

Środowiskowe Studia Doktoranckie Nauk Przyrodniczych

INSTYTUT FIZJOLOGII ROŚLIN *im. FRANCISZKA GÓRSKIEGO*
POLSKIEJ AKADEMII NAUK



Katarzyna Kaczanowska

**Mechanizmy tolerancji sorga
(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)
na stres chłodu**

Rozprawa doktorska

Promotor

prof. dr hab. inż. Franciszek Janowiak

Kraków, 2024

Praca została wykonana w ramach projektu:

ERANET GAS - *Genetyczna Adaptacja Sorga: oparta na genomice hodowla rośliny energetycznej nowej generacji dla zrównoważonego rozwoju Europy /*

ERANET GAS – *Genetic Adaptation of Sorghum: Genomics-based breeding of a sustainable, next-generation bioenergy crop for Europe,*

finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBR), Nr. umowy ERA-NET-BIOENERGY/3/2013.

Składam serdeczne podziękowania
Panu Promotorowi prof. dr hab. inż. Franciszkowi Janowiakowi
za opiekę merytoryczną, cenne uwagi i sugestie oraz wyrozumiałość
w trakcie prowadzonych badań i przygotowywania rozprawy doktorskiej.

Spis treści

Streszczenie.....	6
Summary	9
Wykaz stosowanych skrótów.....	12
1. WSTĘP.....	13
1.1. Pojęcie stresu u roślin.....	13
1.2. Stres chłodu	14
1.2.1. Sprawność aparatu fotosyntetycznego roślin w warunkach stresowych ..	16
1.2.2. Funkcjonowanie aparatów szparkowych w warunkach stresowych.....	18
1.2.3. Rola kwasu abscysynowego u roślin w warunkach stresowych.....	19
1.2.4. Potencjał osmotyczny oraz stosunki wodne w liściach oraz korzeniach w warunkach stresowych	21
1.2.5. Skutki stresu oksydacyjnego	22
1.3. Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench)	23
2. CEL	26
3. MATERIAŁ I METODY	27
3.1. Materiał roślinny	27
3.2. Przeprowadzone doświadczenia.....	27
3.3. Układ doświadczeń i warunki wzrostu roślin	29
3.4. Pomiary parametrów fizjologicznych	35
3.4.1. Parametry fluorescencji chlorofilu.....	35
3.4.2. Przewodność aparatów szparkowych.....	37
3.4.3. Zawartość kwasu abscysynowego	38
3.4.4. Potencjał osmotyczny	40
3.4.5. Całkowita aktywność drobnocząsteczkowych antyoksydantów.....	42
3.4.6. Wartość pH	44
3.4.7. Przewodność hydrauliczna.....	44
3.5. Pomiary uszkodzeń chłodowych.....	45
3.5.1. Wpływ elektrolitów.....	45
3.5.2. Zazielenienie liści	46
3.6. Analiza statystyczna wyników	46
4. WYNIKI.....	48
4.1. I grupa doświadczeń.....	48
4.1.1. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II.....	48
4.1.2. Przewodność aparatów szparkowych.....	49
4.1.3. Zawartość kwasu abscysynowego (ABA)	50
4.1.4. Wartość pH	53

4.1.5.	Potencjał osmotyczny	55
4.1.6.	Całkowita aktywność drobnocząsteczkowych antyoksydantów.....	57
4.1.7.	Zawartość wody w tkankach liści	58
4.1.8.	Przewodność hydrauliczna.....	59
4.2.	II grupa doświadczeń	60
4.2.1.	Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II.....	61
4.2.2.	Przewodność aparatów szparkowych.....	64
4.2.3.	Zawartość ABA.....	65
4.2.4.	Potencjał osmotyczny	66
4.2.5.	Zawartość wody w tkankach.....	67
4.2.6.	Zdolności adaptacyjne do warunków chłodu hartowanych suszą siewek	68
4.3.	III grupa doświadczeń	75
4.3.1.	Populacja mapująca JxE.....	75
4.3.2.	Populacja mapująca SxM.....	82
4.3.3.	Populacja mapująca SxE.....	87
4.3.4.	Populacja mapująca SxJ.....	92
5.	DYSKUSJA	97
5.1.	Fizjologiczne reakcje sorga na stres chłodu.....	98
5.1.1.	Fluorescencja chlorofilu <i>a</i>	98
5.1.2.	Przewodność szparkowa	100
5.1.3.	Uszkodzenia chłodowe	101
5.2.	Potencjalna rola akumulacji ABA w adaptacji do chłodu u siewek sorga..	102
5.3.	Adaptacja osmotyczna siewek sorga w stresie chłodu.....	104
5.4.	Komunikacja korzenie-liście w warunkach chłodu	105
6.	WNIOSKI	109
7.	LITERATURA	111
8.	ŹRÓDŁA INTERNETOWE.....	120

Streszczenie

Celem prezentowanych badań było określenie poziomu i zróżnicowania tolerancji na chłód (13/10°C dzień/noc) siewek sorga (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) oraz określenie procesów i cech, które odgrywają decydującą rolę w tolerancji stresu chłodu u tego gatunku.

Badania wykonano na sześciu liniach rodzicielskich sorga (M71, SS79, Etian, Keller, Ji2731, Btx623) - będących liniami wyjściowymi wielu populacji mapujących używanych obecnie w hodowli, genetyce molekularnej i genomice gatunku oraz czterech populacjach mapujących (JxE, SxM, SxJ, SxE) i ich liniach rodzicielskich, o różnym stopniu tolerancji na chłód. W ramach niniejszej pracy przeprowadzono trzy grupy doświadczeń. W pierwszej grupie doświadczeń przeprowadzono fizjologiczną charakterystykę 2 linii rodzicielskich sorga (M71, SS79), gdzie oceniano fizjologiczne reakcje części nadziemnej i korzenia na stres chłodu, sygnały komunikacji korzenieliście oraz przewodność hydrauliczną korzeni sorga w warunkach chłodu. W drugiej grupie doświadczeń przeprowadzono fizjologiczne fenotypowanie wszystkich badanych 6 linii rodzicielskich sorga, gdzie oceniano: fizjologiczne reakcje części nadziemnej na stres chłodu oraz zdolności adaptacyjne do warunków chłodu hartowanych suszą siewek. W trzeciej grupie doświadczeń przeprowadzono fizjologiczne fenotypowanie 4 populacji mapujących i ich linii rodzicielskich, gdzie oceniano fizjologiczne reakcje części nadziemnej na stres chłodu.

Siewki w fazie trzeciego liścia poddano działaniu chłodu (13/10°C, dzień/noc) w komorze wzrostowej przez pięć dni, a następnie pięciodniowemu okresu zdrowienia (*recovery*) w normalnych warunkach wzrostu (25/20°C, dzień/noc). Pomiaru wykonano bezpośrednio przed chłodzeniem oraz codziennie podczas traktowania chłodem i *recovery*. Reakcje fizjologiczne roślin określono na podstawie zmian: efektywnej wydajności kwantowej fotosystemu II (PSII) mierząc fluorescencję chlorofilu *a* (fluorymetr PAM 2000), stanu aparatów szparkowych (porometr Delta T), potencjału osmotycznego liści i korzeni (osmometr Osmomat 030-D 300), zawartości kwasu abscysynowego (ABA) w liściach, korzeniach i soku ksylemu (ELISA), pH soku ksylemu (pH metr pH 211), zawartości drobnocząsteczkowych antyoksydantów (metoda spektrofotometryczna wykorzystująca rodnik DPPH), wpływu elektrolitów z tkanek roślinnych (konduktometr CC-550), zazielenienia liści - na podstawie pomiaru

ogólnej zawartości chlorofilu (SPAD-502 Plus) oraz pomiaru przewodnictwa hydraulicznego korzeni (aparat HPFM).

Już w pierwszym dniu traktowania chłodem odnotowano znaczny spadek efektywnej wydajności kwantowej PSII u wszystkich sześciu linii rodzicielskich sorga oraz linii populacji mapujących i ich linii rodzicielskich. W tym czasie nie zaobserwowano jednak zamykania aparatów szparkowych. Dopiero po zakończeniu oddziaływania tego stresu, w czasie *recovery*, aparaty szparkowe przymykały się, co powodowało substratowe ograniczenia w efektywnej wydajności kwantowej PSII. Największe różnice w efektywnej wydajności kwantowej PSII między liniami obserwowano na późniejszym etapie chłodzenia i w czasie *recovery*. Różnice między liniami spowodowane były przez spadek wydajności fotosyntetycznej wskutek zamknięcia aparatów szparkowych u linii wrażliwych, co skutkowało brakiem zdolności odzyskania przez nie wydajności fotosyntetycznej po zakończeniu chłodzenia. Zaobserwowano też większe zróżnicowanie przewodności szparkowej między wrażliwymi i tolerancyjnymi mieszańcami populacji mapujących podczas *recovery* niż w trakcie działania stresu chłodu. Linie tolerancyjne szybciej otwierały aparaty szparkowe podczas *recovery*, przywracając wydajność fotosyntetyczną, w porównaniu z wrażliwymi. Drugim parametrem wyraźnie różnicującym linie w warunkach chłodu był spadek potencjału osmotycznego liści oraz korzeni i osmotyczna adaptacja do warunków tego stresu. W trakcie trwania chłodu dochodziło do uruchamiania mechanizmu osmoregulacji i gromadzenia w liściach substancji osmotycznie czynnych. Różnice genotypowe widoczne były tak podczas chłodzenia jak i *recovery*. Występowały też duże różnice w reakcji korzeni siewek linii sorga na chłód. U linii wrażliwej na ten stres (SS79) korzenie wykazywały większy stres oksydacyjny w porównaniu z tolerancyjną linią (M71). Chłód działający na siewki sorga spowodował wzrost zawartości kwasu abscysynowego (ABA) w liściach u prawie wszystkich badanych linii, jednak u linii tolerancyjnych wzrost był bardziej wyraźny. U wszystkich sześciu badanych linii rodzicielskich w czasie kiedy doszło do zwiększenia zawartości ABA w liściach, dochodziło też do spadku przewodności szparkowej w liściach, co wskazuje na udział ABA w przymykaniu aparatów szparkowych w warunkach chłodu. Wyższy poziom ABA w liściach w warunkach chłodu był również skutkiem zwiększonego transportu ABA z korzeni do części nadziemnych siewek, co objawiało się podwyższonym stężeniem ABA w soku

ksylemu. Podczas działania chłodu doszło do alkalizacji soku ksylemu, zwiększającej sekwestrowanie ABA w wyniku „pułapki anionowej”, a tym samym powodującej akumulację ABA w rejonach jego działania np. w komórkach szparkowych. W trakcie trwania *recovery* zaobserwowano również wzrost zawartości ABA w liściach oraz jego stężenia w soku ksylemu. Pomiar zawartości ABA u linii rodzicielskich oraz populacji mapującej JxE (176 linii) potwierdziły istotną rolę akumulacji ABA w tolerancji na niską temperaturę. W badaniach zaobserwowano ogromne zróżnicowanie w fizjologicznych parametrach w obrębie linii badanych populacji mapujących, a różnice między badanymi liniami są bardziej wyraźne podczas *recovery* niż podczas chłodzenia.

Ogromne zróżnicowanie w zakresie reakcji i tolerancji na chłód u sorga sugeruje, że ukierunkowana selekcja i hodowla może przyczynić się w krótkim czasie do stworzenia nowych odmian o zwiększonej odporności na stres chłodu.

Summary

The aim of the presented study was to determine the level and the differentiation of chilling tolerance (13/10°C day/night) in sorghum seedlings (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) and to identify the processes and traits that play a significant role in low temperature stress tolerance of this species. The study was conducted on six sorghum parental lines (M71, SS79, Etian, Keller, Ji2731, Btx623) - which are the founding lines of many mapping populations currently used in breeding, molecular genetics, and genomics of the species - as well as on four mapping populations (JxE, SxM, SxJ, SxE) and their parental lines, with different degrees of chilling tolerance.

Within this work, three groups of experiments were conducted. In the first group of experiments, a physiological characterization of two sorghum parental lines (M71, SS79) was performed, assessing the physiological responses of the shoot and root to low temperature stress, root-to-shoot signaling, and the hydraulic root conductance of sorghum under chilling conditions. In the second group of experiments, physiological phenotyping of all six sorghum parental lines was carried out, evaluating the physiological responses of the shoot to low temperature stress and the adaptive capacity of drought-hardened seedlings to chilling conditions. In the third group of experiments, physiological phenotyping of four mapping populations and their parental lines was conducted, focusing on the physiological responses of seedlings to chilling stress.

Seedlings at the third-leaf stage were exposed to chilling temperature (13/10°C, day/night) in a growth chamber for five days, followed by a five-day recovery period under normal growth conditions (25/20°C, day/night). Measurements were taken immediately before the chilling, and then during chilling and recovery periods. The physiological responses of plants were assessed based on changes in effective quantum yield of photosystem II (PSII), measured as chlorophyll a fluorescence (PAM 2000 fluorometer); stomata status (Delta T porometer); osmotic potential of leaves and roots (Osmomat 030-D 300 osmometer); abscisic acid (ABA) content in leaves, roots, and xylem sap (ELISA); pH of xylem sap (pH meter pH 211); content of low-molecular-weight antioxidants (spectrophotometric method using DPPH radical); electrolyte leakage from plant tissues (conductometer CC-550); leaf greenness based on total chlorophyll content (SPAD-502 Plus); and hydraulic root conductance (HPFM apparatus).

A significant decrease in the effective quantum yield of PSII was observed as early as the first day of chilling treatment across all six sorghum parental lines, as well as the lines of the mapping populations and their parental lines. However, no stomatal closure was noted at this stage. Stomatal closure was only observed during the recovery phase, after the low temperature stress had ceased, which led to substrate limitations in the effective quantum yield of PSII. The largest differences in photosynthetic efficiency between the lines were noted at a later stage of low temperature exposure and during the recovery period. Differences between the lines were caused by a decline in photosynthetic efficiency due to stomatal closure in sensitive lines, resulting in their inability to restore photosynthetic efficiency after the low temperature stress ended. Greater differentiation in stomatal conductance was observed between sensitive and tolerant hybrids of the mapping populations during the recovery phase compared to the low temperature stress period. Tolerant lines reopened their stomata more rapidly during recovery, restoring photosynthetic efficiency compared to the sensitive lines.

The second parameter that distinctly differentiated the lines under chilling conditions was the decline in osmotic potential of the leaves and roots, indicating osmotic adaptation to the stress conditions. During low temperature exposure, the osmotic regulation mechanism was activated, leading to the accumulation of osmotic active substances in leaves. Genotypic differences were evident both during chilling and recovery. There were also significant differences in the root response of sorghum seedlings to low temperature. In the chilling sensitive line (SS79), the roots exhibited higher oxidative stress compared to the tolerant line (M71).

Chilling exposure of sorghum seedlings resulted in an increase in abscisic acid (ABA) content in leaves of almost all tested lines; however, this increase was more pronounced in the tolerant lines. In all six parental lines, the increase in leaf ABA content was accompanied by a reduction in stomatal conductance, indicating the involvement of ABA in stomatal closure under chilling conditions. The higher ABA levels in the leaves during low temperature stress were also a consequence of enhanced ABA transport from roots to shoots of seedlings, as evidenced by elevated ABA concentrations in the xylem sap. Chilling exposure led to the alkalization of the xylem sap, which enhanced ABA sequestration via the "anion trap" mechanism, resulting in the accumulation of ABA in its target regions, such as guard cells. During the recovery phase, an increase

in ABA content in leaves and its concentration in the xylem sap was also observed. Measurements of ABA content in the parental lines and the mapping population JxE (176 lines) confirmed the significant role of ABA accumulation in chilling tolerance. The study revealed considerable differentiation in physiological parameters among the lines of the examined mapping populations, with differences between the tested lines being more pronounced during recovery than during low temperature exposure.

The substantial differentiation in the responses and chilling tolerance of sorghum suggests that targeted selection and breeding could rapidly lead to the development of new varieties with enhanced resistance to low temperature stress.

Wykaz stosowanych skrótów

ABA - kwas abscysynowy, (abscisic acid)

ACC - kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy

DPPH - 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazyl

ELISA - immunometoda, (enzyme-linked immunosorbent assay)

F_m' - maksymalna wydajność fluorescencji

F_o' - minimalna wydajność fluorescencji

F_v'/F_m' - maksymalna (potencjalna) aktywność fotochemiczna

F_v' - fluorescencja zmienna

LSD - najmniejsza statystycznie istotna różnica

PG - fosfatydyloglicerol

pK_a - moc kwasu

PPW - pełna pojemność wodna

PSII - fotosystem drugi

qP - wygaszanie fotochemiczne

RFT - reaktywne formy tlenu

SPAD - ogólna zawartość chlorofilu (ang. Soil Plant Analysis Development)

ΦPSII, YIELD - efektywna (rzeczywista) wydajność kwantowa fotosystemu

Ψ_m - siły matrycowe

Ψ_p - ciśnienie hydrostatyczne

Ψ_w - potencjał wody

Ψ_π - potencjał osmotyczny

1. WSTĘP

1.1. Pojęcie stresu u roślin

Termin „stres” wywodzi się od łacińskiego słowa *stringere*, co oznacza wymuszać reakcję. W biologii znane są różne definicje tego pojęcia. Jedna z nich mówi, że stres to czynnik środowiskowy potencjalnie niekorzystny dla żywego organizmu (Levitt, 1980). Inna zakłada, że jest to zarówno czynnik działający na organizm, jak i stan organizmu wywołany działaniem tego czynnika (Kacperska, 2012a). Kolejna, że jest to każdy stan różny od homeostazy (Starck et al., 1995). Jednak stres ma nie tylko działanie destrukcyjne, może być także czynnikiem selekcji pozwalającym przetrwać organizmom o większej odporności (eustres) i możliwości przystosowania do zmiennych warunków na zasadzie często występującego w przyrodzie zjawiska hormezy (Larcher, 1981).

Rośliny ciągle narażone są na działanie różnego typu stresów. Wszystkie czynniki środowiska, których oddziaływanie na organizm może doprowadzić do niekorzystnych zaburzeń funkcji i struktury rośliny określa się terminem czynnik stresowy albo stresor. W zależności od intensywności i czasu działania czynnika zaburzenia te mogą być odwracalne albo nieodwracalne. Przyczyniają się do zahamowania wzrostu i rozwoju roślin, mogą także powodować trwałe uszkodzenia komórek, tkanek i organów, a nawet doprowadzić do śmierci rośliny (Farooq et al., 2009; Taiz and Zeiger, 2010).

Wyróżnia się stresory abiotyczne i biotyczne. Do czynników stresowych abiotycznych należą:

- temperatura – wysoka, niska (chłód, mróz),
- promieniowanie – wysokie lub niskie natężenie,
- woda – suche powietrze, susza glebowa, zatapianie,
- zanieczyszczenia gazowe lub pyłowe,
- składniki mineralne – niedobór, nadmiar, zasolenie, metale ciężkie, zakwaszenie, alkalizacja,
- czynniki mechaniczne – wiatr, pokrywa śnieżna, powłoka lodowa.

Wzrost i rozwój roślin zależy także od interakcji z ożywionymi elementami środowiska. Do czynników stresowych biotycznych zalicza się:

- niekorzystne działanie mikroorganizmów (bakterie, wirusy, grzyby),
- wzajemne oddziaływanie roślin różnych gatunków (allelopatia, rośliny pasożytnicze),
- zwierzęta (pasożytnictwo),
- czynniki antropogeniczne (chemiczne środki ochrony roślin) (Kacperska, 2012b).

1.2. Stres chłodu

Temperatura jest jednym z głównych czynników decydujących o życiu i rozprzestrzenianiu się roślin na kuli ziemskiej. Wzrost roślin jest wynikiem szeregu reakcji biochemicznych, a procesy te wymagają optymalnej temperatury dla normalnego funkcjonowania. Optimum temperaturowe może być różne dla różnych procesów biochemicznych, jest zależne od gatunku, jego przystosowania do środowiska, typu tkanki, czy też stadium wzrostu i rozwoju rośliny. Odchylenie od optymalnych warunków jest więc czynnikiem stresowym, który zakłóca normalne procesy fizjologiczne, a tym samym wpływa na zahamowanie wzrostu i rozwoju roślin, następnie wywołuje odwracalny spadek szybkości procesów życiowych, uszkodzenia tkanek i organów, a w końcu nieodwracalne uszkodzenia i śmierć rośliny.

W warunkach klimatu umiarkowanego stres spowodowany niską temperaturą ogranicza albo nawet eliminuje wzrost oraz plonowanie wielu roślin, szczególnie dotyczy to gatunków roślin pochodzenia subtropikalnego i tropikalnego (Lukatkin et al., 2012; Mahajan and Tuteja, 2005; Soualiou et al., 2022; Zhou et al., 2021). Ze względu na różnorodne zakresy temperatury oraz specyfikę mechanizmów odporności na niską temperaturę można wyróżnić trzy kategorie roślin (Kacperska, 2012a):

- rośliny wrażliwe na chłód, które ulegają uszkodzeniu i giną w temperaturze wyższej od temperatury zamarzania wody,
- rośliny wrażliwe na zamarzanie, które tolerują spadek temperatury jedynie do chwili rozpoczęcia krystalizacji wody w tkankach,
- rośliny tolerujące zamarzanie, które po okresie wzrostu w warunkach chłodu są w stanie przetrwać pozakomórkową krystalizację wody i związane z tym zjawisko odwodnienia komórek.

Stres chłodowy obejmuje temperaturę od 0° do 15°C. Uszkodzenia wywoływane tymi temperaturami nazywane są uszkodzeniami chłodowymi (Levitt, 1980). Szybkość powstawania, stopień i odwracalność tych uszkodzeń zależy od: zakresu temperatury, czasu działania, szybkości jej obniżania, warunków wzrostu poprzedzających chłodzenie, a także gatunku i etapu rozwoju rośliny (Soualiou et al., 2022; Taiz and Zeiger, 2010).

Istnieją różne teorie dotyczące pierwotnej odpowiedzi roślin na działanie chłodu, które tłumaczą powstawanie uszkodzeń roślin spowodowanych niską temperaturą. Jedna z nich zakłada, że pod wpływem niskiej temperatury dochodzi do zaburzeń w budowie oraz funkcjonowaniu błon cytoplazmatycznych. Chłód powoduje przejście fazowe dwuwarstwy lipidowej – ze struktury płynnokrystalicznej powstaje struktura krystaliczna (żel). Fosfolipidem zapoczątkowującym przejście fazowe w obrębie błon jest fosfatydyloglicerol (PG). Reszty nasyconych kwasów tłuszczowych o wysokiej temperaturze topnienia, występujące w lipofilnej części PG, ułatwiają przejście fazowe tego lipidu oraz sąsiadujących z nim fosfo- i galaktolipidów w niskiej temperaturze (Lyons, 1973). Skutkami uszkodzenia błon są występujące w roślinach w warunkach chłodu zaburzenia takie jak: zwiększenie przepuszczalności błon, co prowadzi do wypływu elektrolitów i wody z komórek (Simon, 1974), zmiana energii aktywacji i konformacji wielu enzymów zlokalizowanych w błonach (Lyons et al., 1979), aktywacja enzymów lipolitycznych, co powoduje zaburzenia metabolizmu komórkowego i nagromadzenie w roślinie szkodliwych metabolitów (Wilson and McMurdo, 1981), czego konsekwencją są uszkodzenia komórek i tkanek, a w końcu śmierć rośliny.

Według innej teorii, w wyniku obniżenia temperatury dochodzi do nagłej depolaryzacji plazmolemy i otwarcia kanałów wapniowych w tej błonie, co powoduje wnikanie jonów wapnia do wnętrza komórek i nagły wzrost ich stężenia w cytozolu (Minorsky, 1985). Akumulacja wapnia zwiększa turgor komórek i sprawia, że aparaty szparkowe pozostają otwarte, co powoduje, że transpiracja przewyższa pobieranie wody przez korzenie, przyczyniając się do wędnięcia roślin. W warunkach chłodu zmniejsza się pobieranie wody przez korzenie i jej transport w obrębie rośliny, spowodowane przez wzrost oporu dyfuzyjnego korzeni dla wody (McWilliam et al., 1982). Chłód zmienia także właściwości fizyczne wody, zwiększając gęstość i lepkość, co dodatkowo

utrudnia pobieranie jej przez roślinę oraz wpływa na deficyt wody w roślinie, co zostało potwierdzone w licznych pracach (McWilliam et al., 1982; Wilson and McMurdo, 1981; Wolfe, 1991).

Objawami niekorzystnego wpływu niskich temperatur chłodowych mogą być: zahamowanie wzrostu liści, więdnienie liści, chlorozy, nekrozy, czy nawet śmierć rośliny (Liu et al., 2018; Lukatkin et al., 2012). Pojawiający się na początku fazy wzrostu chłód może ograniczać rozwój siewek w okresie kiełkowania i wschodów, a także osłabiać ich dalszy wzrost (Yu et al., 2004). Rośliny rosnące w warunkach chłodu wykazują ograniczenie tempa wzrostu, co może objawiać się niewielkim przyrostem suchej masy (Sowiński et al., 2005; Verheul et al., 1996), a także zahamowaniem rozwoju systemu korzeniowego (Richner et al., 1996; Sowiński et al., 2005; Zhou et al., 2021).

Skutkiem zmian zachodzących pod wpływem działania chłodu są zaburzenia związane z procesami metabolicznymi, w tym zaburzenia przebiegu fotosyntezy (Allen and Ort, 2001; Andrews et al., 1995; Fracheboud et al., 1999; Holaday et al., 2016), zmiany stopnia otwarcia aparatów szparkowych (Melkonian et al., 2004), czy też powstawanie reaktywnych form tlenu, wywołujących stres oksydacyjny (Prasad, 1996; Raza et al., 2023). W warunkach niskiej temperatury zmniejsza się pobieranie soli mineralnych (Mozafar et al., 1993). Konsekwencją chłodu są także zaburzenia równowagi hormonalnej w roślinie. U wielu gatunków dochodzi do wzrostu zawartości kwasu abscysynowego (Janowiak et al., 2002), etylenu i jego prekursorów (Antunes and Sfakiotakis, 2002), natomiast u innych ograniczona jest synteza np. cytokinin (Todorova et al., 2005).

1.2.1. Sprawność aparatu fotosyntetycznego roślin w warunkach stresowych

Stresy abiotyczne wpływają na sprawność aparatu fotosyntetycznego roślin, która może być oceniana m. in. na podstawie pomiarów fluorescencji chlorofilu *a* (Maxwell and Johnson, 2000). Fluorescencja chlorofilu *a* to reemisja energii świetlnej pochłoniętej przez anteny energetyczne aparatu fotosyntetycznego. Jest więc wskaźnikiem energii zaabsorbowanej przez roślinę, która nie została wykorzystana w czasie procesów fotochemicznych oraz nie została utracona w postaci ciepła (Kalaji and Łaboda, 2010). Dotychczasowe badania wykazały, że w zależności od gatunku,

ilość energii traconej przez rośliny w postaci fluorescencji wynosi od 2 do 5% całkowitego zaabsorbowanego światła, jednak każdy czynnik zakłócający proces fotosyntezy powoduje jej wyraźny wzrost (Lichtenthaler et al., 1998; Maxwell and Johnson, 2000).

Relację pomiędzy przebiegiem fotosyntezy i emisją fluorescencji chlorofilu jako pierwsi opisali Kautsky i Hirsch, którzy zbadali indukcję fluorescencji po wystawieniu na promieniowanie liści zaadaptowanych do ciemności. Stwierdzili oni, że istnieje odwrotna zależność pomiędzy intensywnością fotosyntezy (wyrażonej jako asymilacja CO₂ w czasie), a intensywnością fluorescencji (Kautsky and Hirsch, 1931).

Analiza zmian fluorescencji chlorofilu pozwala uzyskać szczegółowe informacje na temat struktury i funkcji fotosystemu II (PSII) (Murchie and Lawson, 2013). Pomiar fluorescencji chlorofilu jest jedną z najbardziej znanych i powszechnie wykorzystywanych metod w badaniach nad fizjologią stresu roślin (Dabrowski et al., 2019; Rapacz, 2007; Rapacz et al., 2011). Niewątpliwą zaletą tej metody jest jej nieinwazyjność, możliwość pomiaru *in vivo* oraz wykonania dużej ilości pomiarów (Kalaji et al., 2016; Murchie and Lawson, 2013). Pomiar fluorescencji chlorofilu *a* wykorzystywany jest w badaniach dotyczących zmian zachodzących w aparatach fotosyntetycznych (w procesie fotosyntezy) pod wpływem działania różnych czynników środowiskowych, takich jak: chłód (Fracheboud et al., 1999; Kościelniak and Biesaga-Kościelniak, 2006), susza (Hura et al., 2007; Oukarroum et al., 2007), zalewanie (Else et al., 2009), czy też zasolenie (Netondo et al., 2004; Zribi et al., 2009).

Stres chłodu znacznie obniża intensywność procesu fotosyntezy szczególnie u roślin klimatu tropikalnego i subtropikalnego. Temperatury chłodowe zmniejszają aktywność fotosyntetyczną liści i powodują pojawianie się chlorotycznych plam na liściach (Fracheboud et al., 1999). W warunkach chłodu znacząco obniża się zawartość chlorofilu w liściach, może także dochodzić do zmian w rozwoju chloroplastów, ich ilości i strukturze (Kutík et al., 2004; Liu et al., 2018). Spadek tempa fotosyntezy związany może być również ze zmniejszoną aktywnością enzymów, które biorą udział w tym procesie. Niska temperatura powoduje, że enzymy, które rutynowo uczestniczą w fotosyntezie, mają mało energii, co spowalnia proces fotosyntezy (Prasad and Vinay, 2007). Przyczyną uszkodzeń aparatu fotosyntetycznego mogą być też powstające w warunkach stresu reaktywne formy tlenu (RFT) wywołujące zmiany

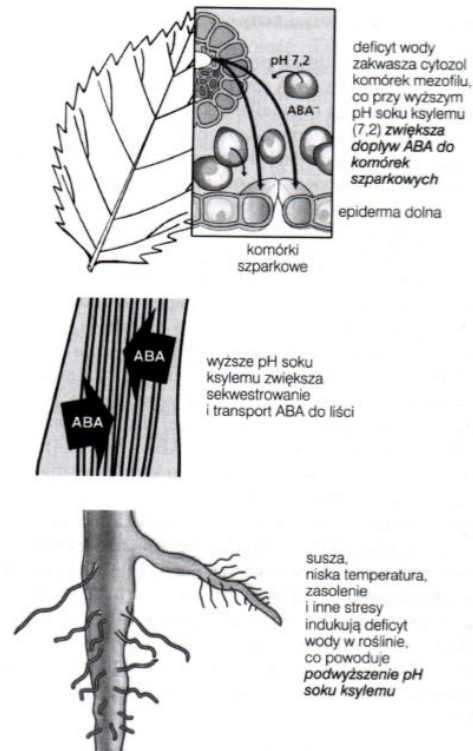
w funkcjonowaniu błon spowodowane peroksydacją lipidów (Lukatkin, 2002) oraz oksydacyjnymi uszkodzeniami białek (Kingston-Smith and Foyer, 2000).

1.2.2. Funkcjonowanie aparatów szparkowych w warunkach stresowych

Aparaty szparkowe reagują na zmiany czynników środowiska, takich jak natężenie światła, temperatura, względna wilgotność powietrza, międzykomórkowe stężenie CO₂, czy też zmiany stężenia hormonu – kwasu abscysynowego (ABA).

Dobowy rytm rozwarcia aparatów szparkowych zależy jest od światła, wody i międzykomórkowego stężenia CO₂. Największe rozwarcie aparaty szparkowe mają w godzinach południowych natomiast w godzinach rannych, wieczornych i nocnych ulegają przymknięciu.

Działające na roślinę czynniki stresowe powodują przymknięcie aparatów szparkowych w porównaniu do poziomu otwarcia w warunkach optymalnych. Przymykanie aparatów szparkowych regulowane jest na dwa sposoby: hydropasywnie i hydroaktywnie. Na drodze hydropasywnej komórki szparkowe tracą turgor w wyniku parowania wody do atmosfery. Hydroaktywne zamykanie aparatów szparkowych indukują reakcje metaboliczne spowodowane odwodnieniem liści lub korzeni i aktywujące syntezę kwasu abscysynowego (Willmer and Fricker, 1996). ABA jest słabym kwasem o pKa równym 4.8, a więc im wyższe jest pH środowiska, w tym większym stopniu cząsteczki tego kwasu występują w formie zdysocjowanej. Jony ABA⁻ nie mają zdolności przenikania przez błony w przeciwieństwie do niedysocjowanych cząsteczek ABA, które mogą swobodnie przez nie przenikać. Zmiana stężenia ABA w poszczególnych organellach lub organach rośliny następuje wskutek zmian pH indukowanych w tych strukturach w warunkach stresowych. Alkalinizacja środowiska działa więc jako tzw. „pułapka anionowa” i powoduje akumulację ABA w danym rejonie komórki lub tkanki, co umożliwia uruchomienie łańcucha sygnałowego (Wilkinson and Davies, 2002) (Ilustracja. 1).



Ilustracja 1. Mechanizm transportu ABA do komórek szparkowych roślin wykorzystujący mechanizm pułapki anionowej wskutek zmiany pH w ksylemie i cytozolu komórek liści (Janowiak, 2011).

W warunkach stresu podwyższony poziom ABA powoduje przemykanie aparatów szparkowych, nawet gdy nie wystąpiły jeszcze zmiany potencjału wody w komórkach liści (Hartung and Davies, 1991).

1.2.3. Rola kwasu abscysynowego u roślin w warunkach stresowych

Hormony roślinne odgrywają ważną rolę w reakcji roślin na działanie stresów biotycznych i abiotycznych (Bari and Jones, 2009; Taiz and Zeiger, 2010). W literaturze pojawiają się doniesienia głównie o roli ABA, który występuje powszechnie w świecie roślin naczyniowych, ale obecny jest także u mchów i glonów. Ze względu na jego szybką reakcję i akumulację podczas działania różnych czynników stresowych zwany jest hormonem stresu (Christmann et al., 2004; Vishwakarma et al., 2017). W reakcji roślin na stres biorą udział także inne hormony roślinne, jak etylen i jego bezpośredni prekursor kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy (ACC) (Janowiak and Dörffling, 1996), cytokininy (Wani et al., 2016), gibereliny (Fahad et al., 2015), kwas salicylowy (Verma et al., 2016), a także auksyny (Rahman, 2013; Wani et al., 2016).

ABA jest seskwiterpenem, a jego aktywną formą są cząsteczki (+)-cis-ABA (Ilustracja 2) (Christmann et al., 2004; Lewak, 2012). Syntetyzowany jest bezpośrednio w trakcie przemian szlaku kwasu mewalonowego (Hirai et al., 2000), głównie u grzybów, albo pośrednio podczas degradacji karotenoidów u roślin (Schwartz and Zeevaart, 2010).

Stężenie ABA w roślinach jest bardzo małe i waha się w granicach od 5 do 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ świeżej masy, jest nierównomiernie rozmieszczone w roślinie, a jego najwyższy poziom występuje głównie w chloroplastach. Poziom ABA w roślinie zmienia się zależnie od stanu tkanek czy organów, a także w wyniku działania czynnika stresowego (Janowiak, 2011). Głównym miejscem syntezy ABA w trakcie stresu są korzenie, skąd jako substancja sygnałowa transportowany jest z sokiem ksylemu do innych części rośliny (Zhang et al., 1987).

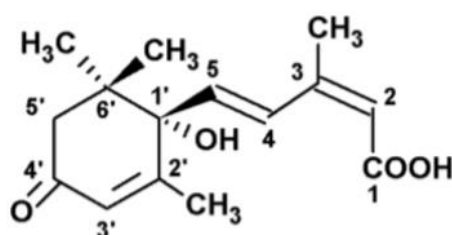
Przekazywanie sygnału z korzeni do liści odbywa się w trzech etapach. Pierwszy etap ma miejsce na poziomie systemu korzeniowego. Korzeń odbiera informację o działającym stresie i następuje produkcja substancji sygnałowej, np. ABA. Drugi etap obejmuje transport ABA z korzenia poprzez sok ksylemu do części nadziemnej. W trzecim etapie następuje odebranie sygnału hormonalnego przez część nadziemną, koniec transportu przez sok ksylemu i zmiany w obrębie metabolizmu, które powodują zwiększenie tolerancji na działający stres i aklimatyzację do niekorzystnych warunków (Jackson, 1997).

ABA odgrywa rolę w reakcji roślin na stesy środowiskowe, a o jego udziale w adaptacji do warunków suszy pisano już w latach sześćdziesiątych dwudziestego wieku (Wright and Hiron, 1969). Poza jego udziałem w adaptacji do warunków suszy (Bahrun et al., 2002; Zhang et al., 2006), ABA pełni również rolę w reakcji roślin na stres chłodu (Aroca et al., 2003; Farooq et al., 2009; Janowiak and Dörffling, 1996; Raza et al., 2023; Venzhik et al., 2016) oraz zalewanie (Else et al., 2006) czy zasolenie (Fahad et al., 2015).

ABA uczestniczy w regulacji wielu procesów zachodzących w roślinie w trakcie działania czynników stresowych. Bierze udział w:

- zamykaniu aparatów szparkowych i zmniejszaniu strat wody przez ograniczenie transpiracji (Dodd, 2003; Janowiak et al., 2003; Janowiak et al., 2002; Pospisilova, 2003; Wilkinson and Davies, 2002);

- regulacji ekspresji wielu genów i biosyntezy białek (Soualiou et al., 2022; Vishwakarma et al., 2017; Zhang et al., 2006);
- zwiększeniu aktywności enzymów antyoksydacyjnych neutralizujących powstające w czasie stresu RFT (Jiang and Zhang, 2002);
- stymulacji syntezy niektórych składników ściany komórkowej, akumulacji osmolitów (np. cukrów) oraz regulacji syntezy metabolitów stresowych np. proliny (Kacperska, 2012b);
- zwiększeniu pobierania wody przez korzenie oraz ułatwianiu jej przewodzenia przez zmniejszenie oporności hydraulicznej (Melkonian et al., 2004).



Ilustracja 2. Chemiczna struktura cząsteczki aktywnej fizjologicznie formy kwasu abscysynowego ((+)-cis-ABA).

1.2.4. Potencjał osmotyczny oraz stosunki wodne w liściach oraz korzeniach w warunkach stresowych

W niekorzystnych dla rośliny warunkach dochodzi do zmian parametrów gospodarki wodnej. Niektóre z tych zmian pojawiają się już w pierwszych minutach działania stresu i mogą stanowić dla rośliny sygnał do zmian przystosowawczych do panujących warunków.

Chłód wpływa na gospodarkę wodną roślin, oddziałując na pobieranie, transport, transpirację wody oraz na jej biochemiczne wiązanie w roślinie. Chłodzenie całych siewek albo ich korzeni często powoduje deficyt wody w liściach.

Jednym z parametrów oceny kondycji roślin jest potencjał wody (Ψ_w), którego wartość wpływa na przebieg wielu procesów. W warunkach stresu wartość Ψ_w spada, a działające na roślinę niekorzystne czynniki środowiskowe powodują zahamowanie wzrostu komórek oraz syntezy białek. Dochodzi również do spadku intensywności fotosyntezy i zamykania aparatów szparkowych oraz zwiększenia zawartości kwasu abscysynowego i substancji osmotycznie czynnych. Wartość potencjału wody tkanek

jest wypadkową strat wody i dostępności wody z gleby (Willmer and Fricker, 1996). Rośliny mogą pobierać wodę, jeśli potencjał wody korzeni jest niższy niż potencjał wody gleby. O wartości potencjału wody w komórce decydują trzy siły: potencjał osmotyczny ($\Psi\Pi$), ciśnienie hydrostatyczne (Ψp) i siły matrycowe (Ψm). Wartość poszczególnych sił nie jest stała i zależy od gatunku rośliny, etapu rozwojowego komórki, jej stanu fizjologicznego i warunków środowiska. Wartości potencjału wody w komórkach roślinnych są zazwyczaj mniejsze od 0. W dobrze uwodnionych komórkach wahają się w granicach od -0,1 do -1,0 MPa (Kacperska, 2012a). Do zmian wartości potencjału wody dochodzi w warunkach suszy (Dalal et al., 2012; Jongdee et al., 2002), chłodu (McWilliam et al., 1982; Wolfe, 1991), czy zalewania (Else et al., 2009).

