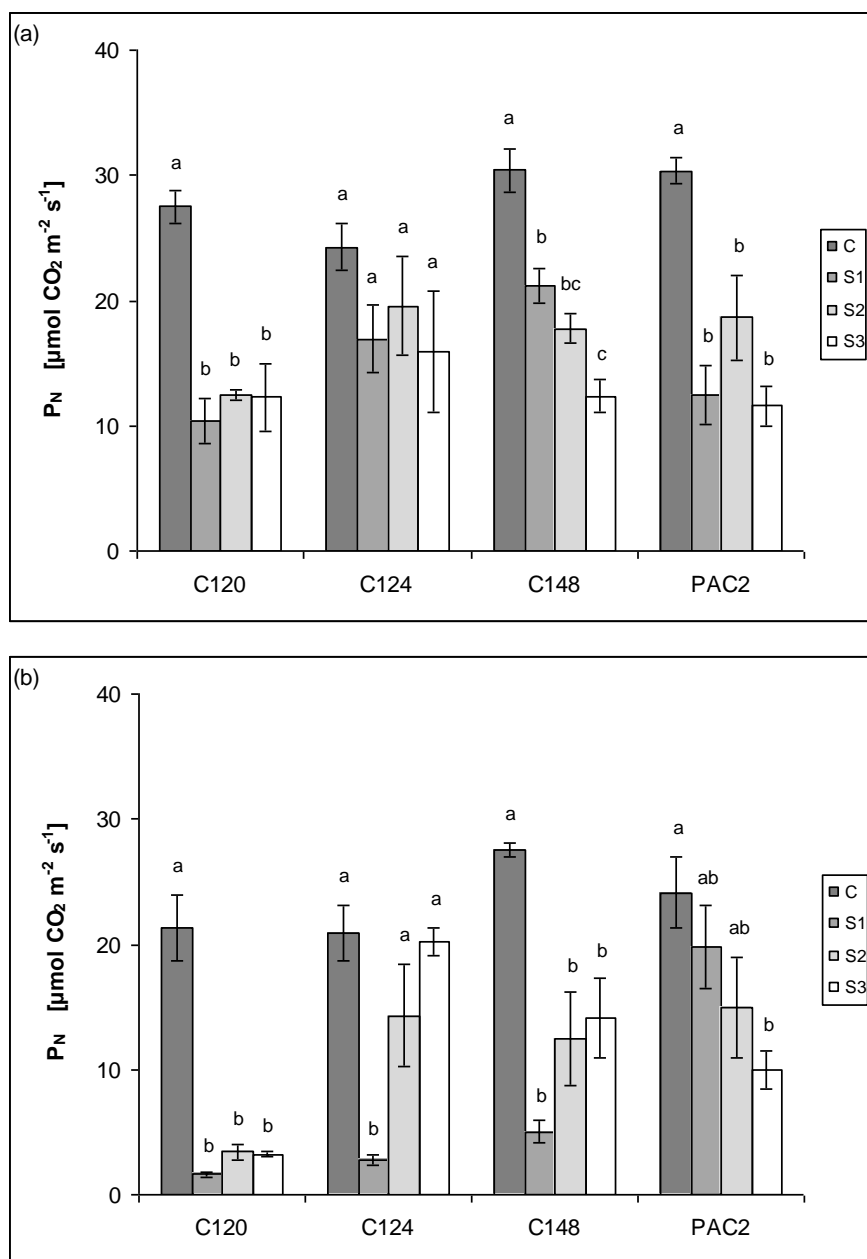
Kaleem et al. (2009), kteří testovali výsev a pěstování 4 genotypů slunečnice roční (Alisson-RM, Parasio-24, MG-2 a S-278) jak v podzimním, tak v jarním termínu v polních podmínkách v Pakistánu, také potvrdili postupný pokles rychlosti fotosyntézy, transpirace a vodivosti průduchů s postupně klesající teplotou v podzimním období a zároveň zvyšování hodnot těchto charakteristik v korelaci s rostoucí teplotou v období jarním. Rovněž Ottander et al. (1995) zjistili u rostlin borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) postupný pokles hodnot P_N v důsledku klesající teploty na podzim (od září), nejnižší hodnota byla zaznamenána v únoru a březnu a poté se se stoupající teplotou začala úroveň fotosyntézy opět zvyšovat. V březnu byla část větví vystavených stresu nízkými teplotami přenesena do laboratorních podmínek pro regeneraci při teplotě 20°C po dobu 3 dnů. Úroveň fotosyntézy se během regenerace plně obnovila.

Např. listy huseníčku rolního [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] a dalších rostlinných druhů tolerantních k nízké teplotě, které byly pěstovány při teplotě 5°C , vykazovaly velkou schopnost regenerace fotosyntetické kapacity, na rozdíl od k chladu citlivých rostlinných druhů (Strand et al., 1999), jakým je i slunečnice roční. V souladu s tímto zjištěním v pokusu 1 (ČR) nedošlo u testovaných genotypů slunečnice roční během regenerace (S2 a S3) k úplnému navrácení hodnot P_N na kontrolní úroveň s výjimkou genotypu C124, u kterého nebyly při teplotě -3 ani -5°C během regenerace pozorovány průkazné změny P_N v porovnání s kontrolou (C).

V souladu s tvrzením Martina et al. (1981) a Fernandez et al. (2008) se u sledovaných genotypů slunečnice roční v pokusu 1 (ČR) také projevil významný pokles rychlosti čisté fotosyntézy (P_N) následující den po vystavení stresu nízkou (resp. mrazovou) teplotou (S1). Průkazný pokles hodnot P_N v termínu měření S1 v porovnání s kontrolou (C) byl u teploty

-3 °C zjištěn u genotypů C120, C148 a PAC2 a při teplotě -5 °C u genotypů C120, C124 a C148. Fotosyntetická odpověď rostlin na působení mrazové teploty se tedy lišila v závislosti na genotypu a mrazové teplotě. Hodnoty P_N se v průběhu regenerace (S2 až S3) začaly opět zvyšovat (např. C148 -5 °C), zůstaly na stejné úrovni (např. C120 -5 °C) či dále klesaly (např. C148 -3 °C). Ačkoliv se ovlivnění P_N teplotou -3 °C v pokusu 1 (ČR) projevilo mezi všemi sledovanými genotypy podobnou mírou, pouze u genotypu C124 nebyly zaznamenány průkazné změny P_N v porovnání s kontrolou (C). Větší změny P_N byly zjištěny až při teplotě -5 °C. Tato teplota ovlivnila výrazněji genotypy C120, C124 a C148, u kterých byla v porovnání s genotypem PAC2 zjištěna větší redukce hodnot P_N zejména v termínu S1. Genotyp PAC2 se tak jeví jako odolnější; za odolnější lze však považovat i genotyp C124, který i přesto, že u něj byla zjištěna výrazná redukce P_N v termínu S1, dokázal hodnoty P_N během regenerace navrátit na kontrolní úroveň. Naopak jako nejcitlivější lze označit genotyp C120, u kterého byla při teplotě -5 °C zjištěna největší redukce hodnot P_N (S1) a v průběhu regenerace (S2 a S3) nedošlo u tohoto genotypu k opětovnému zvyšování hodnot této charakteristiky.

Vzhledem k výsledkům pokusu 1 (ČR) i výsledkům pokusů dalších autorů (např. Fracheboud et al., 1999; Zheng et al., 2009) lze změny v rychlosti čisté fotosyntézy (P_N) hodnotit jako velmi vhodný ukazatel pro sledování vlivu nízkých teplot na fotosyntetický aparát a jeho efektivitu a pro stanovení odolnosti rostlin slunečnice roční k nízkým teplotám. Nízkou teplotou indukovaný pokles rychlosti fotosyntézy je spojen s fotopoškozením reakčních center PS II, změnou v tvorbě fotosyntetických pigmentů v listech (Haldiman et al., 1995), zvýšením disipace nadbytečné energie fotosběrných antén PS II (Andrews et al., 1995), nižší aktivitou enzymů uhlíkového cyklu (Kingston-Smith et al., 1997) a změnou vývoje chloroplastů (Robertson et al., 1993). Míra redukce rychlosti čisté fotosyntézy tak vypovídá o schopnosti rostliny snášet působení nízké teploty.



Obr. 4. Vliv teplot -3 a -5 °C na rychlost čisté fotosyntézy (P_N) u genotypů slunečnice roční C120, C124, C148 a PAC2 - pokus 1 (ČR).

Legenda: (a) -3 °C; (b) -5 °C. (C) měření 9 hod. před vystavením rostlin mrazové teplotě, tj. kontrolní měření; (S1) měření 5 hod. po působení mrazové teploty; (S2) měření 3. den po působení mrazové teploty, tj. 3. den regenerace; (S3) měření 7. den po vystavení mrazové teplotě, tj. 7. den regenerace. Uvedené hodnoty jsou průměry \pm s. e. pro $n = 30$, průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukeyho test); hodnoty sdílející stejné písmeno nejsou statisticky průkazně rozdílné.

Podmínky pokusů: počet opakování $n = 30$ (na 1 rostlině naměřeno 10 hodnot), počet jedinců: 3 rostliny/1 genotyp/1 termín měření.

5.2. Rychlost transpirace (E)

Jak vyplývá z obr. 5., působení mrazových teplot způsobilo u testovaných genotypů slunečnice roční v pokusu 1 (ČR) redukcí rychlosti transpirace (E). Pokles rychlosti transpirace vlivem nízké teploty odpovídá výsledkům dřívějších pokusů dalších autorů (např. Martin et al., 1981; Kaleem et al., 2009), kteří také sledovali změny hodnot rychlosti transpirace při působení stresu nízkými teplotami. Kaleem et al. (2009) zjistili u rostlin slunečnice roční snížení rychlosti transpirace (E) v důsledku působení nízkých teplot při pěstování v podzimním období v polních podmínkách. Kozłowski (1943) zaznamenal u rostlin borovice kadidlové (*Pinus taeda* L.) a bobkovišně lékařské (*Prunus laurocerasus* L.) v Severní Karolině, USA dvojnásobně nižší hodnoty transpirace vlivem nižší teploty v období prosinec až leden, než v období říjen až listopad. Martin et al. (1981) pozorovali pokles rychlosti transpirace po 16ti hodinovém nočním působení chladové teploty 1 °C na listy rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.), které je stejně jako slunečnice roční rostlinným druhem citlivým k nízkým teplotám. Významné obnovení rychlosti transpirace v listech rajčete se objevilo do 24 hod. po ukončení působení chladové teploty 1 °C, avšak konečná rychlost transpirace byla přibližně o 15 % nižší, než hodnoty před působením chladové teploty. Drake and Salisbury (1972) zjistili, že rostliny druhu řepěň durkoman (*Xanthium strumarium* L.) reagovaly na působení nízké teploty (10/5 °C den/noc) redukcí transpirace. Její úroveň se začala postupně obnovovat v následném měření při zvyšující se teplotě listů. V rozmezí teploty listů přibližně 10 až 30 °C se rychlost transpirace obnovovala pozvolna, teprve až při teplotě cca 33 °C došlo k výraznému zvýšení její rychlosti. Výsledky uvedených autorů tedy potvrzují, že rostliny reagují na působení nízkých teplot redukcí rychlosti transpirace.

Genotyp C120 reagoval v pokusu 1 (ČR) statisticky průkazným poklesem E v porovnání s kontrolním měřením (C) ve všech termínech měření po působení obou mrazových teplot (S1 až S3). Nejnižší hodnota E po působení teploty -3 °C byla zjištěna v termínu S3 (1,5 mmol H₂O m⁻² s⁻¹), zatímco teplota -5 °C způsobila největší redukcí E u tohoto genotypu již v termínu S1 (0,64 mmol H₂O m⁻² s⁻¹).

U genotypu C124 nebyly po působení teploty -3 °C pozorovány statisticky průkazné rozdíly oproti kontrole. Po působení teploty -5 °C byl statisticky průkazný pokles E zaznamenán pouze v termínu S1 (1,3 mmol H₂O m⁻² s⁻¹). V termínech S2 a S3 se začala rychlost transpirace opět zvyšovat, rozdíly oproti kontrole nebyly v těchto termínech statisticky průkazné.

Genotyp C148 reagoval na působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ statisticky průkazným snížením E pouze v termínu S3 ($1,59\text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), naopak po působení teploty $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ došlo ke statisticky průkaznému poklesu hodnot E již v termínu S1 ($1,08\text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). Hodnoty E se v průběhu regenerace (S2 a S3) při teplotě $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ opět zvýšily, přičemž statisticky průkazný v porovnání s kontrolou byl pouze rozdíl v termínu S3 ($2,67\text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), úroveň před působením stresu (C: $4,24\text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) však hodnoty E v termínech S2 a S3 nedosáhly.

Rovněž u genotypu PAC2 byla po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ pozorována statisticky průkazná redukce E v porovnání s kontrolou (C) až v termínu S3 ($2,09\text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) a po působení teploty $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebyly statisticky průkazné rozdíly pozorovány v žádném termínu.

Stejně jako v pokusech Drakea and Salisburyho (1972) a Martina et al. (1981) byla i u rostlin slunečnice roční v pokusu 1 (ČR) zjištěna různá schopnost obnovy úrovně rychlosti transpirace během regenerace (S2 a S3). Genotyp C124 dokázal během regenerace po působení teploty $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ úroveň rychlosti transpirace plně obnovit, naopak u genotypů C148 a PAC2 byla při teplotě $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ zaznamenána nejnižší hodnota E v termínu S3, tedy úroveň E během regenerace dále klesala a nedocházelo k její obnově.

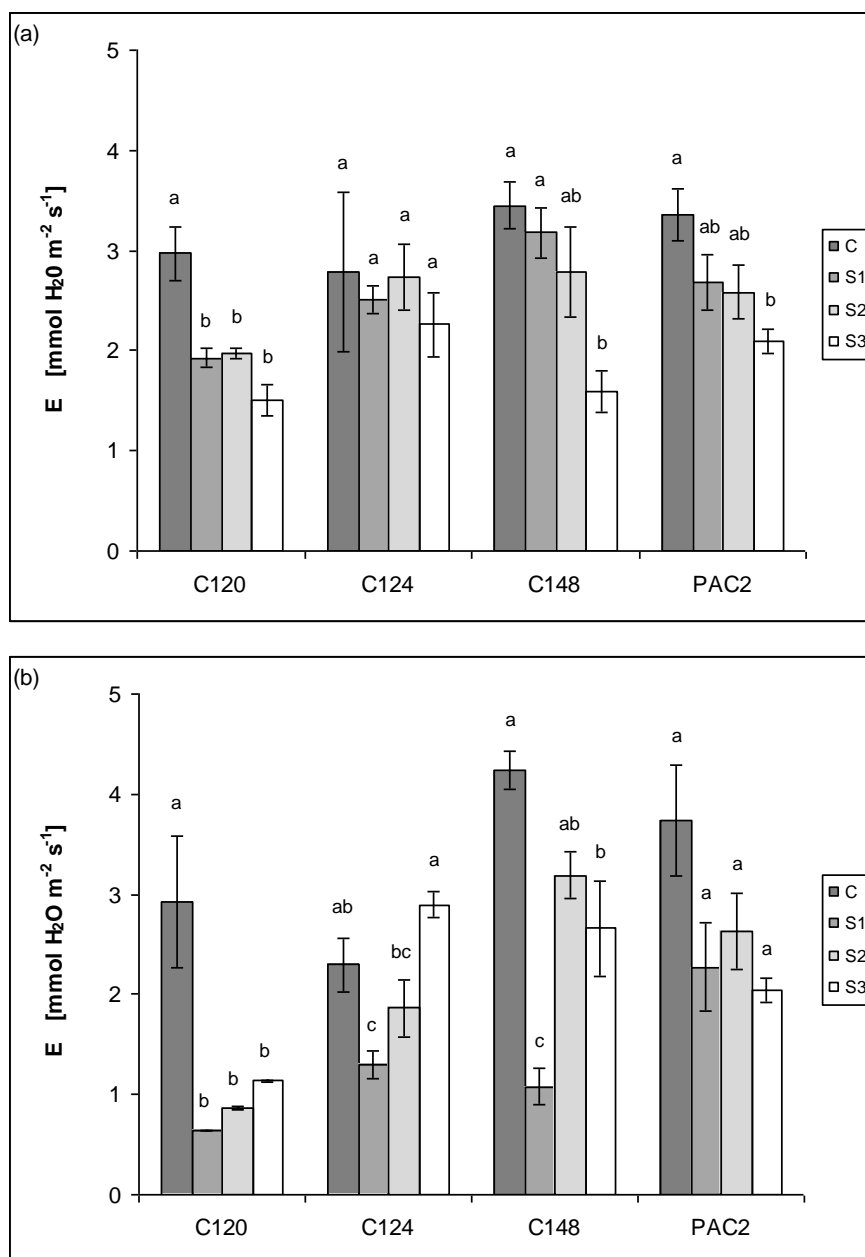
Výsledky pokusu 1 (ČR) dále potvrzují pozitivní korelaci mezi rychlostí transpirace (E) a vodivostí průduchů (g_s). Zjištěná hodnota koeficientu korelace ($r = 0,926$) odpovídá silné závislosti mezi g_s a E a z hodnoty koeficientu determinace ($r^2 = 0,857$) vyplývá, že změny E jsou z 85,7 % vysvětlovány změnami g_s .

Závislost mezi E a g_s potvrzuje např. Acatrinei (2010), který tento vztah hodnotil v experimentu, kde srovnával různé fyziologické charakteristiky u rostlin rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) pěstovaných ve skleníku konvenčním a ekologickým způsobem. Rovněž Jarvis et al. (1999) a Bunce (2007) potvrzují závislost rychlosti transpirace na vodivosti průduchů, kdy redukce stomatální vodivosti může způsobit pokles transpirace (Jarvis et al., 1999) a naopak při zvyšující se vodivosti průduchů rychlost transpirace stoupá (a současně se snižuje vodní potenciál listů) (Bunce, 2007).

V pokusu 1 (ČR) se reakce rostlin na působení mrazových teplot lišily v závislosti na genotypu a mrazové teplotě. Po vystavení rostlin $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebyly u rychlosti transpirace pozorovány mezi genotypy C124, C148 a PAC2 výrazně rozdílné reakce; největší pokles hodnot E byl pozorován u genotypu C120. Teplota $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ způsobila výraznější změny rychlosti transpirace než teplota $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Genotyp PAC2 reagoval při teplotě $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ nejmenším poklesem rychlosti transpirace, u genotypu C120 byly hodnoty rychlosti transpirace v porovnání s ostatními genotypy sníženy nejvíce.

V případě rychlosti transpirace (E) se však na základě získaných výsledků v pokusu 1 (ČR) nepodařilo vyhodnotit odolnost sledovaných genotypů vůči mrazovým teplotám vzhledem k nekonzistentním reakcím genotypů (resp. stejného genotypu) v rámci dvou mrazových teplot. Odolný genotyp by měl během a krátce po působení mrazové teploty redukovat hodnoty E a zabránit tak ztrátám vody transpirací, avšak během regenerace by se hodnoty E měly opět zvyšovat, aby byl zajištěn (obnoven) pohyb vody v rostlině a příjem vody kořeny. Ze získaných výsledků však vyplývá, že např. genotyp C120 dokázal snížit hodnoty E při obou teplotách nejvíce v porovnání s ostatními genotypy, avšak během regenerace nebyla úroveň E obnovena. Naopak genotyp C148 dokázal při teplotě -5 °C hodnotu E v termínu S1 výrazně redukovat a během regenerace (S2 a S3) její úroveň opět zvyšovat, takže by bylo možné považovat tento genotyp za odolnější, ale při teplotě -3 °C byla reakce genotypu C148 zcela opačná, tj. v termínu S1 nedošlo k průkazné redukcii E oproti kontrolnímu měření a během regenerace hodnoty E začaly postupně klesat.

Zejména vzhledem k existenci silné závislosti rychlosti transpirace na vodivosti průduchů, ale i z důvodu nekonzistentních výsledků pokusu 1 (ČR), lze měření rychlosti transpirace pro sledování vlivu mrazové teploty na rostliny považovat pouze jako vedlejší, doplňkovou metodu. Rychlost transpirace totiž není přímo ovlivněna samotným efektem mrazové teploty, ale primárně se projeví závislost, resp. její limitace vodivostí průduchů. Avšak právě proto, že tyto charakteristiky spolu úzce korelují, lze sledováním rychlosti transpirace alespoň nepřímo hodnotit reakce rostlin (změny g_s) vyvolané působením nízké teploty.



Obr. 5. Vliv teplot -3 a -5 °C na rychlost transpirace (E) u genotypů slunečnice roční C120, C124, C148 a PAC2 - pokus 1 (ČR).

Legenda: (a) -3 °C; (b) -5 °C. (C) měření 9 hod. před vystavením rostlin mrazové teplotě, tj. kontrolní měření; (S1) měření 5 hod. po působení mrazové teploty; (S2) měření 3. den po působení mrazové teploty, tj. 3. den regenerace; (S3) měření 7. den po vystavení mrazové teplotě, tj. 7. den regenerace. Uvedené hodnoty jsou průměry ± s. e. pro n = 30, průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukeyho test); hodnoty sdílející stejné písmeno nejsou statisticky průkazně rozdílné.

Podmínky pokusů: počet opakování n = 30 (na 1 rostlině naměřeno 10 hodnot), počet jedinců: 3 rostliny/1 genotyp/1 termín měření.

5.3. Vodivost průduchů (g_s)

Z obr. 6. je zřejmý vliv mrazových teplot -3 a -5 °C na hodnoty vodivosti průduchů (g_s) u všech sledovaných genotypů v pokusu 1 (ČR). Redukci hodnot vodivosti průduchů vlivem působení nízké teploty potvrzují např. Zheng et al. (2009), kteří zjistili u rostlin dávivce černého (*Jatropha curcas* L.) výrazný pokles vodivosti průduchů (g_s) vlivem nočního působení chladu, přičemž po 5ti dnech regenerace se hodnoty této charakteristiky opět zvýšily. Kaleem et al. (2009), kteří testovali výsev a pěstování slunečnice roční v podzimním a jarním termínu výsevu v polních podmínkách, pozorovali postupný pokles rychlosti fotosyntézy, transpirace a vodivosti průduchů v korelaci s klesající teplotou v podzimním období a zároveň zvyšování těchto charakteristik s postupně se zvyšující teplotou v jarním období. Uzavírání průduchů vlivem nízké teploty se může projevit v důsledku redukce hydraulické vodivosti kořenů nízkou teplotou (Bassirirad et al., 1993; Marocco et al., 2005), kdy je omezen příjem vody kořeny (Davies et al., 1982). Citlivé rostlinné druhy při působení nízkých teplot často ponechávají průduchy otevřené (Lee et al., 1993), dochází u nich k poklesu vodního potenciálu listů a k vadnutí, což může omezit růst, fotosyntetickou aktivitu i samotné přežití rostliny (Pardossi et al., 1982). Naopak odolné rostlinné druhy dokáží udržet dostatečnou hodnotu vodního potenciálu rychlým uzavřením průduchů, čímž účinně brání ztrátám vody transpirací (Cornic and Ghashghaie, 1991) a dehydrataci listů (Davies et al., 1982).