Informacją o działającym stresie są zmiany wartości potencjału osmotycznego. W wyniku działania różnych czynników stresowych komórki zaczynają tracić wodę i maleje ich turgor, a u niektórych roślin włączają się mechanizmy osmoregulacji, umożliwiające regulację potencjału osmotycznego. Dochodzi wówczas do przyspieszonej syntezy i/lub akumulacji substancji osmotycznie czynnych: niektórych aminokwasów, związków amoniowych (prolina, betaina), cukrów prostych (glukoza, fruktoza), innych związków organicznych (mannitol) oraz jonów nieorganicznych (potas) (Dalal et al., 2012; Kacperska, 2012b).

Gromadzenie substancji osmotycznie czynnych obniża potencjał osmotyczny w komórkach, co pozwala na pobranie wody z otoczenia i utrzymanie uwodnienia na odpowiednim poziomie. Osmolity nie wchodzi w interakcje z enzymami i nie zaburzają przebiegu podstawowych procesów metabolicznych (Mahajan and Tuteja, 2005). Ponadto stabilizują czwartorzędową strukturę białek oraz pomagają utrzymać selektywne właściwości błon komórkowych (Dalal et al., 2012).

1.2.5. Skutki stresu oksydacyjnego

W prawie każdych warunkach stresowych u roślin dochodzi do wzrostu stężenia wolnych rodników, głównie RFT, co prowadzi do stanu określanego jako stres oksydacyjny. Systemy antyoksydacyjne odpowiadają za usuwanie nadmiaru powstających w warunkach stresu RFT i utrzymanie równowagi redox w komórkach i tkankach. Obejmują one antyoksydanty nieenzymatyczne i enzymatyczne.

Enzymami aktywowanymi w stresie oksydacyjnym są dysmutazy ponadtlenkowe, katalazy i peroksydazy, a ich zwiększoną aktywność oraz udział w adaptacji roślin do niekorzystnych warunków wykazano w wielu badaniach dotyczących reakcji roślin na chłód (Aroca et al., 2001; Bączek-Kwinta et al., 2005).

Do najważniejszych antyoksydantów nieenzymatycznych u roślin zalicza się między innymi: glutation, tokoferole, karotenoidy, kwas askorbinowy, alkaloidy, czy związki fenolowe. Zmiany stężenia, a zwłaszcza całkowitej zdolności antyoksydacyjnej drobnocząsteczkowych antyoksydantów dają informację o stresie oksydacyjnym działającym na roślinę (Gill et al., 2012).

Antyoksydanty pełnią także funkcję w procesach aklimatyzacji związaną między innymi z ekspresją genów i programowaną śmiercią komórek, a także wpływają na wzrost roślin poprzez modyfikacje wzrostu wydłużeniowego i podziałów mitotycznych oraz procesów starzenia komórek (Foyer and Noctor, 2005).

1.3. Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)

Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) jest gatunkiem należącym do rzędu wiechlinowce (*Poales*), rodziny wiechlinowate (*Poaceae*) i rodzaju sorgo (*Sorghum*). Pochodzi z Afryki i prawdopodobnie zaczęto go uprawiać 5-8 tysięcy lat temu w Etiopii. Z Afryki rozprzestrzeniło się handlowymi szlakami lądowymi i morskimi na Bliski Wschód, do Indii i Chin. W Ameryce Północnej zostało wprowadzone do uprawy komercyjnej pod koniec XIX wieku, następnie trafiło do Ameryki Południowej i Australii. Obecnie sorgo uprawiane jest w wielu krajach o klimacie tropikalnym i podzwrotnikowym, a także w cieplejszych regionach klimatu umiarkowanego.

Sorgo jest jedną z najważniejszych roślin uprawowych na świecie i piątą, po ryżu, pszenicy, kukurydzy i jęczmieniu, najważniejszą rośliną zbożową (Hernández et al., 2023). Ma ogromne znaczenie dla ludności żyjącej w pół-pustynnych częściach Afryki, Azji, Ameryki Środkowej i Ameryki Południowej (Ramatoulaye et al., 2016). Światowy areal uprawy sorga wynosi ok 41 milionów hektarów, a produkcja sorga to ok. 58 milionów ton ziarna na rok (FAOSTAT, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, www.faostat.fao.org, 2022). Największym producentem jest Nigeria (prawie 12% światowej produkcji), następnie Sudan, Stany Zjednoczone, Meksyk, Etiopia i Indie.

W Europie, według statystyki FAO na rok 2022, sorgo na ziarno jest uprawiane w 14 krajach, na łącznej powierzchni ok. 240 tys. ha, z tego ponad 88 tys. w europejskiej części Rosji, a ponad 100 tys. we Francji, Włoszech i na Węgrzech. W statystykach uwzględniona jest również Słowenia i Macedonia, w których uprawa sorga wynosi łącznie niespełna 80 ha, jednak Polska nie jest w nich ujęta (www.fao.org).

Sorgo stanowi surowiec dla wielu dziedzin gospodarki. Uprawiane jest zarówno na żywność dla ludzi, jak i na paszę dla zwierząt, wykorzystywane jest także do produkcji bioenergii (Tari et al., 2013). Łodygi sorga cukrowego zawierają dużą ilość cukru, dzięki czemu mogą być przetwarzane na etanol (Regassa and Wortmann, 2014). Uzyskana biomasa może być palona i przekształcana w węgiel albo biopaliwo.

Sorgo dobrze rozwija się na większości typów gleb, jednak najlepiej na lekkich i średnich. Jest stosunkowo odporne na krótkie okresy niedoboru wody, a wymagania dotyczące nawozu wynoszą dla azotu: 180 kg/ha, fosforu: 20-45 kg/ha i potasu: 35-80 kg/ha. Sorgo, w porównaniu do innych roślin uprawnych, jest bardziej odporne na suszę dzięki dobrze rozbudowanemu systemowi korzeniowemu, który może sięgać nawet do 2 m głębokości, skutecznej kontroli ewapotranspiracji i przymykania aparatów szparkowych, a także możliwości szybkiego powrotu do zdrowia po okresie suszy (www.fao.org).

Sorgo jest dobrze przystosowane do wzrostu w niekorzystnych warunkach, takich jak zalewanie, zasolenie czy też alkalizacja podłoża (Regassa and Wortmann, 2014). W związku z tym, że pochodzi z półpustynnych tropikalnych obszarów Afryki, dobrze rozwija się w warunkach suszy i w wysokich temperaturach, w których wzrost innych zbóż może być utrudniony (Hernández et al., 2023). Ponadto bardzo efektywnie pobiera i wykorzystuje wodę oraz N i P z gleby. Dodatkowo jest odporne na stonkę kukurydzianą (Bekele et al., 2014). Jednak sorgo jest rośliną wrażliwą na niskie temperatury (Rutayisire et al., 2021). Uszkodzeń spowodowanych chłodem doznaje już w temperaturze poniżej 15°C (Peacock, 1982). Minimum temperaturowe dla większości typów sorga wynosi 16°C (Doggett, 1970), a zalecane minimum temperaturowe dla wysiewu to 18°C (Antony et al., 2019; Stoffer and Riper, 1963). Niemniej jednak sorgo charakteryzuje duża zmienność genetyczna reakcji na chłód (Bekele et al., 2014). Niektóre odmiany sorgo rozwinięto w rejonach chłodniejszych. Odmiany te odporne są na zimno i można je uprawiać na wyżynach, gdzie występują

niewielkie i nieregularne opady deszczu albo sezon wegetacyjny jest zwykle mniej odpowiedni dla innych odmian sorgo (Hernández et al., 2023).

Sorgo zostało wybrane do badań jako kandydat na przyszłościową roślinę uprawną w naszej szerokości geograficznej. Bowiem globalne zmiany klimatyczne powodują ocieplenie klimatu i stepowienie niektórych rejonów Europy, a sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) jako gatunek odporny na suszę glebową, wydaje się dobrym kandydatem na roślinę uprawną dla przyszłego rolnictwa naszego kontynentu. Głównym czynnikiem ograniczającym wprowadzenie sorga w Europie jest jednak jego mała tolerancja na niskie temperatury, które mogą pojawiać się w tym rejonie wczesną wiosną i wpływać na opóźnienie kiełkowania oraz wschodów lub też uszkadzać siewki. Obserwowane duże zróżnicowanie cechy tolerancji na chłód u sorga daje nadzieję, iż celowa selekcja i hodowla w kierunku zwiększenia tolerancji na niską temperaturę stworzy nowe odporniejsze na chłód odmiany sorga.

2. CEL

Celem badań niniejszej pracy była fizjologiczna i fenotypowa charakterystyka reakcji linii rodzicielskich sorga (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) i ich populacji mapujących na niską, chłodową temperaturę (13/10°C dzień/noc) oraz określenie procesów i cech, które odgrywają decydującą rolę w tolerancji stresu chłodu u tego gatunku.

Podstawowym celem przeprowadzonych badań było określenie poziomu tolerancji na chłód i jego zróżnicowania u sześciu linii rodzicielskich sorga (M71, SS79, Etian, Keller, Ji2731, Btx623) - będących liniami wyjściowymi wielu populacji mapujących – oraz w czterech populacjach mapujących i ich liniach rodzicielskich: JxE (176 linii), SxM (41 linii), SxE (50 linii) i SxJ (49 linii). Wymienione linie rodzicielskie i populacje mapujące są używanych obecnie w tradycyjnej hodowli w molekularnej genetyce jak również genomice sorga.

Poprzez pomiary zmian najważniejszych procesów i parametrów fizjologicznych w warunkach chłodu:

- wydajności kwantowej fotosystemu II (PSII),
- stanu aparatów szparkowych,
- potencjału osmotycznego,
- zawartości fitohormonu kwasu abscysynowego (ABA),
- całkowitej aktywności antyoksydantów, jako wskaźnika stresu oksydacyjnego,
- zazielenienia liści,
- wpływu elektrolitów jako wskaźnika poziomu uszkodzeń,
- pomiaru pH soku ksylemu,

określono biochemiczne i fizjologiczne mechanizmy decydujące o poziomie tolerancji / wrażliwości genotypów / linii sorga na ten stres.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał roślinny

Badania wykonano na siewkach sorga (*Sorghum bicolor* (L.) Moench).

Wykorzystano:

- sześć linii rodzicielskich sorga:
 - **M71** – linia tolerancyjna na działanie chłodu,
 - **SS79** – linia wrażliwa na działanie chłodu,
 - **Etian** – linia pośrednia,
 - **Keller** – linia wrażliwa na działanie chłodu,
 - **Ji2731** – linia tolerancyjna na działanie chłodu,
 - **Btx623** – linia wrażliwa na działanie chłodu,

(tolerancja na chłód – wg. (Bekele et al., 2014) oraz informacji ustnej prof. Roda Snowdona, Uniwersytet w Giessen, Niemcy);

- cztery populacje mapujące:
 - **JxE**: 176 linii,
 - **SxM**: 41 linii,
 - **SxE**: 50 skrajnie różniących się linii (26 tolerancyjne, 24 wrażliwe),
 - **SxJ**: 49 skrajnie różniących się linii (25 tolerancyjne, 24 wrażliwe).

Nasiona do badań zostały przesłane przez Prof. Roda Snowdona (Uniwersytet w Giessen, Niemcy) koordynatora projektu ERANET GAS – Genetyczna Adaptacja Sorga: Oparta na genomice hodowla rośliny energetycznej dla zrównoważonego rozwoju (Program ERA-NET Bioenergy).

3.2. Przeprowadzone doświadczenia

Wykaz przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doświadczeń zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wykaz przeprowadzonych doświadczeń

Grupa doświadczeń	I	II	III
Odmiany / Linie	2 linie rodzicielskie: M71 SS79	6 linii rodzicielskich: M71 SS79 Etian Keller Ji2731 Btx623	4 populacje mapujące (+ich linie rodzicielskie): JxE (176 linii+Ji2731 i Etian) SxM (41 linii+SS79 i M71) SxE (50 linii+SS79 i Etian) SxJ (49 linii+SS79 i Ji2731)
Czynnik stresowy	Chłód 14/12°C (dzień/noc)	<u>Doświadczenie A:</u> Chłód 13/10°C (dzień/noc)	Chłód 13/10°C (dzień/noc)
		<u>Doświadczenie B:</u> Chłód 13/10°C (dzień/noc) + Susza	
Obiekty (czas traktowania)	Kontrola Chłodzenie (przez 5 dni) Recovery (przez 5 dni)	<u>Doświadczenie A:</u> Kontrola Chłodzenie (przez 5 dni) Recovery (przez 5 dni)	Kontrola Chłodzenie (przez 5 dni) Recovery (przez 5 dni)
		<u>Doświadczenie B:</u> Kontrola (optymalne podlewanie) Susza (deficytowe podlewanie) Chłodzenie (przez 5 dni) Chłodzenie/Susza (przez 5 dni, traktowane uprzednio suszą)	

W ramach realizacji badań niniejszej pracy przeprowadzono trzy grupy doświadczeń na siewkach sorga:

I grupa:

Fizjologiczna charakterystyka 2 linii rodzicielskich sorga: **M71** i **SS79**, gdzie oceniano:

- fizjologiczne reakcje części nadziemnej i korzenia na stres chłodu,
- sygnały komunikacji korzenie-liście,
- przewodność hydrauliczną korzeni sorga w warunkach chłodu.

II grupa:

Fizjologiczne fenotypowanie 6 linii rodzicielskich sorga: **M71**, **SS79**, **Etian**, **Keller**, **Ji2731** oraz **Btx623**, gdzie oceniano:

- fizjologiczne reakcje części nadziemnej na stres chłodu,
- zdolności adaptacyjne do warunków chłodu poprzez hartowanie suszą siewek.

III grupa:

Fizjologiczne fenotypowanie 4 populacji mapujących:

- **JxE** – złożona ze 176 linii; dodatkowo badano 2 linie rodzicielskie: **Ji2731** i **Etian**,
- **SxM** – złożona z 41 linii; dodatkowo badano 2 linie rodzicielskie: **SS79** i **M71**,
- **SxE** – złożona z 50 linii; dodatkowo badano 2 linie rodzicielskie: **SS79** i **Etian**,
- **SxJ** – złożona z 49 linii; dodatkowo badano 2 linie rodzicielskie: **SS79** i **Ji2731**.

Linie populacji SxM, SxE oraz SxJ zostały wybrane przez grupę Prof. Snowdona z całych populacji jako skrajnie różniące się w zdolności kiełkowania w warunkach niskiej temperatury.

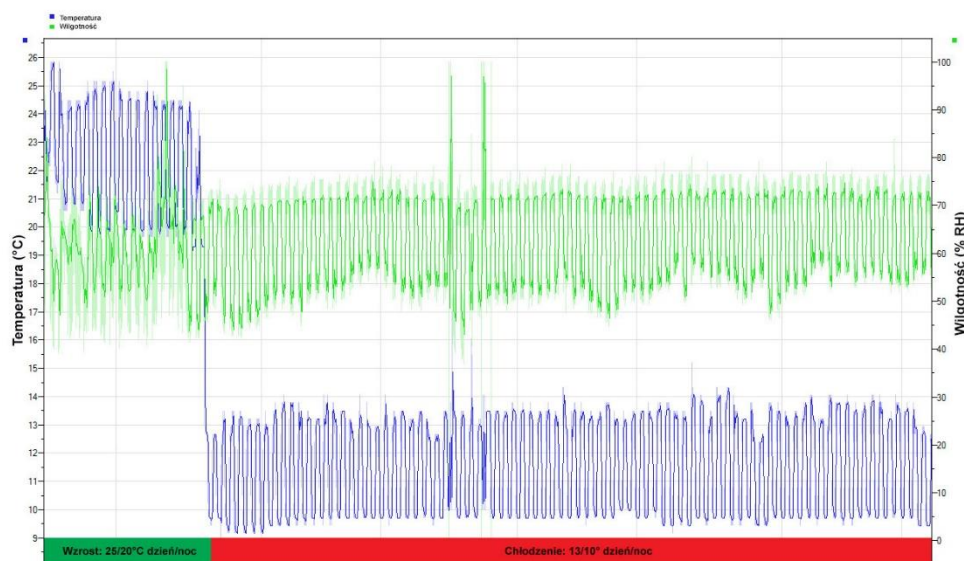
3.3. Układ doświadczeń i warunki wzrostu roślin

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w komorach wzrostowych (Fot. 1) w warunkach ściśle regulowanych. Warunki kiełkowania i początkowego wzrostu:

- temperatura 25/20°C (dzień/noc),
- fotoperiod 12 h (8:00-20:00),

- intensywność oświetlenia ok. $350 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$,
- wilgotność ok. 50%.

Podczas wzrostu roślin monitorowano temperaturę oraz wilgotność powietrza (Schemat 1). Dane były zapisywane co 15 minut rejestratorem temperatury i wilgotności Tinytag View 2 TV-4500 (Gemini Data Loggers Ltd, UK).



Schemat 1. Przykładowy schemat pomiaru temperatury i wilgotności powietrza w komorze wzrostowej przed chłodzeniem i w trakcie chłodzenia. Doświadczenia z III grupy.

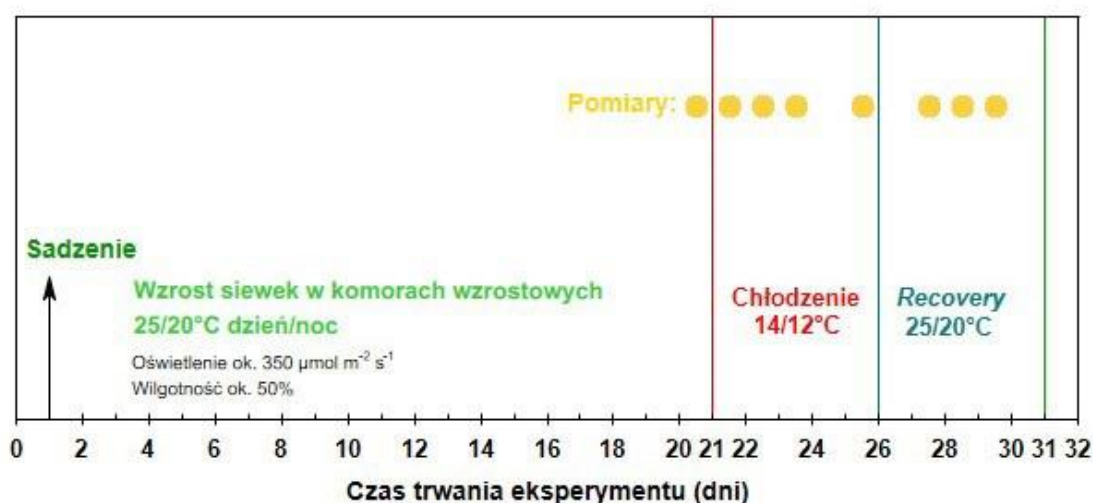
Wszystkie wazony wypełnione były taką samą mieszanką glebową, na którą składały się: ziemia uniwersalna Universal EKO-ZIEM (www.ekoziem.com.pl), przesiana przez sito oraz piasek, zmieszane w stosunku 4:1 (v/v).

I grupa doświadczeń

Doświadczenia przeprowadzono niezależnie dwa razy, na siewkach dwóch linii rodzicielskich sorga: M71 i SS79.

Celem tych doświadczeń była szczegółowa fenotypowa i fizjologiczna charakterystyka dwóch linii rodzicielskich sorga oraz poznanie procesów i cech, które odgrywają rolę w tolerancji sorga na działanie niskiej temperatury. Ponadto badania miały na celu poznanie fizjologicznych mechanizmów komunikacji korzenie - liście oraz hydraulicznej przewodności korzenia u sorga w warunkach chłodu.

Nasiona wysadzano po jednym do każdego wazonu na głębokość 2 cm. Siewki rosły w specjalnym systemie dwóch wazonów: pierwszy (górny, z otworami) wypełniony mieszanką glebową, umieszczony w drugim (dolnym) wypełnionym 50% pożywką Hoaglanda. Korzenie wyrastające z górnego wazonu zanurzone były w pożywce (Fot. 1A, B). W fazie w pełni wykształconego 3-go liścia, siewki poddano działaniu chłodu w 14/12 °C dzień/noc (Schemat 2). Po pięciu dniach traktowania chłodem następował 5-dniowy okres odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*), w którym warunki wzrostu roślin były takie same jak przed chłodzeniem.



Schemat 2. Schemat I grupy doświadczeń. Siewki sorga rosły w komorze wzrostowej w warunkach kontrolnych do fazy w pełni wykształconego 3-go liścia. Po 21 dniach wzrostu poddano je chłodzeniu. Po pięciu dniach traktowania chłodem następował 5-dniowy okres odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*).

Zbadano następujące traktowania:

- Kontrola – rośliny rosnące w temperaturze 25/20°C (dzień/noc),
- Chłodzenie – rośliny rosnące w temperaturze 14/12°C (dzień/noc),
- Zdrowienie siewek po okresie stresu (*recovery*) – rośliny rosnące w temperaturze 25/20°C (dzień/noc).

II grupa doświadczeń

Doświadczenia przeprowadzono niezależnie dwa razy, na siewkach sześciu linii rodzicielskich sorga: M71, SS79, Etian, Keller, Ji2731 i Btx623.

Celem tych doświadczeń była fenotypowa i fizjologiczna charakterystyka ważnych dla

hodowców linii rodzicielskich sorga oraz określenie procesów i cech, które odgrywają rolę w tolerancji na chłód tego gatunku (A), a dodatkowo poznanie możliwości adaptacji sorga do chłodu poprzez hartowanie suszą siewek (B).

Doświadczenie A

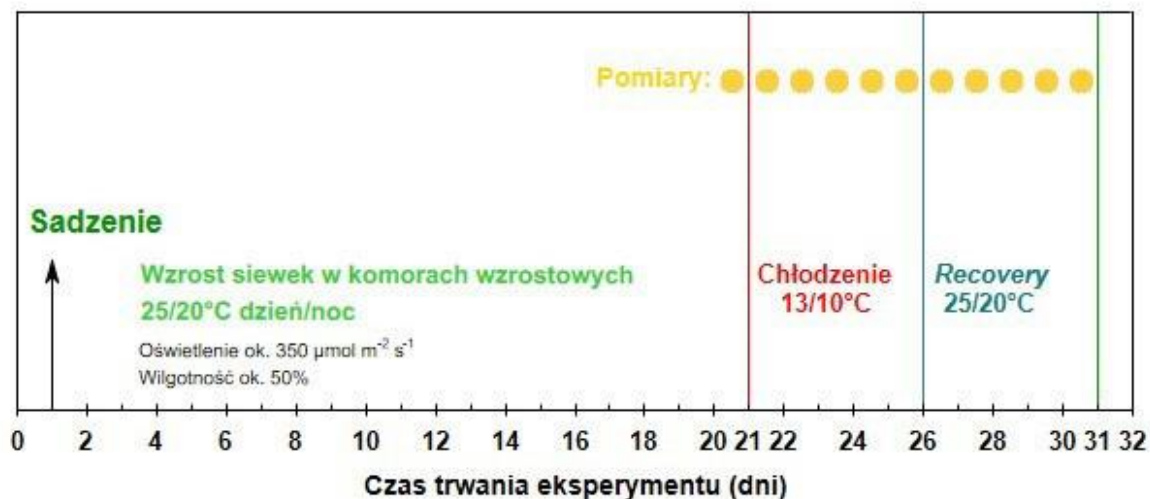
Nasiona wysiewano po 13 do każdego wazonu na głębokość 2 cm. W fazie w pełni wykształconego 3-go liścia, siewki poddano działaniu chłodu (Schemat 3). Po pięciu dniach traktowania chłodem następował 5-dniowy okres odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*). Warunki wzrostu roślin były takie same jak przed chłodzeniem.

Zbadano następujące traktowania:

- Kontrola – rośliny rosnące w temperaturze 25/20°C (dzień/noc),
- Chłodzenie – rośliny rosnące w temperaturze 13/10°C (dzień/noc),
- Zdrowienie siewek po okresie stresu (*recovery*) – rośliny rosnące w temperaturze 25/20°C (dzień/noc).

Doświadczenie B

Nasiona wysiewano po 13 do każdego wazonu na głębokość 2 cm. Doświadczenie przeprowadzono niezależnie dwa razy. Za każdym razem przygotowano po 6 wazonów dla jednej linii sorga (3 wazony – kontrola, 3 wazony – susza), każdy wazon po 13 roślin (w sumie 78 roślin dla jednej linii). Po 10 dniach wzrostu, w fazie drugiego liścia, siewki sześciu linii sorga podzielono na dwie grupy, każda grupa składała się z trzech wazonów dla każdej z sześciu linii. Grupy te były różnie podlewane. W pierwszej grupie roślin nietraktowanych suszą (kontrola) uwodnienie wynosiło 65% pełnej pojemności wodnej (PPW) stosowanej mieszanki glebowej, w drugiej grupie (hartowanie suszą) – 20% PPW. Po kolejnych 10 dniach, w fazie w pełni rozwiniętego 3-ego liścia, siewki z drugiej grupy podlano do 65% PPW gleby. Wszystkie rośliny (kontrola i hartowane suszą) zostały poddane chłodzeniu na okres 5 dni w temp. 13/10°C (dzień/noc).



Schemat 3. Schemat doświadczenia A - II grupy doświadczeń. Siewki sorga rosły w komorze wzrostowej w warunkach kontrolnych do fazy w pełni wykształconego 3-go liścia. Po 21 dniach wzrostu poddano je chłodzeniu. Po pięciu dniach traktowania chłodem następował 5-dniowy okres odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*).

Zbadano następujące traktowania:

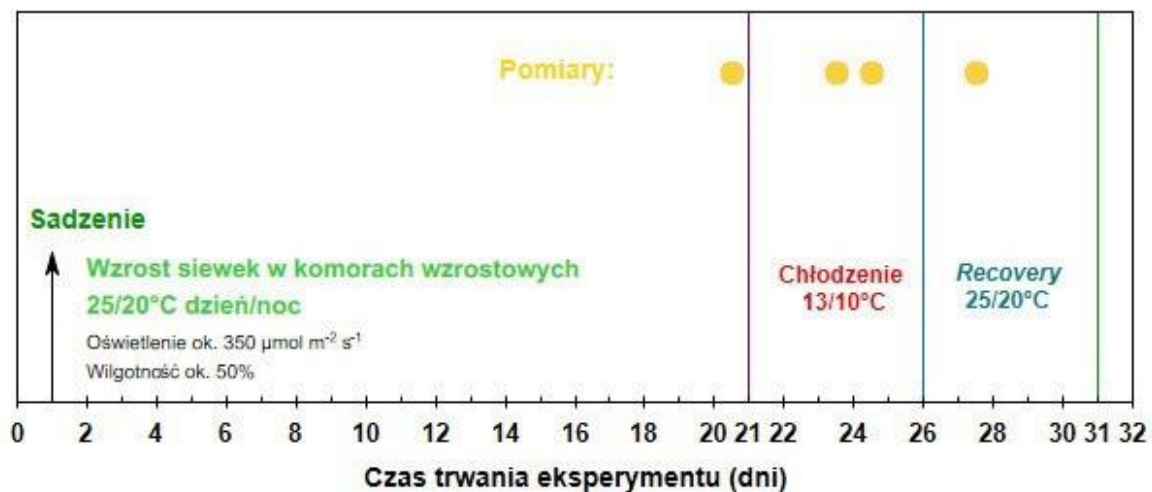
- Kontrola – po 20 dniach wzrostu: temperatura 25/20°C (dzień/noc), podlewanie optymalne (65% PPW),
- Hartowanie suszą – po 10 dniach wzrostu: temperatura 25/20°C (dzień/noc), podlewanie deficytowe (20% PPW),
- Chłód – w trakcie 5-go dnia chłodzenia: temperatura 13/10°C (dzień/noc), podlewanie optymalne (65% PPW),
- Susza/chłód – w trakcie 5-go dnia chłodzenia: temperatura 13/10°C (dzień/noc), rośliny uprzednio hartowane suszą, podlewanie deficytowe (20% PPW).

III grupa doświadczeń

Doświadczenia przeprowadzono na siewkach czterech populacji mapujących oraz ich linii rodzicielskich: JxE (176 linii + 2 linie rodzicielskie: Ji2731 i Etian), SxM (41 linii + 2 linie rodzicielskie: SS79 i M71), SxE (50 linii + 2 linie rodzicielskie: SS79 i Etian), SxJ (49 linii + 2 linie rodzicielskie: SS79 i Ji2731).

Celem badań była fenotypowa i fizjologiczna charakterystyka populacji mapujących sorga i ich linii rodzicielskich mająca na celu identyfikację potencjalnych cech różnicujących odpowiedź danych genotypów na działanie chłodu.

Nasiona wysiewano po 13 do każdego wazonu na głębokość 2 cm. W fazie w pełni wykształconego 3-go liścia, siewki poddano działaniu chłodu (Schemat 4). Po pięciu dniach traktowania chłodem następował 5-dniowy okres odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*). Warunki wzrostu roślin były takie same jak przed chłodzeniem.



Schemat 4. Schemat III grupy doświadczeń. Siewki sorga rosły w komorze wzrostowej w warunkach kontrolnych do fazy w pełni wykształconego 3-go liścia. Po 21 dniach wzrostu poddano je chłodzeniu. Po pięciu dniach traktowania chłodem następował 5-dniowy okres odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*).

Zbadano następujące traktowania:

- Kontrola – rośliny rosnące w temperaturze 25/20°C (dzień/noc),
- Chłodzenie – rośliny rosnące w temperaturze 13/10°C (dzień/noc),
- Zdrowienie siewek po okresie stresu (*recovery*) – rośliny rosnące w temperaturze 25/20°C (dzień/noc).



Fot. K. Kaczanowska

Fot. 1. Siewki sorga w komorze wzrostowej, w fazie w pełni wykształconego trzeciego liścia: doświadczenia z grupy I (A, B), II (C) i III (D).

3.4. Pomiary parametrów fizjologicznych

3.4.1. Parametry fluorescencji chlorofilu

Pomiary fluorescencji chlorofilu wykonano fluorymetrem PAM 2000 (PulsAmplituden-Modulations-Fluorometer; Walz, Meß- und Regeltechnik, Niemcy) (Fot. 2).

Zmierzono i wyliczono następujące parametry fluorescencji chlorofilu *a* (www.walz.com):

- F_o' – minimalna wydajność fluorescencji, fluorescencja początkowa na świetle - jest miarą emisji fluorescencji, gdy pierwsze stabilne akceptory elektronów w PSII są utlenione i zachodzi wygaszanie nefotochemiczne,
- F_m' – maksymalna wydajność fluorescencji, fluorescencja maksymalna na świetle - oznacza maksymalny poziom fluorescencji chlorofilu mierzony, gdy roślina lub próbka jest oświetlona i PSII jest w pełni zredukowany (wszystkie

centrum reakcji PSII są zamknięte), mierzy się po krótkim, intensywnym błysku światła,

- $F_v' = F_m' - F_o'$, fluorescencja zmienna, wartość tego parametru uzależniona jest od maksymalnej wydajności kwantowej PSII,
- qP – wygaszanie fotochemiczne – określa proporcję energii świetlnej zaabsorbowanej przez PSII do energii wykorzystanej przez otwarte centra do reakcji fotosyntezy,
- F_v'/F_m' – maksymalna (potencjalna) fotochemiczna wydajność PSII – jest miernikiem aktywności fotochemicznej aparatu fotosyntetycznego,
- Φ_{PSII} , YIELD – efektywna (rzeczywista) wydajność kwantowa fotosystemu II - na podstawie tego parametru określany jest stosunek kwantów wykorzystanych w przemianach fotochemicznych do całkowitej liczby zaabsorbowanych kwantów (Kalaji and Łaboda, 2010; Maxwell and Johnson, 2000).

Pomiary fluorescencji chlorofilu *a* wykonano we wszystkich doświadczeniach:

Doświadczenia z grupy I i II: dzień przed rozpoczęciem chłodzenia (kontrola), przez 5 dni w trakcie chłodzenia oraz przez 5 dni w trakcie odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*) (Schemat 2, 3).

Doświadczenia z grupy III: dzień przed chłodzeniem (kontrola), w trakcie 3-go dnia chłodzenia oraz 2-go dnia odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*) (Schemat 4).

Pomiary fluorescencji chlorofilu *a* wykonywano w godzinach południowych między 11:00 a 14:00. Fluorescencję chlorofilu mierzono na roślinach zaadaptowanych do światła. Impuls światła wzbudzającego wynosił $10\ 000\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. Z każdej linii i z każdego traktowania wybierano losowo trzy rośliny, a pomiary wykonywano na trzech pierwszych liściach, na środku blaszki liściowej, omijając główną wiązkę (w I i II grupie doświadczeń: $n=18$, w III: $n=9$).



Fot. K. Kaczanowska

Fot. 2. Fluorymetr PAM 2000 służący do pomiarów fluorescencji chlorofilu.

3.4.2. Przewodność aparatów szparkowych

Stopień otwarcia aparatów szparkowych zmierzono za pomocą porometru Delta-T typ AP4 (Delta-T Devices, UK) (Fot. 3). Urządzenie to mierzy czas potrzebny do uwolnienia do komory pomiarowej określonej ilości pary wodnej przez aparaty szparkowe zdefiniowanej części liścia. Uzyskaną wartość porównuje z płytką kalibracyjną, w której określone rozmiary otworów odpowiadają poszczególnym wartościom przewodności szparkowej. Na tej podstawie urządzenie wylicza wartość przewodności szparkowej w $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (www.delta-t.co.uk/index.html).

Pomiary przewodności szparkowej wykonano we wszystkich doświadczeniach:

Doświadczenia z grupy I i II: dzień przed rozpoczęciem chłodzenia (kontrola), przez 5 dni w trakcie chłodzenia oraz przez 5 dni w trakcie odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*) (Schemat 2, 3),

Doświadczenia z grupy III: dzień przed chłodzeniem (kontrola), w trakcie 3-go dnia chłodzenia oraz 2-go dnia odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*) (Schemat 4).

Pomiary przewodności szparkowej wykonywano w godzinach południowych pomiędzy 11:00 a 14:00. Z każdej linii i z każdego traktowania wybierano losowo dwie rośliny, a pomiary wykonywano na trzech pierwszych liściach, omijając główną wiązkę przewodzącą (w I i II grupie doświadczeń: $n=12$, w III: $n=6$).



Fot. K. Kaczanowska

Fot. 3. Porometr Delta-T typ AP4 do pomiarów przewodności szparkowej.

3.4.3. Zawartość kwasu abscysynowego

Pomiar zawartości kwasu abscysynowego (abscisic acid, ABA) wykonano immunometodą ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) wg zmodyfikowanego protokołu Walker-Simmons and Abrams (Walker-Simmons and Abrams, 1991) z zastosowaniem monoklonalnych, specyficznych antyciał MAC 252 (Babraham Technix, Cambridge, UK). Absorbancję mierzono czytnikiem płytek mikrotitracyjnych Model 680 (Bio-Rad Laboratories, USA) przy długości fali 405 nm. Stężenie ABA w próbach roślinnych obliczano na podstawie wartości absorbancji uzyskanych dla roztworów standardów kwasu abscysynowego o znanym stężeniu. Schematyczny przebieg reakcji i zasadę pomiaru przedstawiono na Ilustracji 3. Zawartość ABA mierzono w korzeniach, liściach i soku ksylemu.

Przygotowanie materiału i oznaczenie zawartości ABA:

Liście:

Doświadczenia z grupy I i II: dzień przed rozpoczęciem chłodzenia (kontrola), przez 5 dni w trakcie chłodzenia oraz przez 5 dni w trakcie odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*) (Schemat 2, 3).

Doświadczenia z grupy III: dzień przed chłodzeniem (kontrola), w trakcie 4-go dnia chłodzenia oraz 2-go dnia odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*) (Schemat 4).

Próby pobierano ze środkowej części pierwszego, drugiego i trzeciego liścia siewki. Każda próba pochodziła co najmniej z dwóch roślin. Dla obiektu pobierano trzy próby

a każdą próbę mierzono dwa razy na niezależnych płytkach. W I i II grupie doświadczeń: n=12 – każde doświadczenie wykonywano dwa razy, w III grupie: n=6.

Procedura przygotowania prób i pomiaru ABA:

1. Ważenie zebranych liści i zamrażanie w ciekłym azocie, a następnie umieszczenie ich w zamrażarce w temperaturze -40°C .
2. Liofilizowanie prób (LABCONCO, USA) i rozbijanie przez 6 minut w młynku kulowym MM400 (Retsch, Niemcy).
3. Zalewanie prób 1,5 ml schłodzonej, destylowanej wody.
4. Podgrzewanie prób przez 3 min. w termo-blokach w temperaturze 90°C w celu dezaktywacji enzymów (białek) oraz lepszej dezintegracji subcelularnych struktur próby.
5. Po ostygnięciu do temperatury pokojowej, zamrożenie prób w -40°C do następnego dnia.
6. Rozmrożenie prób i ekstrahowanie w ciemności na wytrząsarce Yellow Line OS 5 Basic (560 cykli/min.) w temperaturze 4°C (komora CH 500 VL, Angelantoni Life Science, Włochy) przez ok. 18 h.
7. Wirowanie prób przez 20 min. w schłodzonej do 4°C wirówce MPW 350R (MPW MED. INSTRUMENTS, Polska; 15 000 obrotów/min., 18 000 g).
8. Odpipetowanie supernatantu do 1,5 mL naczynek typu Eppendorf.
9. Ponowne zamrożenie prób na noc, następnie odmrożenie, wirowanie (warunki j.w.) i odpipetowanie supernatantu.
10. Pomiar zawartości ABA wykonywany był bezpośrednio w ekstrakcie wodnym albo w odpowiednio rozcieńczonym supernatancie w zależności od spodziewanego stężenia ABA. Przyjęto, że po rozcieńczeniu stężenie ABA powinno wahać się od 125 do 4000 pg w 100 μL używanego ekstraktu wodnego. Pojedynczą próbę mierzono trzy razy (na różnych płytkach).

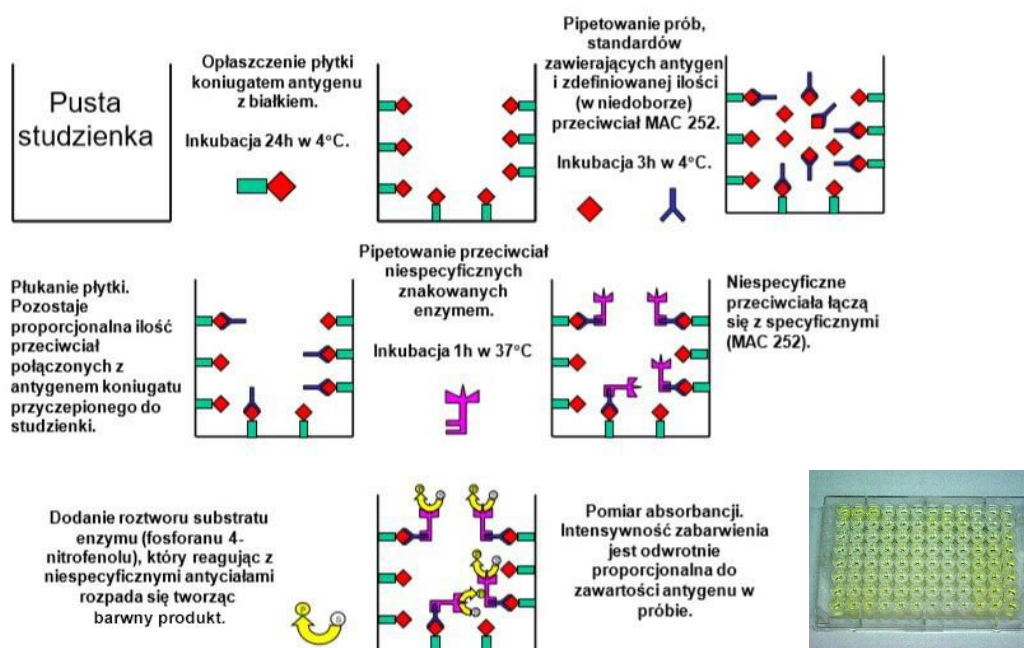
Korzenie:

Doświadczenia z grupy I: próby do analiz pobrano dzień przed rozpoczęciem chłodzenia (kontrola), w trakcie 1-go, 2-go, 3-go i 5-go dnia chłodzenia oraz 2-go, 3-go i 4-go dnia odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*). Próby pobierano z części systemu korzeniowego wyrastającego z górnego wazonu i osuszano na papierowych ręcznikach. Następnie korzenie z dwóch roślin

cięto, dzielono na trzy części (3 próby), ważono, zamrażano w ciekłym azocie, a następnie umieszczano w zamrażarce w temperaturze -40°C . Próby do pomiarów przygotowywano według procedury opisanej dla liści ($n=12$).