U genotypu C120 bylo v pokusu 1 (ČR) zjištěno statisticky průkazné snížení hodnot g_s po působení obou teplot ve srovnání s kontrolním měřením (C). Po působení teploty -3 °C byl statisticky průkazný pokles hodnot g_s pozorován v termínech S1 až S3 (S1: 0,14, S2: 0,15 a S3: 0,1 mol H₂O m⁻² s⁻¹), vlivem teploty -5 °C byla statisticky průkazná redukce g_s zjištěna v termínech S1 (0,04 mol H₂O m⁻² s⁻¹) a S2 (0,05 mol H₂O m⁻² s⁻¹). V žádném termínu měření po působení mrazových teplot však nedošlo ke zvýšení hodnot g_s na úroveň před jejich působením.

Genotyp C124 na působení teploty -3 °C nereagoval statisticky průkaznými změnami g_s . Při teplotě -5 °C bylo statisticky průkazné snížení pozorováno v termínech S1 (0,09 mol H₂O m⁻² s⁻¹) a S2 (0,14 mol H₂O m⁻² s⁻¹), v termínu měření S3 se hodnota g_s průkazně nelišila od kontrolního měření.

U genotypu C148 byl při teplotě -3 °C zjištěn průkazný pokles hodnot g_s v termínech S2 (0,26 mol H₂O m⁻² s⁻¹) a S3 (0,11 mol H₂O m⁻² s⁻¹), přičemž hodnoty g_s během měření po působení této mrazové teploty postupně klesaly. Po působení teploty -5 °C byla nejnižší,

statisticky průkazně rozdílná hodnota v porovnání s kontrolou zjištěna již v termínu S1 (0,06 mol H₂O m⁻² s⁻¹). V termínech S2 a S3 se hodnoty g_s začaly opět zvyšovat a ačkoliv úrovně před působením stresu nedosáhly, od hodnoty stanovené v kontrolním měření se statisticky průkazně nelišily.

U genotypu PAC2 byly zaznamenány statisticky průkazné rozdíly oproti kontrole pouze po působení teploty -3 °C, kdy v termínech S1 až S3 hodnoty g_s postupně klesaly (S1: 0,24, S2: 0,23 a S3: 0,17 mol H₂O m⁻² s⁻¹).

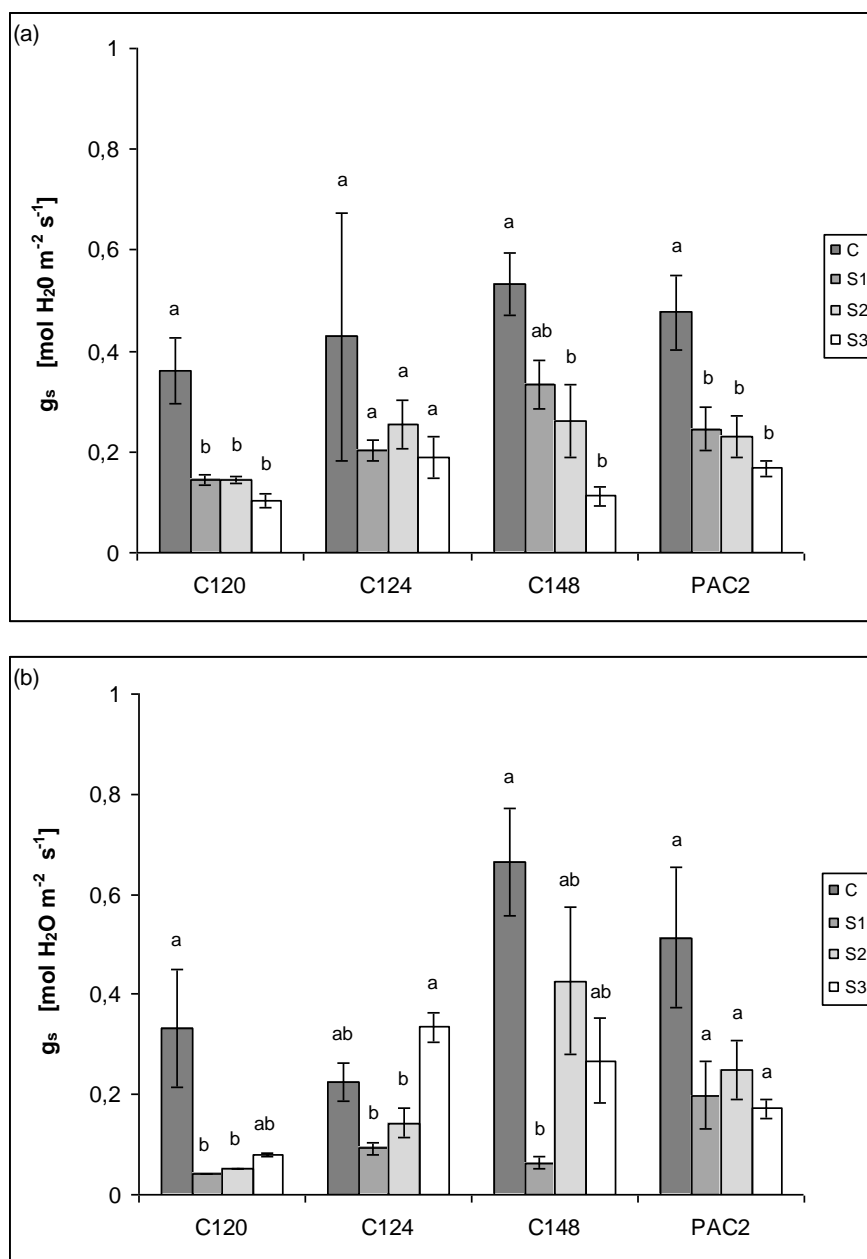
Z výsledků pokusu 1 (ČR), ve kterém vlivem mrazových teplot nastal pokles vodivosti průduchů (g_s), vyplývá, že odpověď rostlin na působení mrazové teploty se lišila v závislosti na genotypu a mrazové teplotě. Významný pokles vodivosti průduchů se projevil následující den po vystavení rostlin mrazovým teplotám (S1). Hodnoty této charakteristiky se v průběhu regenerace (S2 až S3) začaly postupně zvyšovat (C124 -5 °C) stejně jako v pokusu Zhenga et al. (2009), zůstaly na stejné úrovni (C120 -3 °C) či dále klesaly (C148 -3 °C). K největšímu poklesu vodivosti průduchů vlivem teploty -3 °C došlo u genotypu C120, a to ve všech termínech měření. U ostatních genotypů se neprojevila takto výrazná redukce g_s. Významnější snížení vodivosti průduchů a rozdílnější reakce mezi jednotlivými genotypy způsobila až teplota -5 °C, kdy byl u genotypu PAC2 zjištěn nejmenší pokles vodivosti průduchů vlivem této teploty, naopak u genotypu C120 byly hodnoty této charakteristiky v porovnání s ostatními genotypy sníženy nejvýrazněji. V průběhu regenerace (S2 a S3) po působení teploty -5 °C dokázaly hodnoty g_s zvyšovat pouze genotypy C124 a C148. Úroveň g_s u těchto genotypů po působení -3 °C a u genotypů C120 a PAC2 (obě teploty) však v průběhu regenerace zůstala stejná nebo dále klesala. U testovaných genotypů slunečnice roční v pokusu 1 (ČR) tedy byl zjištěn průkazný pokles g_s po působení obou mrazových teplot, přičemž výraznější redukci g_s způsobila teplota -5 °C.

Z regresní a korelační analýzy provedené v pokusu 1 (ČR) rovněž vyplývá, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ existuje pozitivní korelace mezi g_s a P_N. Hodnota koeficientu korelace ($r = 0,777$) odpovídá střední závislosti mezi g_s a P_N. Koeficient determinace $r^2 = 0,604$, což znamená, že z 60,4 % jsou změny P_N vysvětlovány změnami g_s. Dále byla zjištěna pozitivní korelace mezi g_s a E. Hodnota koeficientu korelace ($r = 0,926$) odpovídá silné závislosti mezi g_s a E, z hodnoty koeficientu determinace ($r^2 = 0,857$) pak vyplývá, že změny E jsou z 85,7 % vysvětlovány změnami g_s.

Výsledky regresní a korelační analýzy potvrzují např. Santos et al. (2011), kteří u rostlin pomerančovníku čínského (*Citrus sinensis* L.) zaznamenali vlivem různých kombinací

nočního a denního působení chladu a nízké teploty pěstebního substrátu nejen redukcí g_s , P_N a F_v/F_M , ale také lineární závislost mezi g_s a P_N , přičemž redukce hodnot P_N souvisela s poklesem hodnot g_s . Kaleem et al. (2009) rovněž zjistili u slunečnice roční lineární závislost fotosyntézy na vodivosti průduchů. Závislost mezi g_s a E pak pozoroval Acatrinei (2010) u rostlin rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) pěstovaných ve skleníku konvenčním a ekologickým způsobem; limitaci rychlosti transpirace vodivostí průduchů potvrzují také Jarvis et al. (1999), Bunce (2007) a McDowell et al. (2008).

Pokusné rostliny slunečnice roční v pokusu 1 (ČR) sice dokázaly redukovat g_s a bránit tak efektivněji dehydrataci listů způsobené mrazovou teplotou, avšak obdobně jako u rychlosti transpirace (E), nelze ani u vodivosti průduchů vyhodnotit odolnost sledovaných genotypů vůči mrazovým teplotám vzhledem k nekonzistentním reakcím jednotlivých genotypů při testovaných mrazových teplotách. Odolný genotyp by totiž měl v souladu s tvrzením Cornica and Ghashghaie (1991) a Leea et al. (1993) reagovat uzavřením průduchů při a krátce po působení mrazové teploty, aby tak zabránil ztrátám vody transpirací (tzn. v termínu S1), avšak v průběhu regenerace (S2 a S3) by takový genotyp měl dokázat obnovit vodivost průduchů na úroveň před vystavením stresu mrazovou teplotou, aby tak byla obnovena úroveň rychlosti fotosyntézy a transpirace. Rychlost fotosyntézy a transpirace je totiž uzavřením průduchů do odpovídající míry limitována, což potvrzují i výsledky regresní a korelační analýzy, kdy v pokusu 1 (ČR) byla zjištěna pozitivní korelace mezi g_s a P_N (střední závislost) a mezi g_s a E (silná závislost). Přesto však lze sledování změn vodivosti průduchů považovat za jeden z ukazatelů vhodných pro zjištění vlivu mrazové teploty a odolnosti rostlin k nízkým teplotám, jelikož dochází k přímému ovlivnění této charakteristiky nízkou teplotou.



Obr. 6. Vliv teplot -3 a -5 °C na vodivost průduchů (g_s) u genotypů slunečnice roční C120, C124, C148 a PAC2 - pokus 1 (ČR).

Legenda: (a) -3 °C; (b) -5 °C. (C) měření 9 hod. před vystavením rostlin mrazové teplotě, tj. kontrolní měření; (S1) měření 5 hod. po působení mrazové teploty; (S2) měření 3. den po působení mrazové teploty, tj. 3. den regenerace; (S3) měření 7. den po vystavení mrazové teplotě, tj. 7. den regenerace. Uvedené hodnoty jsou průměry \pm s. e. pro $n = 30$, průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukeyho test); hodnoty sdílející stejné písmeno nejsou statisticky průkazně rozdílné.

Podmínky pokusů: počet opakování $n = 30$ (na 1 rostlině naměřeno 10 hodnot), počet jedinců: 3 rostliny/1 genotyp/1 termín měření.

5.4. Efektivita využití vody (WUE)

Vliv nízkých teplot na efektivitu využití vody doposud nebyl dostatečně studován. Tato fyziologická charakteristika se využívá zejména při studiu jiných abiotických stresů, než je stres nízkou teplotou (např. vodní nebo osmotický stres). Hodnoty WUE navíc mohou být do značné míry určovány jak variabilitou P_N nebo E , tak oběma uvedenými charakteristikami (Guo et al., 2011). Ma et al. (2004) potvrzují ovlivnění WUE hodnotami P_N a E a jejich vzájemným poměrem, kdy ve svých pokusech u rostlin druhů *Caragana microphylla* Lam., *C. intermedia* Lam. a *C. korshinskii* Kom. zaznamenali redukci hodnot WUE způsobenou zvýšením hodnot P_N a současným poklesem hodnot E .

Obr. 7. zobrazuje vliv teplot -3 a -5 °C na efektivitu využití vody (WUE) u sledovaných genotypů slunečnice roční v pokusu 1 (ČR). Kromě genotypu C148 reagovaly sledované genotypy na působení mrazových teplot statisticky průkaznými rozdíly.

U genotypu C120 byl pozorován statisticky průkazný pokles hodnot WUE ve srovnání s kontrolou (C) v termínu S1 po působení teploty -3 °C ($5,3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) a ve všech termínech po působení teploty -5 °C (S1: $2,49$, S2: $4,0$ a S3: $2,84 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$).

Genotyp C124 reagoval statisticky průkazným poklesem hodnoty WUE pouze v termínu S1 ($2,19 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) při působení teploty -5 °C.

U genotypu C148 nebyly vlivem testovaných mrazových teplot zaznamenány žádné statisticky průkazné rozdíly.

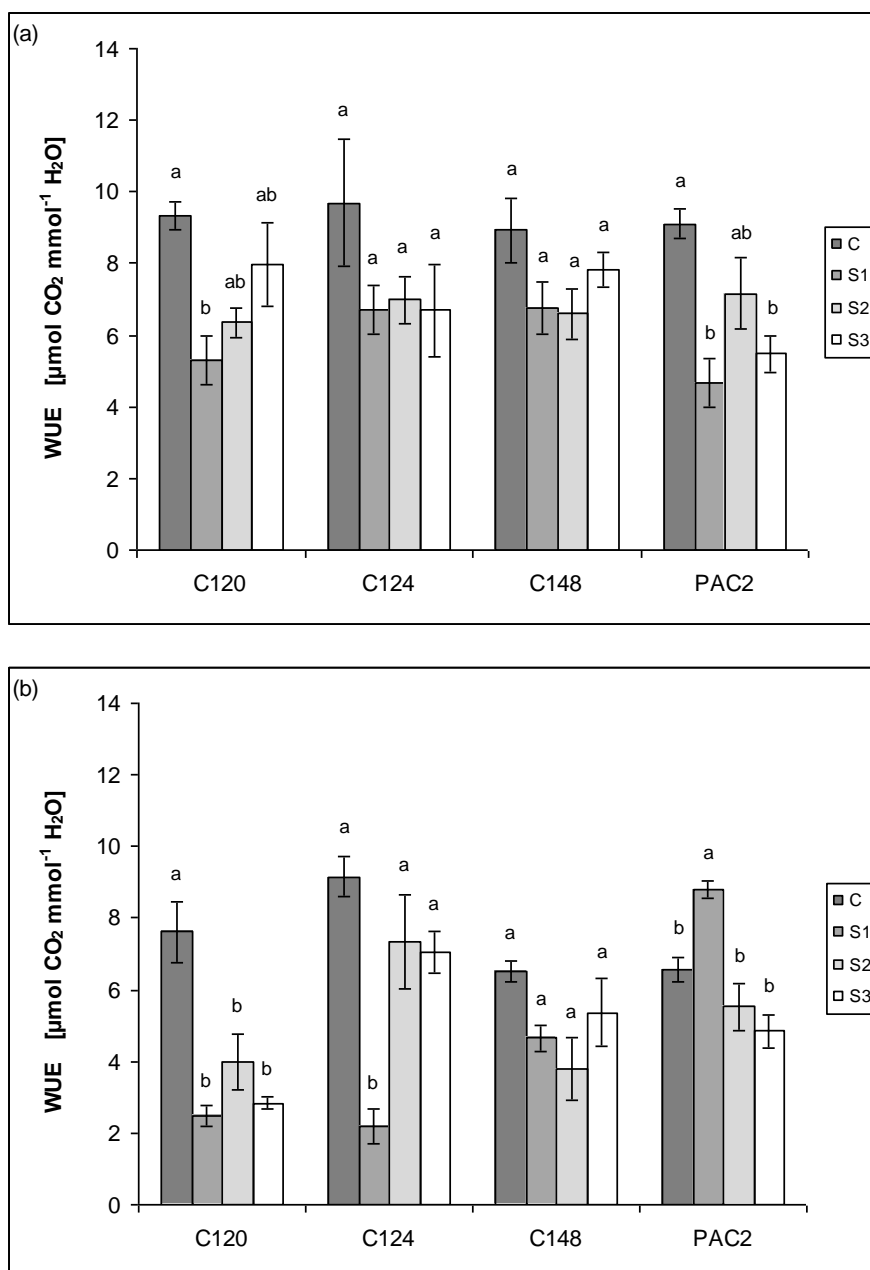
Genotyp PAC2 reagoval na teplotu -3 °C statisticky průkazným snížením hodnot WUE v termínech S1 ($4,66 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) a S3 ($5,47 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$). U teploty -5 °C nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi kontrolou a termíny S2 a S3, v termínu S1 bylo naopak zaznamenáno statisticky průkazné zvýšení hodnoty WUE ($8,78 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) oproti kontrole.

Sledováním přímého vlivu nízkých (resp. chladových) teplot na změny hodnot WUE se zabývali Tallec et al. (2013), kteří studovali efektivitu využití vody u rostlin slunečnice roční, pšenice seté a kukuřice seté v polních podmínkách na dvou lokalitách ve Francii (Auradé a Lamasquère). Průměrná denní teplota stoupala od dubna do července přibližně z 10 na 25 °C a poté začala opět postupně klesat. Hodnoty WUE se u slunečnice nejprve snižovaly se stoupající teplotou od výsevu (duben) do fáze maximálního LAI (polovina července) a následně stoupaly až do sklizně (září). Při nižší teplotě (10 °C) tedy Tallec et al. (2013) zaznamenali větší hodnoty WUE než při teplotě vyšší (25 °C). Man and Lieffers (1997) pozorovali pokles hodnot WUE s rostoucí teplotou u jehlic semenáčků smrku sivého

[*Picea glauca* (Moench.) Voss.], tedy také zjistili vyšší úroveň WUE při nižší teplotě. Avšak vzhledem k faktu, že se v obou případech jednalo o pokusy v polních podmínkách, lze se domnívat, že hodnoty WUE mohly být významně ovlivněny působením dalších faktorů prostředí, než pouze nízkou teplotou, a to zejména vláhovými poměry v době pěstování pokusných rostlin.

V pokusu 1 (ČR) došlo na rozdíl od výsledků experimentů Mana and Liefferse (1997) a Talleca et al. (2013) vlivem působení nízkých (mrazových) teplot ke snížení hodnot WUE v porovnání s kontrolou (C). Reakce rostlin na působení mrazových teplot se lišila v závislosti na genotypu a teplotě. Hodnoty WUE po působení $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly u genotypů C124 a C148 na stejné úrovni a současně byly vyšší než hodnoty WUE u genotypů C120 a PAC2. Teplota $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ způsobila výraznější změny efektivity využití vody než teplota $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Největší pokles hodnot WUE byl při teplotě $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ zaznamenán u genotypu C120, naopak k nejmenší redukci došlo u genotypů C148 a PAC2.

Sledování změn hodnot WUE vlivem nízkých teplot není ukazatelem, který je přímo ovlivněn samotným působením stresu nízkou teplotou. Pokud uvážíme existenci korelace mezi rychlostí čisté fotosyntézy a vodivostí průduchů a obdobně rychlostí transpirace a vodivostí průduchů (např. Jarvis et al., 1999; Collins et al., 2008), dospějeme k závěru, že WUE není relevantním ukazatelem pro stanovení odolnosti rostlin k nízkým teplotám, jelikož není primárně stanovenou a nízkou teplotou přímo ovlivněnou charakteristikou, ale charakteristikou až sekundárně odvozenou z hodnot rychlostí čisté fotosyntézy a transpirace jako jejich vzájemný poměr (P_N/E). Rychlost čisté fotosyntézy a transpirace jsou navíc samy do určité míry limitovány vodivostí průduchů. Další nevýhodou je fakt, že nelze jednoznačně určit, do jaké míry se na změnách hodnot WUE podílí vliv nízké teploty a další faktory, obzvláště vláhové poměry prostředí a vodní stav rostliny. Stanovení odolnosti rostlin slunečnice roční k nízkým teplotám pomocí hodnocení efektivity využití vody z uvedených důvodů nelze doporučit.



Obr. 7. Vliv teplot -3 a -5 °C na efektivitu využití vody (WUE) u genotypů slunečnice roční C120, C124, C148 a PAC2 - pokus 1 (ČR).

Legenda: (a) -3 °C; (b) -5 °C. (C) měření 9 hod. před vystavením rostlin mrazové teplotě, tj. kontrolní měření; (S1) měření 5 hod. po působení mrazové teploty; (S2) měření 3. den po působení mrazové teploty, tj. 3. den regenerace; (S3) měření 7. den po vystavení mrazové teplotě, tj. 7. den regenerace. Uvedené hodnoty jsou průměry ± s. e. pro n = 30, průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukeyho test); hodnoty sdílející stejné písmeno nejsou statisticky průkazně rozdílné.

Podmínky pokusů: počet opakování n = 30 (na 1 rostlině stanoveno 10 hodnot jako poměr P_N/E), počet jedinců: 3 rostliny/1 genotyp/1 termín měření.

5.5. Fluorescence chlorofylu *a*: potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_V/F_M)

Z obr. 8. vyplývá, že v pokusu 1 (ČR) nebyly vlivem působení teploty $-3\text{ }^\circ\text{C}$ u sledovaných genotypů slunečnice roční zjištěny statisticky průkazné rozdíly v porovnání s kontrolním měřením (C). Naopak teplota $-5\text{ }^\circ\text{C}$ způsobila statisticky významné rozdíly hodnot F_V/F_M . Obr. 9. zobrazuje vliv teploty $-3\text{ }^\circ\text{C}$ na fluorescenci chlorofylu *a* u sledovaných genotypů v pokusu 2 (Francie). Jak je patrné, genotypy C33, C98, C124 a C148 reagovaly na působení testované mrazové teploty průkazným snížením hodnoty F_V/F_M .

Stanovený průkazný pokles F_V/F_M v pokusu 1 (ČR) a 2 (Francie) vlivem stresu nízkou (resp. mrazovou) teplotou potvrzují výsledky Allinne et al. (2009), kteří zjistili při testování různých termínů časného jarního výsevu slunečnice roční v polních podmínkách ve Francii (Toulouse) redukcí F_V/F_M u časných termínů výsevu vlivem působení nízkých teplot na počátku vegetativního růstu. Ve dvou termínech časného jarního výsevu (únor a březen) byla průměrná teplota na počátku vegetativního růstu $10,3$ a $8,4\text{ }^\circ\text{C}$, v tradičním termínu výsevu (duben) pak byla průměrná teplota $17,8\text{ }^\circ\text{C}$. Zheng et al. (2009) zaznamenali u rostlin dávilce černého (*Jatropha curcas* L.) po nočním působení chladu rovněž redukcí hodnot F_V/F_M , přičemž po 5ti dnech regenerace se hodnoty této charakteristiky opět zvýšily.

Vliv nízkých teplot na redukcí F_V/F_M dále potvrzují např. Ottander et al. (1995), kteří zjistili u rostlin borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) postupný pokles F_V/F_M v podzimním období vlivem klesajících teplot a zvyšování hodnot F_V/F_M s rostoucí teplotou na jaře. Nejnižší hodnoty F_V/F_M byly zaznamenány v období únor až březen, kdy teplota vzduchu dosahovala nejnižších hodnot s nočními minimy až $-30\text{ }^\circ\text{C}$. V březnu pak byla část větví nízkými teplotami stresovaných rostlin přenesena do laboratorních podmínek pro regeneraci při teplotě $20\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 dnů. Úroveň F_V/F_M se během regenerace plně obnovila. V pokusech Robakowskiho and Wyka (2009) při studiu fotoinhibice u jehlic tisu červeného (*Taxus baccata* L.) byl v zimním období s nástupem teplot pod $0\text{ }^\circ\text{C}$ zjištěn pokles úrovně F_V/F_M s klesající teplotou od poloviny ledna a postupné zvyšování této charakteristiky od začátku března. Stejně tak Nippert et al. (2004) potvrdili při studiu sezónních změn fotosyntetické kapacity u jehličnanů horských oblastí korelaci mezi teplotou vzduchu a F_V/F_M .

V pokusu 1 (ČR) (obr. 8.) byl u genotypů C120 a C124 po působení teploty $-5\text{ }^\circ\text{C}$ zaznamenán nejvýraznější, statisticky průkazný pokles hodnot F_V/F_M oproti kontrolnímu měření (C) v termínu měření S1 (C120: 0,36 a C124: 0,43). Hodnoty F_V/F_M se začaly postupně

zvyšovat během regenerace (S2 a S3), avšak úrovně před působením stresu (C120 C: 0,8 a C124 C: 0,81) nedosáhly.

Genotyp C148 reagoval po působení teploty $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ v termínu měření S1 statisticky průkazným poklesem F_V/F_M (0,47) ve srovnání s kontrolním měřením (C: 0,83), kdy hodnotu F_V/F_M redukoval na obdobnou úroveň jako genotypy C120 a C124. V termínech měření S2 a S3 se pak hodnoty F_V/F_M opět zvýšily téměř na stejnou úroveň jako před působením stresu mrazovou s teplotou (S2: 0,79 a S3: 0,8) a tyto hodnoty se od kontrolního měření statisticky průkazně nelišily.

U genotypu PAC2 byla zjištěna shodná reakce na obě mrazové teploty. Tento genotyp reagoval v termínech měření S1 až S3 pouze nepatrným poklesem hodnot F_V/F_M oproti kontrolním měřením, naměřené hodnoty se však od kontroly statisticky průkazně nelišily.

Z výsledků pokusu 1 (ČR) je tak patrné, že se u sledovaných genotypů slunečnice roční projevil průkazný a nejvýraznější pokles hodnot fluorescence chlorofylu *a* (F_V/F_M) následující den po vystavení rostlin stresu mrazovou teplotou $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (S1), a to u genotypů C120, C124 a C148. Hodnoty F_V/F_M se v průběhu regenerace u genotypů C120, C124 a C148 při teplotě $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ opět zvyšovaly, u genotypu C148 došlo k úplnému navrácení hodnoty F_V/F_M na kontrolní úroveň již 3. den regenerace (S2), přičemž postupné obnovení úrovně F_V/F_M během regenerace potvrzují např. výsledky Zhenga et al. (2009). Reakce rostlin na působení mrazových teplot se tedy v pokusu 1 (ČR) lišila v závislosti na genotypu a mrazové teplotě. Ovlivnění F_V/F_M teplotou $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ se projevilo mezi všemi sledovanými genotypy ve stejné míře, resp. žádný z genotypů nebyl průkazně ovlivněn působením této mrazové teploty, negativní vliv teploty $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl výraznější u genotypů C120, C124 a C148, než u genotypu PAC2, který se tak jeví jako nejodolnější.

Výsledky regresní a korelační analýzy provedené v pokusu 1 (ČR) dále potvrdily, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ existuje pozitivní korelace mezi P_N a F_V/F_M (koeficient korelace $r = 0,598$). Hodnota koeficientu korelace odpovídá střední závislosti mezi P_N a F_V/F_M .

Ačkoliv Ottander et al. (1995), Zheng et al. (2009) či Santos et al. (2011 - viz kapitola 5.3.2.), kteří hodnotili působení nízkých teplot na různé rostlinné druhy, nestanovovali korelaci mezi fluorescencí chlorofylu *a* (F_V/F_M) a rychlostí čisté fotosyntézy (P_N), obě uvedené charakteristiky byly v jejich experimentech vlivem nízké teploty redukovány současně. Lze se tedy domnívat, že i v těchto experimentech existovala korelace mezi F_V/F_M a

P_N , čemuž odpovídají i výsledky pokusu 1 (ČR), kde byla potvrzena pozitivní korelace a středně silná závislost mezi P_N a F_V/F_M .

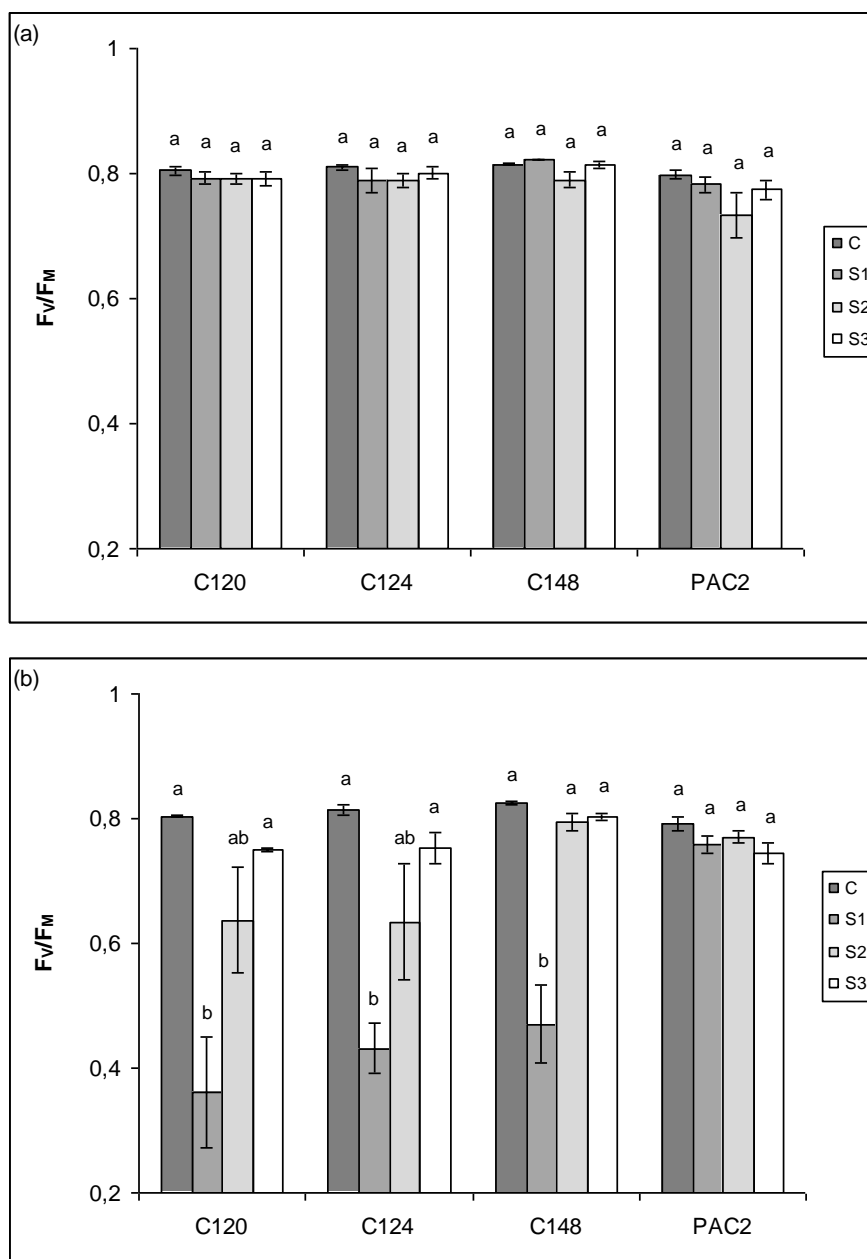
Jak je patrné z obr. 9., v pokusu 2 (Francie) byla u všech genotypů zjištěna redukce hodnot F_V/F_M vlivem teploty $-3\text{ }^\circ\text{C}$ v termínu S1, tj. ihned po jejím působení, avšak statisticky průkazně rozdílný byl pokles F_V/F_M v porovnání s rostlinami kontrolními (C) pouze u genotypů C33, C98, C124 a C148. Největším poklesem F_V/F_M reagovaly genotypy C124 (0,8) a C148 (0,79). V termínu S2 (5. den po působení stresu) pak stresované rostliny dokázaly zvýšit hodnotu F_V/F_M na úroveň před působením stresu a hodnoty F_V/F_M statisticky průkazně nelišily od kontrolních rostlin (C).

Z výsledků pokusu 2 (Francie) je zřejmé, že pouze u genotypu 2603 nebyla zaznamenána průkazná změna F_V/F_M v porovnání s kontrolou, a tudíž lze tento genotyp považovat za nejodolnější vůči mrazové teplotě. I v pokusu 2 (Francie) se tedy projevil genotypový rozdíl při sledování vlivu stresu mrazovou teplotou na změny fluorescence chlorofylu *a*.

Z obr. 8. a 9. také vyplývá, že genotypy C124 a C148 reagovaly rozdílně na působení stejné mrazové teploty (tj. $-3\text{ }^\circ\text{C}$) ve fázi 2 pravých listů (pokus 1 - ČR) a ve fázi 6 až 8 pravých listů (pokus 2 - Francie). Ve fázi 2 pravých listů nezpůsobila teplota $-3\text{ }^\circ\text{C}$ žádné průkazné rozdíly F_V/F_M v porovnání s kontrolním měřením (C), naopak ve fázi 6 až 8 pravých listů byla v porovnání s kontrolními rostlinami zjištěna redukce hodnot F_V/F_M ihned po působení stresu mrazovou teplotou (S1), avšak během regenerace (S2) pokusné rostliny úroveň F_V/F_M plně obnovily. Ve fázi 6 až 8 pravých listů tedy došlo k průkaznému ovlivnění fluorescence chlorofylu *a* mrazovou teplotou $-3\text{ }^\circ\text{C}$, ve fázi 2 pravých listů se průkazný vliv této teploty u genotypů C124 a C148 neprojevil.

Poměr F_V/F_M , tj. potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II, je jednou z nejvýznamnějších charakteristik využívaných k hodnocení úrovně fotosyntézy. Hodnota poměru F_V/F_M se obvykle (tzn. u rostlin v optimálních podmínkách) pohybuje v rozmezí 0,75 až 0,85 a představuje přímý vztah mezi efektivitou využití světla při standardních podmínkách pro fixaci CO_2 a kvantovou výtěžností fotochemických procesů fotosyntézy (Demning and Björkman, 1987). Pokles hodnoty poměru F_V/F_M je velmi citlivým a rychlým indikátorem změn fotosyntézy i fyziologického stavu rostliny celkově, ke kterým dochází v důsledku celé řady environmentálních stresů (Baker, 2008; Čaňová et al., 2012), např. vlivem vodního stresu (Nakashima et al., 2011), osmotického stresu a stresu nadměrnou ozářeností (Weng et al., 2011). Měření fluorescence chlorofylu *a* však bylo využíváno také při

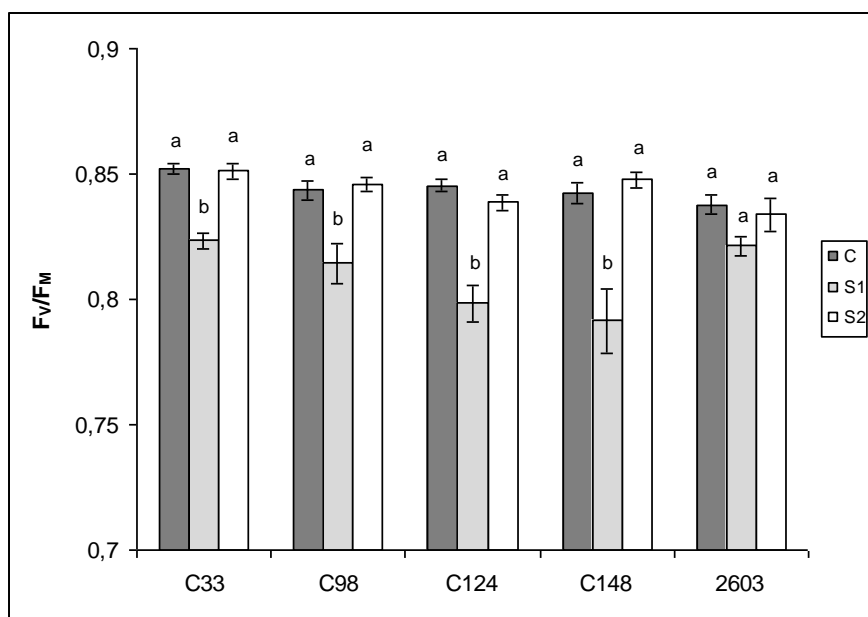
studiu možné ochranné funkce antokyanů před fotoinhibičním poškozením PS II (Manetas and Buschmann, 2011), při pozorování vlivu deficitu draslíku na PS II (Cao et al., 2011), ale také při sledování poškození fotosyntetického aparátu působením nízkých teplot (Fracheboud et al., 1999; Fracheboud et al., 2004). Jde tedy o široce využitelný způsob hodnocení stavu fotosyntetického aparátu a úrovně fotosyntézy. Regresní a korelační analýza provedená v pokusu 1 (ČR) navíc prokázala existenci pozitivní korelace a středně silné závislosti mezi P_N a F_V/F_M , sledování změn fluorescence chlorofylu *a* je tak rovněž vhodnou doplňující metodou k měření rychlosti čisté fotosyntézy pro stanovení poškození fotosyntetického aparátu nízkou teplotou. Měření fluorescence chlorofylu *a* lze však široce využít i jako samostatný fyziologický ukazatel. Na základě výsledků pokusů 1 (ČR) a 2 (Francie) i pokusů dalších autorů (např. Allinne et al., 2009; Zheng et al., 2009) lze stanovení fluorescence chlorofylu *a* (F_V/F_M) doporučit jako velmi vhodný ukazatel pro sledování vlivu nízkých teplot na fotosyntetický aparát a jeho efektivitu a pro posouzení odolnosti rostlin slunečnice roční ke stresu nízkými teplotami.



Obr. 8. Vliv teplot -3 a -5 °C na fluorescenci chlorofylu *a* (F_v/F_m) u genotypů slunečnice roční C120, C124, C148 a PAC2 - pokus 1 (ČR).

Legenda: (a) -3 °C; (b) -5 °C. (C) měření 9 hod. před vystavením rostlin mrazové teplotě, tj. kontrolní měření; (S1) měření 5 hod. po působení mrazové teploty; (S2) měření 3. den po působení mrazové teploty, tj. 3. den regenerace; (S3) měření 7. den po vystavení mrazové teplotě, tj. 7. den regenerace. Uvedené hodnoty jsou průměry ± s. e. pro $n = 6$, průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukeyho test); hodnoty sdílející stejné písmeno nejsou statisticky průkazně rozdílné.

Podmínky pokusů: počet opakování $n = 6$ (na 1 rostlině naměřeny 2 hodnoty), počet jedinců: 3 rostliny/1 genotyp/1 termín měření.



Obr. 9. Vliv teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ na fluorescenci chlorofylu a (F_v/F_M) u genotypů slunečnice roční C33, C98, C124, C148 a 2603 - pokus 2 (Francie).

Legenda: (C) měření kontrolních rostlin v termínu odpovídajícím 1. dni po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$; (S1) měření stresovaných rostlin 1. den ihned po vystavení mrazové teplotě; (S2) měření stresovaných rostlin 5. den po vystavení mrazové teplotě, tj. 5. den regenerace. Uvedené hodnoty jsou průměry \pm s. e. pro $n = 6$, průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukeyho test); hodnoty sdílející stejné písmeno nejsou statisticky průkazně rozdílné.

Podmínky pokusů: počet opakování $n = 6$ (na 1 rostlině stanovena 1 hodnota), počet jedinců: 6 rostlin/1 genotyp/1 termín měření.

5.6. Relativní výtok elektrolytů (REL%)

V pokusu 1 (ČR) i 2 (Francie) byl zaznamenán významný negativní vliv mrazových teplot na permeabilitu plazmatických membrán indukující zvýšení relativního výtoku elektrolytů (REL%), jak je patrné z obr. 10 a 11. Průkazné zvýšení relativního výtoku elektrolytů oběma mrazovými teplotami (-3 a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$) v pokusu 1 (ČR) a teplotou $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ v pokusu 2 (Francie) je v souladu např. s výsledky Hewezihho et al. (2006), kteří testovali mrazovou toleranci dvou genotypů slunečnice roční (Santiago II - raně kvetoucí genotyp a Melody - pozdně kvetoucí genotyp). Pokusné rostliny byly nejprve pěstovány při teplotě $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ do fáze dvou pravých listů, dále byla teplota snížena na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (po dobu 12 dnů). Poté byly z rostlin odebrány listové terčičky, které byly vystaveny různým mrazovým teplotám. Následně byla hodnocena mrazová tolerance uvedených genotypů slunečnice roční prostřednictvím měření relativního výtoku elektrolytů na listových terčičkách. Teploty -3 a

-4 °C způsobily průkazné zvýšení REL_% v porovnání s kontrolními rostlinami, které nebyly vystaveny mrazové ani chladové teplotě a po celou dobu byly pěstovány při 25 °C. Také Zhou and Leul (1998) zaznamenali u rostlin ozimé řepky olejky (*Brassica napus* L. cv. 601) ve fázích vzcházení a kvetení, které byly vystaveny 5 dnů noční mrazové teplotě -3 °C, zvýšení relativního výtoku elektrolytů o 34,7 % ve fázi vzcházení a o 21,8 % ve fázi kvetení v porovnání s kontrolními rostlinami. Allinne et al. (2009) rovněž zjistili při testování různých termínů výsevu slunečnice roční v polních podmínkách při působení nízkých teplot zvýšení relativního výtoku elektrolytů, což potvrzuje, že působení nízké teploty vede ke snížení stability buněčné membrány. Následoval také pokles F_v/F_M , Ψ_π , obsahu chlorofylů a sušiny.

V pokusu 1 (ČR) (obr. 10.) reagovaly genotypy C120 a C148 na působení teploty -5 °C nejvyšším, statisticky průkazným zvýšením hodnoty REL_% ve srovnání s kontrolním měřením (C) bezprostředně po působení mrazové teploty, tj. v termínu měření S1 (C120: 78,7 % a C148: 59,0 %). U genotypu C120 se při této teplotě projevil statisticky průkazný nárůst hodnoty REL_% kromě termínu S1 také v termínu S3 (67,8 %). V ostatních termínech měření a rovněž po působení teploty -3 °C nebyly u genotypů C120 a C148 zjištěny statisticky průkazné rozdíly ve srovnání s kontrolním měřením.

U genotypu C124 byl největší, statisticky průkazný nárůst hodnot REL_% zaznamenán při působení obou teplot v termínu S1 (-3 °C: 67,8 %, -5 °C: 74,7 %). V ostatních termínech měření nebyly oproti kontrole zjištěny statisticky průkazné rozdíly.

Ačkoliv genotyp PAC2 reagoval po působení obou teplot zvýšením hodnot REL_% v porovnání s kontrolním měřením v termínu S1, tyto hodnoty se od kontroly statisticky průkazně nelišily. Rovněž v termínech S2 a S3 nebyly zaznamenány statisticky průkazně vyšší hodnoty REL_% oproti kontrole.

Jak je zřejmé z obr. 11., rovněž v pokusu 2 (Francie) došlo u sledovaných genotypů vlivem teploty -3 °C ke změnám hodnot relativního výtoku elektrolytů (REL_%), tj. k negativnímu ovlivnění permeability plazmatických membrán.

Stresované rostliny genotypů C98, C124 a C148 reagovaly na působení mrazové teploty obdobně; k výraznému zvýšení hodnoty REL_% oproti kontrolním rostlinám C1 (termín měření odpovídající 1. dni po působení teploty -3 °C) došlo v termínu měření S1 (1. den po působení mrazové teploty). Úroveň hodnot REL_% u stresovaných rostlin stanovena v termínu S2 (5. den regenerace) opět klesla na hodnotu statisticky průkazně nerozdílnou od měření kontrolních rostlin C1 a C2 (termín odpovídající 5. dni regenerace). Pouze u genotypu C98

však bylo zvýšení hodnoty $REL_{\%}$ u stresovaných rostlin v termínu S1 (58,2 %) statisticky průkazně rozdílné od hodnot $REL_{\%}$ stanovených v ostatních termínech měření (C1, C2, S2).

U genotypů C33 a 2603 nebylo zjištěno statisticky průkazné zvýšení hodnot $REL_{\%}$ u stresovaných rostlin v termínech měření po působení stresu (S1 a S2) v porovnání s měřeními kontrolních rostlin (C1 a C2).