Sok ksylemu:

Doświadczenia z grupy I: próby do analiz pobrano dzień przed rozpoczęciem chłodzenia (kontrola), w trakcie 1-go, 2-go, 3-go i 5-go dnia chłodzenia oraz 2-go, 3-go i 4-go dnia odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*). Sok ksylemu z fragmentów części nadziemnych uzyskiwano poprzez ich odwirowanie przez 20 min. przy 4000 obrotach/min. (2500g) w schłodzonej do 4°C wirówce MPW 350R (MPW MED. INSTRUMENTS, Polska); Próby następnie zamrażano w -60°C . Przed pomiarem sok rozmrażano i odwirowano przez 20 min. przy 15 000 obrotach/min., 18 000 g w schłodzonej do 4°C wirówce MPW 350R. Po wirowaniu odpipetowano supernatant i wykonano pomiar zawartości ABA ($n=12$).



Fot. K. Kaczanowska

Ilustracja 3. Schemat pośredniej metody ELISA; wg Folkard Asch, zmodyfikowany. (Abscisic acid determination through ELISA, last update 6/04/2001, www.asch-online.eu/downloads/hormones/ELISA%20Manual.pdf).

3.4.4. Potencjał osmotyczny

Pomiar potencjału osmotycznego prób z liści oraz korzeni wykonano krioskopowym osmometrem OSMOMAT 030-D (Gonotec GmbH, Berlin, Niemcy) (Fot. 4). Na

podstawie pomiaru osmolarności prób (Osmol kg^{-1}) wyliczono potencjał osmotyczny (MPa) wg wzoru: $\text{Osmolarność} \times (R \times TK/1000)$, gdzie R jest stałą gazową a T temperaturą w skali Kelvina. Przed wykonaniem pomiarów osmometr kalibrowano trzema punktami: ustanawiano zero wodą podwójnie destylowaną, a następnie kalibrowano dwoma roztworami kalibracyjnymi 300 i 850 mOsmol kg^{-1} .

Próby pobrano we wszystkich doświadczeniach:

Doświadczenia z grupy I:

Liście: dzień przed rozpoczęciem chłodzenia (kontrola), przez 5 dni w trakcie chłodzenia oraz przez 5 dni w trakcie odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*).

Korzeń: dzień przed rozpoczęciem chłodzenia (kontrola), w trakcie 1-go, 2-go, 3-go i 5-go dnia chłodzenia oraz 2-go, 3-go i 4-go dnia odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*) (Schemat 2).

Doświadczenia z grupy II: dzień przed rozpoczęciem chłodzenia (kontrola), przez 5 dni w trakcie chłodzenia oraz przez 5 dni w trakcie odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*) (Schemat 3).

Doświadczenia z grupy III: dzień przed chłodzeniem (kontrola), w trakcie 4-go dnia chłodzenia oraz 2-go dnia odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*) (Schemat 4).

Próby pobierano z środkowej części trzeciego oraz czwartego liścia, a w przypadku korzenia z jego środkowej części (2 rośliny/1 próba) i zamrażano w -40°C . Przed pomiarem próby odtajano przez 10 minut, a następnie przekładano do strzykawek 2 mL (Braun Melsungen AG, Niemcy) i standardowo wyciskano sok przez ok. 1 min. przy nacisku do 30 kg. Uzyskany sok z próby wirowano przez 10 min. w wirówce (MPW-55, MPW MED. INSTRUMENTS, Polska) przy obrotach 15 000 obrotów/min., 18 000 g. Do pomiaru pipetowano 50 μL próby z nad osadu.

Potencjał osmotyczny mierzono dla każdej próby dwukrotnie. Pomiar polegał na przechłodzeniu próby do temperatury -7°C , wzbudzeniu jej krystalizacji oraz rejestracji i analizie przebiegu temperatury w czasie krystalizacji (w I i II grupie doświadczeń: $n=12$, w III: $n=6$).



Fot. K. Kaczanowska

Fot. 4. Osmometr OSMOMAT 030-D służący do pomiarów potencjału osmotycznego.

3.4.5. Całkowita aktywność drobnocząsteczkowych antyoksydantów

Całkowitą aktywność drobnocząsteczkowych antyoksydantów zmierzono metodą spektrofotometryczną wykorzystującą stabilny rodnik DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylohydrazyl) (Brand-Williams et al., 1995), którą zaadaptowano na płytki mikrotitracyjne (96 studzienek, pojedyncza studzienka o pojemności $300\ \mu\text{L}$). Metoda ta zakłada, że na skutek reakcji z występującymi w próbce antyoksydantami rodnik DPPH zostaje zneutralizowany, co objawia się zmianą zabarwienia metanolowego roztworu rodnika z fioletowej na żółtą i spadkiem absorbancji. Spadek absorbancji jest proporcjonalny do sumarycznej zawartości i aktywności wszystkich małowcząsteczkowych antyoksydantów w próbce. Substancję wzorcową w przeprowadzonych analizach stanowił Trolox, pipetowany w odpowiednich stężeniach: 4, 3, 2.5, 2, 1.75, 1.5, 1.25, 1, 0.75 mM. Na podstawie wartości absorbancji tych roztworów została wykreślona krzywa wzorcowa, z której odczytano aktywność antyoksydantów w próbach i wyrażono jako ekwiwalent $\mu\text{mol Troloxu/g DW}$ (Laskoś et al., 2021).

Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej wykonano w:

Doświadczeniach z grupy I:

Liście: dzień przed rozpoczęciem chłodzenia (kontrola), przez 5 dni w trakcie chłodzenia oraz przez 5 dni w trakcie odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*).

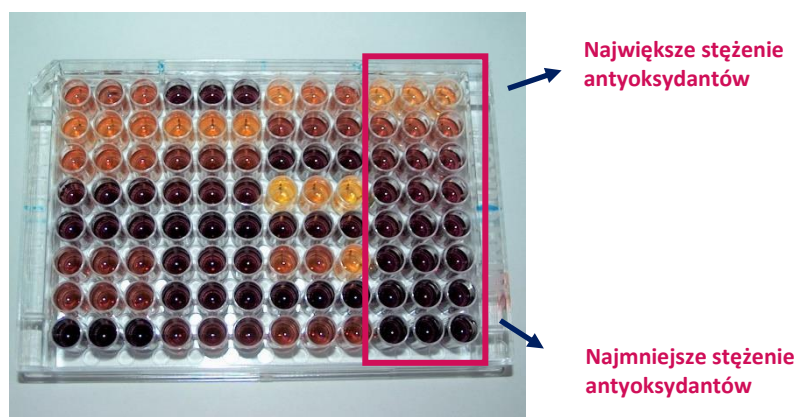
Korzeń: dzień przed rozpoczęciem chłodzenia (kontrola), w trakcie 1-go, 2-go, 3-go i 5-go dnia chłodzenia oraz 2-go, 3-go i 4-go dnia odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*) (Schemat 2).

Doświadczeniach z grupy II: dzień przed rozpoczęciem chłodzenia (kontrola), przez 5 dni w trakcie chłodzenia oraz przez 5 dni w trakcie odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*) (Schemat 3).

Pojedynczą próbę pobierano ze środkowej części trzeciego i czwartego liścia dwóch siewek, a w przypadku korzenia z części systemu korzeniowego dwóch siewek wyrastającego z górnego wazonu (materiał cięto i dzielono na trzy próby, w I i II grupie doświadczeń: n=12).

Przygotowanie materiału i oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej:

1. Rozbijanie prób w młynku kulowym MM400 (Retsch, Niemcy) przez 6 minut.
2. Zalanie prób 50% etanolem i ekstrakcja na wytrząsarce przez 2 h w temperaturze pokojowej.
3. Odwirowanie prób przez 20 minut w temperaturze 4°C przy obrotach 15 000 / min., 18 000 g w wirówce MPW 350R (MPW MED. INSTRUMENTS, Polska) i odpipetowanie ekstraktu.
4. Pipetowanie na płytkę: najpierw próby (40 µL) oraz Trolox (16,5 µL), a następnie dodanie do wszystkich studzienek 0,5 mM metanolewego roztworu DPPH (250 µL).
5. Termostatowanie płytki w temperaturze 37°C przez 30 minut w celu zapewnienia całkowitego przebiegu reakcji (Fot. 5).
6. Pomiar absorbancji wykonany czytnikiem płytek mikrotitracyjnych Model 680 (Bio-Rad Laboratories, USA) przy długości fali 515 nm. Każdą próbę pipetowano do trzech studzienek. Pomiar powtarzano co najmniej dwa razy na różnych płytkach.



Fot. K. Kaczanowska

Fot. 5. Płytkę mikrotitracyjną z próbkami i roztworem DPPH po 30 min. termostatowania w temp. 37°C. W prostokątnej ramce zaznaczono standard Trolox.

3.4.6. Wartość pH

Pomiar pH wykonano pH metrem pH 211 (Hanna Instruments, Niemcy) z zastosowaniem mikroelektrody HANHI1330B w soku ksylemu zebranym z części nadziemnych siewek tuż nad korzeniem. Próby pobierano ze środkowej części pierwszego, drugiego i trzeciego liścia siewki. Sok ksylemu z fragmentów części nadziemnych uzyskiwano poprzez ich odwirowanie przez 20 min. przy 4000 obrotach/min. (2500g) w schłodzonej do 4°C wirówce MPW 350R (MPW MED. INSTRUMENTS, Polska); Próby następnie zamrażano w -60°C. Przed pomiarem sok rozmrażano i odwirowano przez 20 min. przy 15 000 obrotach/min., 18 000 g w schłodzonej do 4°C wirówce MPW 350R. Po wirowaniu odpipetowano supernatant i wykonano pomiar pH metrem.

Oznaczenia pH wykonano na próbach soku ksylemu przeznaczonych do pomiaru kwasu abscysynowego. Pomiary wykonywano w temperaturze pokojowej, odczytując wartości po 1 minucie od zanurzenia elektrody w próbce. Pomiary wykonano w I grupie doświadczeń (n=12).

3.4.7. Przewodność hydrauliczna

Pomiary przewodnictwa hydraulicznego korzeni wykonano za pomocą aparatu HPFM (High Pressure Flow Meter) produkcji Dynamax Inc, USA. Aparat ten służy do pomiarów objętości wody dostarczanej pod ciśnieniem do badanych organów (Tyree

et al., 1995), co umożliwia określenie przewodności hydraulicznej zarówno liści (Tyree et al., 2005), pędów (Cochard et al., 2000), jak i korzeni (Tyree et al., 1995).

Pomiary wykonano dzień przed rozpoczęciem chłodzenia (kontrola) oraz w trakcie 2-go dnia chłodzenia w I grupie doświadczeń. Zastosowano stałe ciśnienie 1,5 atm. I zmierzono przepływ wody przez korzeń w czasie ($\text{kg s}^{-1} \text{MPa}^{-1} \text{m}^{-1}$).

3.5. Pomiary uszkodzeń chłodowych

3.5.1. Wpływ elektrolitów

Pomiar wypływu elektrolitów z tkanek roślinnych wykonano za pomocą konduktometru CC-550 (Elmetron, Polska). Wpływ wewnątrzkomórkowych elektrolitów mierzono jako wzrost elektroprzewodnictwa ich wodnych dyfuzatów (Lieberman et al., 1958).

Wpływ elektrolitów mierzono w III grupie doświadczeń w populacji mapującej JxE w piątym dniu chłodzenia.

Ocenę uszkodzeń membran cytoplazmatycznych dokonano na podstawie wypływu elektrolitów z fragmentów liści po drugim chłodzeniu. Do naczynka scyntylacyjnego odmierzano 15 mL wody redestylowanej, a następnie wkładano 8 fragmentów ok. 1 cm wyciętych ze środkowych części 3-go i 4-go liścia pobranych z dwóch roślin (po dwa fragmenty z jednego liścia).

Próby wytrząsano na wytrząsarce MWX-8 (Biomix, Polska) przez 24h w temperaturze ok. 20°C, w ciemności, a następnie mierzono elektroprzewodnictwo prób (Lt). Potem próby zamrażano w celu zabicia materiału roślinnego i określenia całkowitej zawartości elektrolitów we fragmentach liści prób. Po odtajaniu, wytrząsaniu przez kolejne 24h i osiągnięciu przez próby temperatury ok. 20°C ponownie mierzono elektroprzewodnictwo roztworu, otrzymując całkowitą zawartość elektrolitów w materiale roślinnym (Lk). Wpływ elektrolitów (EL) przedstawiono w procentach ich całkowitej zawartości w tkance:

$$\text{EL} = \text{Lt} / \text{Lk} * 100 [\%]$$

Dla każdej linii wykonywano 6 powtórzeń (n=6).

3.5.2. Zazielenienie liści

Zazielenienie liści oznaczano na podstawie pomiaru ogólnej zawartości chlorofilu, którą mierzono metodą fotometryczną przy pomocy urządzenia SPAD-502 Plus (*Soil Plant Analysis Development*, Konica Minolta, Japonia). Pomiar wykonywano przez umieszczenie liścia (omijając główną wiązkę) w szczelinie i domknięcie głowicy pomiarowej, a uzyskane wartości wyliczane były na podstawie ilości promieniowania przepuszczonego przez liść. Miernik urządzenia emituje światło pomiarowe o długości fali 650 i 940 nm ze źródła światła LED, odmiennie absorbowane przez chlorofil. Fale po przejściu przez blaszkę liściową docierają do receptora, który przetwarza je na sygnał elektryczny. Wzmocniony sygnał jest zamieniany na sygnał elektroniczny i podawany w jednostkach umownych, nazywanych odczytami SPAD. Uzyskane wartości są proporcjonalne do zawartości chlorofilu w liściu (www.konicaminolta.eu/en/measuring-instruments/products/colour-measurement/chlorophyll-meter/spad-502plus/introduction.html).

Pomiar wykonywano trzykrotnie na czwartym liściu (dolna, środkowa i górna część blaszki liściowej) trzech roślin z trzech różnych wazonów (n=9).

Ogólną zawartość chlorofilu w liściach mierzono w doświadczeniach z grupy III w trakcie 2-go dnia odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*).

3.6. Analiza statystyczna wyników

Doświadczenia przeprowadzono w komorach wzrostowych w układzie całkowicie rozlosowanym. Dla badanej linii w doświadczeniu zakładano 3 wazony (grupa doświadczeń III z liniami populacji mapujących), 6 wazonów (grupa doświadczeń II) - w każdym wazonie wysadzano 13 roślin albo 30 wazonów (grupa doświadczeń 1) - w każdym po 1 roślinie. Pomiarów poszczególnych parametrów i cech fizjologicznych w doświadczeniach wykonano w 6 (stan aparatów szparkowych, potencjał osmotyczny, poziom ABA, aktywność antyoksydacyjna, wartość pH soku ksylemu, wpływ elektrolitów) lub 9 (zazielenienie liści, fluorescencja chlorofilu) powtórzeniach dla obiektu. Analizę statystyczną zmienności wyników parametrów/cech w poszczególnych doświadczeniach przeprowadzono pakietem statystycznym STATICTICA 12 (StatSoft, USA) w układzie wieloczynnikowym (czynniki: linie

i traktowanie). Prezentując wyniki w postaci graficznej lub tabel zaprezentowano następujące statystyki: średnie arytmetyczne dla obiektów, błąd standardowy średniej (SE), najmniejszą statystycznie udowodnioną różnicę (LSD) dla porównania wszystkich obiektów na danej grafice/tabeli przy poziomie prawdopodobieństwa błędu $p \leq 0,05$ oraz grupy jednorodne średnich badanych obiektów w danym doświadczeniu wg wielokrotnego testu Duncana oznaczonych na grafikach/tabelach takimi samymi literami przy $p \leq 0,05$.

Współzależność między badanymi parametrami i cechami szacowano najczęściej na podstawie współczynnika korelacji liniowej Pearsona, a przy parametrach/cechach mogących mieć rozkład nienormalny, współczynnikiem korelacji rang Spearmana. Prezentując te współczynniki korelacji (r) określano ich statystyczna istotność dla poziomu prawdopodobieństwa błędu: * $p \leq 0,10$, ** $p \leq 0,05$ oraz *** $p \leq 0,01$.

4. WYNIKI

W ramach badań na siewkach sorga przeprowadzono trzy grupy doświadczeń:

4.1. I grupa doświadczeń

W pierwszej grupie doświadczeń przeprowadzono fizjologiczną charakterystykę 2 linii rodzicielskich sorga: M71 i SS79, gdzie oceniano:

- fizjologiczne reakcje części nadziemnej i korzenia na stres chłodu,
- sygnały komunikacji korzenie-liście,
- przewodność hydrauliczną korzeni sorga w warunkach chłodu.

Doświadczenia przeprowadzono niezależnie dwa razy. Siewki sorga rosły w komorze wzrostowej w warunkach kontrolnych do fazy w pełni wykształconego 3-go liścia. Po 21 dniach wzrostu poddano je chłodzeniu. Po pięciu dniach traktowania chłodem następował 5-dniowy okres odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*).

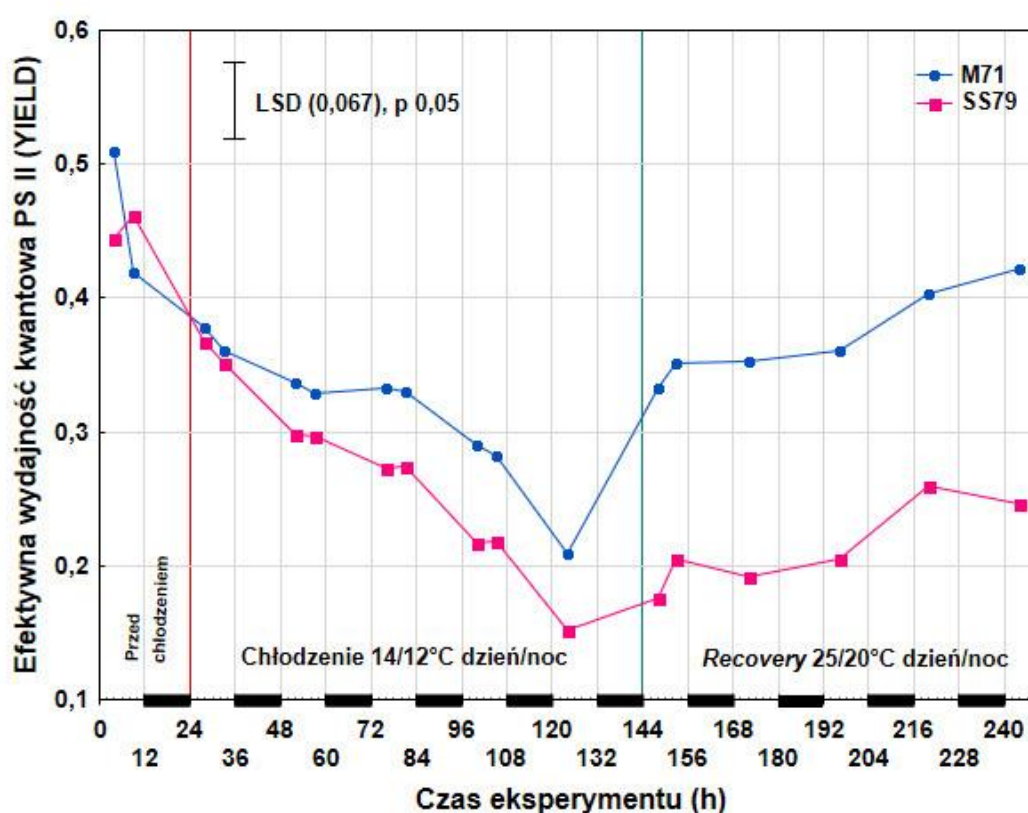
W pierwszej grupie doświadczeń zmierzono następujące parametry fizjologiczne:

- efektywną wydajność kwantową fotosystemu II (PSII),
- przewodność aparatów szparkowych
- zawartość kwasu abscysynowego (ABA)
- wartość pH
- potencjał osmotyczny
- całkowitą aktywność drobnocząsteczkowych antyoksydantów
- zawartość wody w tkankach
- przewodność hydrauliczną.

4.1.1. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II

Pomiary efektywnej wydajności kwantowej PSII – parametru fluorescencji chlorofilu *a* określanego jako YIELD - wykonano w temperaturze 25/20°C (dzień/noc) na roślinach zaadoptowanych do światła bezpośrednio przed działaniem chłodu, każdego dnia w trakcie 5 dni chłodzenia (14/12°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) u dwóch linii rodzicielskich sorga (M71 i SS79) (Schemat 2).

W pierwszym dniu chłodzenia nastąpił znaczny spadek wydajności kwantowej PSII mierzonej fluorescencją chlorofilu *a* (YIELD, Ryc. 1). Dalsze chłodzenie powodowało ciągły dalszy spadek tego parametru, a wśród badanych linii zaznaczały się znaczne różnice. Większy spadek wydajności fotosyntetycznej można było zaobserwować u linii wrażliwej na działanie chłodu (SS79), w porównaniu do linii tolerancyjnej (M71). Najbardziej zauważalne różnice pomiędzy badanymi liniami widoczne były jednak w trakcie trwania pięciu dni zdrowienia siewek po chłodzeniu (*recovery*). W piątym dniu *recovery* u linii bardziej tolerancyjnej wartości badanego parametru były bardzo zbliżone (0,42) do tych sprzed chłodzenia (0,51).

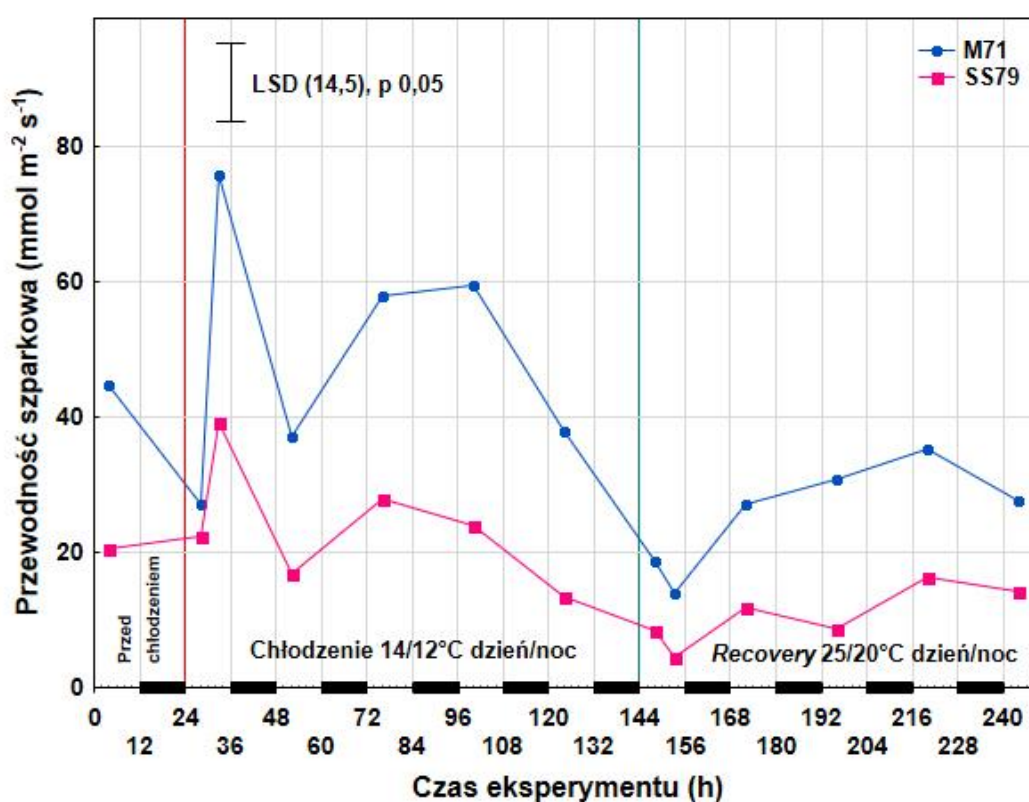


Rycina 1. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II (PSII) mierzona fluorescencją chlorofilu *a* (YIELD) trzech pierwszych liści dwóch linii rodzicielskich sorga bezpośrednio przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

4.1.2. Przewodność aparatów szparkowych

Pomiary przewodności szparkowej wykonywano przed chłodzeniem (25/20°C), każdego dnia w trakcie chłodzenia (14/12°C) oraz podczas pięciu dni trwania *recovery* (25/20°C) u dwóch linii rodzicielskich sorga (Schemat 2).

Pierwszy dzień chłodzenia spowodował otwarcie aparatów szparkowych u obu badanych linii (Ryc. 2), jednak już na początku drugiego dnia traktowania chłodem aparaty szparkowe u obydwu linii przymknęły się do poziomu sprzed działania chłodu. W trzecim oraz czwartym dniu traktowania chłodem przewodność szparkowa, zarówno u linii tolerancyjnej (M71) jak i bardziej wrażliwej (SS79) na chłód, była nieznacznie wyższa niż w warunkach kontrolnych. Natomiast, w pierwszym dniu *recovery* przewodność szparkowa była znacznie niższa niż przed działaniem chłodu u obu linii. W kolejnych dniach wartości te nieznacznie się zwiększyły, choć nie osiągnęły poziomu sprzed chłodzenia.

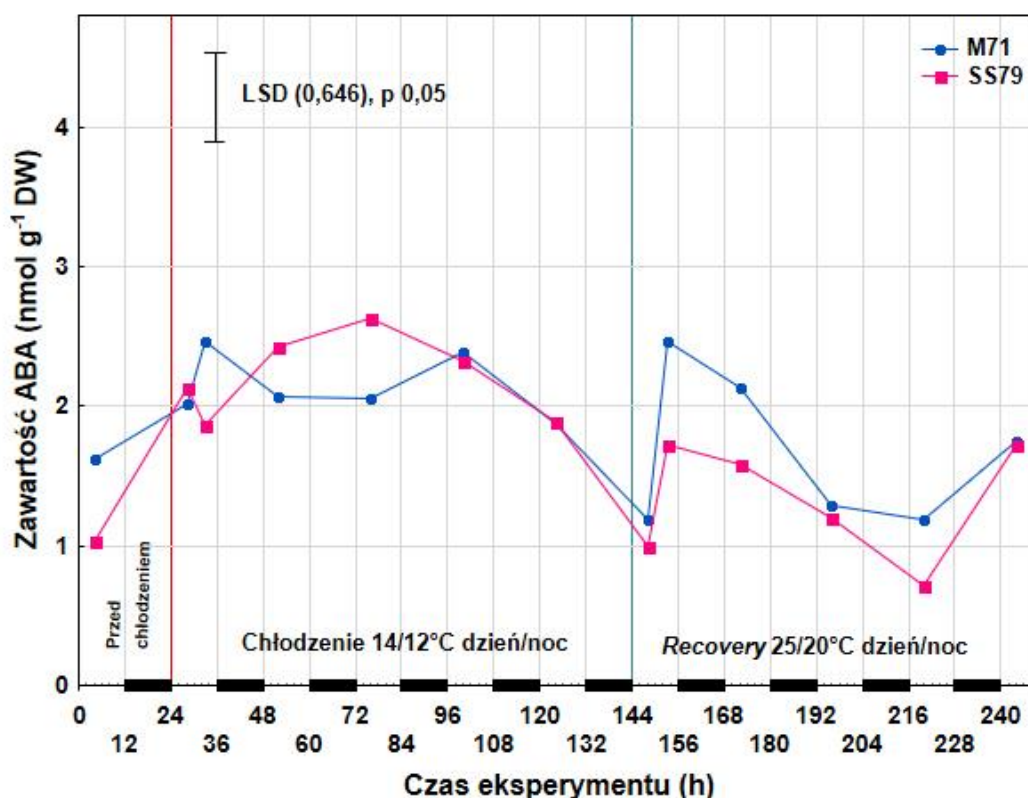


Rycina 2. Przebieg zmian przewodności szparkowej trzech pierwszych liści dwóch linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

4.1.3. Zawartość kwasu abscysynowego (ABA)

Zawartość ABA w liściach i korzeniach oraz stężenie ABA [ABA] w soku ksylemu mierzono u dwóch linii rodzicielskich sorga przed chłodzeniem, podczas traktowania chłodem oraz podczas pięciu dni trwania *recovery* (Schemat 2).

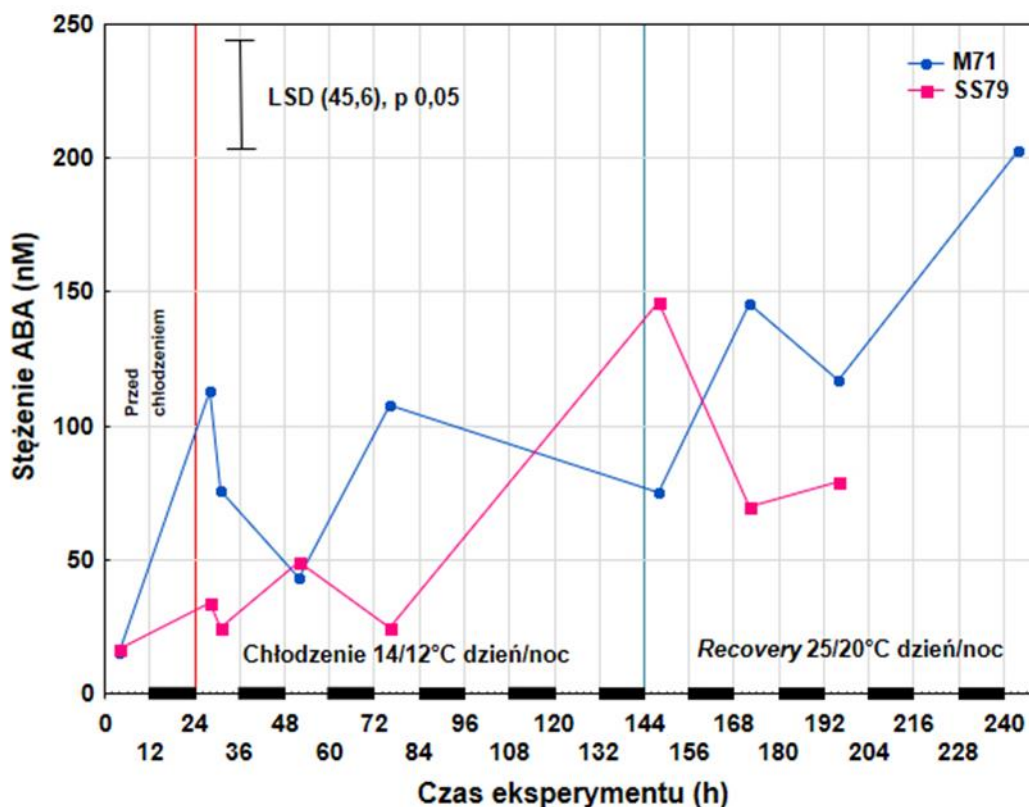
Zawartość ABA w liściach obu badanych linii wzrosła na początku chłodzenia (Ryc. 3), przy czym u linii wrażliwej na działanie chłodu (SS79) wzrost był nieco wyższy. W trakcie dalszego działania chłodu u obydwu linii poziom ABA utrzymywał się wciąż na wyższym poziomie w porównaniu do warunków kontrolnych. W pierwszych godzinach po zaprzestaniu działania chłodu, zawartość ABA spadła u obydwu linii do poziomu zbliżonego do kontroli a w następnych dwóch dniach gwałtownie przejściowo wzrosła. Podczas dalszego *recovery* poziom ABA był zbliżony do tego sprzed chłodzenia.



Rycina 3. Zawartość ABA w trzech pierwszych liściach dwóch linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

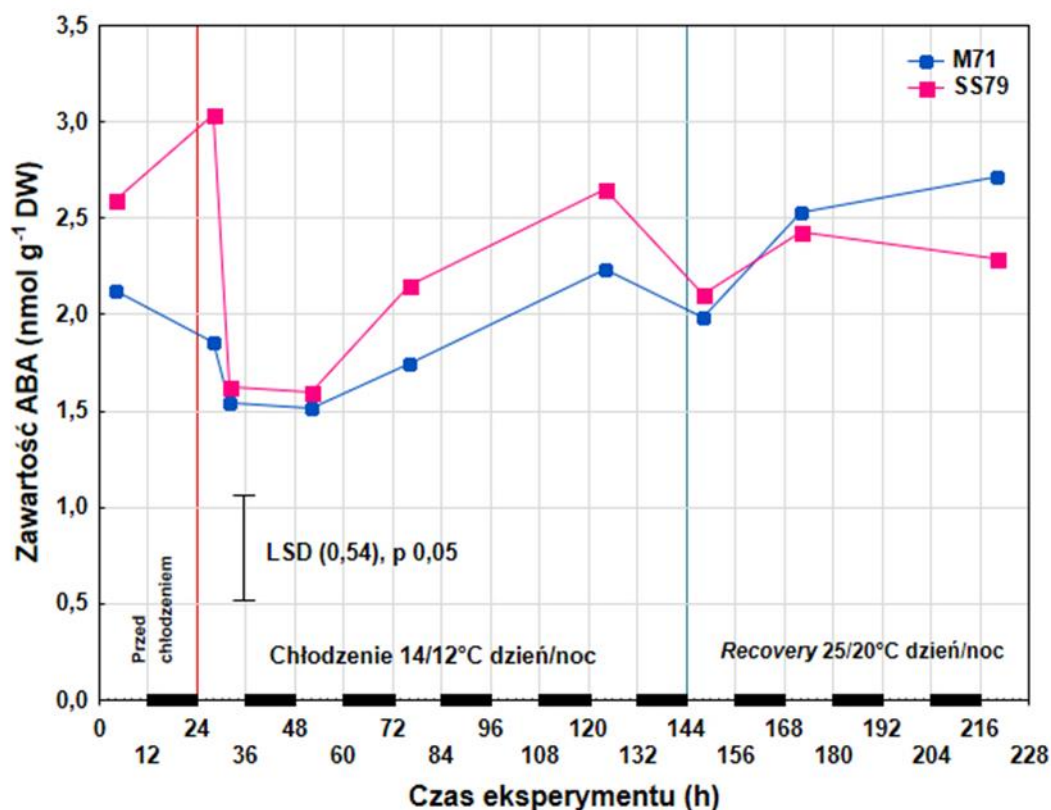
[ABA] soku ksylemu siewek sorga obu badanych linii było podobne w warunkach kontrolnych i wahało się w zakresie 15-18 nM (Ryc. 4). Jednak już po 4 h chłodzenia siewek [ABA] wzrosło istotnie u obu badanych linii, choć wzrost ten był dużo większy u linii bardziej tolerancyjnej na chłód (M71, 113 nM) w porównaniu z linią względnie wrażliwą na ten stres (SS79, 34 nM). W kolejnych godzinach chłodzenia [ABA] u linii SS79 utrzymywało się na prawie takim samym poziomie, natomiast u linii M71 znacznie spadło (47 nM). Dalsze chłodzenie powodowało znaczny wzrost [ABA] u linii

M71. Pierwszy dzień *recovery* spowodował wzrost [ABA] u linii wrażliwej na chłód (SS79), natomiast spadek u tolerancyjnej (M71). W trakcie kolejnych dni trwania *recovery* [ABA] nieznacznie spadło u linii SS79, a u linii M71 wzrosło, jednak wciąż było wyższe, u obydwu linii, w porównaniu do warunków sprzed rozpoczęcia chłodzenia i traktowania chłodem.



Rycina 4. Stężenie ABA w soku ksylemu dwóch linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

W pierwszym dniu chłodzenia poziom ABA w korzeniach obniżył się znacząco u obu badanych linii (Ryc. 5) i przez kolejne trzy dni wciąż utrzymywał się na niższym poziomie, w porównaniu do warunków sprzed chłodzenia. Pod koniec chłodzenia oraz w trakcie *recovery* poziom ABA u linii M71 i SS79 był podobny jak w warunkach kontrolnych.



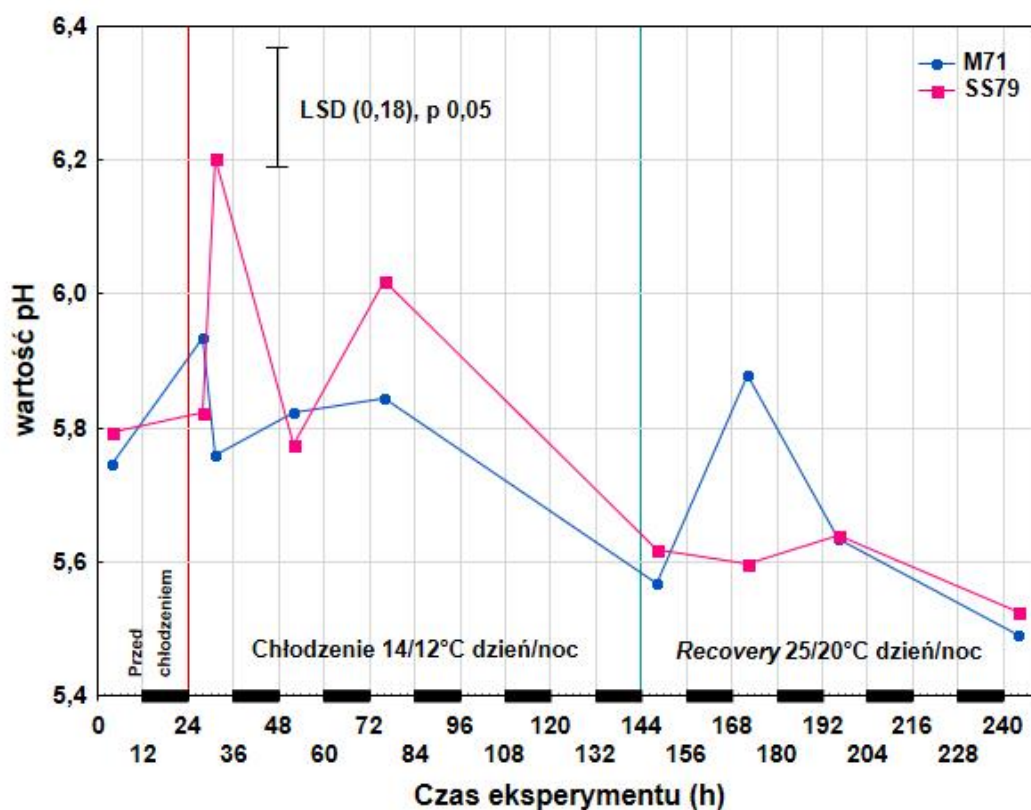
Rycina 5. Zawartość ABA w korzeniach dwóch linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

4.1.4. Wartość pH

Wartość pH mierzono w soku ksylemu oraz soku z liści u dwóch linii rodzicielskich sorga przed chłodzeniem, w trakcie działania chłodu oraz podczas każdego dnia trwania *recovery* (Schemat 2).