Z výsledků našich experimentů vyplývá, že reakce rostlin sledovaných genotypů slunečnice roční na působení mrazových teplot se lišila v závislosti na genotypu (pokus 1 - ČR a pokus 2 - Francie) i mrazové teplotě (pokus 1 - ČR).

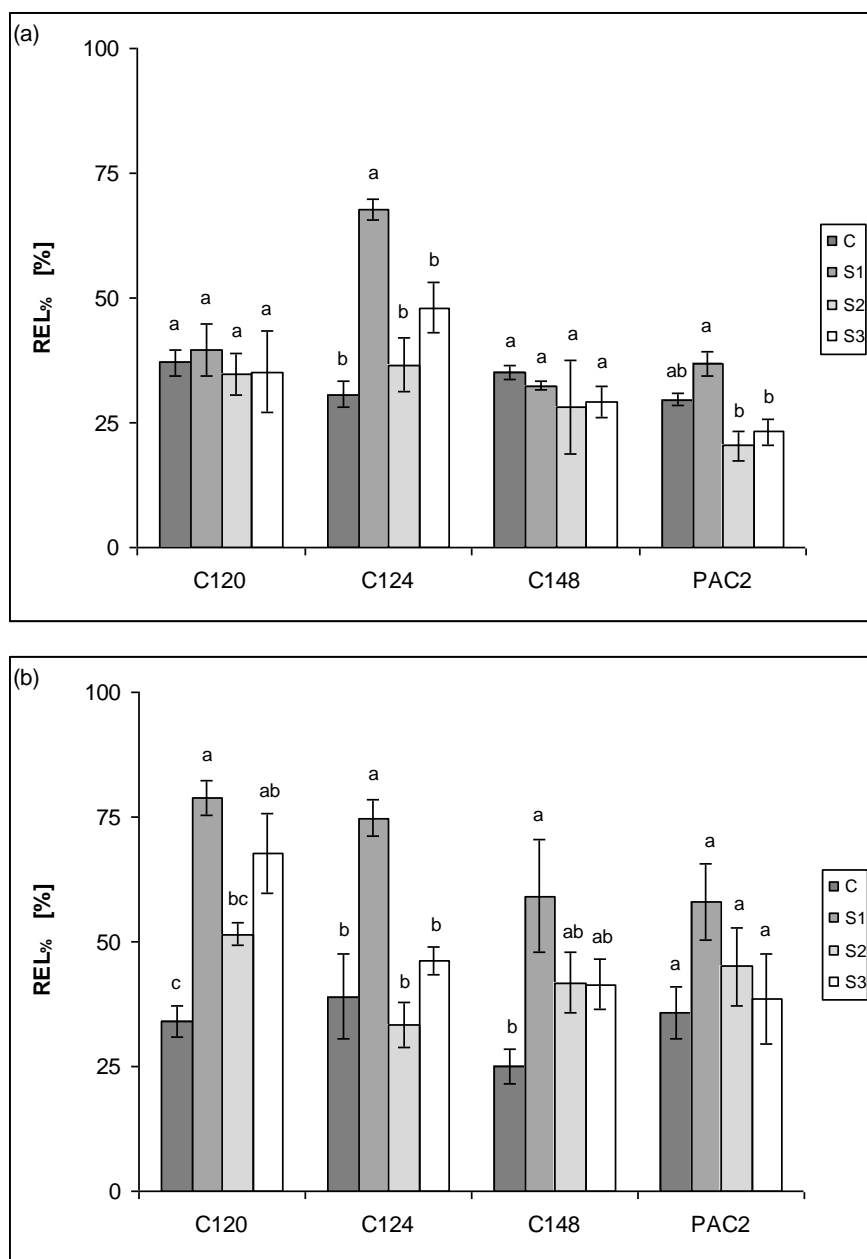
Na základě výsledků pokusu 1 (ČR) lze konstatovat, že k nejvýraznějšímu zvýšení $REL_{\%}$ došlo nejčastěji v měření S1, tj. ihned po působení stresu mrazovou teplotou. V průběhu regenerace (S2 a S3) většinou hodnoty $REL_{\%}$ poklesly zpět na úroveň srovnatelnou s kontrolním měřením (C). U teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ došlo ke statisticky průkaznému zvýšení $REL_{\%}$ oproti kontrole pouze u genotypu C124, a to v termínu S1. Výraznější negativní vliv na propustnost membrán měla až teplota $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Genotyp C124 byl významně ovlivněn oběma teplotami, ostatní genotypy reagovaly zvýšením hodnot $REL_{\%}$ právě až při teplotě $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nejméně negativně ovlivněn teplotou $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl genotyp PAC2, který navíc reagoval odolněji než ostatní genotypy i při teplotě $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, a proto tento genotyp lze považovat za nejodolnější. Naopak jako nejméně odolné lze hodnotit genotypy C120 a C124. Genotyp C120 sice nebyl ovlivněn teplotou $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (tj. nedošlo u něj k poškození membrán), avšak při teplotě $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ u něj byly zaznamenány nejvyšší hodnoty $REL_{\%}$, a to i v průběhu regenerace. Genotyp C124 pak reagoval při teplotě $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ největším zvýšením $REL_{\%}$ a při teplotě $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl rovněž silně negativně ovlivněn působením stresu mrazovou teplotou.

V pokusu 2 (Francie) byl průkazný nárůst hodnot $REL_{\%}$ oproti kontrolním rostlinám (C1) zaznamenán pouze u genotypu C98, a to opět v termínu S1 (ihned po působení mrazové teploty). V průběhu regenerace (S2) nebyla u žádného z genotypů zjištěna průkazně rozdílná hodnota oproti kontrole (C2). Tento genotyp (C98) je tak možné považovat za méně odolný vůči mrazovým teplotám než ostatní sledované genotypy.

Z obr. 10. a 11. je také patrné, že genotyp C124 reagoval odlišně na působení stejné mrazové teploty ($-3\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve fázi 2 pravých listů (pokus 1 - ČR) a ve fázi 6 až 8 pravých listů (pokus 2 - Francie). Ve fázi 2 pravých listů teplota $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ způsobila 1. den po působení stresu (S1) průkazné zvýšení $REL_{\%}$ v porovnání s kontrolním měřením (C), naopak ve fázi 6 až 8 pravých listů nebyla ve srovnání s kontrolními rostlinami (C1 a C2) zjištěna průkazná změna $REL_{\%}$. U genotypu C124 tedy nastalo průkazné ovlivnění permeability plazmatických

membrán (zvýšení hodnoty REL_%) teplotou -3 °C pouze ve fázi 2 pravých listů. U genotypu C148 nebyly průkazné změny vlivem mrazové teploty -3 °C zjištěny ve fázi 2 ani 6 až 8 pravých listů.

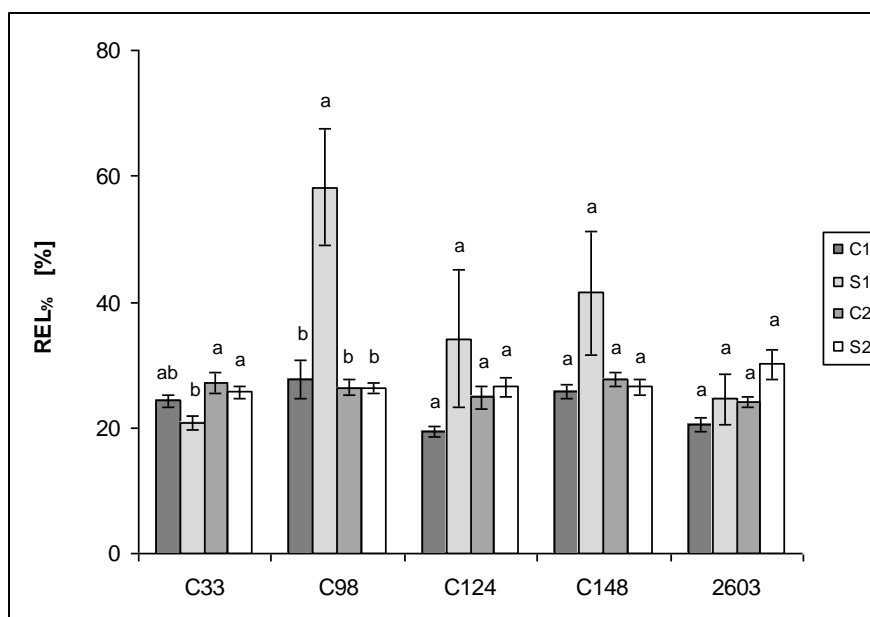
Jak potvrzují výsledky pokusů 1 (ČR), 2 (Francie) i předchozí experimenty dalších autorů (např. Hewezi et al., 2006; Allinne et al., 2009), sledování změn relativního výtoku elektrolytů je velmi vhodným a často využívaným ukazatelem pro přímé sledování vlivu nízké teploty na fyzikální a chemické vlastnosti buněčných membrán a na následné změny v jejich propustnosti. Tolerance rostlin k nízkým teplotám je totiž významně ovlivněna mimo jiné i poměrem nenasycených a nasycených membránových lipidů (Gombos et al., 1994; Moon et al., 1995). Protože nasycené mastné kyseliny (a lipidy, které je obsahují) tuhnou při vyšších teplotách než nenasycené, má jejich vzájemný poměr velký vliv na zachování polotekutosti membrán (Hopkins and Hüner, 2004). Pokud rostliny nedokáží zachovat polotekutost membrán zvýšením podílu nenasycených mastných kyselin, zvětšuje se jejich propustnost (Verlues et al., 2005) a dochází ke zvýšení hodnot relativního výtoku elektrolytů, který vypovídá o primárním poškození rostlinných pletiv mrazem a praskání buněčných membrán (Xin and Browse, 2000; Uemura et al., 2003). U rostlin odolných nízkým teplotám tedy nedochází k tak výraznému zvýšení hodnot relativního výtoku elektrolytů, jako u rostlin citlivých, resp. nemusí nastat žádná změna hodnot REL_% v porovnání s rostlinami kontrolními. Hodnocení změn relativního výtoku elektrolytů tak lze doporučit jako velmi vhodný fyziologický ukazatel pro posouzení odolnosti slunečnice roční k nízkým teplotám.



Obr. 10. Vliv teplot -3 a -5 °C na relativní výtok elektrolytů (REL%) u genotypů slunečnice roční C120, C124, C148 a PAC2 - pokus 1 (ČR).

Legenda: (a) -3 °C; (b) -5 °C. (C) měření 9 hod. před vystavením rostlin mrazové teplotě, tj. kontrolní měření; (S1) měření 5 hod. po působení mrazové teploty; (S2) měření 3. den po působení mrazové teploty, tj. 3. den regenerace; (S3) měření 7. den po vystavení mrazové teplotě, tj. 7. den regenerace. Uvedené hodnoty jsou průměry ± s. e. pro n = 3, průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukeyho test); hodnoty sdílející stejné písmeno nejsou statisticky průkazně rozdílné.

Podmínky pokusů: počet opakování n = 3 (na 1 rostlině naměřena 1 hodnota), počet jedinců: 3 rostliny/1 genotyp/1 termín měření.



Obr. 11. Vliv teploty -3 °C na relativní výtok elektrolytů (REL%) u genotypů slunečnice roční C33, C98, C124, C148 a 2603 - pokus 2 (Francie).

Legenda: (C1) měření kontrolních rostlin v termínu odpovídajícím 1. dni po působení teploty -3 °C; (S1) měření stresovaných rostlin 1. den ihned po vystavení mrazové teplotě; (C2) měření kontrolních rostlin v termínu odpovídajícím 5. dni po působení teploty -3 °C; (S2) měření stresovaných rostlin 5. den po vystavení mrazové teplotě, tj. 5. den regenerace. Uvedené hodnoty jsou průměry ± s. e. pro n = 6, průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukeyho test); hodnoty sdílející stejné písmeno nejsou statisticky průkazně rozdílné.

Podmínky pokusů: počet opakování n = 6 (na 1 rostlině stanovena 1 hodnota), počet jedinců: 6 rostlin/1 genotyp/1 termín měření.

5.7. Osmotický potenciál (Ψ_{π})

Obr. 12. demonstruje rozdílný vliv teplot -3 a -5 °C na osmotický potenciál (Ψ_{π}) rostlin slunečnice roční a průkazné snížení Ψ_{π} vlivem stresu mrazovou teplotou v pokusu 1 (ČR). Průkazný pokles hodnot Ψ_{π} způsobený nízkou teplotou odpovídá např. výsledkům Allinne et al. (2009), kteří při různých termínech časného jarního výsevu slunečnice roční ve Francii pozorovali snížení hodnoty osmotického potenciálu, což bylo způsobeno zvýšením koncentrace osmolytik jako reakce na působení nízkých teplot na počátku vegetativního růstu.

Výraznější vliv na pokles hodnot Ψ_{π} měla v pokusu 1 (ČR) teplota -5 °C. Při teplotě -3 °C nebyly u žádného ze sledovaných genotypů zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi kontrolním měřením (C) a hodnotami získanými v termínech měření po působení mrazové

teploty (S1 až S3). Hodnoty Ψ_{π} stanovené při této teplotě zároveň byly u všech genotypů na podobné úrovni. Reakce na teplotu $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ se však mezi jednotlivými genotypy lišily.

U genotypů C120, C148 a PAC2 se po působení teploty $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ projevil nejvýraznější pokles hodnot Ψ_{π} v termínu S2, tj. 3. den regenerace (C120: $-1,27$, C148: $-1,69$ a PAC2: $-1,46$ MPa), přičemž genotyp C120 reagoval nejmenším poklesem Ψ_{π} z výše uvedených genotypů. Avšak změny hodnot Ψ_{π} oproti kontrole (C) byly v termínu S2 statisticky průkazné pouze u genotypů C120 a C148. V ostatních termínech měření (S1, S3 a u genotypu PAC2 i ve výše zmíněném termínu S2) tyto genotypy reagovaly pouze statisticky neprůkaznými změnami Ψ_{π} .

U genotypu C124 byl zjištěn statisticky průkazný pokles hodnot Ψ_{π} ve všech termínech měření po působení teploty $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, ale na rozdíl od genotypů C120, C148 a PAC2 byla nejnižší hodnota Ψ_{π} zaznamenána v termínu měření S3, tj. až 7. den regenerace ($-1,34$ MPa). Reakce tohoto genotypu na teplotu $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ se tedy projevila nejpozději a zároveň tento genotyp nevykazoval tak výrazný pokles Ψ_{π} jako genotypy C148 a PAC2.

Liu and Osborne (2008), kteří vystavili několik druhů mongolských stepních druhů trav 20 dnům nízké teploty ($15/5\text{ }^{\circ}\text{C}$ den/noc) v laboratorních podmínkách, zjistili vlivem působení chladu u pokusných rostlin nižší hodnoty osmotického potenciálu, kdy v porovnání s kontrolními rostlinami byly jeho hodnoty sníženy o 4 až 43 %. Rovněž Bourion et al. (2003), kteří se zabývali vlivem působení chladu na rostliny hrachu setého (*Pisum sativum* L.), zaznamenali statisticky průkazný pokles Ψ_{π} vlivem nízkých teplot. U pokusných rostlin hrachu setého pozorovali největší pokles osmotického potenciálu 3. den po 10ti denním vystavení rostlin chladové teplotě ($10/3\text{ }^{\circ}\text{C}$ den/noc). Koncentrace sacharidů se dále postupně zvyšovala a nejvyšší hodnoty u všech genotypů dosáhla 6. den po působení chladu. Poté koncentrace sacharidů (v závislosti na genotypu) klesala, nebo zůstala na stejné úrovni, avšak ještě 10. den po působení chladu byla koncentrace sacharidů 2 až 3krát větší než před vystavením chladové teplotě. Stejně tak v pokusu 1 (ČR) byl stanoven největší pokles Ψ_{π} při působení teploty $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ až 3. den (genotypy C120, C148 a PAC2) nebo 7. den (genotyp C124) po působení mrazové teploty. Naopak genotyp PAC2 při teplotě $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ vykazoval největší pokles Ψ_{π} již v měření S1, avšak tento pokles nebyl statisticky průkazný v porovnání s ostatními termíny měření (tzn. ani s kontrolou).

Obr. 13. znázorňuje ovlivnění osmotického potenciálu (Ψ_{π}) působením teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ u sledovaných genotypů slunečnice roční v pokusu 2 (Francie). Všechny genotypy reagovaly na mrazovou teplotu podobným způsobem. V termínech měření S1 a S2 (1. a 5. den po působení

teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$) vykazovaly stresované rostliny testovaných genotypů vyšší hodnoty Ψ_{π} , než byly hodnoty Ψ_{π} stanovené u kontrolních rostlin v termínech měření C1 a C2 (termíny odpovídající 1. a 5. dni po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Avšak ve většině případů byly rozdíly mezi stresovanými a kontrolními rostlinami statisticky neprůkazné, pouze u genotypu C98 bylo uvedené zvýšení hodnoty Ψ_{π} v termínu S1 ($-0,32\text{ MPa}$) statisticky průkazně rozdílné od ostatních termínů měření.

Pokusné rostliny v našich experimentech reagovaly změnami osmotického potenciálu nejen v závislosti na genotypu (pokus 1 - ČR a pokus 2 - Francie), ale i na mrazové teplotě (pokus 1 - ČR). Z výsledků obou pokusů lze vyvodit, že teplota $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ nemá na testované genotypy slunečnice roční vliv, neboť u žádného z genotypů nebyl pozorován statisticky průkazný pokles hodnoty Ψ_{π} .

Z výsledků pokusu 1 (ČR) vyplývá významnější, statisticky průkazný pokles Ψ_{π} u rostlin slunečnice roční po působení teploty $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, a to u genotypů C124 a C148. Ačkoliv genotyp PAC2 prokázal pokles hodnot Ψ_{π} srovnatelný s genotypem C148 a zároveň větší než genotyp C120, tyto změny Ψ_{π} nebyly statisticky průkazné. Při teplotě $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebyly zaznamenány žádné průkazné změny hodnot Ψ_{π} . Za odolnější vůči mrazovým teplotám můžeme tedy považovat genotypy C124 a C148.

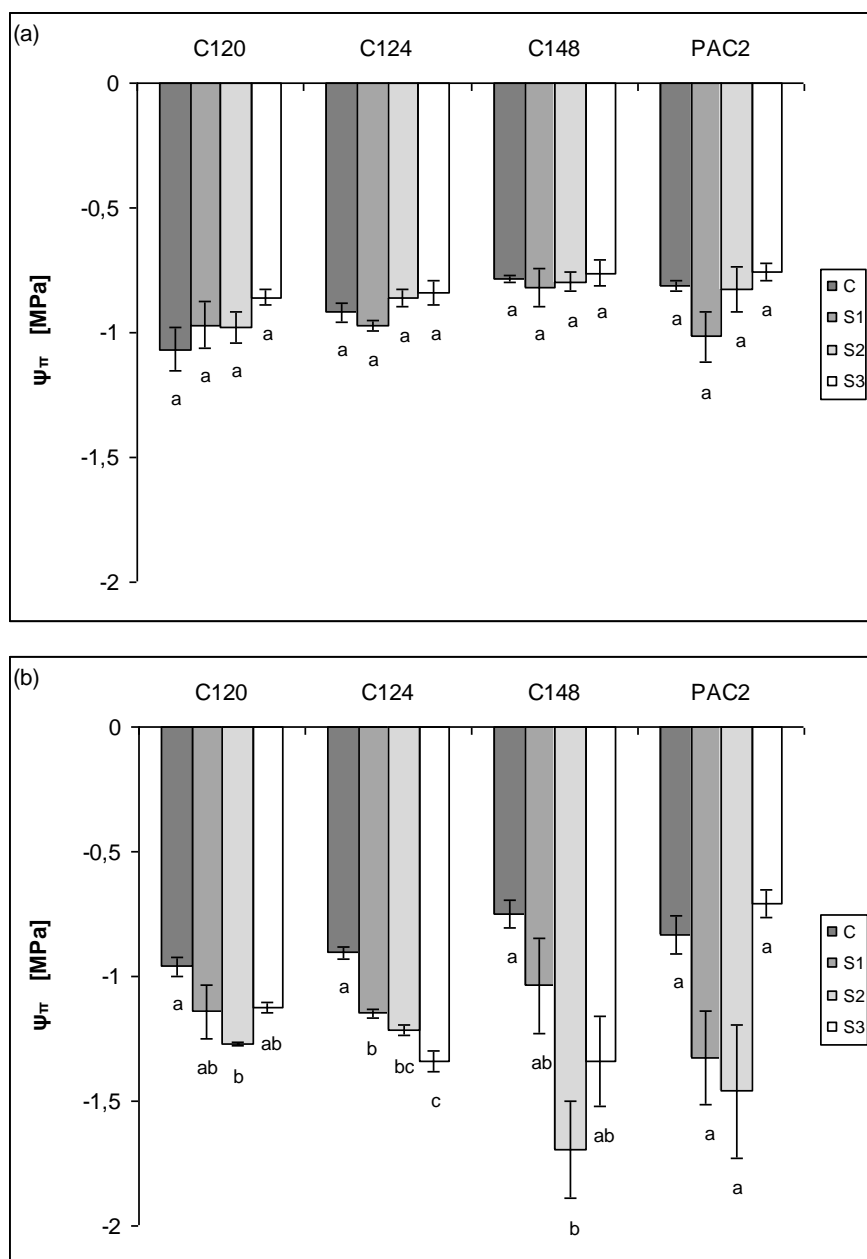
Jak je patrné z výsledků pokusu 2 (Francie) u žádného z genotypů nebylo pozorováno statisticky průkazné snížení hodnot Ψ_{π} v termínech S1 a S2 v porovnání s kontrolními hodnotami (C1 a C2). Jediný průkazný rozdíl byl zjištěn u genotypu C98, kdy v termínu S1 byla hodnota Ψ_{π} statisticky průkazně vyšší, než hodnota kontrolní (C1). Stejný, avšak statisticky neprůkazný trend, byl pozorován i u ostatních genotypů, tj. hodnoty Ψ_{π} se v termínech S1 a S2 v porovnání s kontrolou (C1 a C2) zvýšily. U pokusu 2 (Francie) tak nelze vyvodit odolnost sledovaných genotypů vůči mrazovým teplotám.

Z obr. 12. a 13. je dále zřejmé, že genotypy C124 a C148 reagovaly shodně na působení stejné mrazové teploty ($-3\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve fázi 2 pravých listů (pokus 1 - ČR) a ve fázi 6 až 8 pravých listů (pokus 2 - Francie). Ve fázi 2 ani 6 až 8 pravých listů totiž nezpůsobil stres mrazovou teplotou $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ žádné průkazné změny Ψ_{π} v porovnání s kontrolním měřením (pokus 1 - ČR), resp. s kontrolními rostlinami (pokus 2 - Francie).

Obecně lze předpokládat, že k nízkým teplotám odolný genotyp/rostlina hodnoty Ψ_{π} dokáže při působení nízké teploty snížit, genotyp/rostlina neodolná buď hodnoty Ψ_{π} nesníží tak výrazně nebo Ψ_{π} nesníží vůbec, což potvrzují např. pokusy Guincharda et al. (1997), kdy rostliny jetele plazivého (*Trifolium repens* L.) aklimatizované na působení chladu byly

schopny po působení mrazu osmotického přizpůsobení, naopak u rostlin neaklimatizovaných po působení mrazu snížení osmotického potenciálu zjištěno nebylo. Naopak ke zvýšení hodnoty Ψ_{π} po vystavení rostliny mrazové teplotě by docházet nemělo a ani toto nepotvrzují výsledky pokusů jiných autorů. Dle metodiky pokusu 2 (Francie) byla odebraná listová hmota před vlastním měřením osmotického potenciálu ponechána v plastových zkumavkách s destilovanou vodou po 24 hod. k plnému nasycení rostlinného pletiva vodou. Vzhledem k tomu, že v tomto pokusu byl testován vliv mrazové teploty a u sledovaných genotypů došlo v různé míře k poškození buněčných membrán (viz výsledky REL_%), lze se domnívat, že nezanedbatelné množství naakumulovaných osmoticky aktivních látek prošlo mrazem poškozenou membránou do vody ve zkumavce. Současně byla odebraná pletiva nasycena vodou ze zkumavky a tím mohlo dojít k „naředění“ buněčné šťávy. Z tohoto důvodu pak mohl být obsah osmoticky aktivních látek při následném měření osmotického potenciálu dokonce nižší, než u rostlin kontrolních, nevystavených mrazové teplotě.

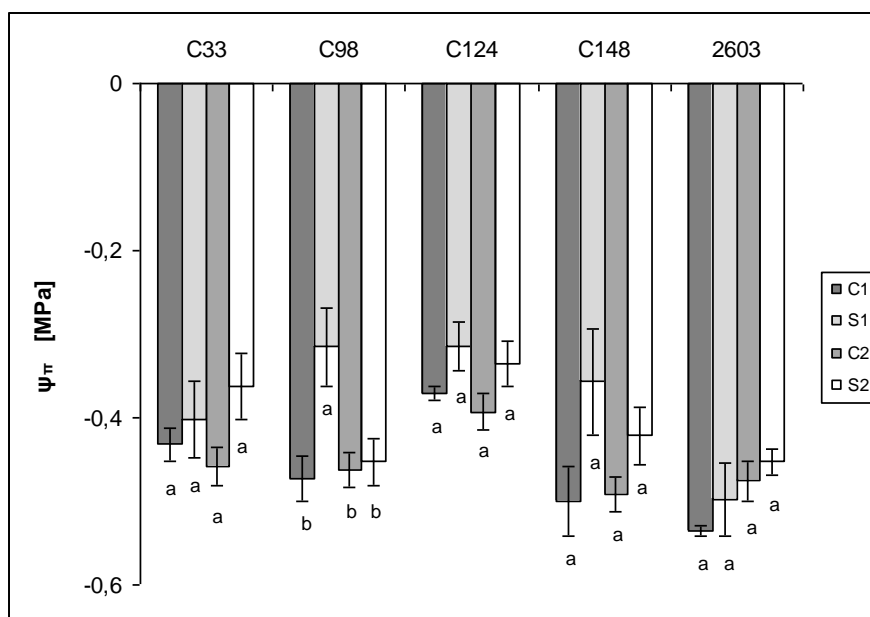
Jedním z aspektů tolerance rostlin k nízkým teplotám je rozklad sacharidů hydrolýzou škrobu pro osmotické přizpůsobení, obnovení a udržení růstu (Vez, 1961; Ashworth et al., 1993; Rosnes et al., 1993), snížení bodu mrznutí buněk (Gonzales et al., 1990; Tronsmo et al., 1993), k udržení obsahu vody a turgoru živých buněk (Steponkus, 1984) a k ochraně buněčných membránových struktur proti mrazové dehydrataci (Xin and Browse, 2000; Collins et al., 2002). Akumulace sacharidů, ale i dalších osmoticky aktivních látek (a výsledný pokles osmotického potenciálu), je tedy jedním z důležitých aspektů odolnosti rostlin k nízkým teplotám. Metoda měření osmotického potenciálu při působení nízkých teplot a pro hodnocení odolnosti a přizpůsobení rostlin nízkým teplotám tak patří mezi nejvýznamnější a nejvhodnější ukazatele, což potvrzují nejen výsledky pokusu 1 (ČR), ale i výsledky pokusů dalších autorů (např. Bourion et al., 2003). Při studiu stresu nízkými (resp. mrazovými) teplotami však pro stanovení osmotického potenciálu není vhodné plné sycení pletiva vodou vzhledem k vlivu nízké teploty na fyzikálně-chemické vlastnosti membrán a jejich zvýšenou propustnost, kdy následně dochází k výtoku obsahu buněčné šťávy (a tím i naakumulovaných osmoticky aktivních látek) do vody sloužící k nasycení pletiva.



Obr. 12. Vliv teplot -3 a -5 °C na osmotický potenciál (Ψ_{π}) u genotypů slunečnice roční C120, C124, C148 a PAC2 - pokus 1 (ČR).

Legenda: (a) -3 °C; (b) -5 °C. (C) měření 9 hod. před vystavením rostlin mrazové teplotě, tj. kontrolní měření; (S1) měření 5 hod. po působení mrazové teploty; (S2) měření 3. den po působení mrazové teploty, tj. 3. den regenerace; (S3) měření 7. den po vystavení mrazové teplotě, tj. 7. den regenerace. Uvedené hodnoty jsou průměry \pm s. e. pro $n = 6$, průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukeyho test); hodnoty sdílející stejné písmeno nejsou statisticky průkazně rozdílné.

Podmínky pokusů: počet opakování $n = 6$ (na 1 rostlině naměřeny 2 hodnoty), počet jedinců: 3 rostliny/1 genotyp/1 termín měření.



Obr. 13. Vliv teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ na osmotický potenciál (Ψ_{π}) u genotypů slunečnice roční C33, C98, C124, C148 a 2603 - pokus 2 (Francie).

Legenda: (C1) měření kontrolních rostlin v termínu odpovídajícím 1. dni po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$; (S1) měření stresovaných rostlin 1. den ihned po vystavení mrazové teplotě; (C2) měření kontrolních rostlin v termínu odpovídajícím 5. dni po působení teploty $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$; (S2) měření stresovaných rostlin 5. den po vystavení mrazové teplotě, tj. 5. den regenerace. Uvedené hodnoty jsou průměry \pm s. e. pro $n = 6$, průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukeyho test); hodnoty sdílející stejné písmeno nejsou statisticky průkazně rozdílné.

Podmínky pokusů: počet opakování $n = 6$ (na 1 rostlině stanovena 1 hodnota), počet jedinců: 6 rostlin/1 genotyp/1 termín měření.

5.8. Koncentrace chlorofylu *a* a *b* (c_a , c_b)

Obr. 14. a 15. zobrazují negativní vliv teplot -3 a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ na koncentraci chlorofylu *a* a *b* (c_a , c_b) u sledovaných genotypů slunečnice roční v pokusu 1 (ČR). Vlivem obou testovaných mrazových teplot (-3 a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$) došlo u většiny genotypů k průkazné redukci hodnot c_a a c_b . V průběhu měření S1 až S3 se hodnoty uvedených charakteristik nejčastěji postupně snižovaly a během regenerace (S2 a S3) nedošlo k jejich opětovnému navrácení na kontrolní úroveň.

Průkazný pokles koncentrace chlorofylu *a* a *b* potvrzují výsledky pokusů dalších autorů. Allinne et al. (2009) zjistili při testování různých termínů časného jarního výsevu slunečnice roční v polních podmínkách ve Francii (Toulouse) snížení obsahu chlorofylů v listech pokusných rostlin vlivem působení nízkých teplot na počátku vegetativního růstu.

Leipner et al. (1997) pozorovali u listů rostlin kukuřice seté, které byly vysety v časném jarním termínu a vystaveny chladovým teplotám v polních podmínkách, typické chladem indukované změny, jako snížení fotosyntetické kapacity a efektivity elektronového transportu v PS II a rovněž redukován obsah pigmentů. Tyto změny se výrazněji projeví u k chladu citlivého genotypu Penjalinan, než u tolerantního genotypu Z7. Martin et al. (1981) zjistili 3. den po 16ti hodinovém nočním působení chladové teploty 1 °C na listy rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) zjevnou ztrátu chlorofylu. Stejně tak Zhou and Leul (1998) zaznamenali u rostlin ozimé řepky olejky (*Brassica napus* L. cv. 601), které byly vystaveny 5 dnům působení noční mrazové teploty -3 °C, pokles obsahu chlorofylů o 16,1 % ve fázi vzcházení a o 4,5 % v době kvetení. Ottander et al. (1995) zjistili u rostlin borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) v oblasti Umeå, Švédsko postupný pokles obsahu chlorofylů v podzimním období vlivem klesajících teplot, přičemž v říjnu byl zaznamenán prudký pokles obsahu chlorofylu *a* i *b*. Po zbytek období nízkých teplot zůstala úroveň obsahu chlorofylu konstantní. V březnu pak byla část větví přenesena do laboratorních podmínek pro regeneraci při teplotě 20 °C po dobu 3 dnů, avšak obsah chlorofylu *b* se během regenerace nezměnil a u chlorofylu *a* bylo pozorováno pouze slabé zvýšení jeho obsahu. Garstka et al. (2007) studovali působení nízkých nočních teplot na listech hrachu setého (*Pisum sativum* L. cv. Baron) (rostlinný druh k chladu tolerantní) a rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker) (rostlinný druh k chladu citlivý). Listy byly odejmuty z rostlin a vystaveny 5 dnům působení teploty 1 °C. Na rozdíl od výše zmíněných autorů nezaznamenali u hrachu ani rajčete pokles obsahu chlorofylů, ačkoliv u rostlin rajčete byla zjištěna nižší hodnota fluorescence chlorofylu *a*.

Jak je patrné z obr. 14, genotyp C120 reagoval v pokusu 1 (ČR) statisticky průkazným poklesem c_a ve srovnání s kontrolou (C) ve všech termínech měření po působení teploty -3 °C (S1: 0,34, S2: 0,27 a S3: 0,3 mg g⁻¹) a v termínech S2 a S3 po působení teploty -5 °C (S2: 0,4 a S3: 0,39 mg g⁻¹).

U genotypu C124 při působení teploty -3 °C došlo ke statisticky průkazné redukci c_a v termínu S1 (0,39 mg g⁻¹). Ačkoliv v termínech měření S2 a S3 byly hodnoty c_a na srovnatelné úrovni, jako v případě termínu S1, oproti kontrolnímu měření nebyly statisticky průkazně odlišné. Po působení teploty -5 °C byl statisticky průkazný pokles hodnot c_a zjištěn až v termínech S2 (0,37 mg g⁻¹) a S3 (0,26 mg g⁻¹).

Genotyp C148 reagoval výrazněji na působení teploty -3 °C. V tomto případě bylo pozorováno průkazné snížení c_a ve všech termínech měření po působení stresu (S1: 0,42,

S2: 0,4 a S3: 0,2 mg g⁻¹), přičemž nejnižší hodnota c_a byla naměřena v termínu S3. Rovněž při teplotě -5 °C se projevil postupný pokles hodnot, avšak statisticky průkazný rozdíl a zároveň nejnižší hodnota c_a byla stanovena rovněž v termínu S3 (0,44 mg g⁻¹).

U genotypu PAC2 nebyly pozorovány žádné statisticky průkazné rozdíly způsobené teplotou -3 °C a u teploty -5 °C byl zaznamenán statisticky průkazný pokles pouze v termínu S3, kdy hodnota c_a byla ze všech termínů měření opět nejnižší (0,18 mg g⁻¹).

Obr. 15. ukazuje ovlivnění koncentrace chlorofylu b (c_b) u pokusných rostlin slunečnice roční testovanými mrazovými teplotami v pokusu 1 (ČR). V případě genotypů C120 (obě teploty), C148 (-3 °C) a PAC2 (-5 °C) byl průběh změn hodnot c_b i průkaznost rozdílů obdobné, jako výsledky pro c_a . U genotypů C124 (-5 °C) a PAC2 (-3 °C) byl rovněž zjištěn srovnatelný průběh změn hodnot c_b , avšak statistická průkaznost rozdílů se od výsledků c_a lišila.

Genotyp C120 reagoval statisticky průkazným poklesem hodnot c_b ve srovnání s kontrolou (C) ve všech termínech měření po působení teploty -3 °C (S1: 0,085, S2: 0,068 a S3: 0,077 mg g⁻¹) a v termínech S2 a S3 po působení teploty -5 °C (S2: 0,103 a S3: 0,101 mg g⁻¹).

U genotypu C124 při působení teploty -3 °C došlo ke statisticky průkaznému poklesu hodnot c_b ve všech termínech po působení mrazové teploty (S1: 0,106, S2: 0,108 a S3: 0,102 mg g⁻¹). Po působení teploty -5 °C byla statisticky průkazná redukce c_b ve srovnání s kontrolou zaznamenána až v termínech S2 (0,107 mg g⁻¹) a S3 (0,09 mg g⁻¹).

Genotyp C148 reagoval výraznějším poklesem c_b po působení teploty -3 °C, kdy bylo zaznamenáno průkazné snížení c_b ve všech termínech měření po působení stresu (S1: 0,108, S2: 0,103 a S3: 0,053 mg g⁻¹), přičemž nejnižší hodnota c_b byla naměřena až v termínu S3. Při teplotě -5 °C se neprojevily statisticky průkazné rozdíly.

Genotyp PAC2 reagoval na působení teploty -3 °C statisticky průkazným snížením hodnoty c_b oproti kontrole pouze v termínu S2 (0,118 mg g⁻¹) a u teploty -5 °C byl zaznamenán statisticky průkazný pokles až v termínu S3, kdy byla hodnota c_b ze všech termínů měření nejnižší (0,039 mg g⁻¹).

V souladu s výsledky Leipnera et al. (1997), Allinne et al. (2009) a dalších byl také v pokusu 1 (ČR) zjištěn pokles koncentrace chlorofylu a a b (c_a a c_b) po působení mrazových teplot -3 a -5 °C. Reakce rostlin na působení mrazové teploty se lišila v závislosti na genotypu a teplotě. Nejmenší pokles koncentrace chlorofylu a i b byl při teplotě -3 °C pozorován u genotypu PAC2, k největší redukci došlo u genotypu C148. Teplota -5 °C pak způsobila postupný pokles hodnot koncentrace chlorofylu a i b u všech genotypů. Ačkoliv teplota -5 °C

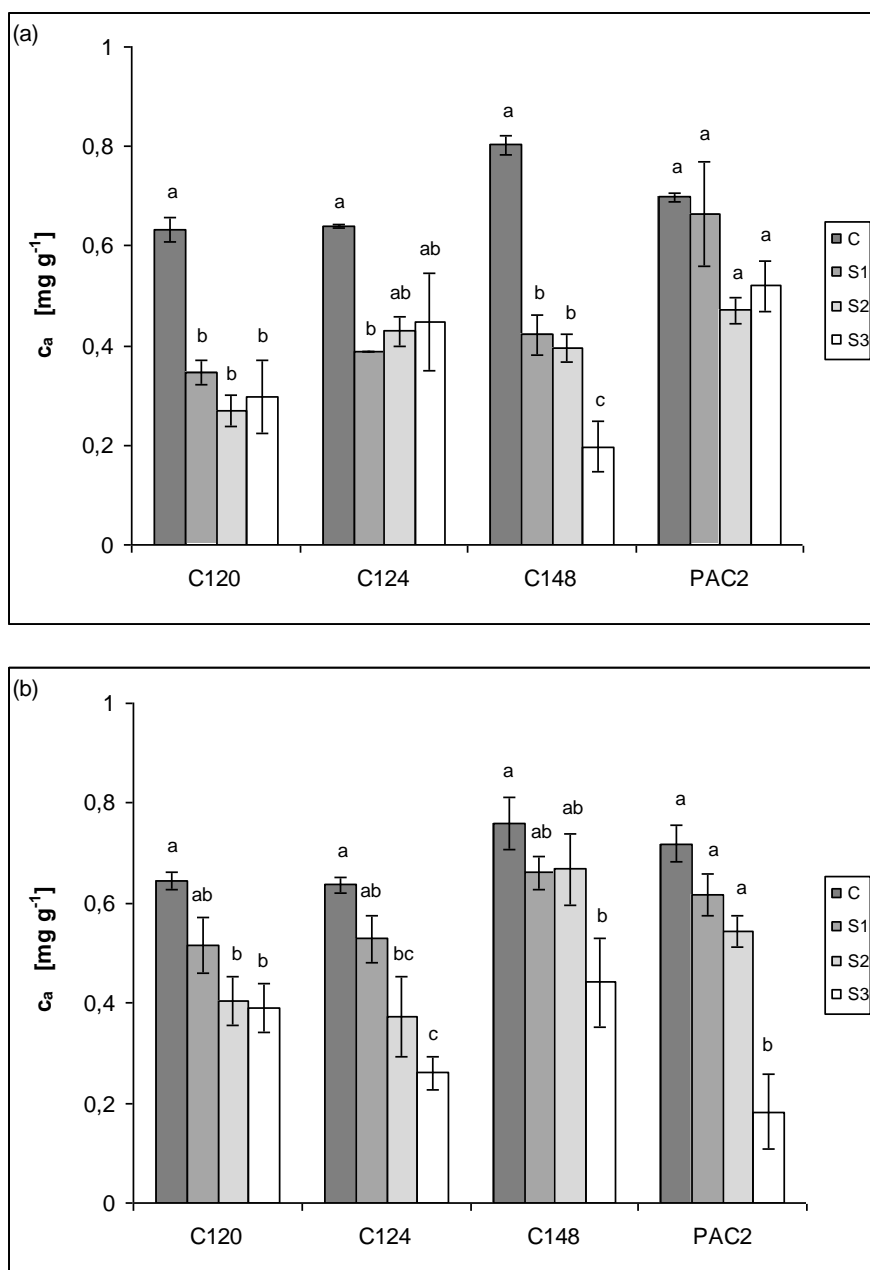
způsobila u všech genotypů pokles hodnot c_a a c_b nejen v termínu S1, ale i dále v průběhu regenerace (S2 a S3), a to zejména u genotypu PAC2, teplota -3 °C zapříčinila výraznější pokles hodnot c_a a c_b . Na rozdíl od teploty -5 °C však při -3 °C nedocházelo (kromě genotypu C148) k dalšímu poklesu c_a a c_b během regenerace (S2 a S3), zároveň se ale hodnoty c_a a c_b během regenerace nezačaly postupně zvyšovat a vracet na kontrolní úroveň.

I přesto, že např. výsledky pokusu Leipnera et al. (1997) potvrzují rozdílný obsah pigmentů u nízkým teplotám citlivého a odolného genotypu, resp. nižší koncentraci pigmentů u citlivého genotypu, nelze vzhledem k nekonzistentním výsledkům pokusu 1 (ČR) jednoznačně vyhodnotit, který z námi testovaných genotypů může být považován za odolný/citlivý k mrazovým teplotám. Stejný genotyp totiž reagoval z hlediska odolnosti v porovnání s ostatními genotypy různě při působení teplot -3 a -5 °C . Např. genotyp PAC2 je možné ve srovnání s ostatními genotypy považovat při působení teploty -3 °C za nejodolnější (nejmenší redukce hodnot c_a a c_b), naopak při působení teploty -5 °C se jeví jako nejméně odolný k mrazovým teplotám (největší redukce hodnot c_a a c_b v termínu S3).

Stejně tak nelze posoudit, která z testovaných teplot měla celkově větší negativní vliv. Při teplotě -3 °C sice byla např. u genotypů C120 a C124 v termínu S1 zjištěna významnější redukce hodnot c_a a c_b než při -5 °C , avšak při teplotě -5 °C (na rozdíl od teploty -3 °C) docházelo u pokusných rostlin k dalšímu, výraznému poklesu hodnot c_a a c_b během regenerace (nejnižší hodnoty byly pozorovány až 7. den regenerace - S3). U genotypu PAC2 se projevil výraznější negativní vliv teploty -5 °C , naopak u genotypu C148 způsobila tato mrazová teplota celkově menší redukci koncentrace chlorofylu *a* a *b* než teplota -3 °C .