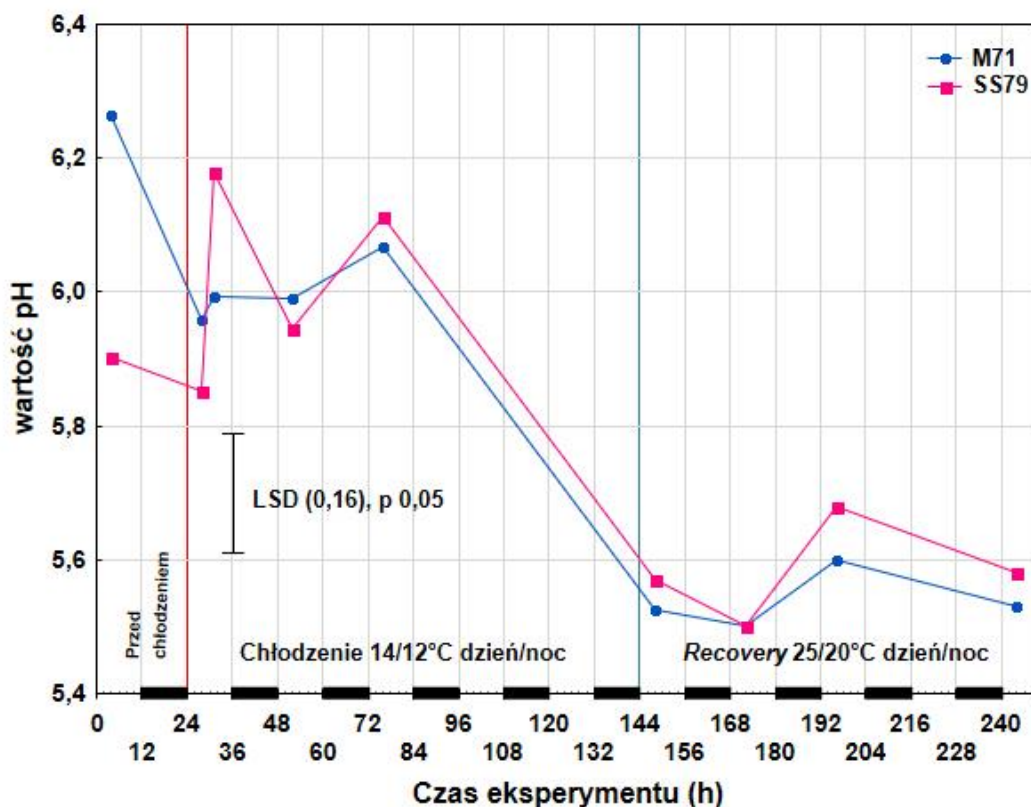
Wartość pH soku ksylemu dla obu linii wzrosła już po 4 h chłodzenia z 5,7 do 5,9 dla linii M71 i z 5,8 do 6,2 po 7h chłodzenia dla linii SS79 (Ryc. 6). W kolejnych dniach chłodzenia wartość pH soku ksylemu dla linii M71 utrzymywała się na nieznacznie wyższym poziomie w porównaniu do warunków sprzed chłodzenia, podobnie było u linii SS79, jednak tutaj na nieco wyższym poziomie w porównaniu do warunków kontrolnych. Natomiast przez większość czasu trwania *recovery* pH soku ksylemu,

zarówno u linii bardziej tolerancyjnej na działanie chłodu, jak i wrażliwej, było niższe w porównaniu do okresu chłodzenia.



Rycina 6. Wartości pH soku ksylemu u dwóch linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

Wartość pH soku z liści siewek sorga linii tolerancyjnej na chłód już po 4h chłodzenia spadła z 6,3 do 6,0 i w trakcie kolejnych dni chłodzenia wciąż utrzymywała się na niższym poziomie w stosunku do wartości sprzed działania chłodu (Ryc. 7). Natomiast u linii wrażliwej na chłód wartość pH wzrosła z 5,9 do 6,2 po 7h chłodzenia i w trakcie trwania chłodu wartość ta wciąż była wyższa niż przed chłodzeniem. Pierwszy dzień *recovery* spowodował dramatyczny spadek wartości pH soku z liści u obydwu badanych linii, który utrzymywał się podczas całego okresu *recovery*.



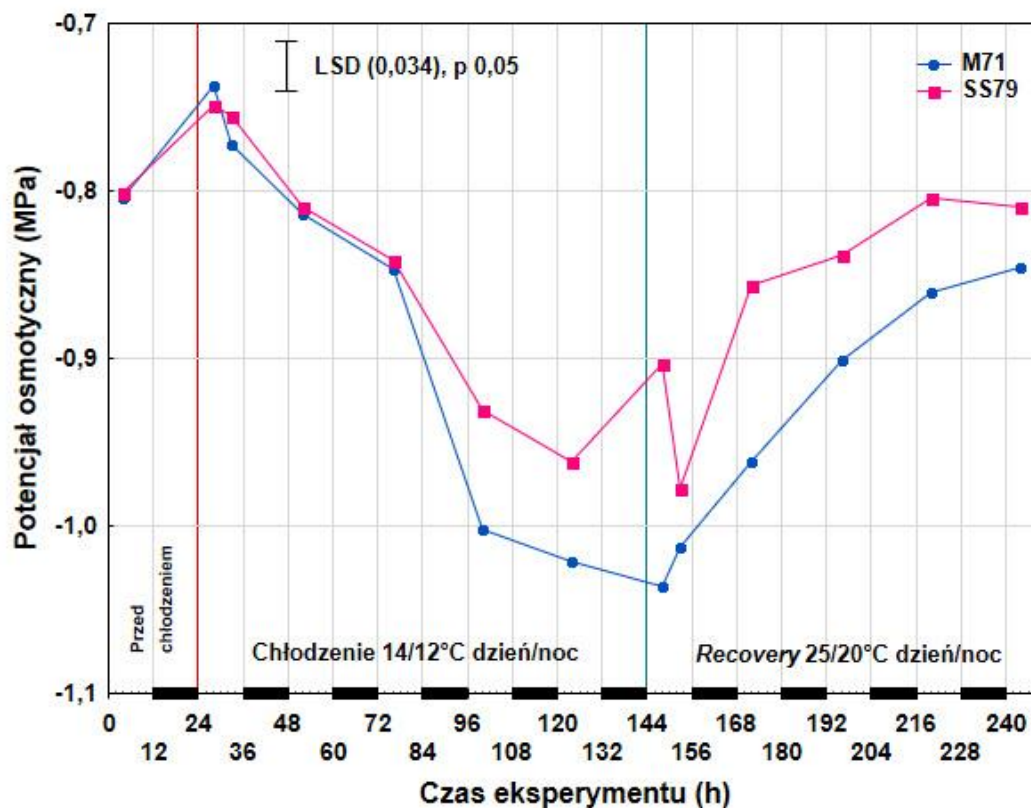
Rycina 7. Wartości pH soku z liści u dwóch linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie trwania czterech dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

4.1.5. Potencjał osmotyczny

Potencjał osmotyczny (OP) w liściach i korzeniach mierzono u dwóch linii rodzicielskich sorga przed chłodzeniem, podczas traktowania chłodem oraz podczas pięciu dni trwania *recovery* (Schemat 2).

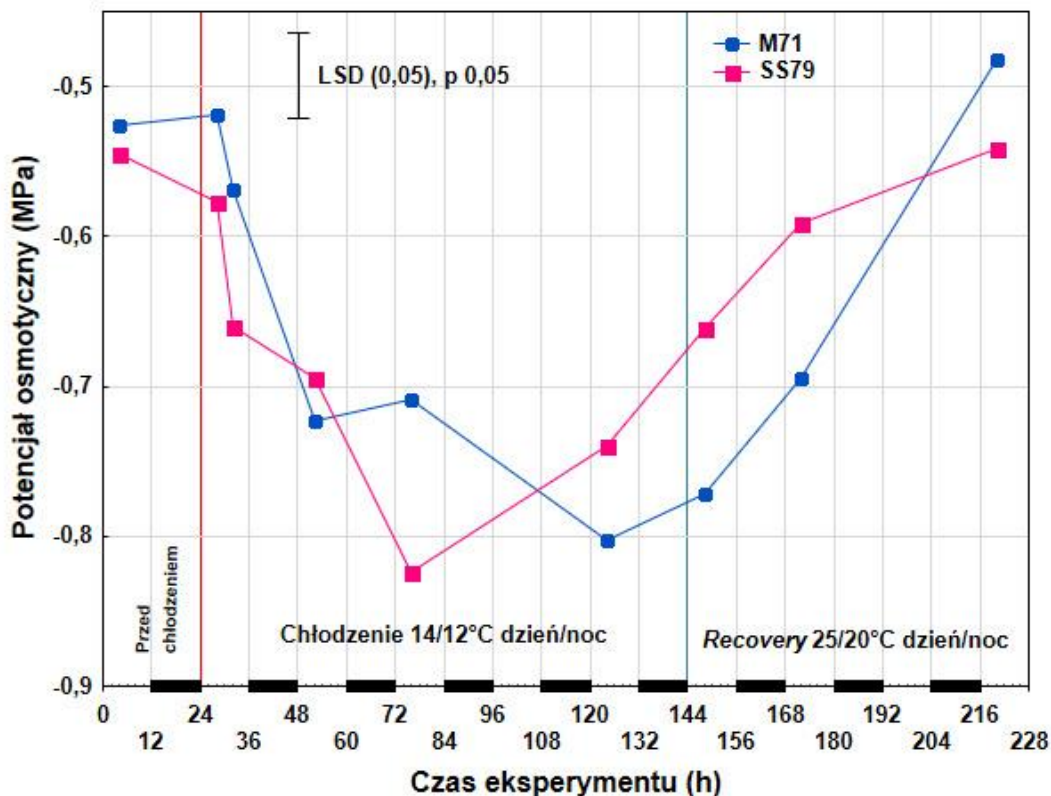
U obu badanych linii obserwowany był spadek potencjału osmotycznego w liściach siewek sorga już od 52h chłodzenia po przejściowym jego wzroście w pierwszym dniu chłodzenia (Ryc. 8). Kolejne godziny traktowania chłodem powodowały ciągły spadek wartości OP, przy czym w trzecim dniu działania chłodu zaznaczyły się różnice między dwiema liniami. U linii tolerancyjnej (M71) zawartość substancji osmotycznie czynnych była istotnie większa w porównaniu do linii wrażliwej na chłód (SS79). Po zaprzestaniu chłodzenia i powrocie do warunków kontrolnych (*recovery*) wartości OP ponownie wzrosły u obu linii, jednak wciąż utrzymywały się różnice pomiędzy

badanymi liniami, będąc niższe u linii tolerancyjnej. Pod koniec trwania okresu *recovery* wartości OP były zbliżone do tych sprzed chłodzenia.



Rycina 8. Potencjał osmotyczny w trzech pierwszych liściach dwóch linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

Potencjał osmotyczny w korzeniach spadł u obu badanych linii już w pierwszym dniu chłodzenia, kolejne dni traktowania chłodem powodowały dalszy spadek potencjału osmotycznego (Ryc. 9). Spadek ten był szybszy i bardziej wyraźny u linii wrażliwej na działanie chłodu (SS79) w porównaniu do linii tolerancyjnej (M71). Podczas trwania okresu zdrowienia siewek potencjał osmotyczny powrócił do poziomu sprzed chłodzenia u obu badanych linii.

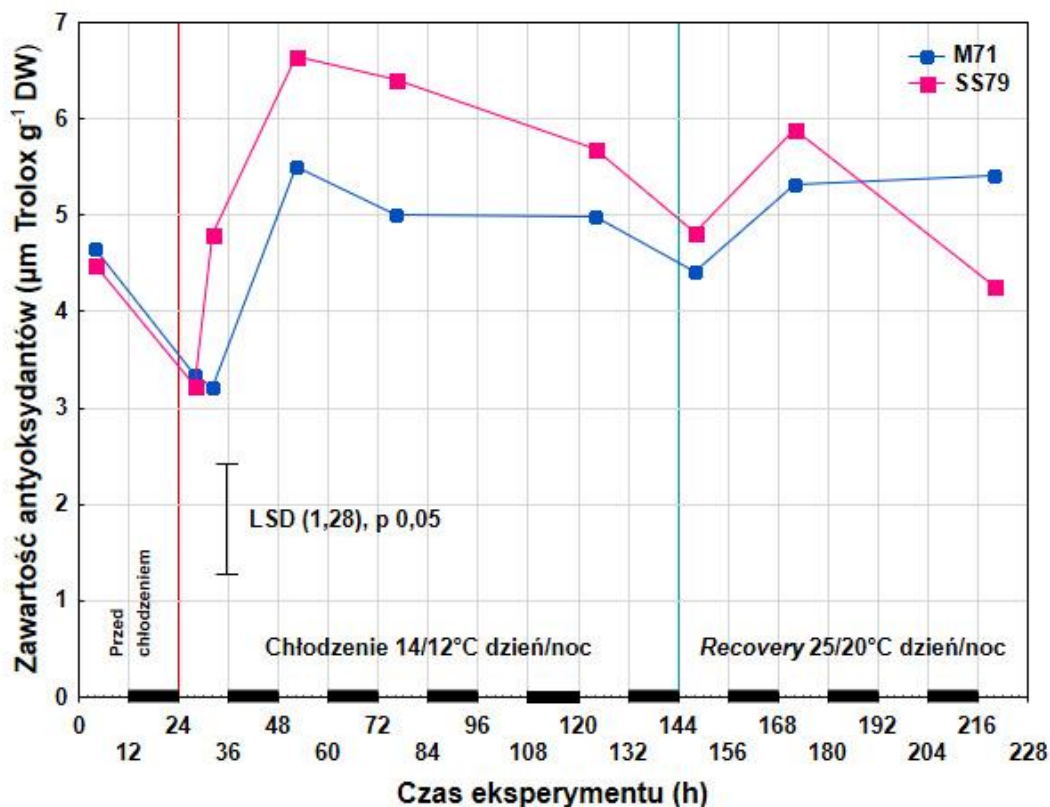


Rycina 9. Potencjał osmotyczny w korzeniach dwóch linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie czterech dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

4.1.6. Całkowita aktywność drobnocząsteczkowych antyoksydantów

Aktywność drobnocząsteczkowych antyoksydantów (tzw. antyoksydacyjna aktywność tkanek) mierzono w korzeniach u dwóch linii rodzicielskich sorga przed chłodzeniem, w trakcie działania chłodu oraz podczas pięciu dni trwania *recovery* (Schemat 2).

Aktywność antyoksydacyjna w korzeniach siewek sorga była taka sama u obu badanych linii w warunkach kontrolnych (Ryc.10). Pierwsze godziny chłodzenia spowodowały spadek aktywności antyoksydacyjnej tkanek zarówno u linii wrażliwej (SS79) jak i tolerancyjnej (M71). Kolejny dzień działania chłodu na siewki sorga spowodował znaczący wzrost zawartości antyoksydantów w korzeniach, zwłaszcza u linii wrażliwej, u której aktywność antyoksydacyjna była wciąż wyższa w trakcie działania chłodu. Pod koniec *recovery* aktywność antyoksydacyjna u obu badanych linii była podobna do tej sprzed chłodzenia.

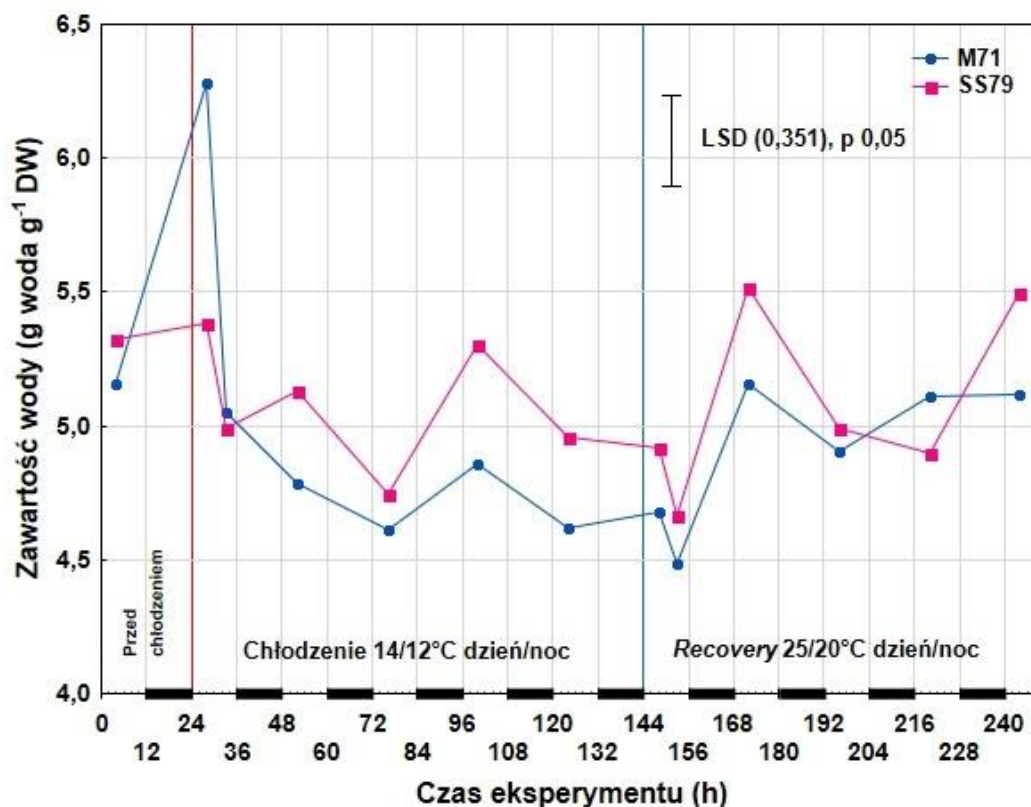


Rycina 10. Aktywność antyoksydacyjna w tkankach korzeni dwóch linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie czterech dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

4.1.7. Zawartość wody w tkankach liści

Zawartość wody mierzono w liściach dwóch linii rodzicielskich sorga przed chłodzeniem, w trakcie działania chłodu oraz podczas pięciu dni trwania *recovery* (Schemat 2).

U obu badanych linii zawartość wody w liściach była bardzo podobna w warunkach kontrolnych. Pierwsze godziny chłodzenia spowodowały wzrost zawartości wody u obu linii, jednak u linii tolerancyjnej na chłód (M71) wzrost ten był znaczący. Kolejne dni chłodzenia powodowały spadek zawartości wody w liściach zarówno u linii M71 jak i SS79. Wartość ta była niższa przez cały okres trwania chłodu w porównaniu do warunków kontrolnych. W trakcie trwania *recovery* zawartość wody w tkankach wzrosła u obu linii, a pod koniec była podobna do tej sprzed chłodzenia.

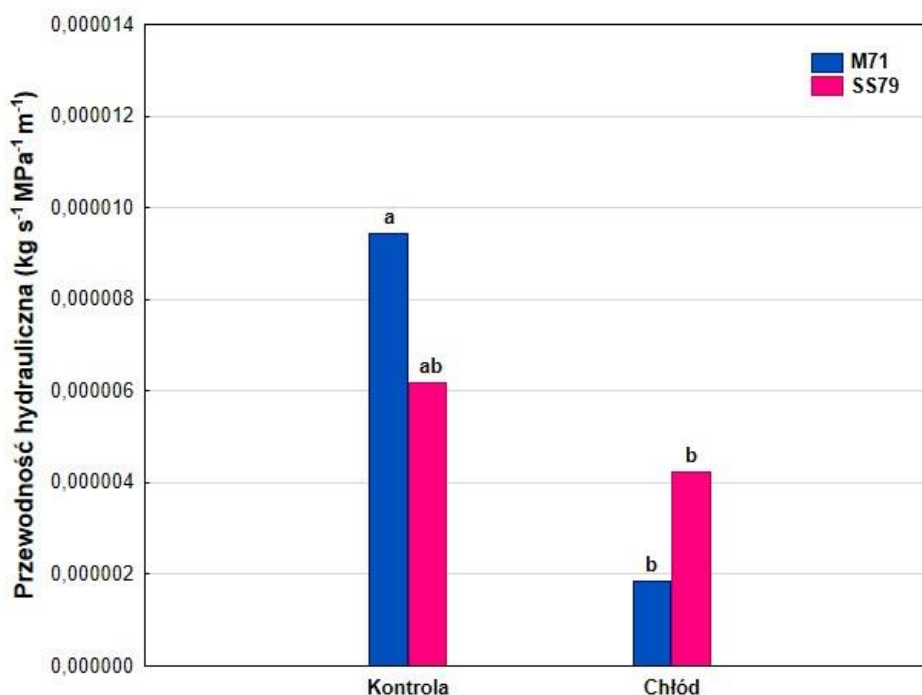


Rycina 11. Zawartość wody w trzech pierwszych liściach dwóch linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni trwania zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

4.1.8. Przewodność hydrauliczna

Przewodność hydrauliczną korzeni mierzono u obu linii rodzicielskich przed chłodzeniem oraz w drugim dniu traktowania chłodem.

W warunkach kontrolnych przewodność hydrauliczna była niższa u linii wrażliwej na chłód (SS79) w porównaniu z tolerancyjną (M71), choć różnica ta nie była statystycznie istotna (Ryc. 12). Chłód spowodował spadek przewodności hydraulicznej u obu linii. Jednakże u linii względnie tolerancyjnej na działanie chłodu, spadek przewodności hydraulicznej był znacznie większy niż u linii wrażliwej.



Rycina 12. Przewodność hydrauliczna w korzeniach dwóch linii rodzicielskich sorga przed chłodzeniem (25/20°C dzień/noc; Kontrola) oraz w trakcie drugiego dnia chłodzenia (14/12°C, Chłód).

4.2. II grupa doświadczeń

W drugiej grupie doświadczeń przeprowadzono fizjologiczne fenotypowanie 6 linii rodzicielskich sorga: M71, SS79, Etian, Keller, Ji2731 oraz Btx623, gdzie oceniano:

- fizjologiczne reakcje części nadziemnej na stres chłodu,
- zdolności adaptacyjne do warunków chłodu hartowanych suszą siewek.

Każde doświadczenie na siewkach sześciu linii rodzicielskich sorga powtarzano niezależnie dwa razy. Siewki sorga rosły w komorze wzrostowej w warunkach kontrolnych do fazy w pełni wykształconego 3-go liścia. Po 21 dniach wzrostu poddano je chłodzeniu. Po pięciu dniach traktowania chłodem następował 5-dniowy okres odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*) (Schemat 3).

W drugiej grupie doświadczeń zmierzono następujące parametry fizjologiczne:

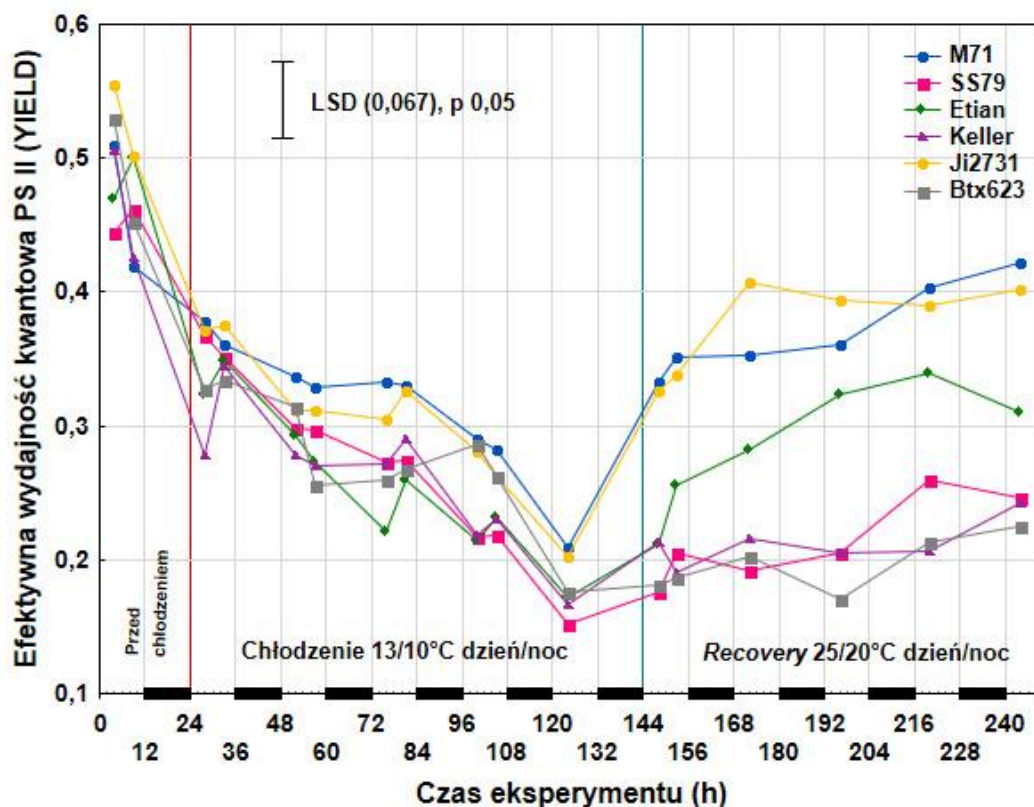
- efektywną wydajność kwantową fotosystemu II (PSII),
- przewodność aparatów szparkowych,
- zawartość kwasu abscysynowego (ABA),

- potencjał osmotyczny,
- zawartość wody w tkankach.

4.2.1. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II

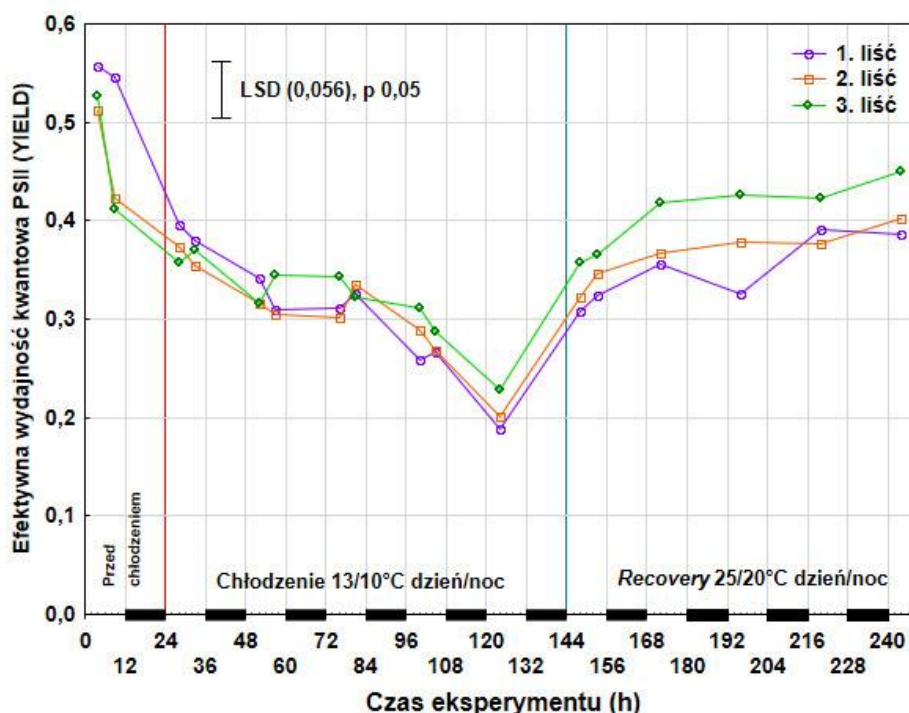
Pomiary parametru fluorescencji chlorofilu *a* efektywnej wydajności kwantowej fotosystemu II (PSII, YIELD wykonano na roślinach zaadaptowanych do światła przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), każdego dnia w trakcie chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) u sześciu linii rodzicielskich sorga (Schemat 3).

Po 4 godzinach chłodzenia nastąpił znaczny spadek wydajności kwantowej PSII (Ryc. 13). Dalsze chłodzenie powodowało dalszy ciągły spadek wydajności kwantowej PSII, a wśród badanych linii zaznaczały się różnice, które szczególnie były widoczne w piątym dniu *recovery*. Linia M71 i Ji2731 prawie w pełni odzyskały normalny stan sprzed traktowania chłodem, podczas gdy linie: SS79, Keller i Btx623 tylko w niewielkim stopniu.

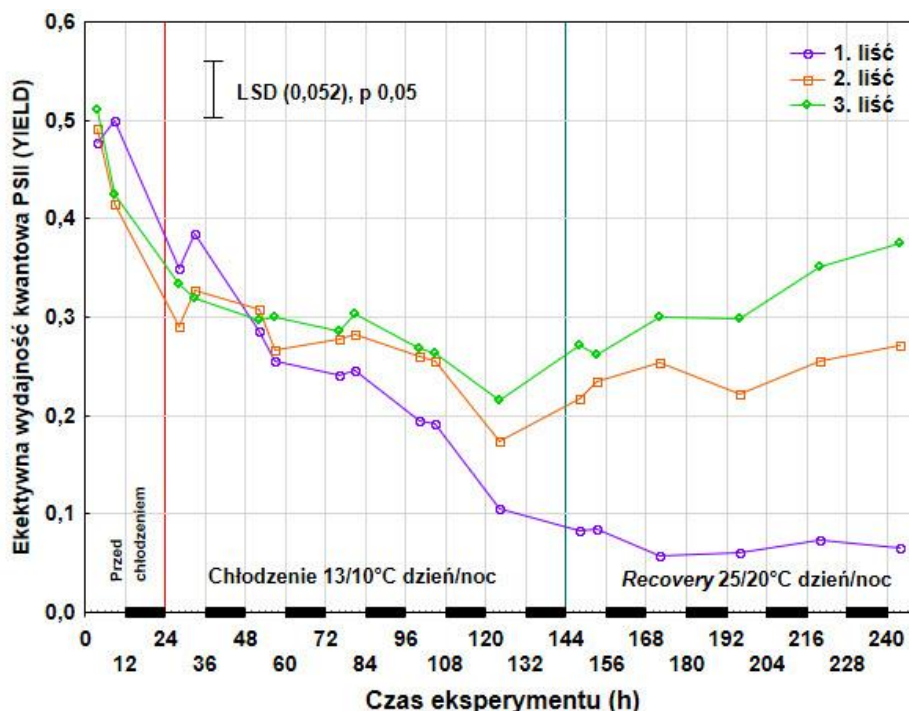


Rycina 13. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II (PSII) mierzona fluorescencją chlorofilu a (YIELD) trzech pierwszych liści dwóch linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni trwania dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

U linii wrażliwych na działanie chłodu (SS79, Keller i Btx623, Ryc. 15) znaczący spadek wydajności fotosyntetycznej mierzony wydajnością kwantową PSII obserwowany był w pierwszym (najstarszym liściu) w porównaniu do trzeciego (najmłodszego), podczas gdy u linii tolerancyjnych (M71 i Ji2731, Ryc. 14) różnice nie były tak wyraźne. W piątym dniu działania chłodu oraz w trakcie *recovery* różnice między badanymi liniami były szczególnie wyraźne.



Rycina 14. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II (PSII) mierzona fluorescencją chlorofilu a (YIELD) dla trzech pierwszych liści u linii sorga tolerancyjnych na chłód (M71, Ji2731) przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

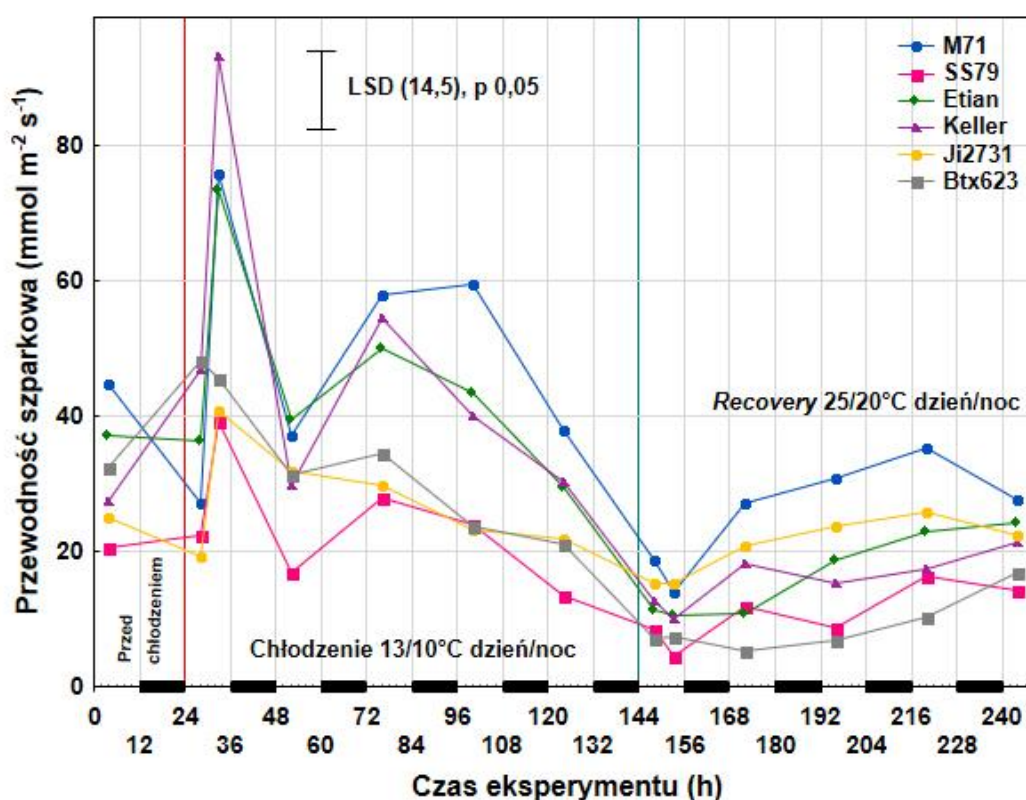


Rycina 15. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II (PSII) mierzona fluorescencją chlorofilu a (YIELD) dla trzech pierwszych liści u linii sorga wrażliwych na chłód (SS79, Keller i Btx623) przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

4.2.2. Przewodność aparatów szparkowych

U wszystkich sześciu linii rodzicielskich pomiary przewodności szparkowej wykonywano przed chłodzeniem, każdego dnia w trakcie działania chłodu oraz w trakcie trwania okresu odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (Schemat 3.).

Działanie temperatury chłodowej powodowało przymknięcie aparatów szparkowych w porównaniu z roślinami kontrolnymi u wszystkich badanych linii (Ryc. 16). Po pierwszych dziewięciu godzinach traktowania chłodem aparaty szparkowe otworzyły się, jednak kolejny dzień działania chłodu spowodował ich przymknięcie do poziomu kontrolnego. Pod koniec chłodzenia oraz w początkowych dniach odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*) aparaty szparkowe były przymknięte u wszystkich badanych linii.

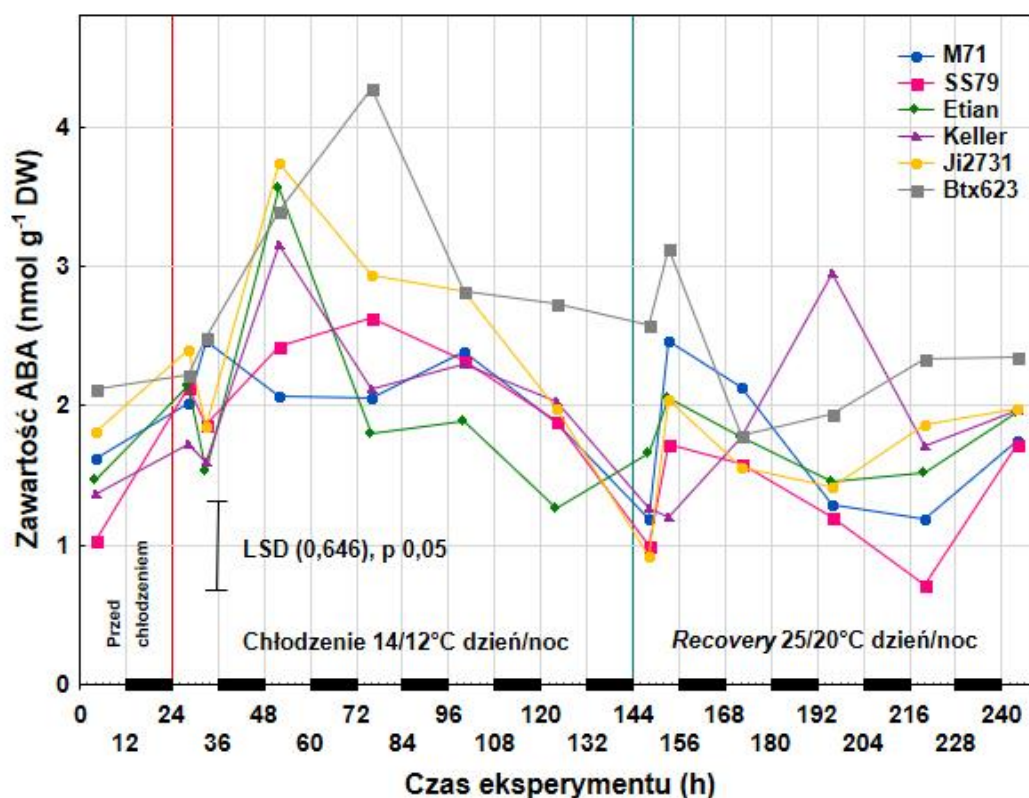


Rycina 16. Przebieg zmian przewodności szparkowej trzech pierwszych liści sześciu linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

4.2.3. Zawartość ABA

U wszystkich sześciu linii rodzicielskich zawartość ABA zmierzono w liściach, przed chłodzeniem, każdego dnia w trakcie działania chłodu oraz w trakcie trwania okresu odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (Schemat 3).

W trakcie drugiego dnia chłodzenia nastąpił wzrost poziomu ABA w liściach u wszystkich badanych linii. Wyższa zawartość ABA w trakcie działania chłodu, w porównaniu z warunkami kontrolnymi, była wyraźnie widoczna przez pierwsze cztery dni traktowania chłodem. Podczas *recovery* poziom ABA u większości linii był porównywalny jak przed chłodzeniem.

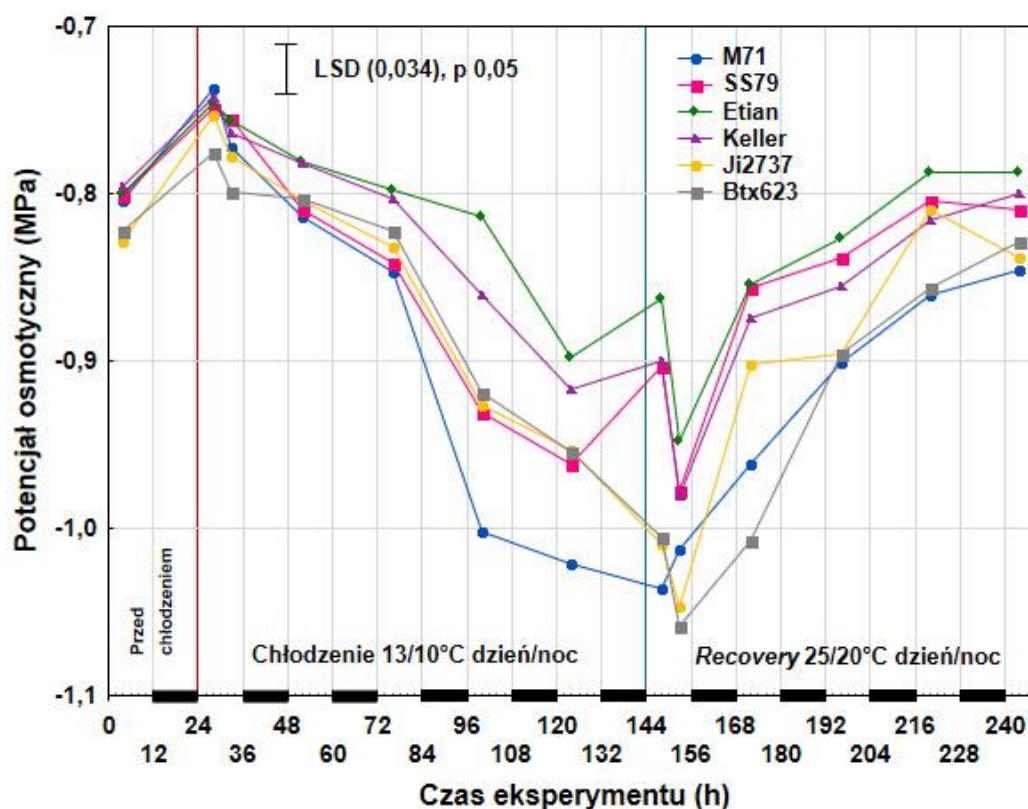


Rycina 17. Zawartość ABA w trzech pierwszych liściach sześciu linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$). Czarne prostokąty na osi X wskazują na...

4.2.4. Potencjał osmotyczny

Potencjał osmotyczny (OP) w liściach sześciu linii rodzicielskich sorga zmierzono przed chłodzeniem, każdego dnia w trakcie działania chłodu oraz w trakcie trwania okresu odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (Schemat 3).

Przed działaniem chłodu wartość OP u sześciu badanych linii była prawie taka sama. W trzecim dniu chłodzenia zaobserwowano znaczący spadek potencjału osmotycznego w liściach u wszystkich linii. Kolejne dni traktowania chłodem powodowały ciągły spadek OP, a różnice pomiędzy liniami zaznaczały się coraz bardziej. Największy spadek zaobserwowano u tolerancyjnej linii M71. W trakcie *recovery* u sześciu badanych linii widoczny był wzrost OP. Wartość OP u wszystkich linii powróciła do poziomu kontrolnego na zakończenie okresu *recovery*.

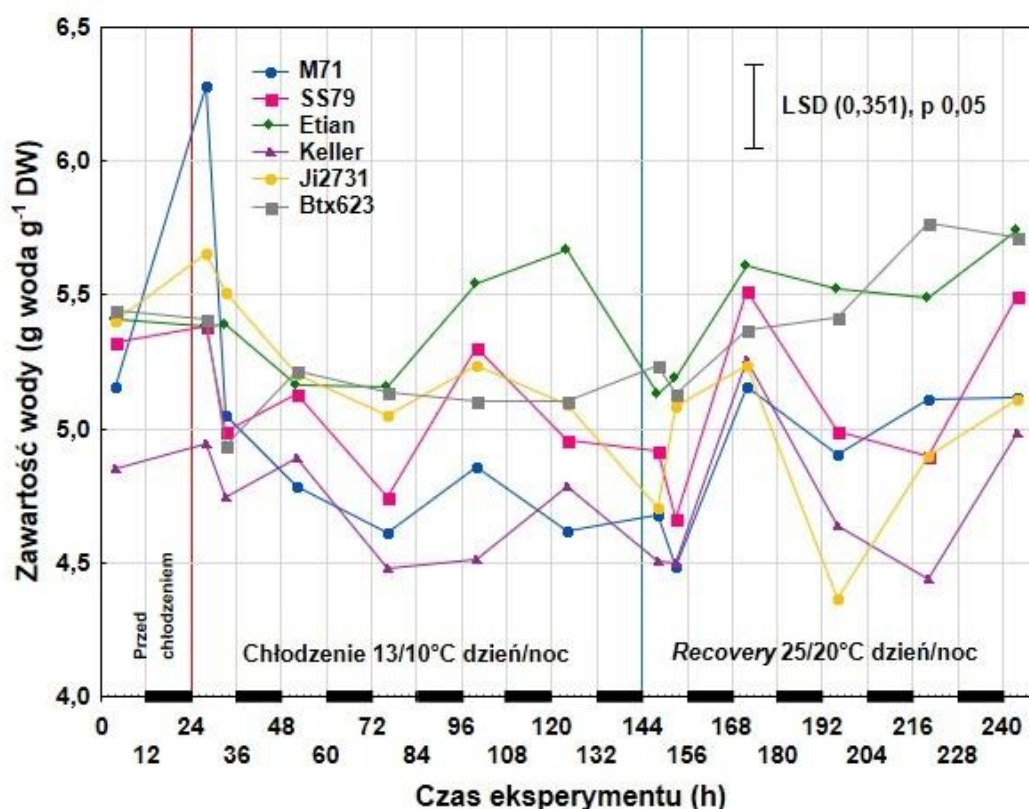


Rycina 18. Potencjał osmotyczny w trzech pierwszych liściach sześciu linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$). Czarne prostokąty na osi X wskazują noc.

4.2.5. Zawartość wody w tkankach

Zawartość wody mierzono w liściach sześciu linii rodzicielskich sorga przed chłodzeniem, w trakcie działania chłodu oraz podczas pięciu dni trwania *recovery* (Schemat 3).

U prawie wszystkich badanych linii zawartość wody w liściach była podobna w warunkach kontrolnych. Pierwsze godziny chłodzenia spowodowały wzrost zawartości wody w tkankach w czterech z sześciu linii, przy czym u linii tolerancyjnych na chłód (M71, Ji2731) wzrost ten był znacznie wyższy w porównaniu do pozostałych. W kolejnych dniach chłodzenia nastąpił spadek zawartości wody w liściach, a wartość ta była najniższa w 3 dniu działania chłodu. Podczas 2 dnia trwania *recovery* zawartość wody w tkankach wzrosła u wszystkich badanych linii, a pod koniec była podobna do tej sprzed chłodzenia.

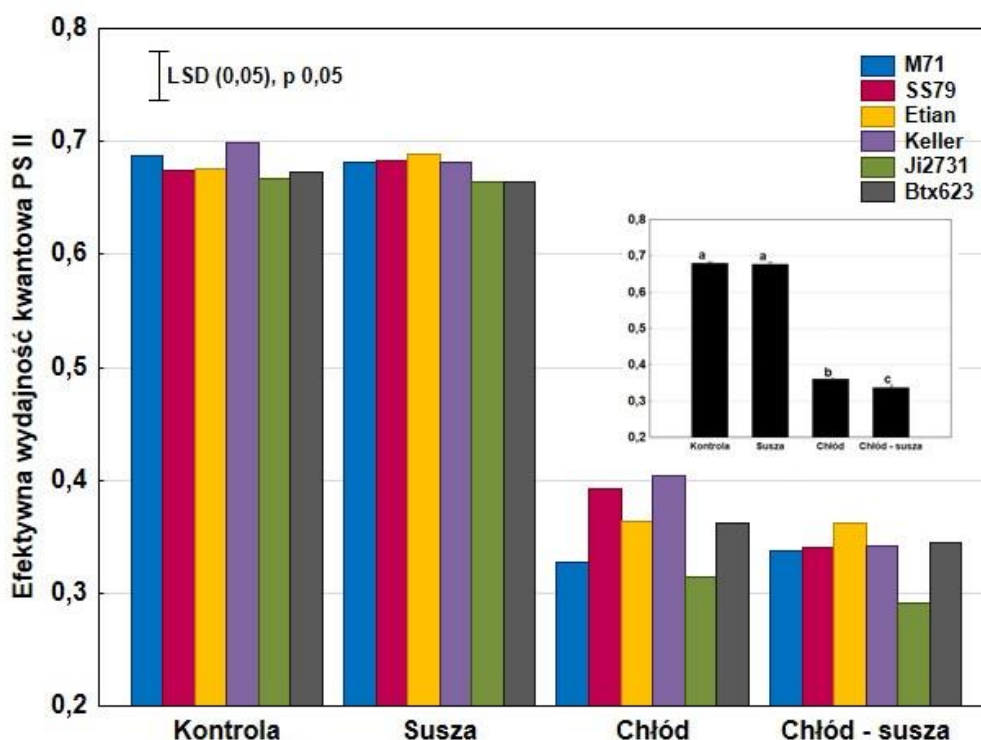


Rycina 19. Zawartość wody w trzech pierwszych liściach sześciu linii rodzicielskich sorga przed działaniem chłodu, podczas pięciu dni traktowania chłodem oraz w trakcie pięciu dni zdrowienia siewek (*recovery*). LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05). Czarne prostokąta na osi X wskazują na noc.

4.2.6. Zdolności adaptacyjne do warunków chłodu hartowanych suszą siewek

W doświadczeniach, w których badano zdolności adaptacyjne sorga do warunków chłodu poprzez hartowanie ich suszą glebową pomiarów dokonano po 20 dniach wzrostu, przed chłodzeniem, czyli w warunkach kontrolnych (25/20°C, dzień/noc, Kontrola, Susza) oraz w chłodzie, po 5 dniach chłodzenia (13/10°C, dzień/noc, Chłód, Chłód - susza) u sześciu linii rodzicielskich.

Uzyskane wyniki pomiarów fluorescencji wskazują, że zastosowany poziom suszy i czas jej oddziaływania na siewki nie spowodował istotnych zmian wydajności aparatu fotosyntetycznego u badanych linii mierzonego wydajnością kwantową PSII (Ryc. 20). Natomiast w chłodzie znacznie obniżyła się efektywna wydajność kwantowa PSII, ale zarówno siewek hartowanych, jak i niehartowanych suszą. Hartowanie suszą przed działaniem chłodu nie wpłynęło więc istotnie na funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego (PSII) w warunkach chłodu.



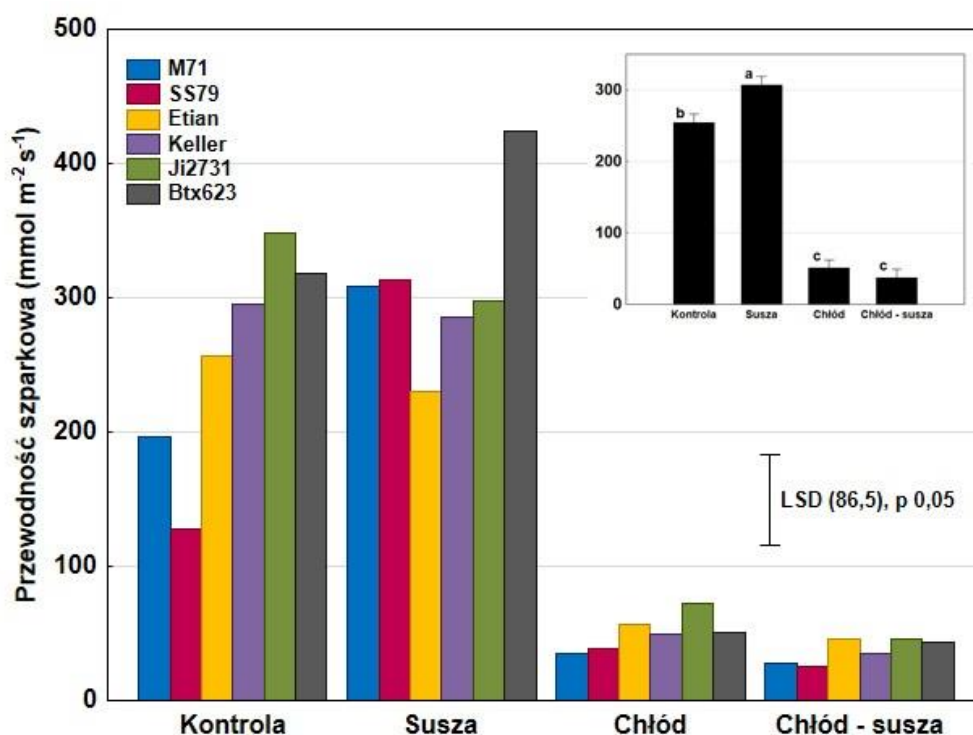
Rycina 20. Efektywna wydajność kwantowa PSII (YIELD) mierzona fluorescencją chlorofilu *a* w trzech pierwszych liściach siewek sześciu linii rodzicielskich sorga przed chłodzeniem (25/20°C dzień/noc; Kontrola, Susza) oraz w trakcie piątego dnia chłodzenia (13/10°C, niehartowane Chłód i hartowane suszą, Chłód - susza). Wyliczono wartość LSD (najmniejsza, statystycznie istotna różnica) przy $p = 0,05$. Inset przedstawia średnie wartości badanego parametru z poszczególnego traktowania dla wszystkich badanych linii sorga. Identyczne litery oznaczają brak różnic istotnych statystycznie według wielokrotnego testu Duncana $p = 0,05$.

Źródło wariancji	Efektywna wydajność kwantowa PSII
Traktowanie	***
Linie	***
Traktowanie x Linie	**

Tabela 2. Tabela analizy wariancji. Źródło wariancji: 4 traktowania, 6 linii oraz interakcja między nimi. *, **, ***, znaczenie przy $p = 0,05, 0,01, 0,001$.

Susza spowodowała nieznaczny spadek przewodności szparkowej liści u trzech badanych linii (Etian, Keller i Ji2731, Ryc. 21), jednak u pozostałych (M71, SS79 i Btx623) przewodność szparkowa wzrosła a aparaty szparkowe otworzyły się, susza spowodowała więc u tych linii przejściową utratę zdolności kontroli stanu rozwarcia aparatów szparkowych. W trakcie działania chłodu aparaty szparkowe u obydwu grup

przymknęły się prawie do tego samego poziomu, jednak u siewek hartowanych suszą przewodność szparkowa była nieco niższa, w porównaniu do niehartowanych.

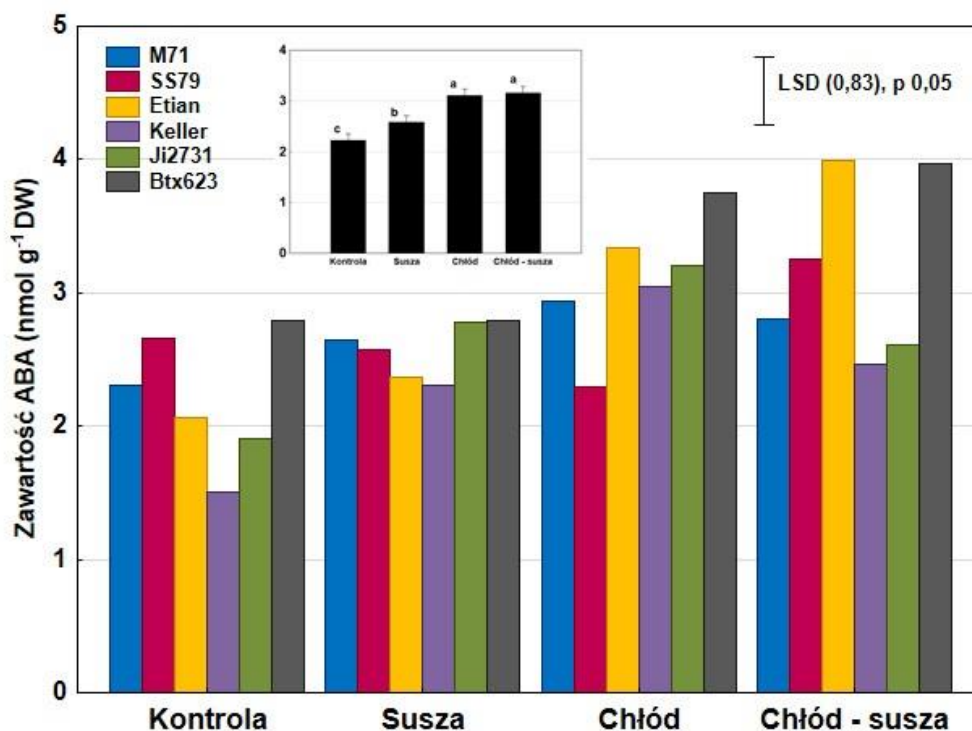


Rycina 21. Przewodność szparkowa w trzech pierwszych liściach siewek sześciu linii rodzicielskich sorga przed chłodzeniem (25/20°C dzień/noc; Kontrola, Susza) oraz w trakcie piątego dnia chłodzenia (13/10°C, niehartowane Chłód i hartowane suszą, Chłód - susza). Wyliczono wartość LSD (najmniejsza, statystycznie istotna różnica) przy p 0,05. Inset przedstawia średnie wartości badanego parametru z poszczególnego traktowania dla wszystkich badanych linii sorga. Identyczne litery w oznaczają brak różnic istotnych statystycznie według wielokrotnego testu Duncana p 0.05.

Źródło wariacji	Przewodność szparkowa
Traktowanie	***
Linie	***
Traktowanie x Linie	***

Tabela 3. Tabela analizy wariacji. Źródło wariacji: 4 traktowania, 6 linii oraz interakcja między nimi. *, **, ***, znaczenie przy p 0.05, 0.01, 0.001.

W trakcie hartowania suszą zawartość ABA w liściach była nieco wyższa niż w warunkach kontrolnych (Ryc. 22). Chłód spowodował wzrost zawartości ABA zarówno u hartowanych jak i niehartowanych siewek sorga. U linii SS79, Ji2731 i Btx623 zawartość ABA u siewek hartowanych suszą była istotnie większa w porównaniu do nie-hartowanych.



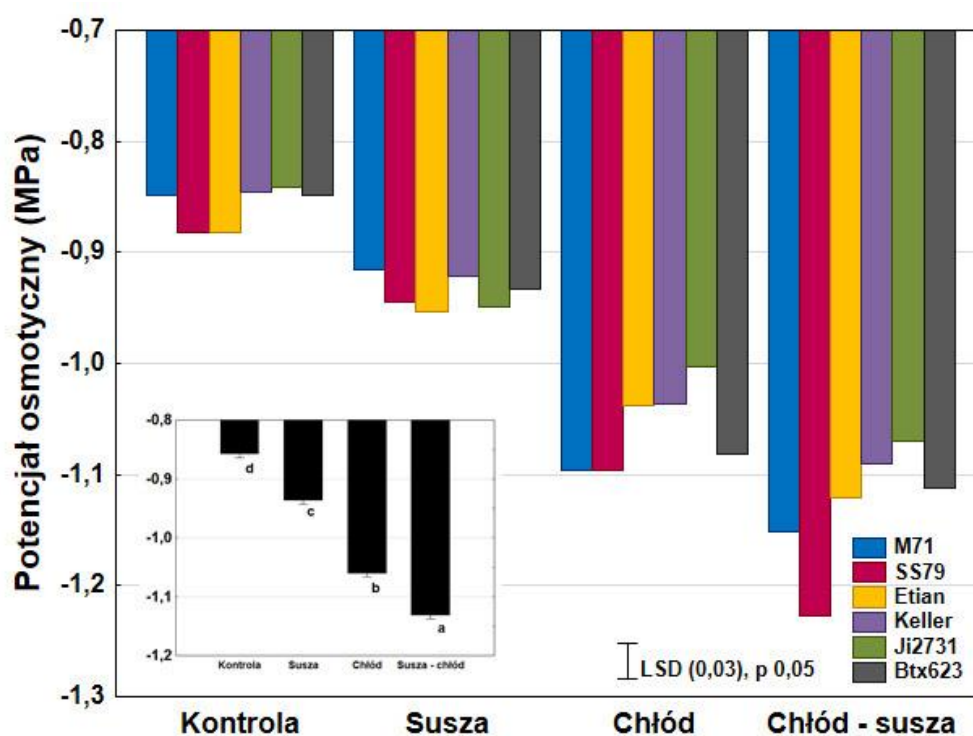
Rycina 22. Zawartość ABA w trzech pierwszych liściach siewek sześciu linii rodzicielskich sorga przed chłodzeniem (25/20°C dzień/noc; Kontrola, Susza) oraz w trakcie piątego dnia chłodzenia (13/10°C, niehartowane Chłód i hartowane suszą, Chłód - susza). Wyliczono wartość LSD (najmniejsza, statystycznie istotna różnica) przy p 0,05. Inset przedstawia średnie wartości badanego parametru z poszczególnego traktowania dla wszystkich badanych linii sorga. Identyczne litery oznaczają brak różnic istotnych statystycznie według wielokrotnego testu Duncana p 0.05.

Źródło wariacji	Zawartość ABA
Traktowanie	***
Linie	***
Traktowanie x Linie	*

Tabela 4. Tabela analizy wariacji. Źródło wariacji: 4 traktowania, 6 linii oraz interakcja między nimi. *, **, ***, znaczenie przy p 0.05, 0.01, 0.001.

U siewek hartowanych suszą wartość potencjału osmotycznego (OP) była niższa niż u niehartowanych (Ryc. 23). Chłód spowodował znaczący spadek OP, który osiągnął niższe wartości u siewek hartowanych suszą niż u niehartowanych. W warunkach stresu

niskiej temperatury u siewek hartowanych suszą u linii SS79 (wrażliwej na działanie chłodu) wartość OP jest znacznie niższa w porównaniu z siewkami niehartowanymi.



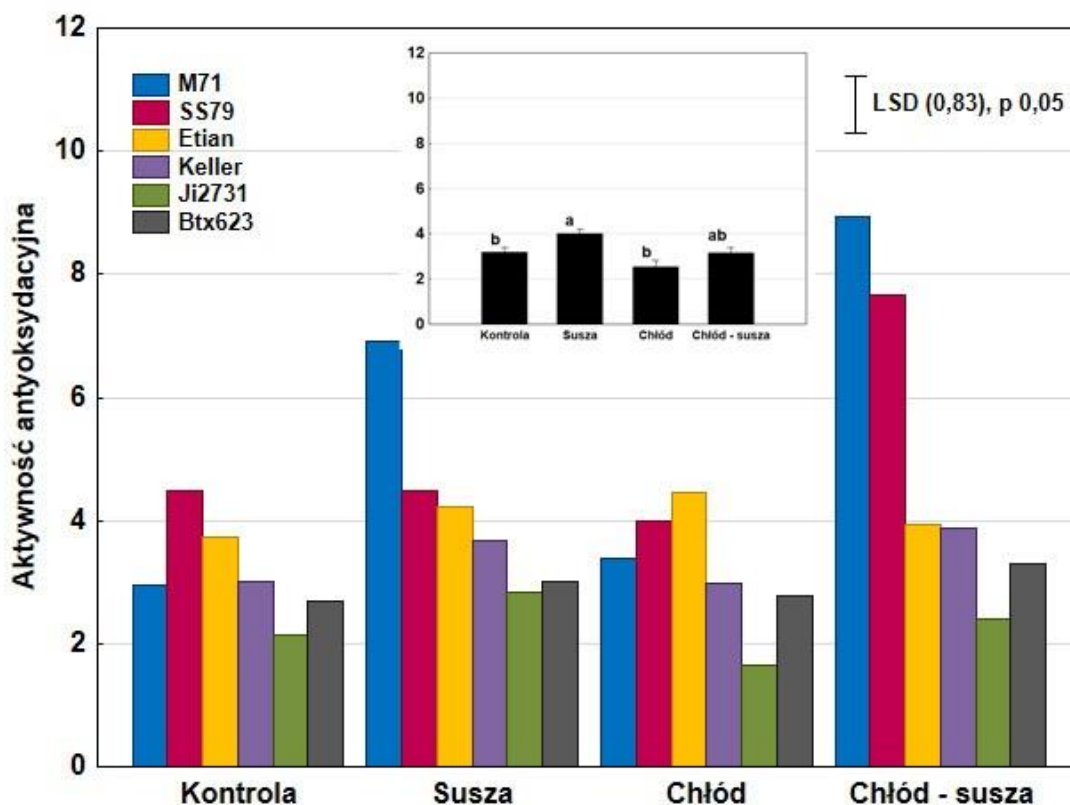
Rycina 23. Potencjał osmotyczny w trzech pierwszych liściach siewek sześciu linii rodzicielskich sorga przed chłodzeniem (25/20°C dzień/noc; Kontrola, Susza) oraz w trakcie piętego dnia chłodzenia (13/10°C, niehartowane Chłód i hartowane suszą, Chłód - susza). Wyliczono wartość LSD (najmniejsza, statystycznie istotna różnica) przy p 0,05. Inset przedstawia średnie wartości badanego parametru z poszczególnego traktowania dla wszystkich badanych linii sorga. Identyczne oznaczają brak różnic istotnych statystycznie według wielokrotnego testu Duncana p 0.05.

Źródło wariancji	Potencjał osmotyczny
Traktowanie	***
Linie	***
Traktowanie x Linie	***

Tabela 5. Tabela analizy wariancji. Źródło wariancji: 4 traktowania, 6 linii oraz interakcja między nimi. *, **, ***, znaczenie przy p 0.05, 0.01, 0.001.

U wszystkich badanych linii chłód nie spowodował zwiększenia aktywności antyoksydacyjnej w siewkach niehartowanych suszą (Ryc. 24). Susza spowodowała znaczący wzrost aktywności antyoksydantów u linii M71, co przyczyniło się do większej aktywności antyoksydacyjnej u tych siewek po zadziałaniu chłodu. U jednej z badanych linii, SS79, można było zauważyć znaczący wzrost aktywności antyoksydacyjnej w siewkach hartowanych suszą w trakcie działania niskiej temperatury, chociaż susza nie powodowała wzrostu aktywności antyoksydacyjnej.

U tej linii w siewkach niehartowanych suszą nie zwiększyła się aktywność antyoksydacyjna w chłodzie, co może sugerować, że hartowanie suszą może zwiększyć odporność na działanie chłodu u niektórych linii.

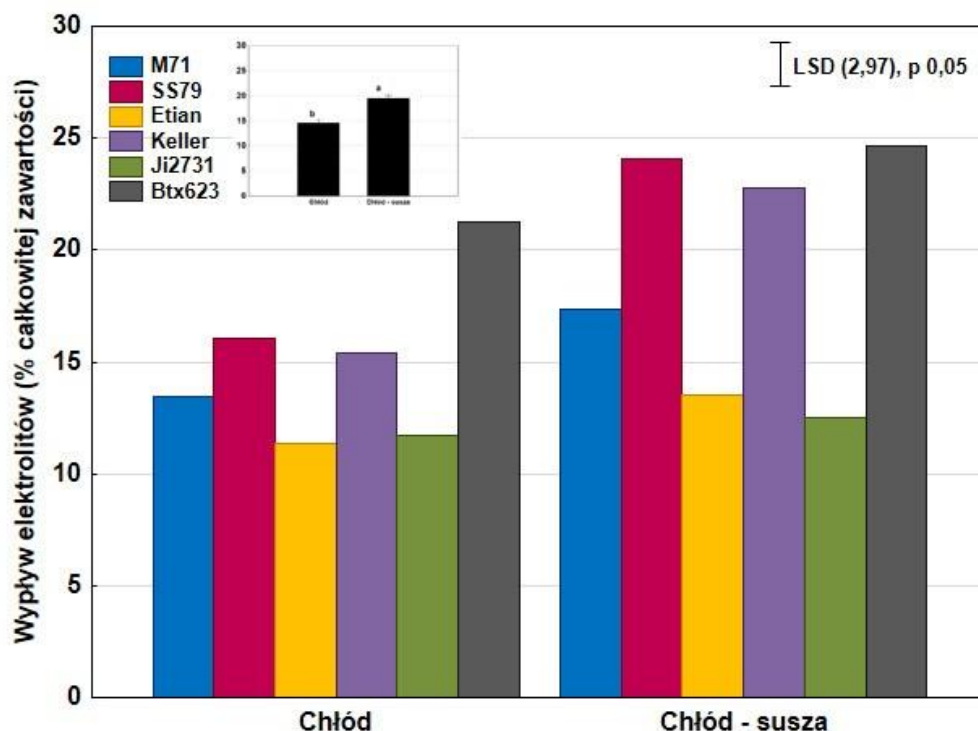


Rycina 24. Aktywność antyoksydacyjna w trzech pierwszych liściach siewek sześciu linii rodzicielskich sorga przed chłodzeniem (25/20°C dzień/noc; Kontrola, Susza) oraz w trakcie piątego dnia chłodzenia (13/10°C, niehartowane Chłód i hartowane suszą, Chłód - susza). Wyliczono wartość LSD (najmniejsza, statystycznie istotna różnica) przy p 0,05. Inset przedstawia średnie wartości badanego parametru z poszczególnego traktowania dla wszystkich badanych linii sorga. Identyczne litery oznaczają brak różnic istotnych statystycznie według wielokrotnego testu Duncana p 0.05.

Źródło wariacji	Aktywność antyoksydacyjna
Traktowanie	***
Linie	***
Traktowanie x Linie	**

Tabela 6. Tabela analizy wariancji. Źródło wariacji: 4 traktowania, 6 linii oraz interakcja między nimi. *, **, ***, znaczenie przy p 0.05, 0.01, 0.001.

U siewek niehartowanych suszą chłód spowodował większy wpływ elektrolitów u linii wrażliwych na działanie tego stresu (SS79, Keller i Btx623, Ryc. 25). U tych trzech linii w siewkach hartowanych suszą jeszcze bardziej zwiększył się wpływ elektrolitów w trakcie działania chłodu w porównaniu z siewkami niehartowanymi.



Rycina 25. Wyływ elektrolitów w trzech pierwszych liściach siewek sześciu linii rodzicielskich sorga w trakcie piątego dnia chłodzenia (13/10°C, niehartowane Chłod i hartowane suszą, Chłod - susza). Wyliczono wartość LSD (najmniejsza, statystycznie istotna różnica) przy p 0,05. Inset przedstawia średnie wartości badanego parametru z poszczególnego traktowania dla wszystkich badanych linii sorga. Identyczne litery w obrębie traktowania oznaczają brak różnic istotnych statystycznie według wielokrotnego testu Duncana p 0.05

Źródło wariacji	Wyływ elektrolitów
Traktowanie	***
Linie	***
Traktowanie x Linie	***

Tabela 7. Tabela analizy wariacji. Źródło wariacji: 4 traktowania, 6 linii oraz interakcja między nimi. *, **, ***, znaczenie przy p 0.05, 0.01, 0.001.

4.3. III grupa doświadczeń

W trzeciej grupie doświadczeń przeprowadzono fizjologiczne fenotypowanie 4 populacji mapujących:

JxE – złożona ze 176 linii; dodatkowo badano 2 linie rodzicielskie: Ji2731 i Etian,

SxM – złożona z 41 linii; dodatkowo badano 2 linie rodzicielskie: SS79 i M71,

SxE – złożona z 50 linii; dodatkowo badano 2 linie rodzicielskie: SS79 i Etian,

SxJ – złożona z 49 linii; dodatkowo badano 2 linie rodzicielskie: SS79 i Ji2731,

gdzie oceniano:

- fizjologiczne reakcje części nadziemnej na stres chłodu.

Siewki sorga rosły w komorze wzrostowej w warunkach kontrolnych do fazy w pełni wykształconego 3-go liścia. Po 21 dniach wzrostu poddano je chłodzeniu. Po pięciu dniach traktowania chłodem następował 5-dniowy okres odzyskiwania normalnego stanu przez siewki (*recovery*) (Schemat 4).

W trzeciej grupie doświadczeń zmierzono następujące parametry fizjologiczne w poszczególnych populacjach mapujących:

- efektywną wydajność kwantową fotosystemu II (PSII) – JxE, SxM, SxE, SxJ,
- przewodność aparatów szparkowych– JxE, SxM, SxE, SxJ,
- potencjał osmotyczny– JxE, SxM, SxE, SxJ,
- zawartość kwasu abscysynowego (ABA) – JxE,
- zawartość chlorofilu- JxE,
- wpływ elektrolitów – JxE.

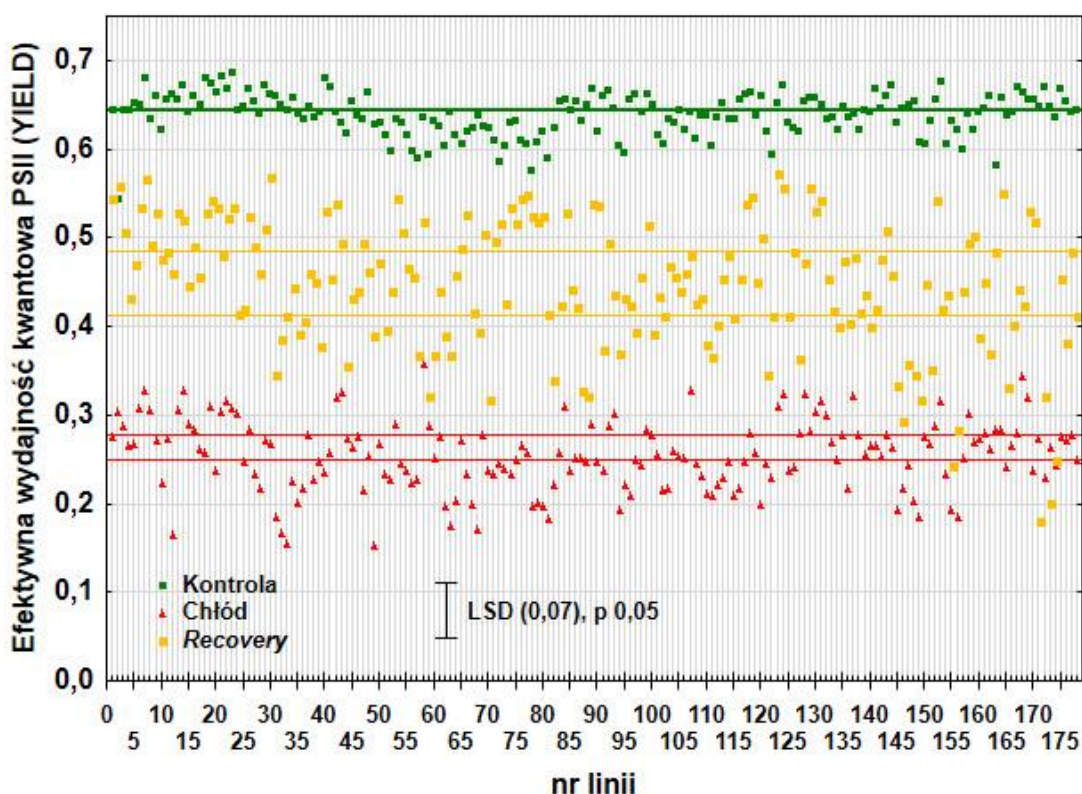
4.3.1. Populacja mapująca JxE

Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II

Pomiary parametru fluorescencji chlorofilu *a* efektywnej wydajności kwantowej fotosystemu II (PSII, YIELD) wykonano na roślinach zaadaptowanych do światła na pierwszym, drugim oraz trzecim liściu siewek. Pomiarów dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapującej oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz

podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

Wydajność kwantowa fotosystemu II u wszystkich linii populacji mapującej JxE, a także u obydwu linii rodzicielskich (Ji2731, Etian) znacząco spadła w trakcie działania chłodu (Ryc. 26). W trakcie *recovery* u większości badanych linii efektywna wydajność kwantowa PSII wzrosła, ale wśród badanych linii zaznaczyło się ogromne zróżnicowanie. Większość wartości mierzonego parametru dla linii populacji mapującej była znacznie powyżej, albo poniżej wartości dla linii rodzicielskich.



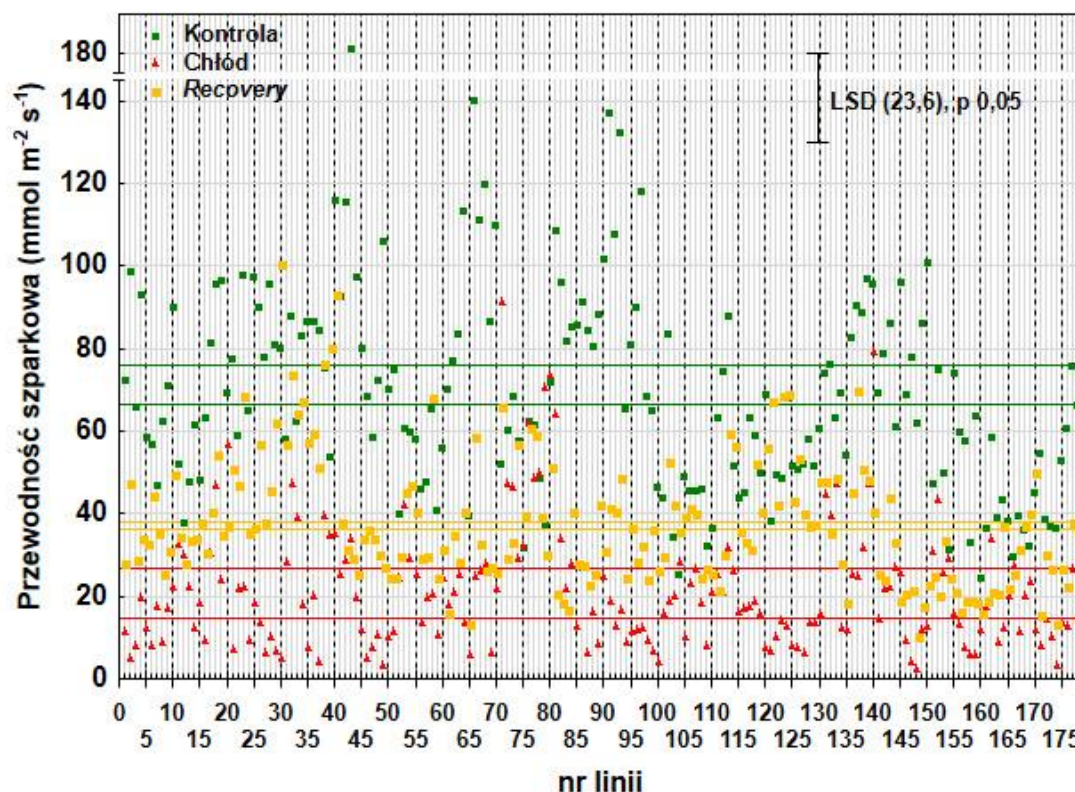
Rycina 26. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II (PSII) mierzona fluorescencją chlorofilu a (YIELD) trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej JxE i dwóch linii rodzicielskich: Ji2731 i Etian, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).

Przewodność aparatów szparkowych

Pomiarów przewodności aparatów szparkowych dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapującej oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni

odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

W trakcie działania chłodu przewodność szparkowa u wszystkich linii populacji mapującej JxE, a także u obydwu linii rodzicielskich (Ji2731, Etian) znacząco spadła (Ryc. 27). Natomiast w trakcie *recovery* – wzrosła, nie osiągając jednak poziomu sprzed chłodzenia. Wśród linii widoczne było bardzo duże zróżnicowanie.

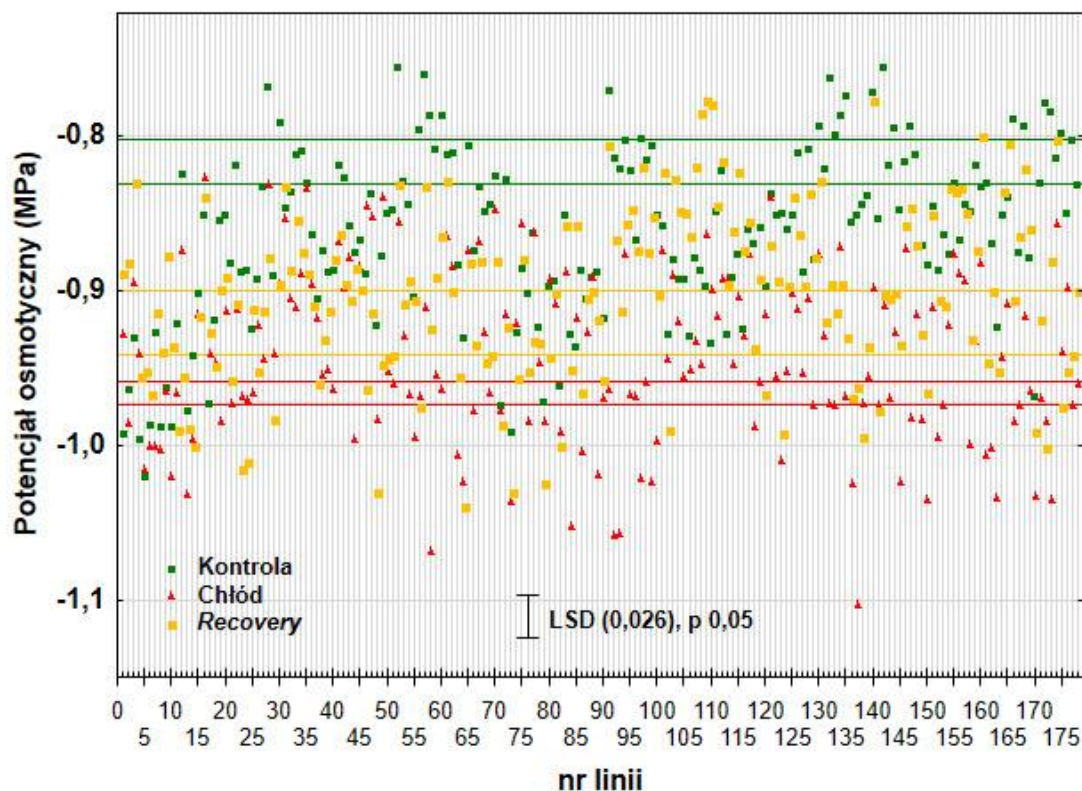


Rycina 27. Przewodność szparkowa trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej JxE i dwóch linii rodzicielskich: Ji2731 i Etian, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).