V pokusu 1 (ČR) se tedy nepodařilo pomocí metody měření změn koncentrace chlorofylu *a* a *b* vlivem působení mrazových teplot zhodnotit míru vlivu testovaných mrazových teplot na rostliny sledovaných genotypů slunečnice roční, ani zhodnotit tyto genotypy z hlediska jejich odolnosti k mrazovým teplotám. Tato metoda je však často využívaným a citlivým ukazatelem odolnosti rostlin k nízkým teplotám, jelikož chloroplasty patří mezi orgány nejdříve a nejsilněji ovlivněné působením nízkých teplot (např. Sowiński et al., 2005). Stanovení koncentrace chlorofylů lze s ohledem na výsledky pokusů dalších autorů (Leipner et al., 1997; Allinne et al., 2009) obecně doporučit pro sledování vlivu nízkých teplot, avšak je možné, že u testování působení mrazových teplot na rostliny slunečnice roční by bylo vhodné zopakovat experimentální stanovení obsahu chlorofylu *a* a *b* a vyloučit tak chybně provedené laboratorní zpracování apod. a případně použít jiný metodický postup, než je extrakce pigmentů do acetonu a následné spektrofotometrické

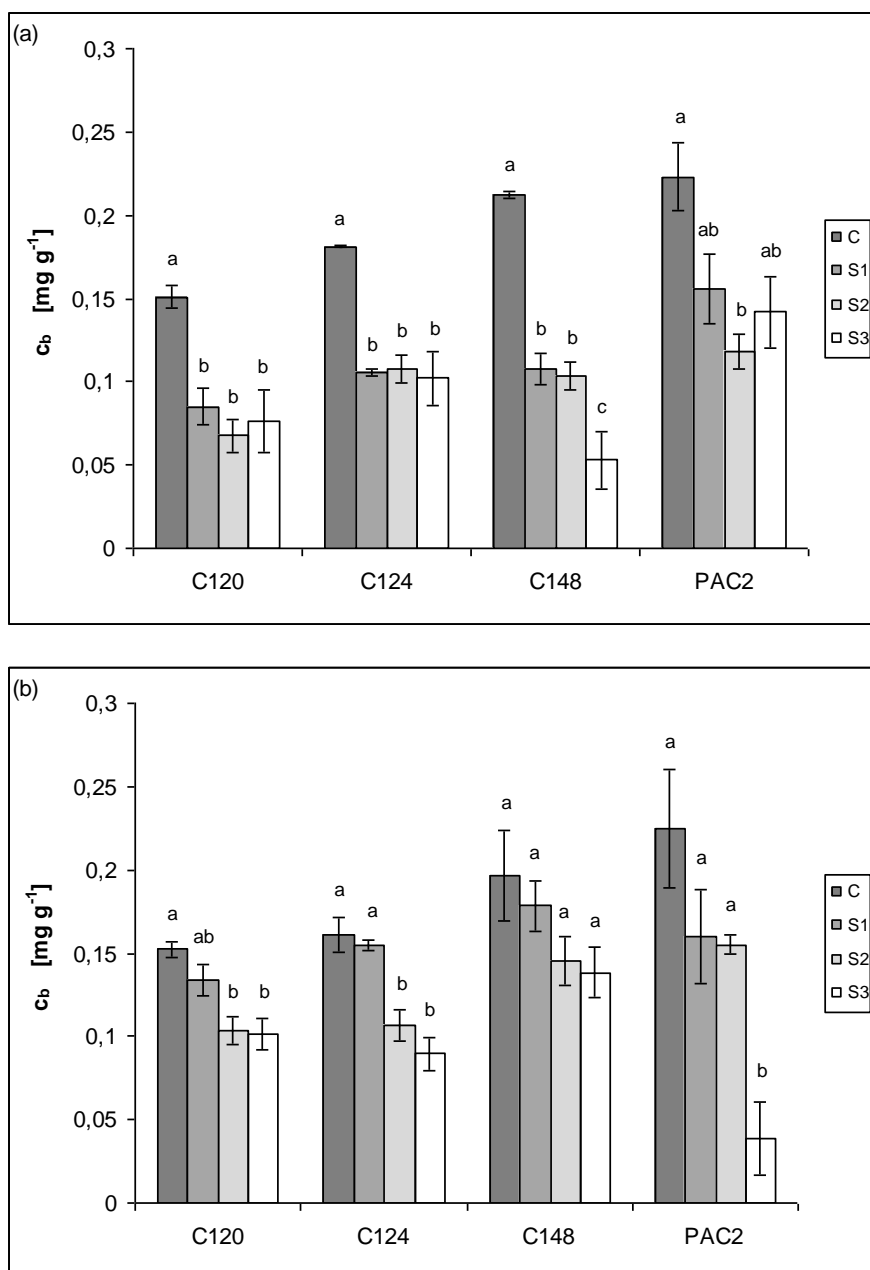
stanovení koncentrace chlorofylu *a* a *b*. V takovém případě by bylo možné využít např. nedestruktivní metodu měření chlorofylmetrem SPAD 502 Plus (Konica Minolta Sensing, Inc., Japonsko), jejíž podstatou je stanovení obsahu chlorofylu v listech na základě absorbance světelného záření při různých vlnových délkách.



Obr. 14. Vliv teplot -3 a -5 °C na koncentraci chlorofylu *a* (c_a) u genotypů slunečnice roční C120, C124, C148 a PAC2 - pokus 1 (ČR).

Legenda: (a) -3 °C; (b) -5 °C. (C) měření 9 hod. před vystavením rostlin mrazové teplotě, tj. kontrolní měření; (S1) měření 5 hod. po působení mrazové teploty; (S2) měření 3. den po působení mrazové teploty, tj. 3. den regenerace; (S3) měření 7. den po vystavení mrazové teplotě, tj. 7. den regenerace. Uvedené hodnoty jsou průměry \pm s. e. pro $n = 3$, průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukeyho test); hodnoty sdílející stejné písmeno nejsou statisticky průkazně rozdílné.

Podmínky pokusů: počet opakování $n = 3$ (na 1 rostlině stanovena 1 hodnota), počet jedinců: 3 rostliny/1 genotyp/1 termín měření.



Obr. 15. Vliv teplot -3 a $-5\text{ }^\circ\text{C}$ na koncentraci chlorofylu *b* (c_b) u genotypů slunečnice roční C120, C124, C148 a PAC2 - pokus 1 (ČR).

Legenda: (a) $-3\text{ }^\circ\text{C}$; (b) $-5\text{ }^\circ\text{C}$. (C) měření 9 hod. před vystavením rostlin mrazové teplotě, tj. kontrolní měření; (S1) měření 5 hod. po působení mrazové teploty; (S2) měření 3. den po působení mrazové teploty, tj. 3. den regenerace; (S3) měření 7. den po vystavení mrazové teplotě, tj. 7. den regenerace. Uvedené hodnoty jsou průměry \pm s. e. pro $n = 3$, průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukeyho test); hodnoty sdílející stejné písmeno nejsou statisticky průkazně rozdílné.

Podmínky pokusů: počet opakování $n = 3$ (na 1 rostlině stanovena 1 hodnota), počet jedinců: 3 rostliny/1 genotyp/1 termín měření.

6. ZÁVĚR

6.1. Potvrzení stanovených hypotéz a splnění cílů práce

Cílem této práce bylo (i) stanovení fyziologické variability vybraného souboru genotypů slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) z hlediska odolnosti k nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu a (ii) stanovení nejrelevantnějších fyziologických ukazatelů odolnosti slunečnice roční k nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu.

Z výsledků pokusů 1 (ČR) a 2 (Francie) vyplývají rozdílné reakce testovaných genotypů ve sledovaných fyziologických charakteristikách v jednotlivých termínech jejich měření, tj. rozdíly hodnot kontrolních a hodnot ovlivněných působením mrazové teploty.

V termínu měření S1, tj. 5 hod. po působení mrazových teplot -3 a -5 °C - pokus 1 (ČR) a 1. den ihned po působení teploty -3 °C - pokus 2 (Francie), se ve většině případů projevil negativní vliv mrazové teploty. Tzn., že došlo k redukcí (např. P_N) nebo naopak ke zvýšení (např. $REL_{\%}$) hodnot sledovaných charakteristik. V průběhu regenerace (S2 a S3 - pokus 1, S2 - pokus 2) se pak hodnoty postupně navracely na kontrolní úroveň (např. $F_V/F_M/C33$, C98, C124 - pokus 2), zůstaly na stejné úrovni (např. $P_N/C120/-3$ °C, -5 °C - pokus 1) nebo dále klesaly (např. $\Psi_{\pi}/C124/-5$ °C - pokus 1). V některých případech však k průkazným změnám sledované charakteristiky v termínech měření po působení stresu v porovnání s kontrolou nedošlo vůbec (např. $F_V/F_M/všechny$ genotypy/ -3 °C - pokus 1).

Za celkově nejodolnější k nízkým (resp. mrazovým) teplotám je možné považovat v pokusu 1 (ČR) genotyp PAC2. U tohoto genotypu bylo v porovnání s ostatními genotypy zaznamenáno nejmenší negativní ovlivnění P_N , F_V/F_M a $REL_{\%}$ vlivem mrazových teplot a u žádné ze sledovaných charakteristik se neprojevil jako nejcitlivější. Naopak za nejcitlivější lze označit genotyp C120, u kterého se projevil největší negativní vliv mrazových teplot na P_N , F_V/F_M a $REL_{\%}$ a zároveň tento genotyp nebyl u žádné charakteristiky vyhodnocen jako nejodolnější. Ostatní genotypy reagovaly v pokusu 1 (ČR) jako nejodolnější/nejcitlivější např. jen u jediné charakteristiky, v porovnání s ostatními genotypy reagovaly středně odolně, nebo reagovaly u jedné charakteristiky jako odolné (C124: Ψ_{π}) a současně u jiné jako citlivé (C124: $REL_{\%}$). V pokusu 2 (Francie) pak nebylo z důvodu značné neprůkaznosti výsledků možné určit odolnost sledovaných genotypů k mrazové teplotě.

V pokusu 1 (ČR) se rovněž potvrdila rozdílnost reakcí mezi testovanými genotypy při působení mrazových teplot -3 a -5 °C i odlišné reakce jednoho genotypu na působení dvou

mrazových teplot. K významnějším změnám sledovaných charakteristik došlo po působení mrazové teploty $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, pouze u koncentrace chlorofylu *a* a *b* byl vliv teploty nejednoznačný a nelze posoudit, která z mrazových teplot měla větší negativní vliv na testované genotypy.

Byly tedy potvrzeny stanovené hypotézy, a to že:

- 1) mezi vybranými genotypy slunečnice roční se při působení stresu nízkou teplotou na počátku vegetativního růstu projeví rozdílné reakce ve sledovaných fyziologických charakteristikách (vliv genotypu) a
- 2) vybrané genotypy slunečnice roční budou reagovat rozdílně na působení různých nízkých (resp. mrazových) teplot (vliv teploty).

Stejně tak se podařilo vyhodnotit, která ze sledovaných fyziologických charakteristik je relevantním ukazatelem pro studium fyziologických reakcí a odolnosti rostlin slunečnice roční při působení testovaných mrazových teplot na počátku vegetativního růstu, tj. byla potvrzena poslední hypotéza:

- 3) lze stanovit relevantní fyziologické ukazatele odolnosti slunečnice roční k nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu.

Na základě výsledků pokusů 1 (ČR) a 2 (Francie) i předešlých experimentů dalších autorů lze jako nejvhodnější fyziologické ukazatele označit:

- stanovení rychlosti čisté fotosyntézy (P_N),
- fluorescenci chlorofylu *a*: potenciální fotochemická efektivita elektronového transportu ve fotosystému II (F_v/F_M),
- hodnocení vlivu nízkých teplot na fyzikálně-chemické vlastnosti buněčných membrán a následné změny v jejich propustnosti pomocí relativního výtoku elektrolytů ($REL_{\%}$),
- stanovení osmotického potenciálu (Ψ_{π}).

Ačkoliv se z výsledků měření vodivosti průduchů (g_s) a koncentrace chlorofylu *a* a *b* (c_a , c_b) (pokus 1 - ČR) nepodařila dovést míra odolnosti sledovaných genotypů k působení testovaných mrazových teplot a u koncentrace chlorofylu *a* a *b* ani vliv mrazové teploty, je možné tyto metody obecně považovat rovněž za vhodné fyziologické ukazatele odolnosti rostlin k nízkým teplotám. Pouze jako doplňkovou metodu pro hodnocení vlivu nízké teploty na rostliny slunečnice roční lze doporučit měření rychlosti transpirace (E). Naopak nevhodným fyziologickým ukazatelem je stanovení změn hodnot WUE.

První cíl práce byl splněn pouze částečně. Ačkoliv jsme v pokusu 1 (ČR) prokázali fyziologickou variabilitu vybraného souboru genotypů slunečnice roční k nízkým teplotám a

stanovili nejodolnější a nejcitlivější genotyp (PAC2 a C120), v pokusu 2 se vyhodnotit odolnost sledovaných genotypů k nízkým teplotám z důvodu značné neprůkaznosti výsledků nepodařilo. Na základě výsledků pokusů 1 (ČR) a 2 (Francie) jsme stanovili nejrelevantnější fyziologické ukazatele odolnosti slunečnice roční k nízkým teplotám na počátku vegetativního růstu, druhý cíl práce byl tedy zcela splněn.

6.2. Další rozvoj vědní disciplíny a doporučení pro praxi

Výsledky práce mohou přispět k lepšímu pochopení mechanismů odolnosti a tolerance vůči nízkým teplotám u slunečnice roční (resp. rostlin obecně). Je však nezbytné pokračovat v další experimentální činnosti v laboratorních podmínkách a následném ověření získaných výsledků v podmínkách polních, kde by výše uvedené relevantní fyziologické ukazatele, tj. rychlosti čisté fotosyntézy (P_N), fluorescence chlorofylu *a* (F_V/F_M), relativní výtok elektrolytů ($REL_{\%}$), osmotický potenciál (Ψ_{π}), vodivost průduchů (g_s) a koncentrace chlorofylu *a* a *b* (c_a , c_b), byly využity pro stanovení vlivu nízkých teplot a odolnosti u slunečnice také při jiném rozmezí mrazových (příp. i chladových) teplot, v různých termínech měření vybraných fyziologických charakteristik apod. Výhodou těchto fyziologických ukazatelů je to, že se jedná o metody pro obsluhu relativně jednoduché, ale zároveň spolehlivé a přesné.

Nejodolnější genotypy pak mohou být využity jako genetický zdroj při šlechtění nových genotypů slunečnice roční z hlediska odolnosti k nízkým teplotám. Pro lokalizaci genů na chromozomu je možné využít genetických metod, jako např. QTL. K nízkým teplotám odolné genotypy je pak možné využít rovněž přímo v agronomické praxi. Budou-li nalezeny takové genotypy, které umožňují změnu pěstebního cyklu slunečnice (posunutí výsevu k časnějším termínům), pak bude nutné inovovat pro tento účel pěstitelské metodiky slunečnice, ve kterých budou zohledněny podmínky časného výsevu.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Acatrinei, L. 2010. Photosynthesis rate, transpiration and stomatal conductance of vegetable species in protected organic crops. *Lucrări Științifice*. 53. 32-35.

Agarwal, P. K., Jha, B. 2010. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum*. 54. 201-212.

Alcázar, R., Cuevas, J. C., Planas, J., Zarzab, X., Bortolotti, C., Carrascoc, P., Salinas, J., Tiburcio, A. F., Altabella, T. 2011. Integration of polyamines in the cold acclimation response. *Plant Science*. 180. 31-38.

Allen, D. J., Ratner, K., Giller, Y. E., Gussakovsky, E. E., Shahak, Y., Ort, D. R. 2000. An overnight chill induces a delayed inhibition of photosynthesis at midday in mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Experimental Botany*. 51. 1893-1902.

Allinne, C. Modélisation écophysiological et analyse génétique pour la recherche de génotypes de tournesol adapté aux basses températures causées par des semis précoces [on-line]. Institut National Polytechnique de Toulouse. 12. února 2010 [cit. 2010-04-11]. Dostupné z:

<http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000998/>

Allinne, C., Maury, P., Sarrafi, A., Grieu, P. 2009. Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions. *Plant Science*. 177. 349-359.

Anastasi, U., Cammarata, M., Abbate, V. 2000. Yield potential and oil quality of sunflower (oleic and standard) grown between autumn and summer. *Italian Journal of Agronomy*. 4. 23-36.

Andrade, F. H. 1995. Analysis of growth and yield of maize, sunflower and soybean grown at Balcare, Argentina. *Field Crops Research*. 41. 1-12.

Andrews, J. R., Fryer, M. J., Baker, N. R. 1995. Characterisation of chilling effects on photosynthetic performance of maize crops during early season growth using chlorophyll fluorescence. *Journal of Experimental Botany*. 46. 1195-1203.

Andriani, J. M., Andrare, F. H., Suero, E. E., Dardanelli, J. L. 1991. Water deficits during reproductive growth of soybeans. I. Their effects on dry matter accumulation, seed yield and its components. *Agronomie*. 11. 737-746.

Annicchiarico, P., Collins, R. P., Fornasier, F., Rhodes, I. 2001. Variation in cold tolerance and spring growth among Italian white clover populations. *Euphytica*. 122. 407-416.

Anon. 2013. Definitivní údaje o sklizni zemědělských plodin - 2012 [on-line]. Český statistický úřad. 14. února 2013 [cit. 2013-05-13]. Dostupné z: <http://www.czso.cz/csu/2013edicniplan.nsf/p/2102-13>

Antikainen, M., Griffith, M., Zhang, J., Hon, W. C., Yang, D. S. C., Pihakaski-Maunsbach, K. 1993. Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns and roots by tissue printing. *Plant Physiology*. 110. 845-857.

Aranda, I., Pardos, M., Puértolas, J., Jiménez, D. M., Pardos, J. A. 2007. Water-use efficiency in cork oak (*Quercus suber*) is modified by the interaction of water and light availabilities. *Tree Physiology*. 27. 671-677.

Aroca, R., Irigoyen, J. J., Sánchez-Díaz, M. 2001. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative stress during chilling and subsequent recovery in two maize varieties differing in chilling sensitivity. *Plant Science*. 161. 719-726.

Ashworth, E. N., Stirm, V. E., Volence, J. J. 1993. Seasonal variation in soluble sugars and starch within woody stems of *Cornus sericea* L. *Tree Physiology*. 13. 379-399.

Ashworth, E. N. 1993. Deep supercooling in woody plant tissues. In: **Li, P. H., Christersson, L. (eds.)**. Advances in plant cold hardiness. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 203-214.

As-Sadi, F., Carrere, S., Gascuel, Q., Hourlier, T., Rengel, D., Le Paslier, M.-C., Bordat, A., Boniface, M.-C., Brunel, D., Gouzy, J., Godiard, L., Vincourt, P., 2011. Transcriptomic analysis of the interaction between *Helianthus annuus* and its obligate parasite *Plasmopara halstedii* shows single nucleotide polymorphisms in CRN sequences. *BioMed Central Genomics*. 12. 498.

Atwell, B., Kriedeman, P., Turnbull, C. 1999. Plants in action: Adaptation in nature, performance in cultivation. Macmillan Education. South Yarra, Australia. p. 664.

Baek, S. G., Woo, S. Y. 2010. Physiological and biochemical responses of two tree species in urban areas to different air pollution levels. *Photosynthetica*. 48. 23-29.

Baker, N. R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*. 59. 89-113.

Baker, J. T., Allen, L. H., Jr. 1993. Contrasting crop species responses to CO₂ and temperature: rice, soybean and citrus. *Vegetatio*. 104/105. 239-260.

Baldini, M., Vannozzi, G. P. 1999. Yield relationships under drought in sunflower genotypes obtained from a wild population and cultivated sunflowers in rain-out shelter in large pots and field experiments. *Helia*. 22. 81-96.

- Bange, M. P., Hammer, G. L., Rickert, K. G. 1998.** Temperature and sowing date affect the linear increase of sunflower harvest index. *Agronomy Journal*. 90. 324-328.
- Barros, J. F. C., de Carvalho, M., Basch, G. 2004.** Response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to sowing date and plant density under Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy*. 21. 347-356.
- Bassirirad, H., Caldwell, M. M., Mott, K. A. 1993.** Effect of root cooling on photosynthesis of *Artemisia tridentata* seedling under different light levels. *Botanica Acta*. 106. 223-227.
- Baydar, H., Erbas, S. 2005.** Influence of seed development and seed position on oil, fatty acids and total tocopherol content in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 29. 179-186.
- Beard, B. H., Geng, S. 1982.** Interrelationships of morphological and economical characters of sunflower. *Crop Science*. 22. 817-822.
- Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., Bhattarai, T. 2007.** Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences*. 32. 501-510.
- Blum, A. 2005.** Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential - are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*. 56. 1159-1168.
- Boujghagh, M. 1993.** Performance of ten sunflower genotypes with winter sowing in free Moroccan edaphic/climatic localities. *Helia*. 16. 31-44.
- Bourion, V., Lejeune-Hénaut, I., Jolain-Munier, N., Salon, C. 2003.** Cold acclimation of winter and spring peas: Carbon partitioning as affected by light intensity. *European Journal of Agronomy*. 19. 535-548.
- Boyer, J. S. 1982.** Plant productivity and environment. *Science*. 218. 443-448.
- Bowers, M. C. 1994.** Environmental effects of cold on plants. In: **Wilkinson, R. E. (ed.)**. *Plant-environment interactions*. Marcel Dekker, NewYork. p. 391-411.
- Bradlow, J. 1990.** Chilling sensitivity of photosynthetic oil-seedlings. I. Cotton and sunflower. *Journal of Experimental Botany*. 41. 1585-1593.
- Bravo, L. A., Gallardo, J., Navarrete, A., Olave, N., Martinez, J., Alberdi, M., Close, T. J., Corcuera, L. J. 2003.** Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiologia Plantarum*. 118. 262-269.

- Bravo, L. A., Saavedra-Mella, F. A., Vera, F., Guerra, A., Caviers, L. A., Ivanov, A. G., Huner, N. P. A., Corcuera, L. J. 2007.** Effect of cold acclimation on the photosynthesis performance of two ecotypes of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Journal of Experimental Botany*. 58. 3581-3590.
- Brouder, S. M., Volenec, J. J. 2008.** Impact of climate change on crop nutrient and water use efficiencies. *Physiologia Plantarum*. 133. 705-724.
- Bunce, J. A. 2007.** Low carbon dioxide concentrations can reverse stomatal closure during water stress. *Physiologia Plantarum*. 130. 552-559.
- Cadic, E., Coque, M., Vear, F., Grezes-Besset, B., Paquet, J., Piquemal, J., Lippi, Y., Blanchard, P., Romestant, M., Pouilly, N., Rengel, D., Langlade, N., Mangin, B., Vincourt, P. 2013.** Combined linkage and association mapping of flowering time in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 126. 1337-1356.
- Campos, P. S., Quartin, V., Ramalho, J. C., Nunes, M. A. 2003.** Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology*. 160. 283-292.
- Cao, X.-T., Wang, X.-W., Cao, M. J., Yu, H.-Q. 2011.** Comparison of gas exchange and chlorophyll fluorescence of low-potassium-tolerant and -sensitive soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars under low-potassium condition. *Photosynthetica*. 49. 633-636.
- Carpenter, J. F., Crowe, J. H. 1988.** The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology*. 25. 244-255.
- Chauhan, S., Srivalli, S., Nautiyal, A. R., Khanna-Chopra, R. 2009.** Wheat cultivars differing in heat tolerance show a differential response to monocarpic senescence under high-temperature stress and involvement of serine proteases. *Photosynthetica*. 47. 536-547.
- Chaves, M. M. 1991.** Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*. 42. 1-16.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., Pereira, J. S. 2003.** Understanding plant responses to drought - from genes to whole plant. *Functional Plant Biology*. 30. 239-265.
- Chen, T. H. H., Burke, M. L., Gusta, L. V. 1995.** Freezing tolerance in plants: an overview. In: Lee, R. E., Jr., Warren, G. J., Gusta, L. V. (eds.). *Biological ice nucleation and its applications*. APS Press, St. Paul, MN. p. 115-135.
- Cirilo, A. G., Andrade, F. H. 1994.** Sowing date and maize productivity. II. Kernel number determination. *Crop Science*. 34. 1044-1046.