Potencjał osmotyczny

Potencjał osmotyczny (OP) zmierzono w pierwszym, drugim oraz trzecim liściu siewek. Pomiarów dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapujących oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

Wśród linii populacji mapującej JxE, a także u obydwu linii rodzicielskich (Ji2731, Etian) zaznaczyło się ogromne zróżnicowanie (Ryc. 28). Większość wartości mierzonego parametru dla linii populacji mapującej była znacznie powyżej albo poniżej wartości dla linii rodzicielskich. Największe różnice między liniami populacji mapującej JxE widoczne były podczas chłodzenia i *recovery*.



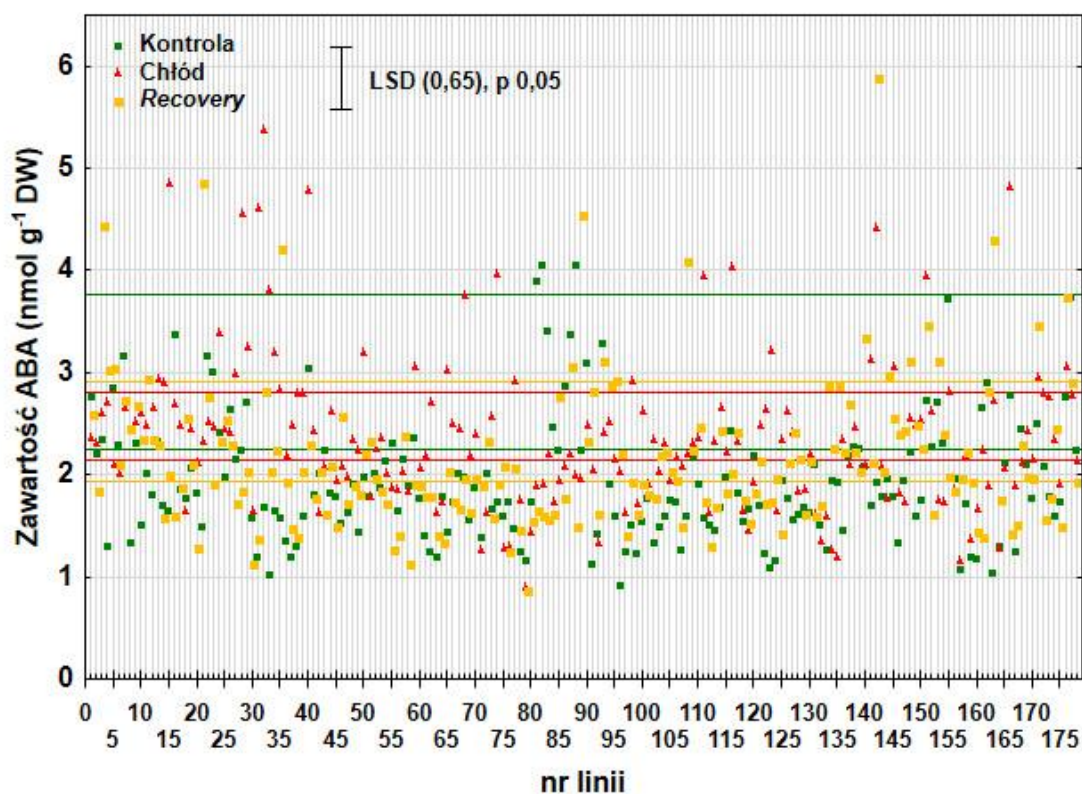
Rycina 28. Potencjał osmotyczny trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej JxE i dwóch linii rodzicielskich: Ji2731 i Etian, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).

Zawartość kwasu abscysynowego

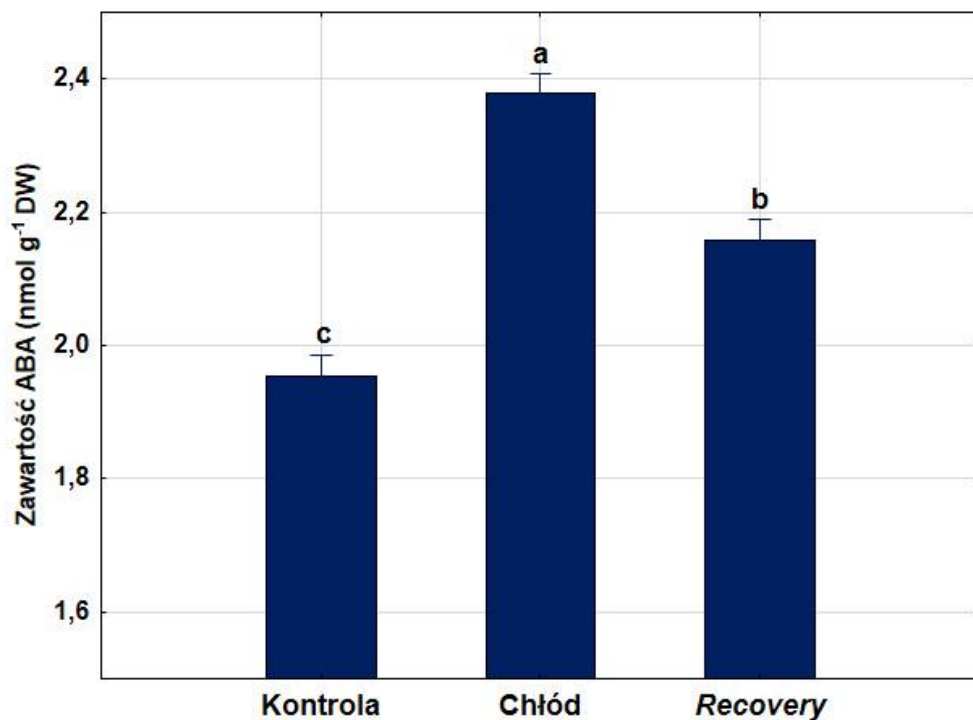
Pomiarów zawartości kwasu abscysynowego (ABA) dokonano w pierwszym, drugim oraz trzecim liściu siewek. Pomiarów dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapujących oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

Zawartość ABA u wszystkich linii populacji mapującej JxE, a także u obydwu linii rodzicielskich (Ji2731, Etian) wzrosła w trakcie działania chłodu (Ryc. 29, 30). Po zaprzestaniu działania chłodu – w trakcie *recovery* u większości badanych linii

zawartość ABA spadła. Zaznaczyły się ogromne różnice w zawartości ABA w liściach między liniami populacji mapującej podczas chłodzenia i *recovery*, a różnice te są znacznie większe, niż różnice między liniami rodzicielskimi, przy czym wiele linii uzyskało wyniki znacznie powyżej lub poniżej poziomu ABA u linii rodzicielskich.



Rycina 29. Zawartość ABA w trzech pierwszych liściach siewek sorga populacji mapującej JxE i dwóch linii rodzicielskich: Ji2731 i Etian, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).

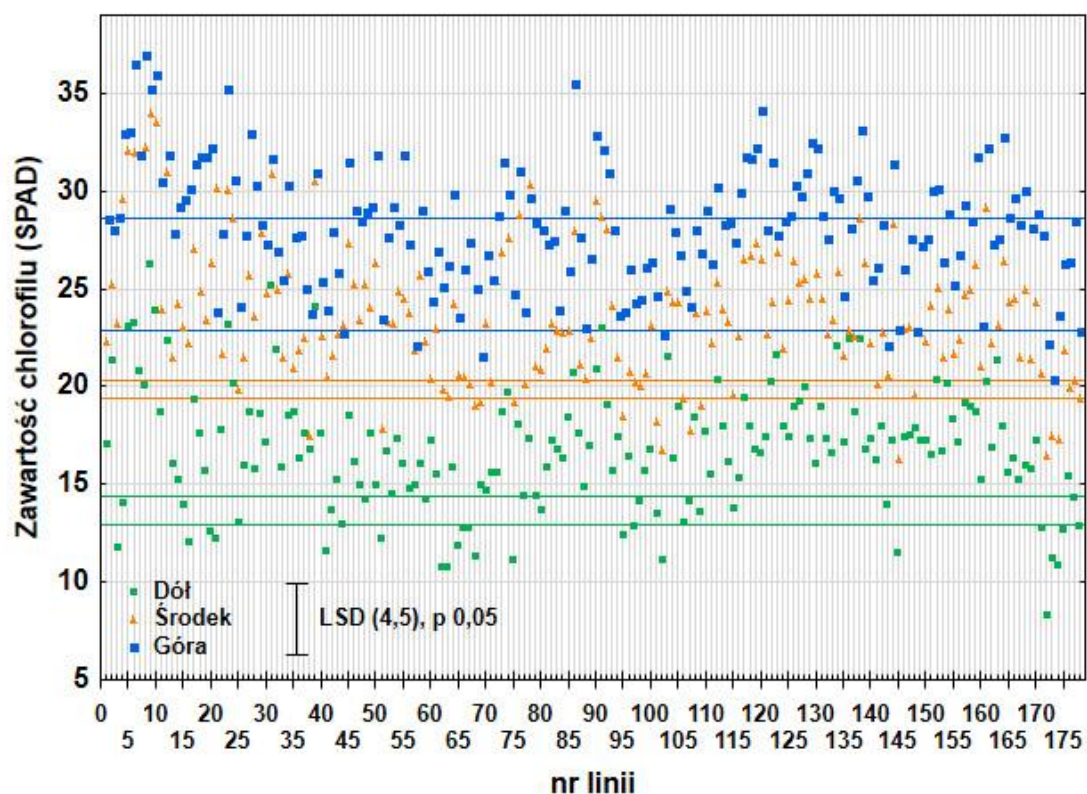


Rycina 30. Średnia zawartość ABA w trzech pierwszych liściach siewek sorga populacji mapującej JxE i dwóch linii rodzicielskich: Ji2731 i Etian, przed (Kontrola), w trakcie działania chłodu oraz recovery. Średnie oznaczone tymi samymi literami nie wykazują statystycznie istotnych różnic ($p > 0,05$).

Zawartość chlorofilu

Ogólną zawartość chlorofilu w liściach mierzono 2-go dnia odzyskiwania normalnego stanu przez siewki po zakończeniu chłodzenia (*recovery*). Pomiar zawartości chlorofilu wykonywano trzykrotnie na czwartym liściu (dolna, środkowa i górna część blaszki liściowej) trzech roślin z trzech różnych wazonów u populacji mapującej JxE i dwóch linii rodzicielskich: Ji2731 i Etian.

W trakcie *recovery* widoczne były różnice w zawartości chlorofilu w górnej, środkowej i dolnej części blaszki liściowej u wszystkich badanych linii (Ryc. 31). Zawartość chlorofilu była największa w górnej części liścia, a najmniejsza w części dolnej.

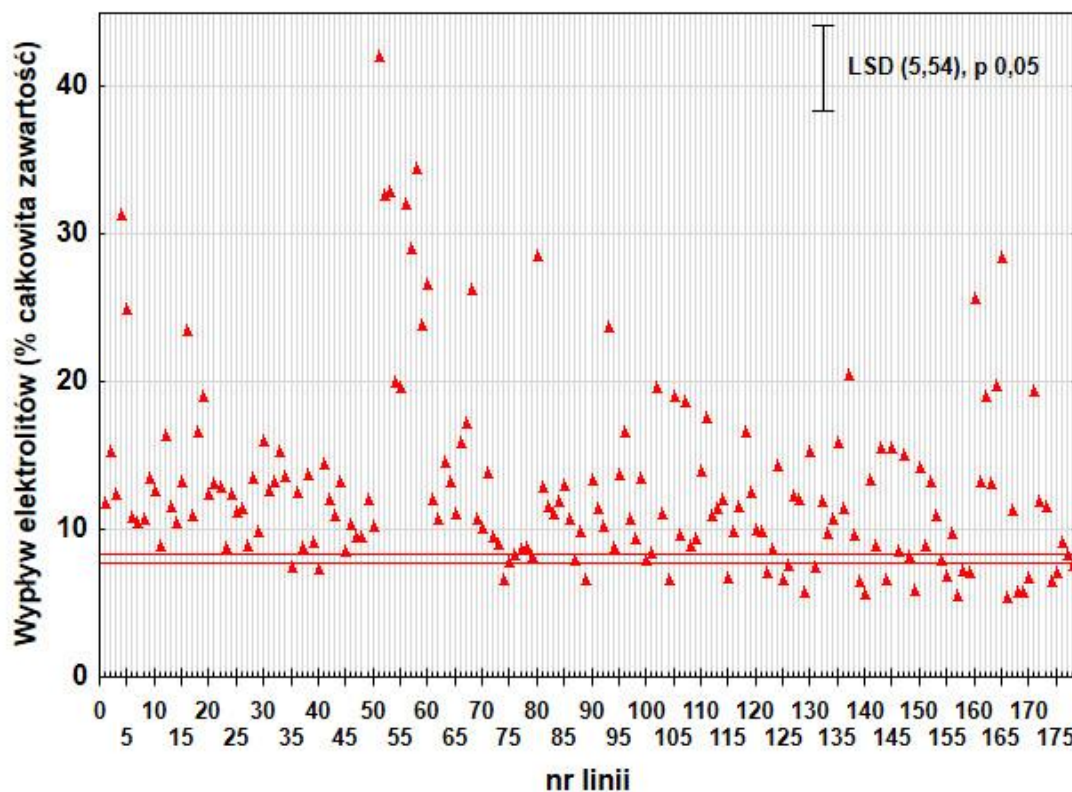


Rycina 31. Zawartość chlorofilu w czwartym liście siewek sorga populacji mapującej JxE i dwóch linii rodzicielskich: Ji2731 i Etian. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).

Wpływ elektrolitów

Pomiary wpływu elektrolitów wykonano na pierwszym, drugim oraz trzecim liście siewek w piątym dniu chłodzenia. Pomiarów dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapującej oraz ich linii rodzicielskich w trakcie chłodzenia (13/10°C, dzień/noc).

Wśród badanych linii populacji mapującej JxE, a także u obydwu linii rodzicielskich (Ji2731, Etian) widać różnice w badanym parametrze (Ryc. 32). U niektórych linii populacji mapującej wartość mierzonego parametru była znacznie powyżej wartości dla linii rodzicielskich, a różnice te wyniosły nawet 30%.



Rycina 32. Wyływ elektrolitów mierzony w trzech pierwszych liściach siewek sorga populacji mapującej JxE i dwóch linii rodzicielskich: Ji2731 i Etian w piątym dniu chłodzenia. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).

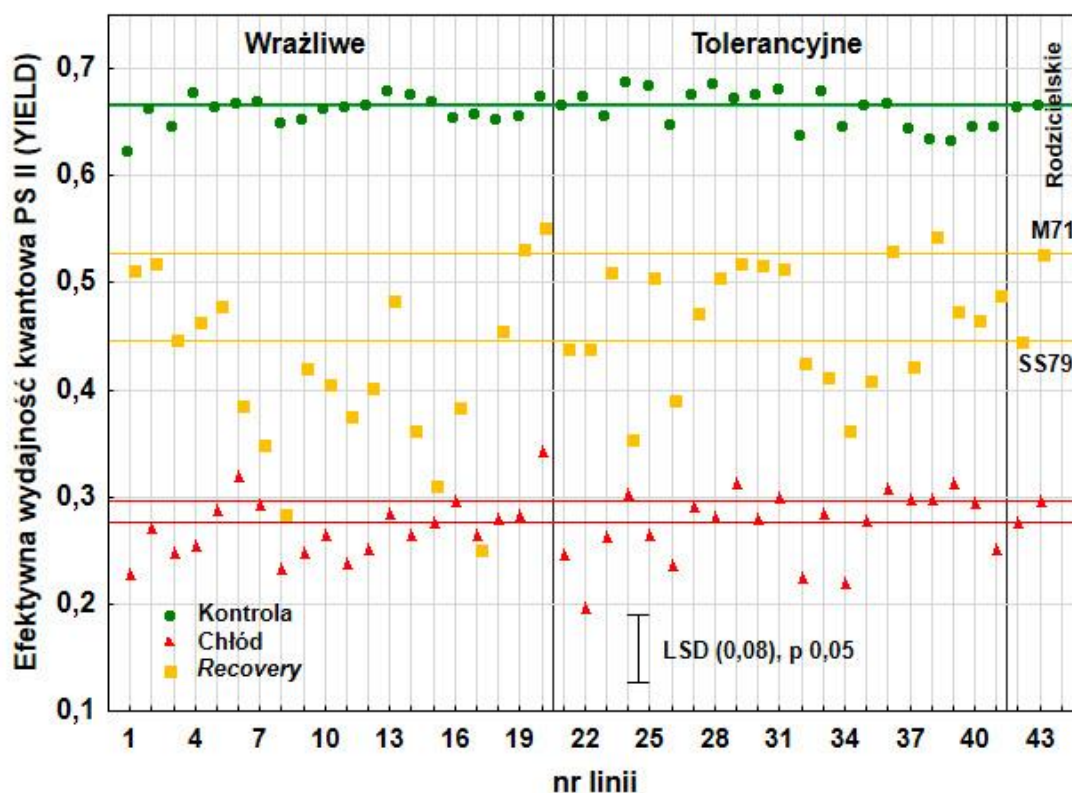
4.3.2. Populacja mapująca SxM

Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II

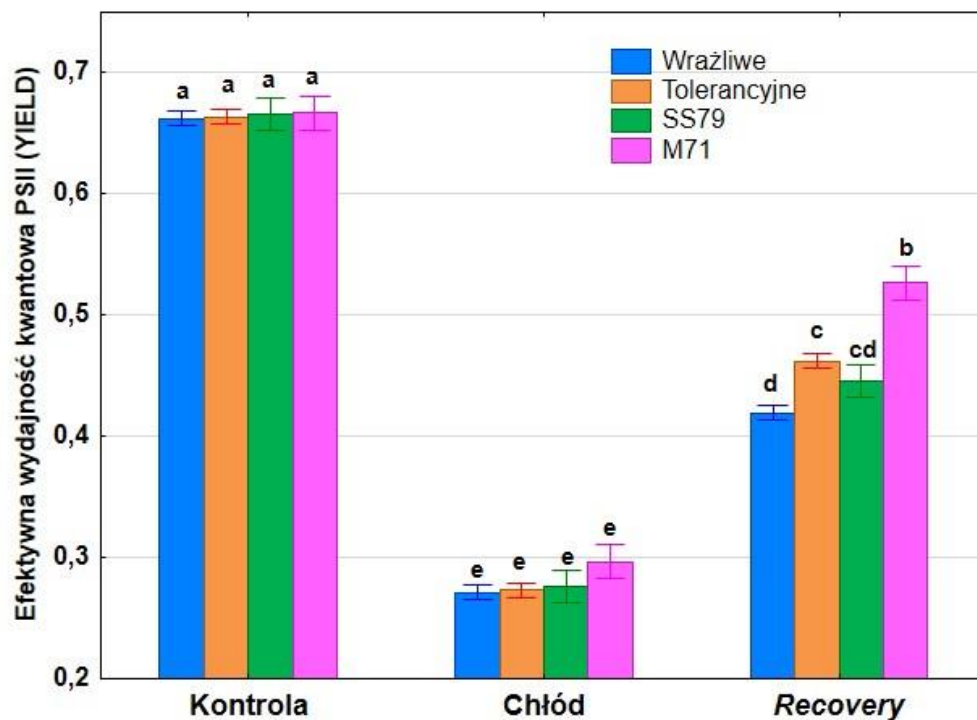
Pomiary parametru fluorescencji chlorofilu *a* efektywnej wydajności kwantowej fotosystemu II (PSII, YIELD) wykonano na roślinach zaadaptowanych do światła na pierwszym, drugim oraz trzecim liściu siewek. Pomiarów dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapujących oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

Wydajność kwantowa fotosystemu II u wszystkich linii populacji mapującej SxM, a także u obydwu linii rodzicielskich (SS79, M71) znacząco spadła w trakcie działania chłodu (Ryc. 33, 34). W trakcie *recovery* u większości badanych linii wzrosła

efektywna wydajność kwantowa PSII, która u linii tolerancyjnych była wyższa niż u linii wrażliwych na chłód. Między liniami wrażliwymi i tolerancyjnymi zaznaczyło się zróżnicowanie (Ryc. 34), a większość wartości mierzonego parametru dla linii populacji mapującej była znacznie powyżej albo poniżej wartości dla linii rodzicielskich.



Rycina 33. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II (PSII) mierzona fluorescencją chlorofilu *a* (YIELD) trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxM i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i M71, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p 0,05$).

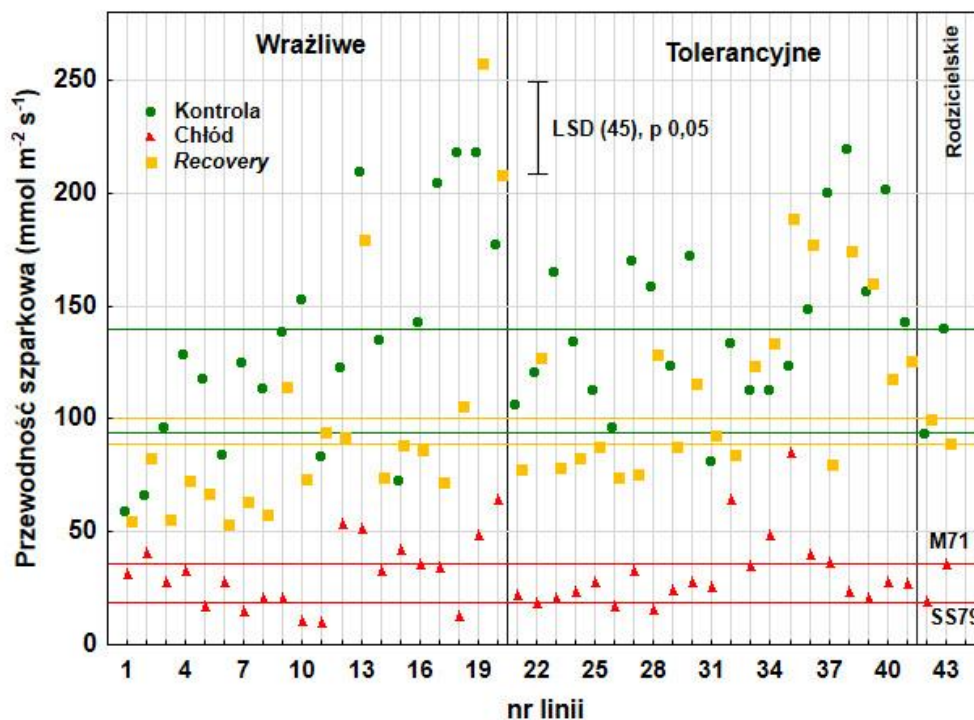


Rycina 34. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II (PSII) mierzona fluorescencją chlorofilu *a* (YIELD) trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxM i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i M71, w warunkach kontroli, stresu chłodu oraz *recovery*. Grafika przedstawia wartości średnie \pm odchylenia standardowe. Średnie oznaczone tymi samymi literami nie wykazują statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$).

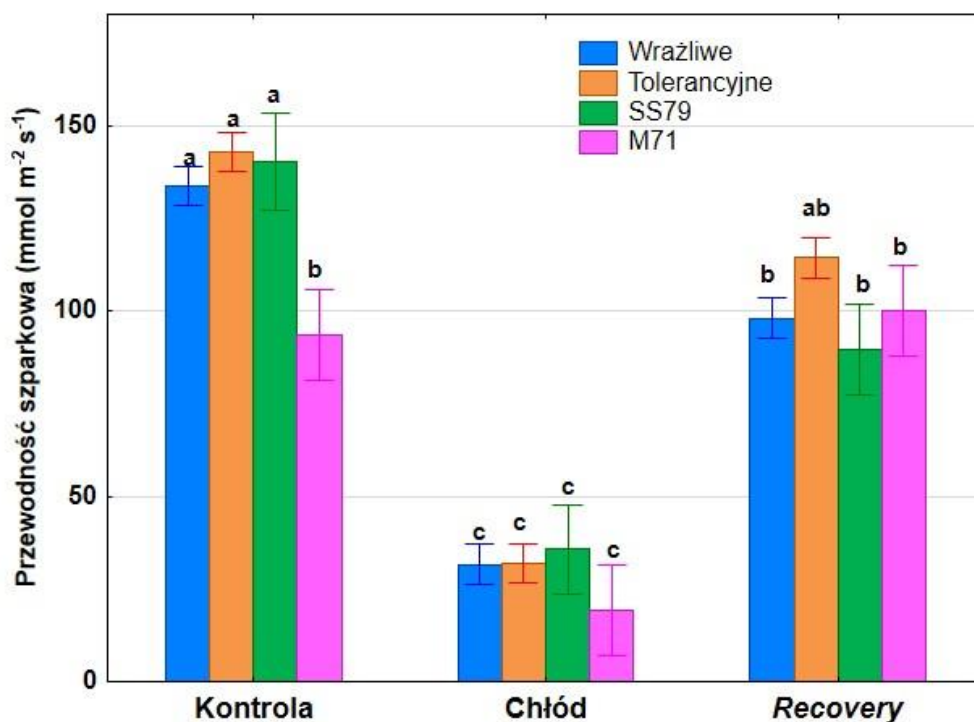
Przewodność aparatów szparkowych

Pomiarów przewodności aparatów szparkowych dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapujących oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

W trakcie działania chłodu przewodność szparkowa u wszystkich linii populacji mapującej SxM, a także u obydwu linii rodzicielskich (SS79, M71) wyraźnie spadła (Ryc. 35, 36), natomiast w trakcie *recovery* – wzrosła. Między liniami tolerancyjnymi a wrażliwymi widoczne było większe zróżnicowanie po zaprzestaniu działania chłodu (*recovery*) niż w trakcie chłodzenia (Ryc. 36). Podczas *recovery* u linii tolerancyjnych można było zauważyć szybsze ponowne otwarcie aparatów szparkowych, w porównaniu do linii wrażliwych.



Rycina 35. Przewodność szparkowa trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxM i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i M71, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).

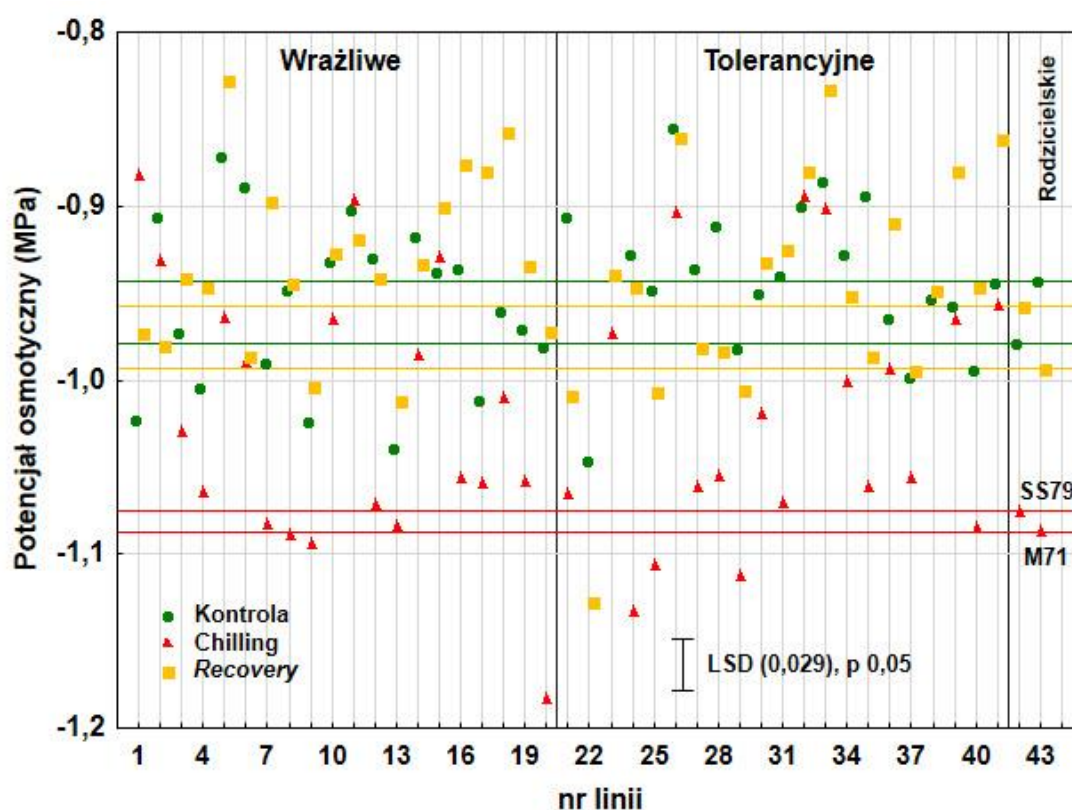


Rycina 36. Przewodność szparkowa trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxM i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i M71, w warunkach kontroli, stresu chłodu oraz *recovery*. Grafika przedstawia wartości średnie \pm odchylenia standardowe. Średnie oznaczone tymi samymi literami nie wykazują statystycznie istotnych różnic (p 0,05).

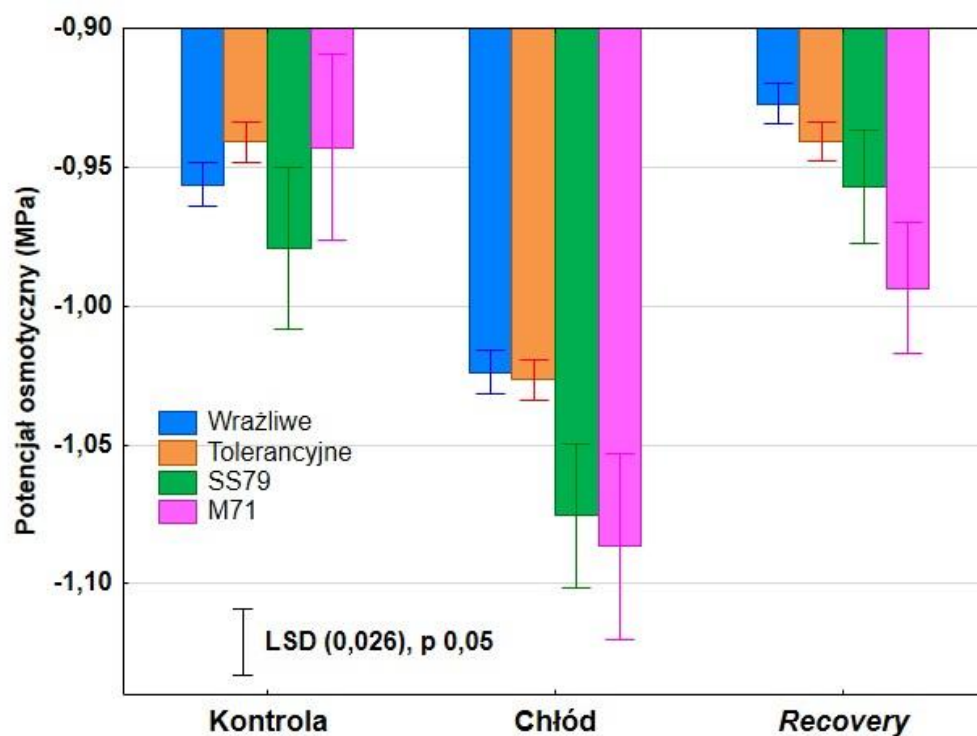
Potencjał osmotyczny

Potencjał osmotyczny (OP) zmierzono w pierwszym, drugim oraz trzecim liście siewek. Pomiarów dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapujących oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

Wśród linii populacji mapującej SxM, a także u obydwu linii rodzicielskich (SS79, M71) widać było zróżnicowanie (Ryc. 37, 38), a większość wartości mierzonego parametru dla linii populacji mapującej była znacznie powyżej albo poniżej wartości dla linii rodzicielskich. Jednak w chłodzie różnice między liniami tolerancyjnymi i wrażliwymi nie były tak istotne, większe zróżnicowanie widoczne były podczas *recovery* (Ryc. 38).



Rycina 37. Potencjał osmotyczny trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxM i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i M71, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).



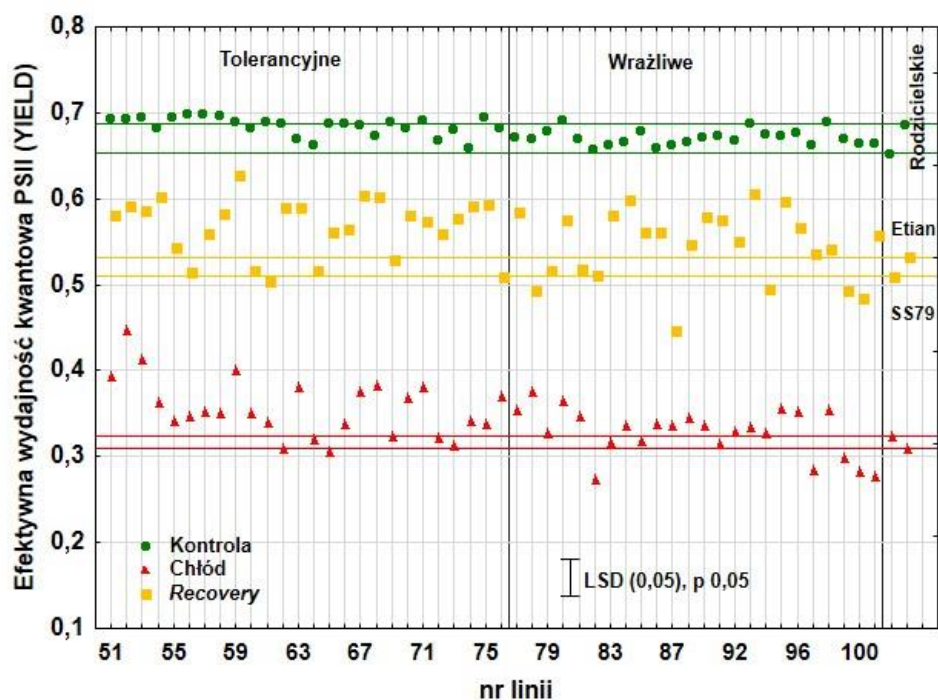
Rycina 38. Potencjał osmotyczny trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxM i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i M71, w warunkach kontroli, stresu chłodu oraz *recovery*. Grafika przedstawia wartości średnie \pm odchylenia standardowe.

4.3.3. Populacja mapująca SxE

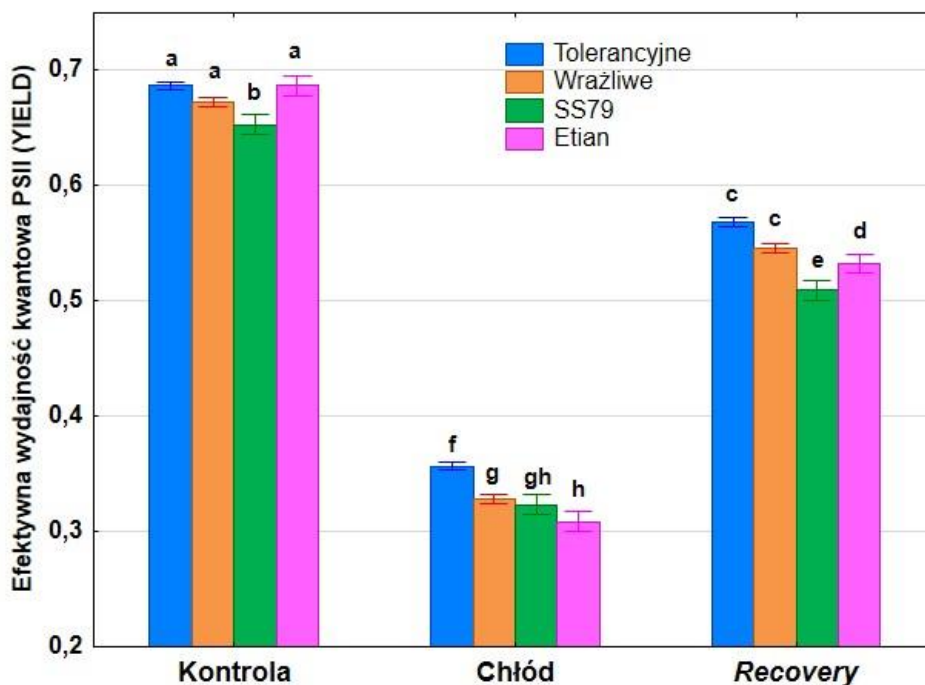
Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II

Pomiary parametru fluorescencji chlorofilu *a* efektywnej wydajności kwantowej fotosystemu II (PSII, YIELD) wykonano na roślinach zaadaptowanych do światła na pierwszym, drugim oraz trzecim liściu siewek. Pomiarów dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapujących oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

Wydajność kwantowa fotosystemu II u wszystkich linii populacji mapującej SxE, a także u obydwu linii rodzicielskich (SS79, Etian) znacząco spadła w trakcie działania chłodu (Ryc. 39, 40), a pomiędzy liniami tolerancyjnymi i wrażliwymi widoczne były znaczące różnice. W trakcie *recovery* u wszystkich badanych linii wzrosła efektywna wydajność kwantowa PSII, jednak różnice między wrażliwymi i tolerancyjnymi liniami nie były istotne.



Rycina 39. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II (PSII) mierzona fluorescencją chlorofilu *a* (YIELD) trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxE i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i Etian, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica ($p 0,05$).

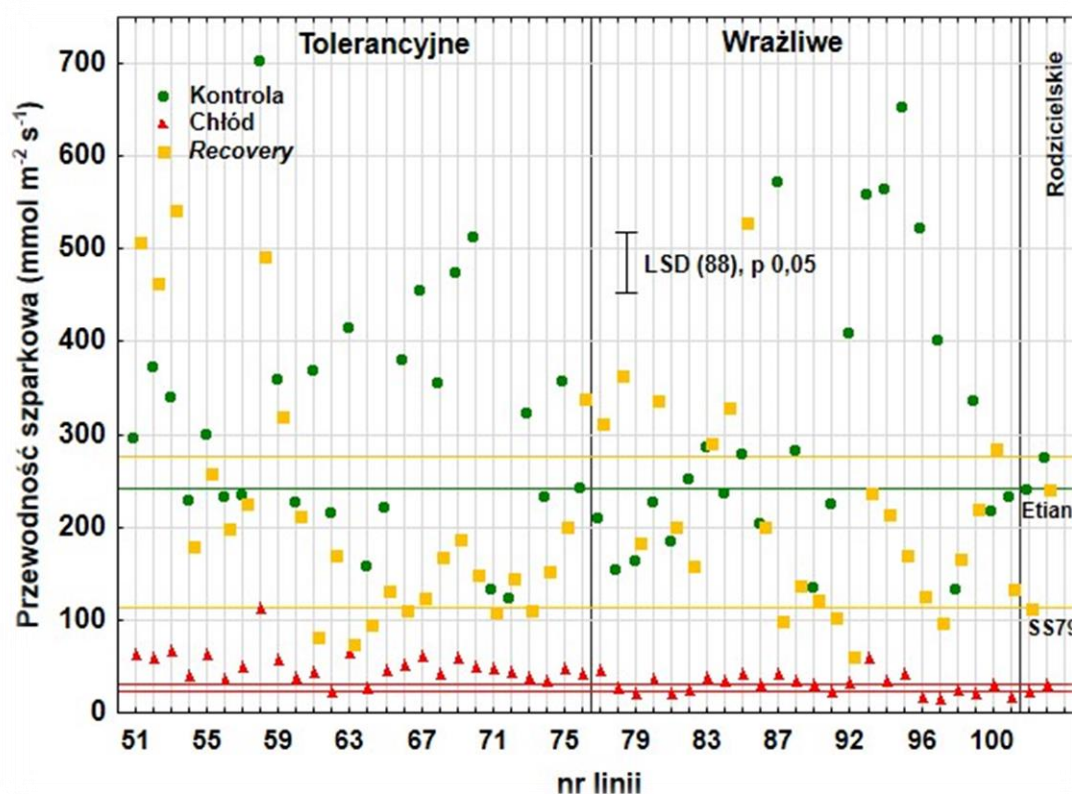


Rycina 40. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II (PSII) mierzona fluorescencją chlorofilu *a* (YIELD) trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxE i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i Etian, w warunkach kontroli, stresu chłodu oraz *recovery*. Grafika przedstawia wartości średnie \pm odchylenia standardowe. Średnie oznaczone tymi samymi literami nie wykazują statystycznie istotnych różnic ($p 0,05$).

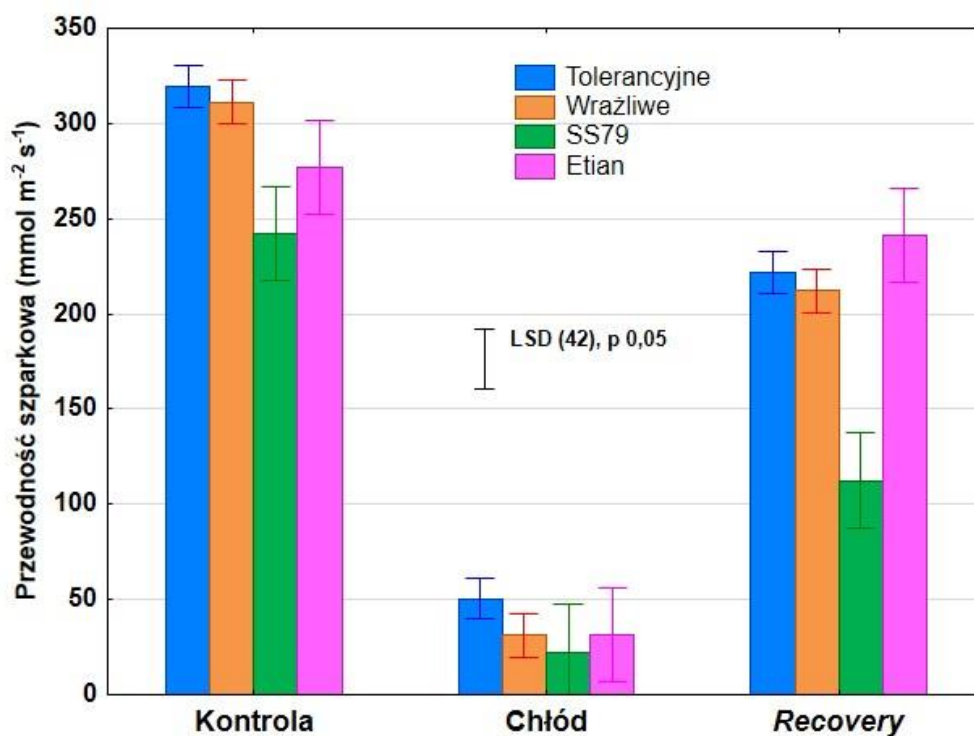
Przewodność aparatów szparkowych

Pomiarów przewodności aparatów szparkowych dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapujących oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

W trakcie działania chłodu przewodność szparkowa u wszystkich linii populacji mapującej SxE, a także u obydwu linii rodzicielskich (SS79, Etian) znacząco spadła (Ryc. 41). Natomiast w trakcie *recovery* – wzrosła, a większość wartości mierzonego parametru dla linii populacji mapującej była znacznie powyżej albo poniżej wartości dla linii rodzicielskich, podobnie jak przed chłodzeniem.



Rycina 41. Przewodność szparkowa trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxE i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i Etian, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).

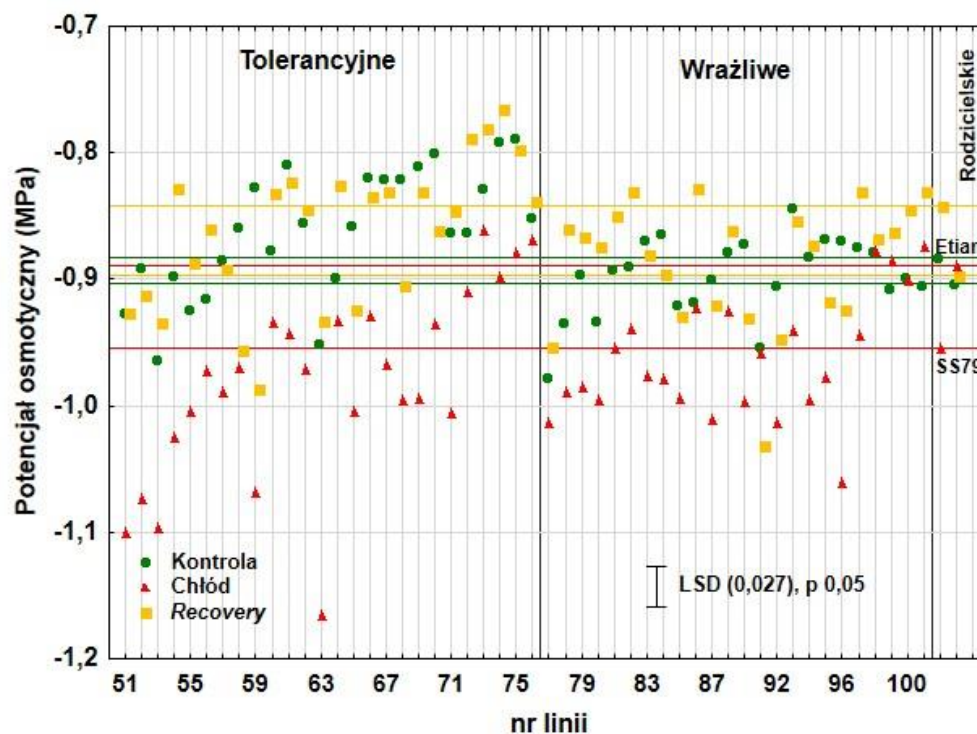


Rycina 42. Przewodność szparkowa trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxE i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i Etian, w warunkach kontroli, stresu chłodu oraz *recovery*. Średnie oznaczone tymi samymi literami nie wykazują statystycznie istotnych różnic ($p > 0,05$). Grafika przedstawia wartości średnie \pm odchylenia standardowe.

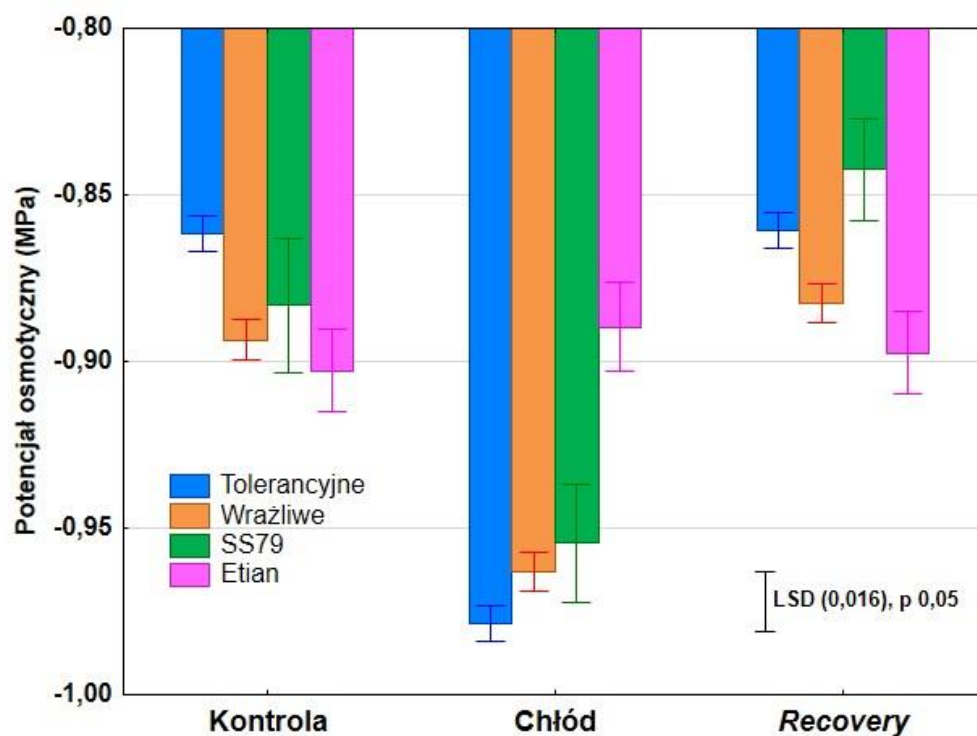
Potencjał osmotyczny

Potencjał osmotyczny (OP) zmierzono w pierwszym, drugim oraz trzecim liściu siewek. Pomiarów dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapujących oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

U linii populacji mapującej SxE wartość OP spadła w trakcie działania chłodu (Ryc. 43, 44), jednak u linii tolerancyjnych spadek ten był większy niż u wrażliwych. W trakcie *recovery* wartość OP znacznie wzrosła i była bardzo podobna do wartości sprzed chłodzenia.



Rycina 43. Potencjał osmotyczny trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej Sx*E* i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i Etian, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).



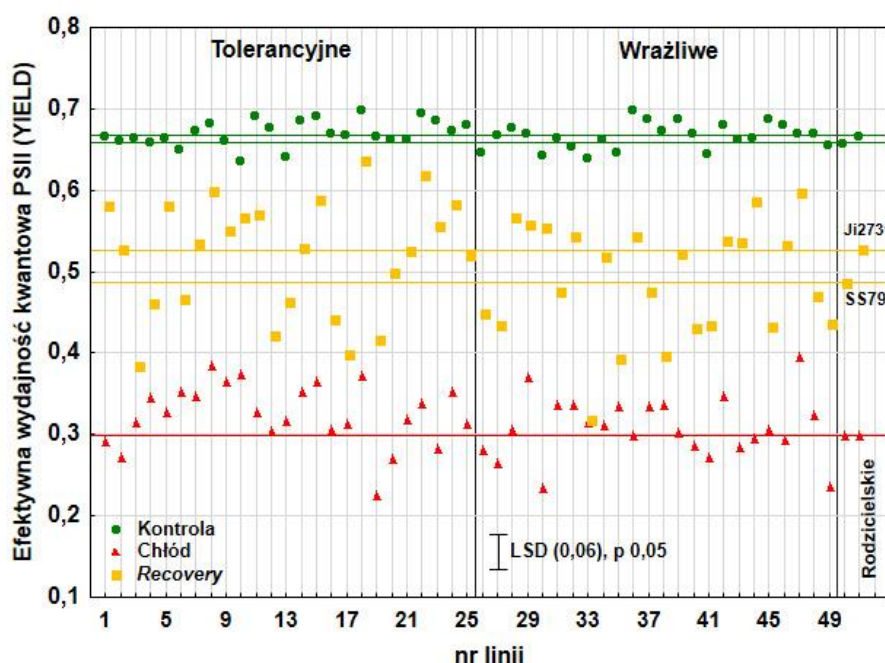
Rycina 44. Potencjał osmotyczny trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej Sx*E* i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i Etian, w warunkach kontroli, stresu chłodu oraz *recovery*. Grafika przedstawia wartości średnie \pm odchylenia standardowe.

4.3.4. Populacja mapująca SxJ

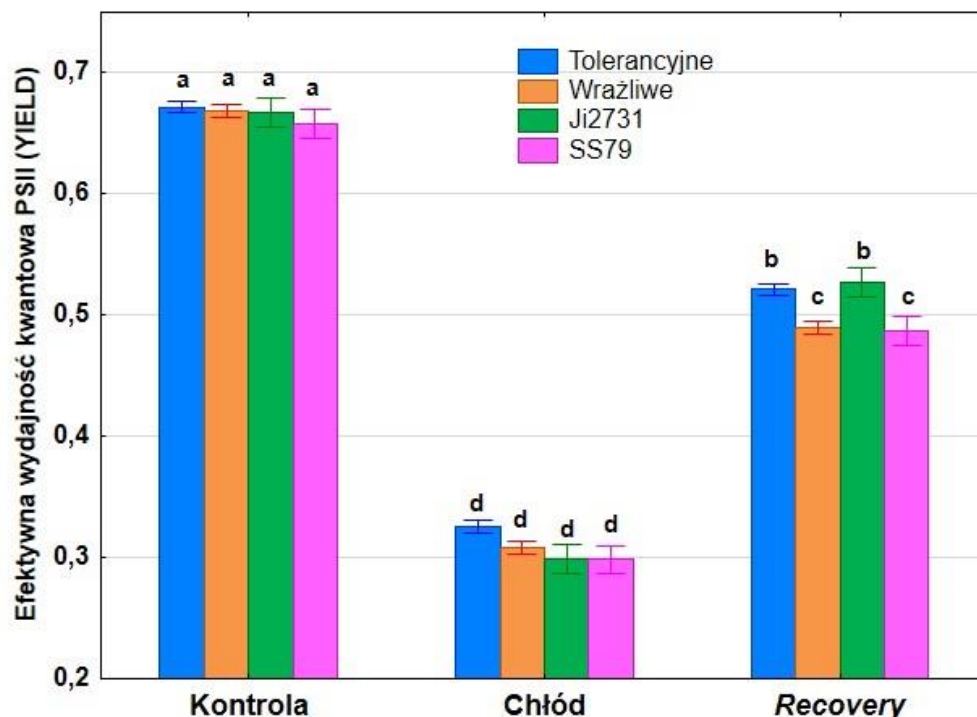
Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II

Pomiary parametru fluorescencji chlorofilu *a* efektywnej wydajności kwantowej fotosystemu II (PSII, YIELD) wykonano na roślinach zaadaptowanych do światła na pierwszym, drugim oraz trzecim liściu siewek. Pomiarów dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapujących oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

Wydajność kwantowa fotosystemu II u wszystkich linii populacji mapującej SxJ oraz u obydwu linii rodzicielskich (SS79, Ji2731) znacząco spadła w trakcie działania chłodu (Ryc. 45, 46). Po zaprzestaniu działania chłodu u większości badanych linii wydajność kwantowa wzrosła, a u linii tolerancyjnych była wyższa niż u linii wrażliwych. Między liniami wrażliwymi i tolerancyjnymi zaznaczyło się zróżnicowanie (Ryc. 34), a większość wartości mierzonego parametru dla linii populacji mapującej była znacznie powyżej albo poniżej wartości dla linii rodzicielskich.



Rycina 45. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II (PSII) mierzona fluorescencją chlorofilu *a* (YIELD) trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxJ i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i Ji2731, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).

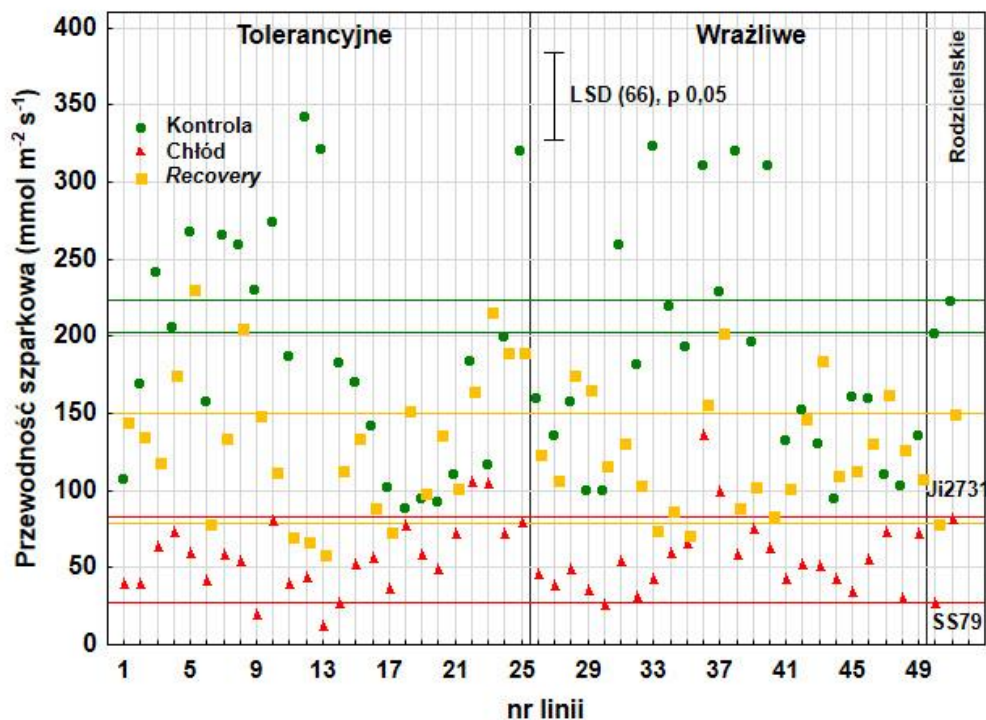


Rycina 46. Efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II (PSII) mierzona fluorescencją chlorofilu *a* (YIELD) trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxJ i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i Ji2731, w warunkach kontroli, stresu chłodu oraz *recovery*. Grafika przedstawia wartości średnie \pm odchylenia standardowe. Średnie oznaczone tymi samymi literami nie wykazują statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$).

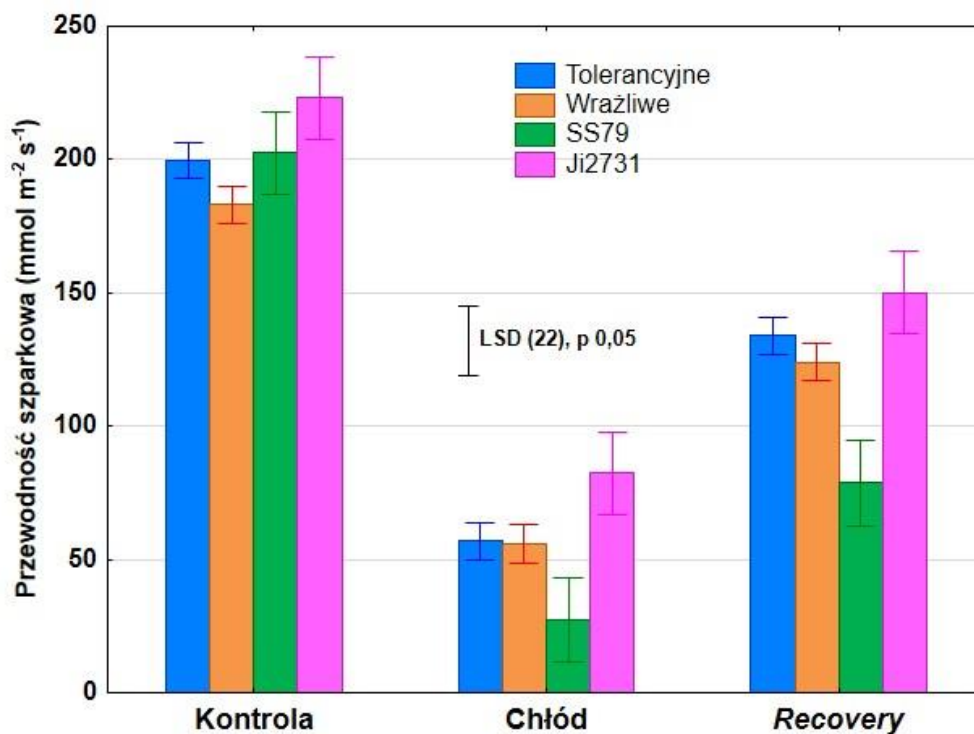
Przewodność aparatów szparkowych

Pomiarów przewodności aparatów szparkowych dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapujących oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

W trakcie działania chłodu przewodność szparkowa u wszystkich linii populacji mapującej SxJ oraz u obydwu linii rodzicielskich (SS79, Ji2731) wyraźnie spadła (Ryc. 47, 48), natomiast w trakcie *recovery* – wzrosła. Między liniami tolerancyjnymi a wrażliwymi widoczne było większe zróżnicowanie po zaprzestaniu działania chłodu (*recovery*) niż w trakcie chłodzenia (Ryc. 48). Między wrażliwą a tolerancyjną linią rodzicielską widoczne były duże różnice zarówno w chłodzie jak i *recovery*.



Rycina 47. Przewodność szparkowa trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxJ i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i Ji2731, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).

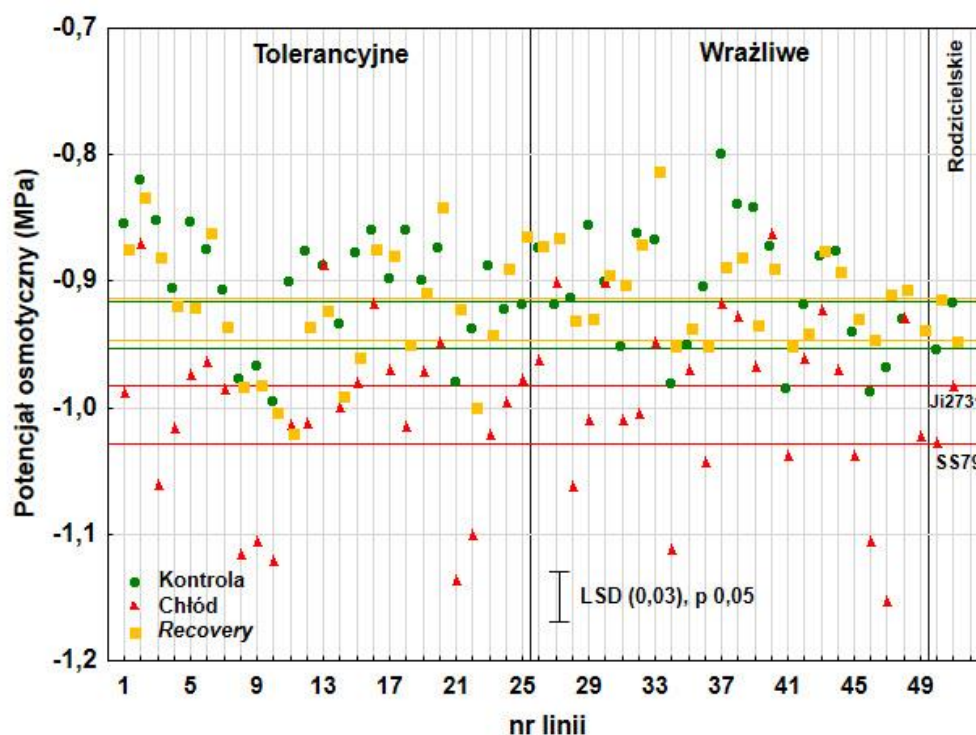


Rycina 48. Przewodność szparkowa trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxJ i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i Ji2731, w warunkach kontroli, stresu chłodu oraz *recovery*. Grafika przedstawia wartości średnie \pm odchylenia standardowe.

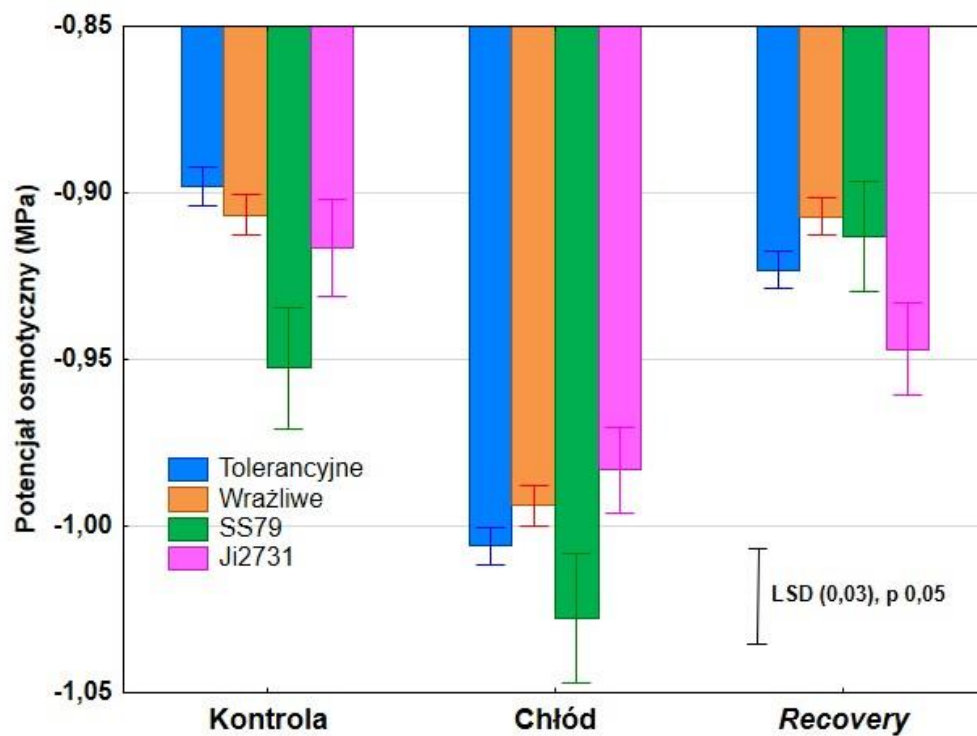
Potencjał osmotyczny

Potencjał osmotyczny (OP) zmierzono w pierwszym, drugim oraz trzecim liściu siewek. Pomiarów dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapujących oraz ich linii rodzicielskich przed działaniem chłodu (25/20°C, dzień/noc), przez pięć dni chłodzenia (13/10°C, dzień/noc) oraz podczas pięciu dni odzyskiwania normalnego stanu siewek po działaniu chłodu (*recovery*, 25/20°C, dzień/noc) (Schemat 4).

Wśród linii populacji mapującej SxJ, a także u obydwu linii rodzicielskich (SS79, Ji2731) wartość OP znacznie spadła w chłodzie (Ryc. 49, 50), a między liniami wrażliwymi i tolerancyjnymi zaznaczyły się różnice. W trakcie *recovery* wartość OP u wszystkich badanych linii wzrosła.



Rycina 49. Potencjał osmotyczny trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxJ i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i Ji2731, przed, w trakcie działania chłodu oraz *recovery*. Poziome linie przedstawiają wartości tego parametru dla linii rodzicielskich. LSD - najmniejsza, statystycznie istotna różnica (p 0,05).



Rycina 50. Potencjał osmotyczny trzech pierwszych liści siewek sorga populacji mapującej SxJ i dwóch linii rodzicielskich: SS79 i Ji2731, w warunkach kontroli, stresu chłodu oraz *recovery*. Grafika przedstawia wartości średnie \pm odchylenia standardowe.

5. DYSKUSJA

Abiotyczne czynniki stresowe takie jak wysoka, czy niska temperatura, niedobór i nadmiar wody, działające na rośliny uprawne, wywołują u nich liczne reakcje fizjologiczne i biochemiczne prowadzące do zakłóceń funkcjonowania najważniejszych procesów wzrostu i rozwoju, a w rezultacie do zmniejszenia plonowania tych roślin. W związku ze znaczącym wpływem zmian klimatycznych w ostatnich latach zwiększyła się częstotliwość występowania zarówno okresów suszy, jak i okresowych podtopień, pojawiających się w różnym czasie okresu wegetacyjnego roślin, w tym szczególnie niekorzystnych okresach krytycznych (Sillmann and Roeckner, 2008). Ważnym czynnikiem ograniczającym wzrost oraz plonowanie roślin tropikalnych i subtropikalnych w regionach o umiarkowanym klimacie, w tym w Polsce, jest temperatura chłodowa, definiowana jako niska, niemrozowa temperatura w zakresie 0-15°C. Zbyt niska temperatura wiosną opóźnia wysiew oraz skraca okres wegetacji. Chłód opóźnia i obniża kiełkowanie, wschody, wzrost i rozwój roślin, także korzeni oraz akumulację biomasy. Częste i nagłe spadki temperatury w maju i czerwcu powodują poważne uszkodzenia siewek, a nawet śmierć, co prowadzi do istotnego obniżenia plonu. Chłód wpływa też na wiele procesów komórkowych w roślinie, tak więc proces aklimatyzacji do chłodu obejmuje wiele zmian fizjologicznych, biochemicznych, metabolicznych i molekularnych.

W pracy badano fizjologiczne reakcje roślin sorga (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) w fazie siewki na stres chłodu oraz określano procesy i cechy, które odgrywają rolę w tolerancji na chłód tego gatunku. W związku ze wspomnianymi globalnymi zmianami klimatycznymi, gatunek ten jest bowiem kandydatem na przyszłą roślinę uprawną w naszej szerokości geograficznej a głównym czynnikiem ograniczającym jego wprowadzenie do uprawy na wielką skalę jest wrażliwość na temperatury chłodowe. Do badań wykorzystano 6 linii rodzicielskich (wrażliwych oraz tolerancyjnych na chłód) oraz 4 populacje mapujące (składające się z linii wrażliwych i tolerancyjnych na chłód) i ich linie rodzicielskie. Linie sorgo pod kątem tolerancyjności na chłód zostały wybrane na podstawie opublikowanych badań (Bekele et al., 2014) oraz informacji ustnej prof. Roda Snowdona, Uniwersytet w Giessen, Niemcy - koordynatora projektu *ERANET GAS – Genetyczna Adaptacja Sorga: Oparta na genomice hodowla rośliny energetycznej dla zrównoważonego*

rozwoju (Program ERA-NET Bioenergy) / *ERANET GAS – Genetic Adaptation of Sorghum: Genomics-based breeding of a sustainable, next-generation bioenergy crop for Europe*. Część genetyczna projektu z wykorzystaniem metod genetyki molekularnej i genomiki została wykonana przez grupę prof. Roda Snowdona.

5.1. Fizjologiczne reakcje sorga na stres chłodu

5.1.1. Fluorescencja chlorofilu *a*

Aparat fotosyntetyczny, a szczególnie strukturę fotosystemu II (PSII) uważa się za wyjątkowo wrażliwe na stres. Jednym ze sposobów oceny stanu aparatu fotosyntetycznego w warunkach stresu są pomiary fluorescencji chlorofilu *a*. Zmiany fluorescencji chlorofilu *a* dostarczają informacji odnośnie zmian funkcji i struktury PSII (Oukarroum et al., 2007). Temperatury chłodowe znacząco obniżają aktywność systemu fotosyntetycznego u gatunków wrażliwych na ten stres, co prowadzi do spadku efektywnej wydajności kwantowej PSII.

W pracy przedstawiono wyniki pomiarów podstawowego parametru fluorescencji chlorofilu efektywnej wydajności kwantowej PSII (Φ PSII, YIELD). YIELD określa stosunek kwantów wykorzystanych w przemianach fotochemicznych do całkowitej liczby zaabsorbowanych kwantów (Kalaji and Łaboda, 2010). Wyniki pomiarów przeprowadzonych we wszystkich doświadczeniach wskazują, że chłód działający na siewki sorga powodował natychmiastowe zaburzenia w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego. Już w pierwszym dniu traktowania chłodem odnotowano znaczny spadek efektywnej wydajności kwantowej PSII u wszystkich sześciu linii rodzicielskich sorga oraz linii populacji mapujących i ich linii rodzicielskich (Ryc. 1, 13, 14, 15, 26, 33, 34, 39, 40, 45, 46). Podobne obniżenie parametrów fluorescencji chlorofilu liści w warunkach niskiej temperatury obserwowano w wielu pracach dotyczących gatunków wrażliwych na chłód np. kukurydzy (Fracheboud et al., 1999; Kościelniak and Biesaga-Kościelniak, 2006; Mazur et al., 2024), soi (Mazur et al., 2024), czy pomidora (Ji et al., 2024). Znaczny spadek wydajności kwantowej PSII w pierwszych godzinach chłodzenia spowodowany był ograniczeniami metabolicznymi, bowiem nie zaobserwowano w tym czasie zamykania aparatów szparkowych. Natomiast w okresie zdrowienia siewek (*recovery*) po zakończeniu działania chłodu poziom wydajności kwantowej PSII istotnie i wysoko ($r = 0.71^{***}$)

korelował z przewodnością aparatów szparkowych sugerując ograniczenia substratowe (dostępność CO₂) dla wydajności fotosyntetycznej siewek sorga mierzonej wydajnością kwantową PSII. Największe różnice w efektywnej wydajności kwantowej PSII między liniami rodzicielskimi oraz w populacjach mapujących obserwowano na późniejszym etapie chłodzenia i w czasie *recovery*. Wydajność kwantowa PSII (YIELD) była ze wszystkich mierzonych parametrów fluorescencji chlorofilu, najlepiej różnicującym tolerancję siewek sorga na stres chłodu. Uzyskane zróżnicowanie badanych linii w obrębie gatunku sorga jest zgodne z doniesieniami w literaturze o tym, że istnieje znacząca zmienność w reakcji aparatu fotosyntetycznego u sorga na stres chłodu i w ich zdolności do odzyskania normalnego stanu po tym stresie (Ortiz et al., 2017). U linii rodzicielskich bardziej tolerancyjnych na chłód (M71, Ji279) efektywna wydajność kwantowa była na nieco wyższym poziomie w trakcie działania chłodu, niż u linii wrażliwych (SS79, Keller i Btx623), a w trakcie *recovery* linia M71 i Ji2731 prawie w pełni odzyskały normalny stan przed traktowania chłodem, podczas gdy linie: SS79, Keller i Btx623 tylko w niewielkim stopniu. Obserwacja ta jest zgodna z doniesieniami w literaturze, że istnieją różnice w wydajności fotosyntetycznej między odmianami sorga tolerancyjnymi i bardziej wrażliwymi na stres chłodu (Zegada-Lizarazu et al., 2016). Bardzo interesującą obserwacją jest, iż większe zróżnicowanie wydajności fotosyntetycznej między wrażliwymi i tolerancyjnymi mieszańcami populacji SxM i SxJ było podczas *recovery* niż w trakcie działania stresu chłodu (Ryc. 34, 46). Wśród badanych populacji mapujących tylko populacja SxE wykazała istotne różnice w wydajności fotosyntetycznej w warunkach bezpośredniego działania stresu chłodu (Ryc. 40). Największy spadek wydajności fotosyntetycznej obserwowano dla najstarszych fizjologicznie liściach, a najmniejsze dla najmłodszych, co też najbardziej różnicowało badane linie (Ryc. 14, 15). U odmian względnie chłodo-tolerancyjnych różnice we wrażliwości między liśćmi były bardzo małe – liście starsze wykazywały również tolerancję na chłód.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, iż reakcja aparatu fotosyntetycznego sorga na temperaturę chłodową bardzo różnicuje linie, a ocena jego stanu i funkcjonalności za pomocą nieinwazyjnej i szybkiej metody pomiaru fluorescencji chlorofilu *a* może być kryterium selekcji w dalszej hodowli tolerancyjnych odmian sorga.

5.1.2. Przewodność szparkowa

Stopień otwarcia aparatów szparkowych jest reakcją na działanie wielu czynników, jak temperatura i wilgotność powietrza, intensywność światła, wilgotność gleby, wewnątrzkomórkowe stężenie dwutlenku węgla, czy zmiana stężenia ABA (Dodd, 2003). Aparaty szparkowe odpowiadają w roślinie za przebieg wielu ważnych procesów, tj. fotosyntezy poprzez dostarczanie do wnętrza liści dwutlenku węgla, odgrywają istotną rolę w kontrolowaniu temperatury liści, regulując straty wody na drodze transpiracji (Acharya and Assmann, 2009). Dlatego jednym z pierwszych i podstawowych wskaźników informujących o działających na rośliny niekorzystnych czynnikach środowiskowych jest właśnie zmiana stopnia otwarcia aparatów szparkowych. Niska temperatura powoduje przymknięcie aparatów szparkowych (Agurla et al., 2018), a zdolność do zamykania aparatów szparkowych uważana jest za jedną z głównych strategii odporności / tolerancji na stres, w literaturze można znaleźć doniesienie o braku tej reakcji u wrażliwych na chłód odmian kukurydzy (Vigh et al., 1981).

W prezentowanych badaniach chłód (13/10°C, dzień/noc) powodował przymknięcie aparatów szparkowych u wszystkich badanych linii rodzicielskich sorga oraz populacji mapujących i ich linii rodzicielskich, zarówno tych bardziej tolerancyjnych jak i wrażliwych na chłód (Ryc. 2, 16, 27, 35, 36, 41, 42, 47, 48). Aparaty szparkowe otwierały się na początku działania chłodu, co powodowane było działaniem niskiej temperatury, jako takiej, na mechanizmy sterujące ich przymknięciem, a nie skutkiem indukowanego chłodem deficytu wody w liściach. Pod koniec chłodzenia oraz w początkowych dniach *recovery* aparaty szparkowe były przymknięte u wszystkich linii. Siewki sorga po okresie chłodu i *recovery* wykazywały niższe wartości przewodności szparkowej w porównaniu do roślin kontrolnych sprzed chłodzenia (Ryc. 16), a podobna sytuację zaobserwowano również u innych gatunków, m.in. u kukurydzy (Melkonian et al., 2004), czy ryżu w warunkach stresu chłodu (Zhang et al., 2015). Niezwykle ciekawą reakcją aparatów szparkowych było ich zamykanie się u chłodzonych siewek po zakończeniu oddziaływania tego stresu w okresie *recovery*. Parametr ten w tym okresie po przejściu chłódów najbardziej różnicował linie sorga. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie, że stan aparatów szparkowych nie był głównym czynnikiem powodującym spadek rzeczywistej wydajności kwantowej PSII

w pierwszych godzinach działania chłodu sugerując jednocześnie oddziaływanie ograniczeń metabolicznych w tym okresie działania chłodu.

Za jeden z czynników powodujących zamykanie aparatów szparkowych podczas stresu chłodu uważa się wzrost stężenia kwasu abscysynowego (ABA). Zależność pomiędzy stężeniem ABA w soku ksylemu, a przewodnością szparkową podczas chłodu stwierdzono u wielu gatunków roślin między innymi u kukurydzy np. w stresie suszy (Wilkinson and Davies, 2002), a prawidłowość tę obserwowano również w niniejszej pracy. Chłód zwiększył początkowo stopień rozwarcia aparatów szparkowych u wszystkich linii rodzicielskich (Ryc. 16), które w trakcie dalszego oddziaływanie tego stresu były przymykane z powrotem do poziomu kontroli na skutek akumulacji ABA w liściach (Ryc. 17). U linii populacji mapującej (JxE), u której badano zawartość ABA, także stwierdzono wzrost zawartości ABA w trakcie działania chłodu oraz spadek przewodności szparkowej (Ryc. 27, 29). Zaobserwowano także większe zróżnicowanie przewodności szparkowej między podatnymi i tolerancyjnymi mieszańcami populacji SxM i SxJ podczas *recovery* niż w trakcie działania stresu chłodu. Mieszańce tolerancyjne szybciej otwierały aparaty szparkowe podczas *recovery* (Ryc. 36, 48) przywracając wydajność fotosyntetyczną w porównaniu z podatnymi (Ryc. 34, 46).

Susza glebowa (10 dni wzrostu siewek przy podlewaniu deficytowym 20% PPW) – stosowana w prezentowanych badaniach jako czynnik hartujący na chłód – spowodowała nieznaczny spadek przewodności szparkowej liści u trzech badanych linii (Etian, Keller i Ji2731, Ryc. 21), jednak u pozostałych (M71, SS79 i Btx623) przewodność szparkowa wzrosła sugerując, iż stres suszy spowodował więc u tych linii przejściową utratę zdolności kontroli stanu rozwarcia aparatów szparkowych. W trakcie działania chłodu na siewki hartowane i niehartowane, aparaty szparkowe u obydwu grup przymknęły się prawie do tego samego poziomu, jednak u siewek hartowanych suszą przewodność szparkowa była nieco niższa, w porównaniu do niehartowanych.