- Clements, F. E, Martin, E. V. 1934.** Effect of soil temperature on transpiration in *Helianthus annuus*. *Plant Physiology*. 9. 619-630.
- Collins, N. C., Tardieu, F., Tuberosa, R. 2008.** Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: Where do we stand? *Plant Physiology*. 147. 469-486.
- Collins, R. P., Helgadottir, A., Fothergill, M., Rhodes, I. 2002.** Variation amongst survivor populations of white clover collected from sites across Europe: Growth attributes and physiological responses to low temperature. *Annals of Botany*. 89. 283-292.
- Come, D. 1992.** Les végétaux et le froid. Hermann, Éditeurs des Sciences et des Arts. Paris. p. 599.
- Condon, A. G., Richards, R. A., Rebetzke, G. J., Farquhar, G. D. 2004.** Breeding for high water-use efficiency. *Journal of Experimental Botany*. 55. 2447-2460.
- Conroy, J. P., Seneweera, A. S., Basra, G., Rogers, G., Nissen-Wooller, B. 1994.** Influence of rising atmospheric CO₂ concentrations and temperature on growth, yield and grain quality of cereal crops. *Australian Journal of Plant Physiology*. 21. 741-758.
- Coopman, R. E., Jara, J. C., Escobar, R., Corcuera, L. J., Bravo, L. A. 2010.** Genotypic variation in morphology and freezing resistance of *Eucalyptus globulus* seedlings subjected to drought hardening in nursery. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13. 5-6.
- Cornic, G., Ghashghaie, J. 1991.** Effect of temperature on net CO₂ assimilation and photosystem II quantum yield of electron transfer of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves during drought stress. *Planta*. 185. 255-260.
- Čaňová, I., Ďurkovič, J., Hladká, D., Lukáčik, I. 2012.** Changes in stomatal characteristic and photochemical efficiency during leaf development in six species of *Sorbus*. *Photosynthetica*. 50. 635-640.
- Davies, W. J., Rodriguez, J. L., Fiscus, E. L. 1982.** Stomatal behaviour and water-movement through roots of wheat plants treated with abscisic acid. *Plant, Cell and Environment*. 5. 485-493.
- Davis, S. D., Sperry, J. S., Hacke, U. G. 1999.** The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. *American Journal of Botany*. 86. 1367-1372.
- Debaeke, P., Nolot, J. M., Batallion, O., Raffailac, D. 2000.** Evaluation of technical producers for durum wheat in south-western France. *Options Méditerranéennes serie A, Séminaires Méditerranéens*. 40. 587-590.

- de Carvalho, M., Basch, G., Azevedo, A. L., Machado, L. 1991.** Efeitos de datas e densidades de sementeira an cultura do girassol, em solos de Barro Preto (Bp.). *Agronomia Lusitana*. 45. 137-158.
- de la Vega, A. J., Hall, A. J. 2002a.** Effects of planting date, genotype and their interaction on sunflower yield. II. Components of oil yield. *Crop Science*. 42. 1202-1210.
- de la Vega, A. J., Hall, A. J. 2002b.** Effects of planting date, genotype and their interaction on sunflower yield. I. Determination of oil-corrected grain yield. *Crop Science*. 42. 1191-1201.
- de Lucia, E. H., Day, T. A. Óquist, G. 1991.** The potential for photoinhibition of *Pinus sylvestris* L. seedlings exposed to high light and low soil temperature. *Journal of Experimental Botany*. 42. 611-617.
- Demning, B., Björkman, O. 1987.** Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77 K) and photon yield of CO₂ evolution on leaves of higher plants. *Planta*. 171. 171-184.
- Dragan, Š. 2009.** Sunflower breeding for resistance to abiotic stresses. *Helia*. 32. 1-15.
- Drake, B. G., Salisbury, F. B. 1972.** Aftereffect of low and high temperature pretreatment on leaf resistance, transpiration and leaf temperature in *Xanthium*. *Plant Physiology*. 50. 572-575.
- Duman, J. G., Olsen, T. M. 1993.** Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants. *Cryobiology*. 30. 322-328.
- Dumlao, M. R., Darehshouri, A., Cohu, C. M., Muller, O., Mathisa, J., Adams III., W. W., Demmig-Adams, B. 2012.** Low temperature acclimation of photosynthetic capacity and leaf morphology in the context of phloem loading type. *Photosynthesis Research*. 113. 181-189.
- El Midaoui, M., Serieys, H., Griveau, Y., Benbella, M. 2003.** *Helianthus annuus*, *H. argophyllus*, *H. debilis*. *Helia*. 38: 1-16.
- Elzebroek, T., Wind, K. 2008.** Guide to cultivated plants. Kyodo Press. Singapore. p. 540.
- Farquhar, G. D., von Caemmerer, S., Berry, J. A. 1980.** A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*. 149. 78-90.
- Farquhar, G. D., Sharkey, T. D. 1982.** Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*. 33. 317-345.

- Faure, N., Serieys, H., Cazaux, E., Kaan, F., Bervillé, A. 2002.** Partial hybridization in wide crosses between cultivated sunflower and the perennial *Helianthus* species *H. mollis* and *H. orgyalis*. *Annals of Botany*. 89. 31-39.
- Feng, Y.-L., Cao, K.-F. 2005.** Photosynthesis and photoinhibition after night chilling in seedlings of two tropical trees species grown under three irradiances. *Photosynthetica*. 43. 567-574.
- Fernandez, P., di Rienzo, J., Fernandez, L., Hopp, H. E., Paniego, N., Heinz, R. A. 2008.** Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis. *BMC Plant Biology*. 8. 1-18.
- Flexas, J., Badger, M., Chow, W. S., Medrano, H., Osmond, C. B. 1999.** Analysis of the relative increase in photosynthetic O₂ uptake when photosynthesis in grapevine leaves is inhibited following low night temperatures and/or water stress. *Plant Physiology*. 121. 675-684.
- Foyer, C. H., Vanacker, H., Gomez, L. D., Harbinson, J. 2002.** Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40. 659-668.
- Fracheboud, Y., Haldimann, P., Leipner, J., Stamp, P. 1999.** Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*. 50. 1533-1540.
- Fracheboud, Y., Jompuk, C., Ribaut, J. M., Stamp, P., Leipner, J. 2004.** Genetic analysis of cold-tolerance of photosynthesis in maize. *Plant Molecular Biology*. 56. 241-253.
- Gabriel, C. 2000.** Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture-not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*. 5. 187-188.
- Garstka, M., Drozak, A., Rosiak, M., Venema, J. H., Kierdaszuk, B., Simeonova, E., van Hasselt, P. R., Dobrucki, J., Mostowska, A. 2005.** Light-dependent reversal of dark-chilling induces changes in chloroplast structure and arrangement of chlorophyll-protein complexes in bean thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1710. 13-23.
- Garstka, M., Venema, J. H., Rumak, I., Gieczewska, K., Rosiak, M., Oziol-Lipinska, J., Kierdaszuk, B., Vredenberg, W. J., Mostowka, A. 2007.** Contrasting effect of dark-chilling on chloroplast structure and arrangement of chlorophyll-protein complexes in pea and tomato: plants with a different susceptibility to non-freezing temperature. *Planta*. 226: 1165-1181.
- 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 Regulation*. 37. 263-285.

- Gimeno, V., Fernandez-Martinez, J. M., Ferreres, E. 1989.** Winter planting as a mean of drought escape in sunflower. *Field Crops Research*. 22. 307-316.
- Gombos, Z., Wada, H., Murata, N. 1994.** The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: A mechanism of chilling tolerance. *Plant Biology*. 91. 8787-8791.
- Gonzalez, B., Boucaud, J., Salette, J., Langois, J. 1990.** Fructan and cryoprotection in ryegrass (*Lolium perenne* L.). *New Phytologist*. 115. 319-323.
- Gosset, H., Vear, F. 1995.** Comparison of yields of sunflowers in Morocco sown in autumn and spring. *Al-Awamia*. 88. 5-20.
- Greer, D. H., Hardacre, A. K. 1989.** Photoinhibition of photosynthesis and its recovery in two maize hybrids varying in low temperature tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology*. 16. 189-198.
- Grieu P., Maury, P., Debaeke, P., Sarrafi, A. 2008a.** Ecophysiological and genetical studies to improve drought tolerance of sunflower genotypes. In: **Hejnák, V., Skalický, M. (eds.)**. Proceedings of the I. Prague Plant Scientific Workshop, Prague. p. 10-16.
- Grieu, P., Maury, P., Debaeke, P., Sarrafi, A. 2008b.** Améliorer la tolérance à la sécheresse du tournesol: apports de l'écophysiologie et de la génétique. *Innovations Agronomiques*. 2. 37-51.
- Griffith, M., Lumb, C., Wiseman, S. B., Johnson, R. W., Wisniewski, M., Loewen, M. C. 2003.** Winter rye antifreeze proteins are not cryoprotective rather they modify the growth of ice in plants. *Acta Horticulturae*. 618. 31-37.
- Griffith, M., Yaish, M. W. F. 2004.** Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities. *Trends in Plant Science*. 9. 399-405.
- Guinchard, M. P., Robin, C., Grieu, P., Guckert, A. 1997.** Cold acclimation in white clover subjected to chilling and frost: Changes in water and carbohydrates status. *European Journal of Agronomy*. 6. 225-233.
- Guo, R. Q., Ruan, H., Yang, W. J., Liu, B., Sun, S. C. 2011.** Differential responses of leaf water-use efficiency and photosynthetic nitrogen-use efficiency to fertilization in Bt-introduced and conventional rice lines. *Photosynthetica*. 49. 507-514.
- Gusta, L. W., Wisniewski, M. 2012.** Frost tolerance in plants. In: **Shabala, S. (ed.)**. Plant stress physiology. CAB International, USA. p. 132-147.

- Gusta, L. V., Wisniewski, M. E., Trischuk, R. G. 2009.** Patterns of freezing in plants: the influence of species, environment and experiential procedures. In: **Gusta, L., Wisniewski, M., Tanino, K. (eds.)**. Plant cold hardiness: From the laboratory to the field. CABI International, Oxford, UK. p. 214-225.
- Haddadi, P., Yazdi-Samadi, B., Berger, M., Naghavi, M. R., Calmon, A., Sarrafi, A. 2011.** Genetic variability of seed-quality traits in gamma-induced mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under water-stressed condition. *Euphytica*. 178. 247-259.
- Hale, M. G., Orcutt, D. M. 1987.** The physiology of plants under stress. John Wiley and Sons, Inc. Toronto. p. 206.
- Haldimann, P., Fracheboud, Y., Stamp, P. 1995.** Carotenoid composition in *Zea mays* developed at sub-optimal temperature and different light intensities. *Physiologia Plantarum*. 95. 409-414.
- Hallgren, J., Öquist, G.** Adaptation to low temperature. In: **Alscher, R. G., Cumming, J. R. (eds.)**. 1990. Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms. Wiley Liss. New York. p. 407.
- Hare, P. D., Cress, W. A. 1997.** Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*. 21. 79-102.
- Hekneby, M., Antolín, M. C., Sánchez-Díaz, M. 2006.** Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environmental and Experimental Botany*. 55. 305-314.
- Hewezi, T., Léger, M., El Kayal, W., Gentzbittel, L. 2006.** Transcriptional profiling of sunflower plants growing under low temperatures reveals an extensive down-regulation of gene expression associated with chilling sensitivity. *Journal of Experimental Botany*. 57. 3109-3122.
- Hezký, P. 2008.** Současnost slunečnice u nás i ve světě. *Farmář*. 13. 14-16.
- Hikosaka, K., Ishikawa, K., Borjigidai, A., Muller, O., Onda, Y. 2006.** Temperature acclimation of photosynthesis: Mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. *Journal of Experimental Botany*. 57. 291-302.
- Honour, S. J., Webb, A. A. R., Mansfield, T. A. 1995.** The response of stomata to abscisic acid and temperature are interrelated. In: **Hassell, P. M. (ed.)**. Proceedings of the Royal Society of Biological Sciences. 259. 301-306.
- Hopkins, W. G., Hüner, N. P. A. 2004.** Introduction to plant physiology - 3rd edition. John Wiley and Sons, Inc. New Jersey. p. 560.

- Hovenden M. J., Warren, C. R. 1998.** Photochemistry, energy dissipation and cold-hardening in *Eucalyptus nitens* and *E. pauciflora*. Australian Journal of Plant Physiology. 25. 581-589.
- Hu, W. Z., Zhou, Y. H., Du, Y. S., Xia, X. J., Yu, J. Q. 2006.** Differential response of photosynthesis in greenhouse and field ecotypes of tomato to long-term chilling under low light. Journal of Plant Physiology. 163. 1238-1246.
- Hüner, N. P. A., Öquist, G., Hurry, V. M., Krol, M., Falk, S., Griffith, M. 1993.** Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. Photosynthesis Research. 37. 19-39.
- Huseynova, I. M., Suleymanov, S. Y., aliyev, J. A. 2007.** Structural-functional state of thylakoid membranes of wheat genotypes under water stress. Biochimica et Biophysica Acta. 1767. 869-875.
- Ilan, N., Moran, N., Schwartz, A. 1995.** The role of potassium channels in temperature control of stomata aperture. Plant Physiology. 108. 1161-1170.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R., Panneerselvam, R. 2009.** Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. International Journal of Agriculture and Biology. 11. 100-105.
- Jarvis, A. J., Mansfield, T. A., Davies, W. J. 1999.** Stomatal behaviour, photosynthesis and transpiration under rising CO₂. Plant, Cell and Environment. 22. 639-648.
- José, F. C. B., de Carvalho, M., Basch, G. 2004.** Response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to sowing date and plant density under Mediterranean conditions. European Journal of Agronomy. 21. 347-356.
- Kalberer, S. R., Leyva-Estrada, N., Krebs, S. L., Arora, R. 2007.** Frost dehardening and rehardening of floral buds of deciduous azaleas are influenced by genotypic biogeography. Environmental and Experimental Botany. 59. 264-275.
- Kaleem, S., Ul-Fayyaz, H., Saleem, A. 2009.** Influence of environmental variations on physiological attributes of sunflower. African Journal of Biotechnology. 8: 3531-3539.
- Kaleem, S., Ul-Hassan, F., Farooq, M., Rasheed, M., Munir, A. 2010.** Physio-morphic traits as influenced by seasonal variation in sunflower: A review. International Journal of Agriculture and Biology. 12. 468-473.
- Kanemura, T., Homma, K., Ohsumi, A., Narisu Horie, T., Shirawia, T., Ebana, K., Uga, Y., Kojima, Y., Fukuoka, S. 2005.** Analysis of genetic variability in yield-related traits of rice using global core collection. II. Leaf photosynthetic rate and associated factors. Japanese Journal of Crop Science. 74. 238-239.

Karimzadeh, G., Darvishzadeh, R., Jalali-Javaran, M., Dehghani, H. 2005. Cold-induced accumulation of protein in the leaves of spring and winter barley cultivars. *Acta Biologica Hungarica*. 56. 83-96.

Kingston-Smith, A. H., Harbinson, J., Williams, J., Foyer, C. H. 1997. Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves. *Plant Physiology*. 114. 1039-1046.

Kingston-Smith, A. H., Foyer, C. H. 2000. Bundle sheath proteins are more sensitive to oxidative damage than those of the mesophyll in maize leaves exposed to paraquat or low temperatures. *Journal of Experimental Botany*. 51. 123-130.

Kirschner, J., Šída, O. 2004. *Helianthus* L. In: Slavík, B., Štěpánková, J. (eds.). Květena České republiky - 7. díl. Academia. Praha. s. 322-331.

Kishitani, S., Tsunoda, S. 1974. Effect of low and high temperature pretreatment on leaf photosynthesis and transpiration in cultivars of *Oryza sativa*. *Photosynthetica*. 8. 161-167.

Kobza, J., Edwards, G. E. 1987. Influences of leaf temperature on photosynthetic carbon metabolism in wheat. *Plant Physiology*. 83. 69-74.

Kodama, H., Horiguchi, G., Nishiuchi, T., Nishimura, M., Iba, K. 1995. Fatty-acid desaturase during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves. *Plant Physiology*. 107. 1177-1185.

Kościelniak, J., Markowski, A., Skrudlik, G., Filek, M. 1996. Effects of some periods on variable daily exposure to temperatures of 5 and 20 °C on photosynthesis and water relations in maize seedlings. *Photosynthetica*. 32. 53-61.

Kosmala, A., Bocian, A., Rapasz, M., Jurczyk, B., Zwierzkowski, Z. 2009. Identification of leaf proteins differentially accumulated during cold acclimation between *Festuca pratensis* plants with distinct level of frost tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 60. 3595-3609.

Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T. 2007. The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum*. 51. 601-617.

Kováčik, A. 2007. Dvacet let pěstování slunečnice v ČR. *Úroda*. 55. 19-20.

Koyro, H. W. 2006. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). *Environmental and Experimental Botany*. 56. 136-146.

Kozłowski, T. T. 1943. Transpiration rates of some forest trees species during the dormant season. *Plant Physiology*. 18. 252-260.

- Kramer, P. J. 1940.** Root resistance as a cause of decreased water absorption by plants at low temperatures. *Plant Physiology*. 15. 63-79.
- Kratsch, H. A., Wise, R. R. 2000.** The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell and Environment*. 23. 337-350.
- Kuroda, E., Kumura, A. 1990.** Difference in single leaf photosynthesis between old and new rice varieties. I. Single-leaf photosynthesis and its dependence on stomatal conductance. *Japanese Journal of Crop Science*. 59. 283-292.
- Labrousse, P., Arnaud, M. C., Serieys, H., Bervillé, A., Thalouarn, P. 2001.** Several mechanisms are involved in resistance of *Helianthus* to *Orobanche cumana* Wallr. *Annals of Botany*. 88. 859-868.
- Larcher, W. 1987.** Stress bei Pflanzen. *Naturwissenschaften*. 74. 158-167.
- Larcher, W. 1995.** *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag. New York. p. 513.
- Lascano, H. R., Casano, L. M., Melchiorre, M. N., Trippi, V. S. 2001.** Biochemical and molecular characterization of wheat chloroplastic glutathione reductase. *Biologia Plantarum*. 44. 509-516.
- Lawson, T., Craigon, J., Tulloch, A.-M., Black, C. R., Colls, J. J., Landon, G. 2001.** Photosynthetic responses to elevated CO₂ and CO₃ in field-grown potato (*Solanum tuberosum*). *Journal of Plant Physiology*. 158. 309-323.
- Lee, T. M., Lur, H. S., Chu, C. 1993.** Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. I. Endogenous abscisic acid levels. *Plant, Cell and Environment*. 16. 481-490.
- Leipner, J., Fracheboud, Y., Stamp, P. 1997.** Acclimation by suboptimal growth temperature diminishes photooxidative damage in maize leaves. *Plant, Cell and Environment*. 20. 366-372.
- Levitt, J. 1980.** Responses of plants to environmental stress. Academic Press. New York. p. 507.
- Levitt, J. 1982.** Stress terminology. In: **Turner, N. C. and Kramer, P. J. (eds.)**. Adaptation of plants to water and high temperature stress. Wiley-Interscience. New York. p. 437-479.
- Liang, H.-Z., Dou, D.-Q., Feng, Y.-L. 2004.** Diurnal changes in photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters of *Amomum villosum* Lour. grown under tropical rainforest in rainy and foggy and cool seasons at Xishuangbanna. *Acta Ecologica Sinica*. 24. 1421-1429.

- Liang, Y., Chen, H., Tang, M.-J., Yang, P.-F., Shen, S.-H. 2007.** Responses of *Jatropha curcas* seedlings to cold stress: Photosynthetic-related proteins and chlorophyll fluorescence characteristics. *Physiologia Plantarum*. 131. 508-517.
- Lidon, F. C., Loureiro, A. S., Vieira, D. E., Bihó, E. A., Nobre, P., Costa, R. 2001.** Photoinhibition in chilling stressed wheat and maize. *Photosynthetica*. 39. 161-166.
- Liu, J., Shi, D.-C. 2010.** Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, inorganic ion and organic acid accumulations of sunflower in responses to salt and salt-alkaline mixed stress. *Photosynthetica*. 48. 127-134.
- Liu, M.-Z., Osborne, C. P. 2008.** Leaf cold acclimation and freezing injury in C3 and C4 grasses of the Mongolina Plateau. *Journal of Experimental Botany*. 59. 4161-4170.
- Long, S. P., East, T. M., Baker, N. R. 1983.** Chilling damage to photosynthesis in young *Zea mays* L. Effect of light and temperature variation on photosynthetic CO₂ assimilation. *Journal of Experimental Botany*. 34. 177-188.
- Ma, C. C., Gao, Y. B., Guo, H. Y., Wang, J. L. 2004.** Photosynthesis, transpiration, and water use efficiency of *Caragana microphylla*, *C. intermedia* and *C. korshinskii*. *Photosynthetica*. 42. 65-70.
- Mahajan, S., Tuteja, N. 2005.** Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 444. 139-158.
- Málek, B. 2007a.** Světový vývoj a produkce slunečnice v roce 2007. *Úroda*. 55. 25-27.
- Málek, B. 2007b.** Slunečnice v České republice. *Úroda*. 55. 28-29.
- Málek, B. 2007c.** O úspěchu pěstování slunečnice rozhoduje jaro. *Květy olejin*. 12. 6-7.
- Málek, B., Povolný, M., Richter, R., Hřivna, L., Jursík, M., Holec, J., Kohout, V., Bartoška, J., Hruža, M., Kazda, J., Říha K. 2005.** Metodika pěstování slunečnice. SPZO s.r.o, Praha. 65 s.
- Man, R., Lieffers, V. J. 1997.** Seasonal photosynthetic responses to light and temperature in white spruce (*Picea glauca*) seedlings planted under an aspen (*Populus tremuloides*) canopy and in the open. *Tree Physiology*. 17. 437-444.
- Manetas, Y., Buschmann, C. 2011.** The interplay of anthocyanin biosynthesis and chlorophyll catabolism in senescing leaves and the question of photosystem II photoprotection. *Photosynthetica*. 49. 515-522.
- Maqbool, A., Shafiq, S., Lake, L. 2010.** Radiant frost tolerance in pulse crops - a review. *Euphytica*. 172. 1-12.

- Markhart, A. H., Fiscus, E. L., Naylor, A. W., Kramer, P. J. 1979.** Effect of temperature on water and ion transport in soybean and broccoli systems. *Plant Physiology*. 64. 83-87.
- Marocco, A., Lorenzoni, C., Fracheboud, Y. 2005.** Chilling stress in maize. *Maydica*. 50. 571-580.
- Martin, B., Ort, D. R., Boyer, J. S. 1981.** Impairment of photosynthesis by chilling temperatures in tomato. *Plant Physiology*. 68. 329-334.
- Martino-Catt, S., Ort, D. R. 1992.** Low temperature interrupts circadian regulation of transcriptional activity in chilling-sensitive plants. In: **Bogorad, L. (ed.)**. Proceedings of the National Academy of Science USA. 89. 3731-3735.
- Masarovičová, E., Repčák, M., Erdelský, K., Gašparíková, O., Ješko, T., Mistrík, I. 2002.** Fyziológia rastlín. Univerzita Komenského. Bratislava. 303 s.
- McConn, M., Browse, J. 1996.** The critical requirement for linolenic acid is pollen development, net photosynthesis, in an arabidopsis mutant. *The Plant Cell*. 8. 403-416.
- McCully, M. E., Canny, M. J., Huang, C. X. 2004.** The management of extracellular ice by petioles of frost-resistant herbaceous plants. *Annals of Botany*. 94. 665-674.
- McDowell, N. G., White, S., Pockman, W. T. 2008.** Transpiration and stomatal conductance across a steep climate gradient in the southern Rocky Mountains. *Ecophysiology*. 1. 193-204.
- McKersie, B. D., Bowley, S. R., Jones, K. S. 1999.** Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiology*. 119. 839-847.
- Meidner, H., Mansfield, T. A. 1968.** Physiology of stomata. McGraw-Hill. New York. p. 179.
- Mellander, P. E., Bishop, K., Lundmark, T. 2004.** The influence of soil temperature on transpiration: A plot scale manipulation in young Scot pine stand. *Forest Ecology and Management*. 195. 15-28.
- Mercer, K. L., Alexander, H. M., Snow, A. A. 2011.** Selection on seedling emergence timing and size in an annual plant, *Helianthus annuus* (common sunflower, *Asteraceae*). *American Journal of Botany*. 98. 975-985.
- Miller, B. L., Huffaker, R. C. 1982.** Hydrolysis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by endoproteinases from senescing barley leaves. *Plant Physiology*. 69. 58-62.

- Mirshekari, M., Hosseini, N. M., Amiri, R., Zandvakili, O. R. 2012.** Study the effects of planting date and low irrigation stress on quantitative traits of spring sunflower (*Helianthus annuus* L). Romanian Agricultural Research. 29. 189-199.
- Mittler, R. 2006.** Abiotic stress, the field environment and stress combination. Trends in Plant Science. 11. 15-19.
- Mokotedi, M. E. O. 2010.** Physiological responses of *Eucalyptus nitens* x *nitens* under experimentally imposed water stress. Southern Forests. 72. 63-68.
- Moon, B. Y., Higashi, S.-I., Gombos, Z., Murata, N. 1995.** Unsaturation of membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. Plant biology. 92. 6219-6223.
- Mottl, V. 2008.** Slunečnice, hořčice, mák setý, sója luštinatá, len olejný. Agro. 9. 7-12.
- Murphy, C., Wilson, J. M. 1981.** Ultrastructural features of chilling-injury in *Episcia reptans*. Plant, Cell and Environment. 4. 261-265.
- Musser, R. L., Thomas, S. A., Wise, R. R., Peeler, T. C. 1984.** Chloroplast ultrastructure, chlorophyll fluorescence and pigment composition in chilling-stressed soybeans. Plant Physiology. 74. 749-754.
- Nakashima, T., Araki, T., Ueno, O. 2011.** Photoprotective function of betacyanin in leaves of *Amaranthus cruentus* L. under water stress. Photosynthetica. 49. 497-506.
- Navarrete-Campos, D., Bravo, L. A., Rubilar, R. A., Emhart, V., Sanhueza, R. 2012.** Drought effect on water use efficiency, freezing tolerance and survival of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus globulus* x *nitens* cuttings. New Forests. 44. 119-134.
- Neufeld, H. S., Chappelka, A. H., Somers, G. L., Burkey, K. O. A., Davison, W., Finkelstein, P. L. 2006.** Visible foliar injury caused by ozone alters the relationship between SPAD meter readings and chlorophyll concentration in cutleaf coneflower. Photosynthesis Research. 87. 281-286.
- Nie, G. Y., Long, S. P., Baker, N. R. 1992.** The effect of development at sub-optimal growth temperatures on photosynthetic capacity and susceptibility to chilling-dependent photoinhibition in *Zea mays*. Physiologia Plantarum. 85. 554-560.
- Nilsen, E., Orcutt, D. M. 1996.** The physiology of plants under stress - Abiotic factors. John Wiley and Sons, Inc. New York. p. 689.
- Nippert, J. B., Duursma, R. A., Marshall, J. D. 2004.** Seasonal variation in photosynthetic capacity of montane conifers. Functional Ecology. 18. 876-886.

- Nybom, N. 1955.** The pigment characteristics of chlorophyll mutations of barley. *Hereditas*. 41. 483-498.
- Ohsumi, A., Kanemura, T., Homma, K., Horie, T., Shiraiwa, T. 2007.** Genotypic variation of stomatal conductance in relation to stomatal density and length in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science*. 10. 322-328.
- Óquist, G., Hurry, V. M., Hüner, N. P. A. 1993.** Low temperature effect on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye. *Physiologia Plantarum*. 101. 245-250.
- Orcutt, D. M., Nilsen, E. 2000.** The physiology of plants under stress - Soil and biotic factors. John Wiley and Sons, Inc. New York. p. 687.
- Orgaz F., Gimenez C., Fereres, E. 1990.** Efficiency of water use in winter plantings of sunflower in a Mediterranean climate. In: **Scaife, A. (ed.)**. Proceedings of the First Congress of the European Society of Agronomy. Paris. p. 13-14.
- Osmond, C. B., Austin, M. P., Berry, J. A., Billings, W. D., Boyer, S., Dacey, J. W. H. 1987.** Stress physiology and the distribution of plants. *Bioscience*. 37. 38-48.
- Ottander, C., Campbell, D., Óquist, G. 1995.** Seasonal changes in photosystem II organisation and pigment composition in *Pinus sylvestris*. *Planta*. 197. 176-183.
- Pardossi, A., Vernieri, P., Tognoni, F. 1992.** The involvement of ABA in ameliorating plant water status of *Phaseolus vulgaris* during chilling. *Plant Physiology*. 100. 1243-1250.
- Pasda, G., Diepenbrock, W. 1991.** The physiological yield analysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.). 2. Climatic factors. *Fat Science Technology*. 93. 155-168.
- Pasternak, D., Wilson, G. L. 1972.** After-effects of night temperatures on stomatal behaviour and photosynthesis of *Sorghum*. *New Phytologist*. 71. 683-689.
- Pearce, R. S., Fuller, M. P. 2001.** Freezing of barley studied by infrared video thermography. *Plant Physiology*. 125. 227-240.
- Pell, E. J., Eckardt, N. A., Glick, R. E. 1994.** Biochemical and molecular-basis for impairment of photosynthetic potential. *Photosynthesis Research*. 39. 453-462.
- Peoples, T. R., Koch, D. W. 1978.** Physiological response of three alfalfa cultivars to one chilling night. *Crop Science*. 18. 255-258.
- Piper, F. I., Corcuera, L. J., Alberdi, M., Lusk, C. 2007.** Differential photosynthetic and survival responses to soil drought in two evergreen Nothofagus species. *Annals of Forest Science*. 64. 447-452.

Poláková, L. Slunečnici se daří i na Berounsku [on-line]. Agroweb. 3. srpna 2007 [cit. 2008-12-20]. Dostupné z:

http://www.agroweb.cz/rostlinna-vyroba/Slunecnici-se-dari-i-na-Berounsku_s44x28572.html

Porter, J. R. 2005. Rising temperatures are likely to reduce crop yields. *Nature*. 436. 174-174.

Potměšilová, J. Slunečnice se stabilní osevní plochou [on-line]. Agroweb. 11. ledna 2013 [cit. 2013-04-03]. Dostupné z:

http://www.agroweb.cz/Slunecnice-se-stabilni-osevni-plochou_s1719x62612.html

Potměšilová, J., Adamec, J. 2009. Situační a výhledová zpráva - olejniny. Ministerstvo zemědělství, Praha. 41 s.

Prášil, I. T., Prášilová, P., Mařík, P. 2007. Comparative study of direct and indirect evaluations of frost tolerance in barley. *Field Crops Research*. 102. 1-8.

Prášil, I. T., Kosová, K., Vítámvás, P., Prášilová, P., Zelenková. 2010. Současné možnosti zvyšování odolnosti plodin vůči stresu mrazu a chladu. In: **Bláha, L., Hnilička, F., Martinková, J. (eds.)**. Současné možnosti fyziologie a zemědělského výzkumu příspěvek k produkci rostlin (vybrané kapitoly). VÚRV, v.v.i. a ČZU v Praze. Praha. s. 69-83.

Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J., Gloser, J., Havel, L., Nátr, L., Prášil, I., Sladký, Z., Šantrůček, J., Tesařová, M., Vyskot, B. 1998. Fyziologie rostlin. Academia. Praha. 484 s.

Qadir, G., Hassan, F. U., Malik, M. A. 2007. Growing degree days and yield relationship in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *International Journal of Agriculture and Biology*. 9. 564-568.

Qin, J., Dong, W. Y., He, K. N., Chen, J., Liu, J., Wang, Z. L. 2010. Physiological responses to salinity in Silver buffaloberry (*Shepherdia argentea*) introduced to Qinghai high-cold and saline area, China. *Photosynthetica*. 48. 51-58.

Radwan, U. A., Springuel, I., Biswas, P. K., Huluka, G. 2000. The effect of salinity on water use efficiency of *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. *Egyptian Journal of Biology*. 2. 1-7.

Rapacz, M. 2007. Chlorophyll and fluorescence transient during freezing and recovery in winter wheat. *Photosynthetica*. 45. 409-418.

Reddy, G. K. M., Dangi, K. S., Kumar, S. S., Reddy, A. V. 2003. Effect of moisture stress on seed yield and quality in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Journal of Oilseeds Research*. 20. 282-283.

- Rizhsky, L., Liang, H. J., Mittler, R. 2002.** The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology*. 130. 1143-1151.
- Robakowski, P., Wyk, T. 2009.** Winter photoinhibition in needles of *Taxus baccata* seedlings acclimated to different light levels. *Photosynthetica*. 47. 527-535.
- Robertson, E. J., Baker, N. R., Leech, M. 1993.** Chloroplast thylakoid protein changes induced by low growth temperature in maize revealed by immunocytology. *Plant, Cell and Environment*. 16. 809-818.
- Rosnes, K., Juntilla, O., Ernstsén, A., Sandli, N. 1993.** Development of cold tolerance in white clover (*Trifolium repens* L.) in relation to carbohydrate and free amino acid content. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil and Plant Science*. 43. 151-155.
- Routaboul, J. M., Fischer, S. F., Browse, J. 2000.** Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. *Plant Physiology*. 124. 1697-1705.
- Ruiz-Sanchez, M. C., García, J. L., Antolín, M. C., Auras, J. L. 2007.** Effect of soil drought and atmospheric humidity on yield, gas exchange and stable isotope composition of barley. *Photosynthetica*. 40. 415-421.
- Sadras, V. O., Villalobos, F. J., Fereres, E., Wolfe, D. W. 1993.** Leaf responses to soil-water deficits - comparative sensitivity of leaf expansion rate and leaf conductance in field-grown sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant and Soil*. 153. 189-194.
- Santos, C. M. A., Ribeiro, R. V., Magalhães Filho, J. R., Machado, D. F. S. P., Machado, E. C. 2011.** Low substrate temperature imposes higher limitation to photosynthesis of orange plants as compared to atmospheric chilling. *Photosynthetica*. 49: 546-554.
- Scott, P. 2008.** *Physiology and behaviour*. John Wiley and Sons, Inc. New York. p. 305.
- Sharma, S. S., Dietz, K. J. 2006.** The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*. 57. 711-726.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., Mittler, R. 2008.** Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*. 132. 199-208.
- Shvaleva, A. L., Silva, F. C. E., Breia, E., Jouve, J., Hausman, J. F., Almeida, M. H., Maroco, J. P., Rodrigues, M. L., Pereira, J. S., Chaves, M. M. 2006.** Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. *Tree Physiology*. 26. 239-248.

Sojka, R. E., Arnold, F. B., Morrison III., W. H., Busscher, W. J. 1989. Effect of early and late planting on sunflower performance in the southeastern United States. *Applied Agricultural Research*. 4. 37-46.

Sokhansaj, A., Sadat Noori, S. A., Niknam, V. 2006. Comparison of bacterial and plant genes participating in proline biosynthesis with osmotin gene, with respect to enhancing salinity tolerance of transgenic tobacco plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 53. 110-115.

Sonoike, K. 1999. The different roles of chilling temperatures in the photoinhibition of photosystem I and photosystem II. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 48. 136-141.

Soriano, M. A., Orgaz, F., Villalobos, F. J., Fereres, E. 2004. Efficiency of water use of early plantings of sunflower. *European Journal of Agronomy*. 21. 465-476.

Sowiński, P., Rudzińska-Langwald, A., Adamczyk, J., Kubica, I., Fronk, J. 2005. Recovery of maize seedling growth, development and photosynthetic efficiency after initial growth at low temperature. *Journal of Plant Biology*. 162. 67-80.

Steponkus, P. L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 35. 543-584.

Strand, A., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardestrom, P., Stitt, M. 1999. Acclimation of Arabidopsis leaves developing at low temperatures: Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiology*. 119. 1387-1397.

Sultana, N., Ikeda, T., Itoh, R. 1999. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environmental and Experimental Botany*. 42. 211-220.

Sun, X. P., Yan, H. L., Ma, P., Liu, B. H., Zou, Y. J., Liang, D., Ma, F. W., Li, P. M. 2012. Responses of young „Pink lady“ apple to alternate deficit irrigation following long-term drought: Growth, photosynthetic capacity, water-use efficiency and sap flow. *Photosynthetica*. 50. 501-507.

Sunderman, H. D., Sweeny, D. W., Lawless, J. R. 1997. Irrigated sunflower response to planting date in the central high plains. *Journal of Production Agriculture*. 10. 607-612.

Šesták, Z., Čatský, J., Šetlík, J., Nečas, J., Květ, J., Smetánková, M., Slavík, B., Janáč, J., Vozněnský, V. L., Bartoš, J., Avrataščuková, N., Kubín, Š. 1966. Metody studia fotosynthetické produkce rostlin. Academia. Praha. 394 s.

Špaldon, E. 1986. Rostlinná výroba. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 714 s.

Špulák, O., Martincová, J. 2006. Hodnocení změn fluorescence chlorofylu smrku ztepilého na začátku jarní růstové aktivity. In: **Jurásek, A., Novák, J., Slodičák, M. (eds.).** Proceedings of International Scientific Conference - Stabilization of the forest functions in biotopes disturbed by anthropogenic activity under changing ecological conditions. Opočno. s. 425-434.

Taiz, L., Zeiger, E. 2008. Plant physiology: Das original mit übersetzungshilfen. Springer-Verlag, Heidelberg. p. 700.

Tallec, T., Béziat, P., Jarosz, N., Rivalland, V., Ceschia, E. 2013. Crops' water use efficiencies in temperate climate: Comparison of stand, ecosystem and agronomical approaches. *Agricultural and Forest Meteorology*. 168. 69-81.

Taschler, D., Neuner, G. 2004. Summer frost resistance and freezing patterns measured in situ in leaves of major alpine plant growth forms in relation to their upper distribution boundary. *Plant, Cell and Environment*. 27. 737-746.

Tezara, W., Mitchell, V., Driscoll, S., Lawlor, D. W. 2002. Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *Journal of Experimental Botany*. 53. 1781-1791.

Thomas, H., James, A. R. 1993. Freezing tolerance and solute changes in contrasting genotypes of *Lolium perenne* L. acclimated to cold and drought. *Annals of Botany*. 72. 249-254.

Tronsmo, A. M., Kobro, G., Morgenlie, S., Flengrud, R. 1993. Carbohydrate content and glycosidases activities following cold hardening in two grass species. *Physiologia Plantarum*. 88. 689-695.

Uemura, M., Steponkus, P. L. 1994. A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiology*. 120. 479-496.

Uemura, M., Joseph, R. A., Steponkus, P. L. 1995. Cold acclimation of Arabidopsis: Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiology*. 109. 15-30.

Uemura, M., Warren, G., Steponkus, P. L. 2003. Freezing susceptibility in the *sfr4* mutant of Arabidopsis is due to low sugar content and is manifested by loss of osmotic responsiveness. *Plant Physiology*. 131. 1800-1807.

Varès, D., Lacombe, S., Griveau, Y., Bervillé, A., Kaan, F. 2002. Inheritance of oleic acid content of F1 seed in a complete diallel cross between seven sunflower lines. *Helia*. 25. 105-112.

Venclová, B. Není důvod odcházet od slunečnice [on-line]. Agroweb. 18. srpna 2008 [cit.-2008-12-18]. Dostupné z:

http://www.agroweb.cz/Neni-duvod-odchazet-od-slunecnice_s44x31476.html

Venema, J. H., Eekhof, M., Van Hasselt, P. R. 2000. Analysis of low-temperature tolerance of a tomato (*Lycopersicon esculentum*) hybrid with chloroplasts from a more chilling-tolerant *L. hirsutum* accession. *Annals of Botany*. 85. 799-807.

Verlues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J. K. 2005. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*. 45. 523-539.

Véronési, C., Bonnin, E., Benharrat, H., Fer, A., Thalouarn, P. 2005. Are pectinolytic activities of *Orobanche cumana* seedlings related to virulence towards sunflower? *Israel Journal of Plant Sciences*. 53. 19-27.

Vez, A. 1961. Etude du développement du trefle blanc en relation avec les fluctuations de quelques substances organiques. *Bericht der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft*. 71. 118-173.

Vogg, G., Heim, R., Hansen, J., Schaefer, C., Beck, E. 1998. Frost hardening and photosynthetic performance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. I. Seasonal changes in the photosynthetic apparatus and its function. *Planta*. 204. 193-200.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M. R. 2007. High temperature tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*. 61. 199-223.

Wang, W. X., Vincour, B., Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. 218. 1-14.

Wani, S. H., Saini, H. K., Gupta, V., Bhat, M. A., Singh, N. B. 2010. Present status and future prospects for heterosis breeding in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Asian Journal of Science and Technology*. 2. 49-54.

Wanner, L. A., Juntilla, O. 1999. Cold-induced tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 120. 391-399.

Wardlaw, I. F., Wrigley, C. V. 1994. Heat tolerance in temperate cereals - an overview. *Australian Journal of Plant Physiology*. 21. 695-703.

Wei, Y., Xu, X., Tao, H., Wang, P. 2006. Growth performance and physiological response in the halophyte *Lycium barbarum* grown at salt-affected soil. *Annals of Applied Biology*. 149. 263-269.

Weng, X. Y., Xu, H. X., Yang, Y., Peng, H. H. 2008. Water cycle involved in dissipation of excess photon energy in phosphorus deficient rice leaves. *Biologia Plantarum*. 52. 307-313.

Weng, J.-H., Chien, C.-T., Chen, C.-W., Lai, X.-M. 2011. Effects of osmotic- and high-light stresses on PS II efficiency of attached and detached leaves of three tree species adapted to different water regimes. *Photosynthetica*. 49. 555-563.

Wilkinson, S., Clephan, A. L., Davies, W. J. 2001. Rapid low temperature-induced stomatal closure occurs in cold-tolerant *Commelina communis* leaves but not in cold-sensitive tobacco leaves, via a mechanism that involves apoplastic calcium but not abscisic acid. *Plant Physiology*. 126. 1566-1578.

Winner, W. E. 1994. Mechanistic analysis of plant responses to air pollution. *Ecological Applications*. 4. 651-661.

Wise, R. R., Naylor, A. W. 1987. Chilling-enhanced photooxidation. *Plant Physiology*. 83. 272-277.

Wisniewski, M., Fuller, M., Glenn, D. M., Gusta, L., Duman, J., Griffith, M. 2002. Extrinsic ice nucleation in plants: What are the factors involved and can they be manipulated. In: **Li, P. H., Palva, E. T. (eds.)**. *Plant cold hardiness: Gene regulation and genetic engineering*. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York. p. 211-221.

Wolfe, D. W. 1991. Low temperature effects on early vegetative growth, leaf gas exchange and water potential of chilling-sensitive and chilling-tolerant crop species. *Annals of Botany*. 67. 205-212.

Woo, S. Y., Lee, D. K., Lee, D. S. 2004. Air pollution effects on the photosynthesis and chlorophyll contents of street tree in Seoul. *Korean Journal of Agricultural Forestry and Meteorology*. 6. 24-29.

Xin, Z., Browse, J. 2000. Cold comfort farm: The acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell and Environment*. 23. 893-902.

Xiong, L., Schumaker, K. S., Zhu, J.-K. 2002. Cell signalling during cold, drought and salt stress. *The Plant Cell*. 14. 165-183.

Yamori, W., Suzuki, K., Noguchi, K., Nakai, M., Terashima, I. 2006. Effects of Rubisco kinetics and Rubisco activation state on the temperature dependence of the photosynthetic rate in spinach leaves from contrasting growth temperatures. *Plant, Cell and Environment*. 29. 1659-1670.

Zhang, C.-L., Li, Y.-P., Feng, Y.-L., Zheng, Y.-L., Lei, Y.-B. 2009. Roles of phenotypic plasticity and local adaptation in *Eupatorium adenophorum* invasion in different altitudes habitats. *Acta Ecologica Sinica*. 29. 1940-1946.

Zhao, X.-X., Ma, Q.-Q., Liang, C., Fang, Y., Wang, Y.-Q., Wang, W. 2007. Effect of glycinebetaine on function of thylakoid membranes in wheat flag leaves under drought stress. *Biologia Plantarum*. 51. 584-588.

Zheng, Y.-L., Feng, Y.-L., Lei, Y.-B., Yang, C.-Y. 2009. Different photosynthetic responses to night chilling among twelve populations of *Jatropha curcas*. *Photosynthetica*. 47. 559-566.

Zhou, W., Leul, M. 1998. Uniconazole-induced alleviation of freezing injury in relation to changes in hormonal balance, enzyme activities and lipid peroxidation in winter rape. *Plant Growth Regulation*. 26. 41-47.

Zhou, Y. H., Wu, J. X., Zhu, L. J., Shi, K., Yu, J. Q. 2009. Effects of phosphorus and chilling under low irradiance on photosynthesis and growth of tomato plants. *Biologia Plantarum*. 53. 378-382.