5.1.3. Uszkodzenia chłodowe

Zwiększony wpływ elektrolitów z komórek roślinnych w trakcie działania chłodu świadczy o uszkodzeniach membran cytoplazmatycznych (Campos et al., 2003;

Markowski and Skrudlik, 1995), a stopień wpływu elektrolitów może być adekwatnym wskaźnikiem uszkodzenia rośliny a więc jej tolerancji na działający stres. Rośliny o wyższym stopniu odporności lub zdolności adaptacji do danych niekorzystnych warunków stresu wykazują niższy poziom wpływu elektrolitów. Za zwiększony wpływ elektrolitów odpowiedzialne są zwiększona przepuszczalność błon cytoplazmatycznych oraz ich częściowa dezintegracja pod wpływem chłodu. W przeprowadzonych doświadczeniach z grupy III pomiarów dokonano u wszystkich badanych linii populacji mapującej JxE (176 linii) oraz ich linii rodzicielskich (Ji2731, Etian) w piątym dniu chłodzenia. Wśród badanych linii populacji mapującej można było zauważyć ogromne różnice w tym wskaźniku uszkodzeń między liniami (Ryc. 32). U niektórych linii populacji mapującej wartość mierzonego parametru była znacznie powyżej wartości dla linii rodzicielskich, a różnice te wyniosły nawet 30% całkowitej zawartości elektrolitów. Uzyskane wyniki wskazują, iż ta metoda pomiaru uszkodzeń w warunkach chłodu u sorga może być parametrem selekcyjnym w hodowli i selekcji odmian tolerancyjnych podobnie jak to miało zastosowanie u innych gatunków wrażliwych na chłód, m.in. kukurydzy (Janowiak and Markowski, 1987; Janowiak and Markowski, 1994).

5.2. Potencjalna rola akumulacji ABA w adaptacji do chłodu u siewek sorga

Kwas abscysynowy (ABA) odgrywa ważną rolę w reakcji roślin na warunki stresowe, w tym stresy abiotyczne jak: susza, wysoka temperatura, chłód, czy zalewanie. W takich warunkach poziom ABA w roślinach zwykle wzrasta, co umożliwia adaptację rośliny do warunków stresowych (Sah et al., 2016). Określając zawartość ABA w liściach oraz korzeniach można oszacować potencjalne zdolności adaptacyjne danego gatunku do niekorzystnych warunków. Zmiany stężenia ABA obserwowano u roślin podczas działania wielu czynników stresowych (Peleg and Blumwald, 2011). W literaturze można znaleźć dane o zmianie stężenia ABA w liściach czy korzeniach podczas działania chłodu (Janowiak et al., 2003), w roślinach wielu gatunków ciepłolubnych poziom ABA wzrasta w tych warunkach (Lee et al., 1993; Rikin et al., 1976; Vernieri et al., 1991). W przeprowadzonych doświadczeniach z grupy I poziom ABA u roślin kontrolnych dwóch linii rodzicielskich (M71 i S79) kształtował się na poziomie: liście 1-1,6 nmol g⁻¹ s.m.; korzenie 1,7-2,6 nmol g⁻¹ s.m.; sok ksylemu 5-10 nM, co koresponduje z danymi literaturowymi dotyczącymi innych gatunków, np.

kukurydzy (Hartung et al., 2002; Zhang, 1994), a także świadczy o prawidłowym rozwoju roślin doświadczalnych. W I grupie doświadczeń chłód działający na siewki sorga spowodował wzrost zawartości ABA w liściach oraz soku ksylemu u obydwu badanych linii, zarówno u tej tolerancyjnej (M71) jak i wrażliwej (SS79) na chłód, jednak u tej pierwszej wzrost był bardziej wyraźny (Ryc. 3 i 4). Podobną sytuację można było zaobserwować w doświadczeniach z grupy II, gdzie u pozostałych czterech badanych linii rodzicielskich (Etian, Keller, Ji2731, Btx623) również odnotowano wzrost zawartości ABA w liściach (Ryc. 17) w trakcie chłodzenia. Taka sama sytuacja pojawiła się w III grupie doświadczeń, u linii populacji mapującej – JxE, u której badano zawartość ABA w chłodzie. Podwyższony poziom ABA w liściach podczas chłodzenia został już odnotowany w badaniach m.in. kukurydzy (Janowiak and Dörffling, 1996a; Zou et al., 2022), przy czym większą akumulację obserwowano, podobnie jak w niniejszej pracy, u linii tolerancyjnych. W doświadczeniach z grupy I można zauważyć, że w trakcie chłodzenia, kiedy poziom ABA wzrastał w liściach u obydwu badanych linii, w korzeniach zawartość ABA spadła (Ryc. 5). Wzrost zawartości ABA w liściach i korzeniach obserwowano u kukurydzy podczas działania chłodu (Melkonian et al., 2004), gdzie pomiary wykonano po 2,5 godzinach traktowania uzyskując znacznie większą zawartość ABA w liściach i brak różnicowania w korzeniach oraz po 24 godzinach, kiedy zawartość w liściach oraz w korzeniach była wyższa niż u roślin kontrolnych. Podobną tendencję i późniejszy wzrost zawartości ABA w korzeniach, w porównaniu do liści, zaobserwowano w niniejszej pracy. U wszystkich sześciu badanych linii rodzicielskich w czasie kiedy doszło do zwiększenia zawartości ABA w liściach (Ryc. 17) dochodziło też do spadku przewodności szparkowej w liściach (Ryc. 16), a więc przemykania aparatów szparkowych, co wskazuje na udział ABA w tej reakcji podczas chłodu. Potwierdza to zwiększone stężenie ABA w soku ksylemu w trakcie działania stresu chłodu jak i w okresie zdrowienia (*recovery*) po zakończeniu działania stresu (Ryc. 4), co zwiększyło transport ABA z korzeni do części nadziemnych siewek. Reasumując, pod wpływem działania chłodu ABA było transportowane z korzeni do liści, co powodowało przymknięcie aparatów szparkowych do poziomu kontrolnego.

W danych literaturowych można znaleźć informacje o tym, że w siewkach np. kukurydzy wzrost ABA w warunkach chłodu jest genotypowo specyficzny, ponieważ genotypy tolerancyjne na chłód akumulują ABA szybciej i w większych ilościach niż

genotypy wrażliwe (Anderson et al., 1994; Capell and Dorffling, 1993; Dörffling et al., 1994; Zou et al., 2022). Stwierdzono, że zdolność do szybkiej i dużej akumulacji ABA w warunkach stresu chłodowego jest jednym z warunków odporności na chłód siewek kukurydzy (Capell and Dorffling, 1993; Janowiak and Dörffling, 1996a; Zou et al., 2022). Pomiary zmian zawartości ABA w warunkach chłodu u sorga pochodzących z różnych linii rodzicielskich oraz populacji mapującej potwierdziły więc tą istotną rolę akumulacji ABA w odporności również sorga na niską temperaturę.

Dla wyjaśniania roli ABA w tolerancji sorga na chłód zbadano zmiany zawartości ABA również po zakończeniu chłodzenia. Wykazano, iż po pięciu dniach traktowania chłodem siewek sorga i przywróceniu warunków kontrolnych (*recovery*), następowało przywrócenie normalnego poziomu ABA w liściach u wszystkich badanych linii rodzicielskich, zarówno tolerancyjnych, jak i wrażliwych oraz znacznie niższy poziom ABA u niektórych linii populacji mapującej JxE (Ryc. 3, 17, 29). Podobna sytuacja wystąpiła u kukurydzy, gdzie w przeprowadzonym doświadczeniu badano zmiany ABA w okresie *recovery*, stwierdzono szybkie przywrócenie normalnego poziomu ABA u genotypów tolerancyjnych oraz utrzymujący się dłużej podwyższony poziom tego hormonu u genotypów wrażliwych po zakończeniu chłodzenia (Janowiak and Dörffling, 2004).

5.3. Adaptacja osmotyczna siewek sorga w stresie chłodu

Zmiany potencjału osmotycznego (OP) w komórkach dają informację o działającym na roślinę stresie. Wartość OP świadczy o zdolności roślin do uruchamiania mechanizmów osmoregulacji zapobiegających utracie wody przez komórki (Masouleh et al., 2019). Zdolność ta jest jednym z czynników decydujących o odporności roślin na stres. W pracy badano zmiany potencjału osmotycznego liści oraz korzeni.

Już w pierwszym dniu chłodzenia zaobserwowano znaczący spadek potencjału osmotycznego w liściach u wszystkich linii rodzicielskich, ale także u populacji mapujących. Kolejne dni traktowania chłodem powodowały ciągły spadek OP, a różnice pomiędzy liniami zaznaczały się coraz bardziej. Wśród linii rodzicielskich największy spadek zaobserwowano u tolerancyjnej linii M71, a wśród linii populacji mapujących u linii tolerancyjnych spadek ten był większy niż u wrażliwych (Ryc. 37, 3843, 44, 49, 50). Otrzymane wyniki wskazują na szybkie uruchamianie mechanizmu

osmoregulacji, co znajduje potwierdzenie w badaniach innych autorów (Masouleh et al., 2019). Obniżenie potencjału osmotycznego stwierdzono między innymi podczas chłodu u kukurydzy (Janowiak and Dörffling, 1995). W literaturze istnieją doniesienia, że do przystosowania osmotycznego dochodzi nie tylko w liściach, ale także w korzeniach (Turner, 2017; Turner and Jones, 1980). W niniejszej pracy w doświadczeniach prowadzonych na korzeniach sorga, można było zauważyć podobną sytuację, jak przy pomiarach OP w liściach - potencjał osmotyczny spadł u obu badanych linii rodzicielskich (M71, SS79) już w pierwszym dniu chłodzenia (Ryc. 9). Podczas trwania okresu zdrowienia siewek potencjał osmotyczny powrócił do poziomu sprzed chłodzenia u wszystkich badanych linii rodzicielskich.

U siewek hartowanych suszą wartość OP była niższa niż u niehartowanych (Ryc. 23). Chłód spowodował znaczący spadek OP, który osiągnął niższe wartości u siewek hartowanych suszą niż u niehartowanych. W warunkach stresu niskiej temperatury u siewek hartowanych suszą u linii wrażliwej na działanie chłodu (SS79) wartość OP była znacznie niższa w porównaniu z siewkami niehartowanymi.

5.4. Komunikacja korzenie-liście w warunkach chłodu

Komunikacja korzenie - liście odgrywa znaczącą rolę w funkcjonowaniu roślin podczas działania różnych czynników stresowych (Dodd, 2005). Proces ten obejmuje przekazywanie różnych sygnałów, w tym: hydraulicznych, hormonalnych oraz chemicznych (Else et al., 2009; Jackson et al., 2003).

Hormony roślinne odgrywają kluczową rolę w komunikacji między korzeniami a liśćmi w odpowiedzi na stres chłodu, a jednym z najważniejszych hormonów zaangażowanych w tę odpowiedź jest kwas abscysynowy (ABA). ABA przypisuje się rolę substancji sygnałowej, której działanie uzależnione jest od innych zmian zachodzących w roślinie. Jednym ze sposobów oceny wpływu stresu na zawartość ABA oraz jego rolę w adaptacji do niekorzystnych warunków jest analiza stężenia tego hormonu w liściach i korzeniach. W literaturze znaleźć można dane o zmianie stężenia w tych tkankach podczas działania różnych czynników (Wilkinson and Davies, 2002). ABA produkowany jest głównie w korzeniach, skąd transportowany jest do liści przez ksylem. W I grupie doświadczeń, gdzie badano zawartość ABA w liściach i korzeniach oraz stężenie ABA ([ABA]) w soku ksylemu u dwóch linii rodzicielskich (M71, SS79)

można było zauważyć, że zawartość ABA w liściach obu badanych linii wzrosła na początku chłodzenia (Ryc. 3), przy czym u linii wrażliwej na działanie chłodu (SS79) wzrost był nieco wyższy. W trakcie dalszego działania chłodu u obydwu linii poziom ABA utrzymywał się wciąż na wyższym poziomie w porównaniu do warunków kontrolnych. [ABA] soku ksylemu siewek sorga obu badanych linii także wzrosło istotnie, choć wzrost ten był dużo większy u linii odporniejszej na chłód (M71) w porównaniu z linią wrażliwą na ten stres (SS79). W kolejnych godzinach chłodzenia [ABA] u linii SS79 utrzymywało się na prawie takim samym poziomie, natomiast u linii M71 znacznie spadło. Dalsze chłodzenie powodowało znaczny wzrost [ABA] u linii M71. Można było zauważyć, że w trakcie chłodzenia, kiedy zawartość ABA wzrosła w liściach, poziom ABA w korzeniach obniżył się znacząco u obu badanych linii (Ryc. 5) i przez kolejne trzy dni wciąż utrzymywał się na niższym poziomie. W warunkach chłodu często dochodzi do zwiększonej produkcji ABA, co prowadzi do przymknięcia aparatów szparkowych, redukując transpirację i zabezpieczając roślinę przed utratą wody. W przeprowadzonych doświadczeniach także stwierdzono podobną zależność. Chłód zwiększał początkowo stopień rozwarcia aparatów szparkowych, które w trakcie dalszego oddziaływania tego stresu zostały przymknięte z powrotem do poziomu kontroli na skutek akumulacji ABA w liściach.

Stres chłodu wpływa na właściwości fizykochemiczne soku ksylemu m.in. pH. Wartość pH soku ksylemu może być wskaźnikiem reakcji rośliny na zmienne warunki środowiskowe. U wielu roślin dochodzi do wzrostu pH (alkalizacji) soku ksylemu na skutek działania różnych czynników stresowych (Wilkinson, 1999). Zmiany pH soku ksylemu obserwowano także w niniejszej pracy. U sorga w doświadczeniach z grupy I już w początkowych godzinach traktowania chłodem odnotowano wzrost pH soku ksylemu u obydwu badanych linii rodzicielskich. ABA jest słabym kwasem i wraz ze wzrostem pH środowiska dochodzi do jego dysocjacji, jony ABA^- , w przeciwieństwie do niezdisocjowanych cząsteczek, nie mają zdolności przenikania przez membrany (Janowiak, 2011), dlatego wyższa wartość pH soku ksylemu sprzyjała sekwestrowaniu ABA do tkanek ksylemu zgodnie z zasadą 'pułapki anionowej', powodując gromadzenia ABA w danym rejonie tkanki. Natomiast wartość pH soku z liści siewek sorga u linii tolerancyjnej na chłód (M71) spadła już w pierwszych godzinach chłodzenia i w trakcie kolejnych dni chłodzenia wciąż była niższa w stosunku do wartości sprzed działania chłodu (ryc. 6). Natomiast u linii wrażliwej na chłód (SS79)

– wzrosła, a w trakcie trwania chłodu wciąż była wyższa. W przeprowadzonym doświadczeniu zauważono, że po początkowej alkalizacji w trakcie trwania *recovery* doszło do spadku wartości pH soku ksylemu u obu linii rodzicielskich, a już w pierwszym dniu *recovery* odnotowano znaczny spadek wartości pH soku z liści u linii M71 oraz SS79. W tym samym czasie w trakcie trwania *recovery* zaobserwowano wzrost zawartości ABA w liściach oraz [ABA] w soku ksylemu. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że również w warunkach chłodu alkalizacja soku ksylemu odgrywa rolę w reakcji sorga na ten czynnik i może być ważnym sygnałem komunikacji korzenie – liście.

Sygnałem w komunikacji korzenie – liście może być analizowane w niniejszej pracy stężenie i aktywność drobnocząsteczkowych antyoksydantów, które odpowiadają za usuwanie powstających w warunkach stresu reaktywnych form tlenu (RFT). Związki te, ze względu na niską masę cząsteczkową i wysoką rozpuszczalność, odgrywają istotną rolę w szybkiej odpowiedzi na podwyższony poziom RFT. W literaturze można znaleźć informacje dotyczące wpływu stresów abiotycznych na całkowitą ilość antyoksydantów (całkowita zdolność antyoksydacyjna tkanek), a także na zawartość poszczególnych grup związków antyoksydacyjnych, takich jak: glutation, tokoferole, związki fenolowe, kwas askorbinowy, czy karotenoidy (Ahmad et al., 2010). Chłód działający na siewki sorga, już w pierwszych godzinach traktowania, spowodował spadek aktywności antyoksydacyjnej tkanek zarówno u linii wrażliwej (SS79) jak i tolerancyjnej (M71), a kolejny dzień chłodzenia doprowadził do znaczącego wzrostu zawartości antyoksydantów w korzeniach, zwłaszcza u linii wrażliwej. Otrzymane wyniki są zgodne z doniesieniami literaturowymi. Podczas działania chłodu na siewki kukurydzy wykazano wzrost stężenia kwasu askorbinowego, glutationu i β -karotenu u genotypów wrażliwych (Hodges i in., 1996). U pszenicy ozimej w trakcie działania chłodu stwierdzono wzrost stężenia askorbinianu i glutationu (Vaitkevičiūtė et al., 2022). Zależność pomiędzy wzrostem stężenia antyoksydantów w liściach a tolerancją na chłód stwierdzono także u ogórka (Shen et al., 1999), a zwiększenie stężenia antyoksydantów w korzeniach w trakcie chłodzenia odnotowano u batata (Padda and Picha, 2008). Pod koniec *recovery* aktywność antyoksydacyjna u obu badanych linii była podobna do tej sprzed chłodzenia. Zaobserwowane w niniejszej pracy zwiększenie stężenia antyoksydantów w trakcie działania chłodu może być uważane za substancję sygnałową w trakcie działania stresu.

W warunkach chłodu korzenie mogą syntetyzować i transportować do liści substancje osmotycznie czynne, które pełnią także funkcję sygnalizacyjną w roślinie. Już w pierwszym dniu chłodzenia zaobserwowano znaczący spadek potencjału osmotycznego w liściach oraz korzeniach u wszystkich badanych linii sorga, co wskazuje na szybkie uruchamianie mechanizmu osmoregulacji. Wyniki z przeprowadzonych w niniejszej pracy doświadczeń znajdują potwierdzenie w literaturze, gdzie zaobserwowano obniżenie potencjału osmotycznego podczas chłodu u kukurydzy (Bilska-Kos et al., 2017). W niniejszej pracy stwierdzono podwyższoną zawartość substancji osmotycznie czynnych w warunkach chłodu i obniżenie potencjału osmotycznego, co uznać zatem można za pozytywny sygnał w warunkach stresu chłodu u sorga.

Reakcje fizjologiczne i biochemiczne siewek sorga w warunkach chłodu, i widoczne ich ogromne zróżnicowanie wśród badanych linii, określone na podstawie badanych parametrów, takich jak fluorescencja chlorofilu *a*, przewodność aparatów szparkowych, poziom ABA czy potencjał osmotyczny, ze względu na ich szybką reakcję na ten czynnik stresowy oraz rolę w adaptacji roślin służyć mogą jako wskaźniki w selekcji odmian tolerancyjnych sorga.

6. WNIOSKI

1. Od pierwszych godzin oddziaływania chłodu następuje spadek efektywnej wydajności kwantowej fotosystemu II (PSII) u siewek sorga, a przyczyną tego są ograniczenia metaboliczne (nieszparkowe), bowiem aparaty szparkowe przymykają się dopiero w okresie zdrowienia po zakończeniu chłodzenia (*recovery*).
2. Na początku działania chłodu na siewki sorga otwierają się aparaty szparkowe, co powodowane jest działaniem niskiej temperatury *per se*, a nie skutkiem indukowanego chłodem deficytu wody w liściach.
3. Największe różnice między genotypami sorga w metabolicznym ograniczeniu wydajności fotosyntetycznej mierzonej wydajnością kwantowej PSII występują w liściu fizjologicznie najstarszym, a najmniejsze w najmłodszym. U odmian względnie chłodo-tolerancyjnych różnice między liśćmi zanikają.
4. Chłód początkowo zwiększa stopień otwarcia aparatów szparkowych, które w trakcie dalszego oddziaływania tego stresu są przymykane z powrotem do poziomu kontroli na skutek akumulacji ABA w liściach, m. in. w wyniku zwiększonego transportu ABA z korzeni z sokiem ksylemu czemu sprzyja jego alkalizacja.
5. Aparaty szparkowe zamykają się u chłodzonych siewek po zakończeniu oddziaływania tego stresu, w czasie *recovery*, co powoduje ograniczenia w efektywnej wydajności kwantowej PSII wskutek ograniczeń substratowych.
6. Najbardziej widoczne różnice genotypowe sorga widoczne są w zakresie adaptacji osmotycznej (obniżenie potencjału osmotycznego) podczas chłodzenia i *recovery* oraz w zdolności *recovery* wydajności fotosyntetycznej po zaprzestaniu działania chłodu.
7. Występują duże różnice w reakcji korzeni siewek linii sorga różniących się w tolerancji na chłód: korzenie linii wrażliwszej wykazują większy stres oksydacyjny w porównaniu z tolerancyjną linią.

8. Zarówno linie tolerancyjne, jak i wrażliwe wykazują intensywny transport ABA w soku ksylemu z korzeni do liści w warunkach chłodu.
9. W warunkach chłodu wyraźny wzrost wartości pH soku ksylemu jest ważnym sygnałem komunikacji korzenie - liście.
10. W obrębie linii badanych populacji mapujących występują ogromne różnice w fizjologicznych parametrach. Zróżnicowanie to jest znacznie większe niż różnice między liniami rodzicielskimi, a wartości badanych parametrów fizjologicznych są powyżej albo poniżej wartości parametrów dla linii rodzicielskich. Różnice między badanymi liniami są bardziej wyraźne podczas *recovery* niż podczas chłodzenia.

7. LITERATURA

- Acharya, B., and S. Assmann. 2009. Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology*. 69:451-462.
- Agurla, S., S. Gahir, S. Munemasa, Y. Murata, and A.S. Raghavendra. 2018. Mechanism of stomatal closure in plants exposed to drought and cold stress. In *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation: Adaptation Mechanisms and Their Applications*. Vol. 1081. M. IwayaInoue, M. Sakurai, and M. Uemura, editors. Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore. 215-232.
- Ahmad, P., C.A. Jaleel, M.A. Salem, G. Nabi, and S. Sharma. 2010. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30:161-175.
- Allen, D.J., and D.R. Ort. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*. 6:36-42.
- Anderson, B.E., J.M. Ward, and J.I. Schroeder. 1994. Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiology*. 104:1177-1183.
- Andrews, J.R., M.J. Fryer, and N.R. Baker. 1995. Characterization of chilling effects on photosynthetic performance of maize crops during early-season growth using chlorophyll fluorescence. *Journal of Experimental Botany*. 46:1195-1203.
- Antony, R.M., M.B. Kirkham, T.C. Todd, S.R. Bean, J.D. Wilson, P.R. Armstrong, E. Maghirang, and D.L. Brabec. 2019. Low-temperature tolerance of maize and sorghum seedlings grown under the same environmental conditions. *Journal of Crop Improvement*. 33:287-305.
- Antunes, M.D.C., and E.M. Sfakiotakis. 2002. Chilling induced ethylene biosynthesis in 'Hayward' kiwifruit following storage. *Scientia Horticulturae*. 92:29-39.
- Aroca, R., J.J. Irigoyen, and M. Sanchez-Diaz. 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.
- Aroca, R., P. Vernieri, J.J. Irigoyen, M. Sanchez-Diaz, F. Tognoni, and A. Pardossi. 2003. Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant Science*. 165:671-679.
- Bahrn, A., C.R. Jensen, F. Asch, and V.O. Mogensen. 2002. Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition, and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*. 53:251-263.
- Bari, R., and J. Jones. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*. 69:473-488.
- Bączek-Kwinta, R., E. Niewiadomska, and Z. Miszański. 2005. Physiological role of reactive oxygen species in chill-sensitive plants. *Phyton-Annales Rei Botanicae*. 45:25-37.
- Bekele, W.A., K. Fiedler, A. Shiringani, D. Schnaubelt, S. Windpassinger, R. Uptmoor, W. Friedt, and R.J. Snowdon. 2014. Unravelling the genetic complexity of sorghum seedling development under low-temperature conditions. *Plant, Cell & Environment*. 37:707-723.
- Bilska-Kos, A., D. Solecka, A. Dziewulska, P. Ochodzki, M. Jończyk, H. Bilski, and P. Sowiński. 2017. Low temperature caused modifications in the arrangement of cell wall pectins due to changes of osmotic potential of cells of maize leaves (*Zea mays* L.). *Protoplasma*. 254:713-724.

- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 28:25-30.
- Campos, P.S., V. Quartin, J.C. Ramalho, and M.A. Nunes. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp plants. *J. Plant Physiol.* 160:283-292.
- Capell, B., and K. Dörffling. 1993. Genotype-specific differences in chilling tolerance of maize in relation to chilling-induced changes in water status and abscisic-acid accumulation. *Physiologia Plantarum*. 88:638-646.
- Christmann, A., E. Grill, and M. Meinhard. 2004. Abscisic acid signalling. In *Plant Responses to Abiotic Stress. Topics in current genetics*. H. Hirt and K. Shinozaki, editors. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Hong Kong London Milan Paris Tokyo. 39-71.
- Cochard, H., R. Martin, P. Gross, and M.B. Bogaert-Triboulot. 2000. Temperature effects on hydraulic conductance and water relations of *Quercus robur* L. *Journal of Experimental Botany*. 51:1255-1259.
- Dabrowski, P., A.H. Baczewska-Dabrowska, H.M. Kalaji, V. Goltsev, M. Paunov, M. Rapacz, M. Wójcik-Jagla, B. Pawluskiewicz, W. Baba, and M. Brestic. 2019. Exploration of chlorophyll a fluorescence and plant gas exchange parameters as indicators of drought tolerance in perennial ryegrass. *Sensors*. 19:2736.
- Dalal, M., K. Mayandi, and V. Chinnusamy. 2012. Sorghum: Improvement of abiotic stress tolerance. In *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*. Vol. 2. N. Tuteja, S.S. Gill, F.A. Tiburcio, and R. Tuteja, editors. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 923-950.
- Dodd, I.C. 2003. Hormonal interactions and stomatal responses. *Journal of Plant Growth Regulation*. 22:32-46.
- Dodd, I.C. 2005. Root-to-shoot signalling: Assessing the roles of 'up' in the up and down world of long-distance signalling in *planta*. *Plant and Soil*. 274:251-270.
- Doggett, H. 1970. Sorghum. Longman Green & Co. Ltd., London.
- Dörffling, K., B. Capell, and F. Janowiak. 1994. Chilling tolerance in maize in relation to water status and abscisic acid. In *Crop development for the cool and wet regions of Europe. Crop adaptation to cool climates*. K. Dörffling, B. Brettschneider, H. Tantau, and K. Pithan, editors. European Commission, COST 814, Brussels. 595-606.
- Else, M.A., F. Janowiak, C.J. Atkinson, and M.B. Jackson. 2009. Root signals and stomatal closure in relation to photosynthesis, chlorophyll a fluorescence and adventitious rooting of flooded tomato plants. *Ann Bot.* 103:313-323.
- Else, M.A., J.M. Taylor, and C.J. Atkinson. 2006. Anti-transpirant activity in xylem sap from flooded tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants is not due to pH-mediated redistributions of root- or shoot-sourced ABA. *Journal of Experimental Botany*. 57:3349-3357.
- Fahad, S., S. Hussain, A. Matloob, F.A. Khan, A. Khaliq, S. Saud, S. Hassan, D. Shan, F. Khan, N. Ullah, M. Faiq, M.R. Khan, A.K. Tareen, A. Khan, A. Ullah, N. Ullah, and J.L. Huang. 2015. Phytohormones and plant responses to salinity stress: A review. *Plant Growth Regulation*. 75:391-404.
- Farooq, M., T. Aziz, A. Wahid, D.J. Lee, and K.H.M. Siddique. 2009. Chilling tolerance in maize: Agronomic and physiological approaches. *Crop & Pasture Science*. 60:501-516.

- Foyer, C.H., and G. Noctor. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*. 17:1866-1875.
- Fracheboud, Y., P. Haldimann, J. Leipner, and P. Stamp. 1999. Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*. 50:1533-1540.
- Gill, S.S., P.L. Singh, R. Gill, and N. Tuteja. 2012. Generation and scavenging of reactive oxygen species in plants under stress. In *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*. N. Tuteja, S.S. Gill, F.A. Tiburcio, and R. Tuteja, editors. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 49-70.
- Hartung, W., and W.J. Davies. 1991. Drought-induced changes in physiology and ABA. In *Abscisic Acid physiology and biochemistry*. W.J. Davies and H.G. Jones, editors. BIOS Scientific Publishers. 63-79.
- Hartung, W., A. Sauter, and E. Hose. 2002. Abscisic acid in the xylem: Where does it come from, where does it go to? *Journal of Experimental Botany*. 53:27-32.
- Hernández, P.F.V., L.E.M. Onofre, and F.D.R. Cárdenas. 2023. Responses of sorghum to cold stress: A review focused on molecular breeding. *Frontiers in Plant Science*. 14:1124335.
- Hirai, N., R. Yoshida, Y. Todoroki, and H. Ohigashi. 2000. Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 64:1448-1458.
- Holaday, A.S., J.R. Mahan, and P. Payton. 2016. Effects of chilling temperatures on photosynthesis. *Journal of Cotton Science*. 20:220-231.
- Hura, T., S. Grzesiak, K. Hura, E. Thiemt, K. Tokarz, and M. Wędzony. 2007. Physiological and biochemical tools useful in drought-tolerance detection in genotypes of winter triticale: Accumulation of ferulic acid correlates with drought tolerance. *Ann Bot*. 100:767-775.
- Jackson, M. 1997. Hormones from roots as signals for the shoots of stressed plants. *Trends in Plant Science*. 2:22-28.
- Jackson, M.B., L.R. Saker, C.M. Crisp, M.A. Else, and F. Janowiak. 2003. Ionic and pH signalling from roots to shoots of flooded tomato plants in relation to stomatal closure. *Plant and Soil*. 253:103-113.
- Janowiak, F. 2011. Kwas abscysynowy. In *Fizjologia roślin sadowniczych strefy umiarkowanej*. Vol. 1. Zagadnienia podstawowe, wzrost i kwitnienie. L.S. Jankiewicz and J. Lipecki, editors. PWN, Warszawa. 48-55.
- Janowiak, F., and K. Dörffling. 1995. Chilling-induced changes in the contents of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and its N-malonyl conjugate (MACC) in seedlings of two maize inbreds differing in chilling tolerance. *J. Plant Physiol*. 147:257-262.
- Janowiak, F., and K. Dörffling. 1996. Chilling tolerance of 10 maize genotypes as related to chilling-induced changes in ACC and MACC contents. *J. Agron. Crop Sci*. 177:175-184.
- Janowiak, F., and K. Dörffling. 1996a. Chilling of maize seedlings: Changes in water status and abscisic acid content in ten genotypes differing in chilling tolerance. *J. Plant Physiol*. 147:582-588.
- Janowiak, F., and K. Dörffling. 2004. Changes in ABA levels during recovery from chilling in 20 maize genotypes differing in chilling tolerance. *Advances of Agricultural Sciences Problem, Ecophysiological Aspects of Plants Responses to Stress Factors*:119-124.

- Janowiak, F., E. Luck, and K. Dörffling. 2003. Chilling tolerance of maize seedlings in the field during cold periods in spring is related to chilling-induced increase in abscisic acid level. *J. Agron. Crop Sci.* 189:156-161.
- Janowiak, F., B. Maas, and K. Dörffling. 2002. Importance of abscisic acid for chilling tolerance of maize seedlings. *J. Plant Physiol.* 159:635-643.
- Janowiak, F., and A. Markowski. 1987. Effect of chilling on germination, growth, survival and membrane permeability in seedling of different forms of maize (*Zea mays* L.). *Acta Physiologiae Plantarum.* 9:77-87.
- Janowiak, F., and A. Markowski. 1994. Changes in leaf water relations and injuries in maize seedlings induced by different chilling conditions. *J. Agron. Crop Sci.* 172:19-28.
- Ji, S.J., Y.F. Zhang, M.H. Xu, M.R. Zhao, H.X. Chen, Y.G. Lu, S.Q. Pang, and W. Xu. 2024. Characterization of low-temperature sensitivity and chlorophyll fluorescence in yellow leaf mutants of tomato. *Agronomy-Basel.* 14:2382.
- Jiang, M.Y., and J.H. Zhang. 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany.* 53:2401-2410.
- Jongdee, B., S. Fukai, and M. Cooper. 2002. Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice. *Field Crops Research.* 76:153-163.
- Kacperska, A. 2012a. Gospodarka wodna. In *Fizjologia Roślin.* J. Kopcewicz and S. Lewak, editors. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. 199-233.
- Kacperska, A. 2012b. Reakcje roślin na stresowe czynniki środowiska. Odpowiedzi na czynniki abiotyczne. In *Fizjologia Roślin.* J. Kopcewicz and S. Lewak, editors. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. 634-708.
- Kalaji, H.M., A. Jajoo, A. Oukarroum, M. Brestic, M. Zivcak, I.A. Samborska, M.D. Cetner, I. Lukasik, V. Goltsev, and R.J. Ladle. 2016. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum.* 38:102.
- Kalaji, H.M., and T. Łaboda. 2010. Fluorescencja chlorofilu w badaniach stanu fizjologicznego roślin. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- Kautsky, H., and A. Hirsch. 1931. Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften.* 19:964-964.
- Kingston-Smith, A.H., and C.H. Foyer. 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.
- Kościelniak, J., and J. Biesaga-Kościelniak. 2006. Photosynthesis and non-photochemical excitation quenching components of chlorophyll excitation in maize and field bean during chilling at different photon flux density. *Photosynthetica.* 44:174-180.
- Kutík, J., D. Holá, M. Kočová, O. Rothová, D. Haisel, N. Wilhelmová, and I. Tichá. 2004. Ultrastructure and dimensions of chloroplasts in leaves of three maize (*Zea mays* L.) inbred lines and their F-1 hybrids grown under moderate chilling stress. *Photosynthetica.* 42:447-455.
- Larcher, W. 1981. Resistenzphysiologische Grundlagen der evolutiven Kälteakklimatisierung von Sproßpflanzen. *Plant Systematics and Evolution.* 137:145-180.
- Laskoś, K., E. Pisulewska, P. Waligórski, F. Janowiak, A. Janeczko, I. Sadura, S. Polaszczyk, and I.M. Czyczyło-Mysza. 2021. Herbal additives substantially

- modify antioxidant properties and tocopherol content of cold-pressed oils. *Antioxidants*. 10:781.
- Lee, T.M., H.S. Lur, and C. Chu. 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.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses Vol. I Chilling, freezing, and high temperature stresses. Academic Press, New York London. 497 pp.
- Lewak, S. 2012. Regulacja procesów fizjologicznych przez czynniki endogenne. In *Fizjologia Roślin*. J. Kopcewicz and S. Lewak, editors. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. 145-175.
- Lichtenthaler, H.K., O. Wenzel, C. Buschmann, and A. Gitelson. 1998. Plant stress detection by reflectance and fluorescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 851:271-285.
- Lieberman, M., C.C. Craft, W.V. Audia, and M.S. Wilcox. 1958. Biochemical studies of chilling injury in Sweetpotatoes. *Plant Physiology*. 33:307-311.
- Liu, X.M., Y.L. Zhou, J.W. Xiao, and F. Bao. 2018. Effects of chilling on the structure, function and development of chloroplasts. *Frontiers in Plant Science*. 9:1715.
- Lukatkin, A.S. 2002. Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: I. reactive oxygen species formation during plant chilling. *Russian Journal of Plant Physiology*. 49:622-627.
- Lukatkin, A.S., A. Brazaityte, C. Bobinas, and P. Duchovskis. 2012. Chilling injury in chilling-sensitive plants: A review. *Zemdirbyste-Agriculture*. 99:111-124.
- Lyons, J.M. 1973. Chilling injury in plants. *Ann Rev Plant Physiol*. 24:445-466.
- Lyons, J.M., J. Raison, and P. Steponkus. 1979. The Plant membrane in response to low temperature: An Overview. In *Low temperature stress in crop plants. The role of membrane*. J.M. Lyons, J. Raison, and S. P, editors. Academic Press, New York, San Francisco.
- Mahajan, S., and N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 444:139-158.
- Markowski, A., and G. Skrudlik. 1995. Electrolyte leakage, ATP content in leaves and intensity of net photosynthesis in maize seedlings at permanent or different daily exposure to low-temperatures. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau*. 175:109-117.
- Masouleh, S.S.S., N.J. Aldine, and Y.N. Sassine. 2019. The role of organic solutes in the osmotic adjustment of chilling-stressed plants (vegetable, ornamental and crop plants). *Ornamental Horticulture-Revista Brasileira De Horticultura Ornamental*. 25:434-442.
- Maxwell, K., and G.N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51:659-668.
- Mazur, M., M.M. Kočar, A. Jambrović, A. Sudarić, M. Volenik, T. Duvnjak, and Z. Zdunić. 2024. Crop-specific responses to cold stress and priming: Insights from chlorophyll fluorescence and spectral reflectance analysis in maize and soybean. *Plants-Basel*. 13:1204.
- McWilliam, J.R., P.J. Kramer, and R.L. Musser. 1982. Temperature-induced water stress in chilling-sensitive plants. *Aust J Plant Physiol*. 9:343-352.
- Melkonian, J., L.X. Yu, and T.L. Setter. 2004. Chilling responses of maize (*Zea mays* L.) seedlings: root hydraulic conductance, abscisic acid, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany*. 55:1751-1760.

- Minorsky, P.V. 1985. An heuristic hypothesis of chilling injury in plants: a role for calcium as the primary physiological transducer of injury. *Plant, Cell & Environment* 8:75-94.
- Mozafar, A., P. Schreiber, and J.J. Oertli. 1993. Photoperiod and root-zone temperature - interacting effects on growth and mineral nutrients of maize. *Plant and Soil*. 153:71-78.
- Murchie, E.H., and T. Lawson. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*. 64:3983-3998.
- Netondo, G.W., J.C. Onyango, and E. Beck. 2004. Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Science*. 44:806-811.
- Ortiz, D., J.Y. Hu, and M.G.S. Fernandez. 2017. Genetic architecture of photosynthesis in *Sorghum bicolor* under non-stress and cold stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 68:4545-4557.
- Oukarroum, A., S. El Madidi, G. Schansker, and R.J. Strasser. 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*. 60:438-446.
- Padda, M.S., and D.H. Picha. 2008. Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotatoes. *Postharvest Biology and Technology*. 47:176-180.
- Peacock, J.M. 1982. Response and tolerance of sorghum to temperature stress. Sorghum in the eighties. *Proceedings of the International Symposium on Sorghum*. 2-7 November 1981.
- Peleg, Z., and E. Blumwald. 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14:290-295.
- Pospisilova, J. 2003. Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biologia Plantarum*. 46:491-506.
- Pramod, K., and M. Vinay. 2007. Effect of low temperature stress on photosynthesis, total soluble sugars, grain filling rate and yield in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Plant Physiology*. 12:253-260.
- Prasad, T.K. 1996. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: Changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant Journal*. 10:1017-1026.
- Rahman, A. 2013. Auxin: A regulator of cold stress response. *Physiologia Plantarum*. 147:28-35.
- Ramatoulaye, F., C. Mady, S. Fallou, K. Amadou, D. Cyril, and D. Massamba. 2016. Production and use sorghum: A literature review. *Journal of Nutritional Health & Food Science*. 4:1-4.
- Rapacz, M. 2007. Chlorophyll a fluorescence transient during freezing and recovery in winter wheat. *Photosynthetica*. 45:409-418.
- Rapacz, M., M. Sasal, and M. Gut. 2011. Chlorophyll fluorescence-based studies of frost damage and the tolerance for cold-induced photoinhibition in freezing tolerance analysis of triticale (*xTriticosecale* Wittmack). *J. Agron. Crop Sci*. 197:378-389.
- Raza, A., S. Charagh, S. Najafi-Kakavand, S. Abbas, Y. Shoaib, S. Anwar, S. Sharifi, G.Y. Lu, and K.H.M. Siddique. 2023. Role of phytohormones in regulating cold

- stress tolerance: Physiological and molecular approaches for developing cold-smart crop plants. *Plant Stress*. 8:100152.
- Regassa, T.H., and C.S. Wortmann. 2014. Sweet sorghum as a bioenergy crop: Literature review. *Biomass Bioenerg.* 64:348-355.
- Richner, W., A. Soldati, and P. Stamp. 1996. Shoot-to-root relations in field-grown maize seedlings. *Agronomy Journal*. 88:56-61.
- Rikin, A., A. Blumenfeld, and A.E. Richmond. 1976. Chilling resistance as affected by stressing environments and abscisic acid. *Botanical Gazette*. 137:307-312.
- Rutayisire, A., G. Lubadde, A. Mukayiranga, and R. Edema. 2021. Response of sorghum to cold stress at early developmental stage. *International Journal of Agronomy*. 2021:875205.
- Sah, S.K., K.R. Reddy, and J.X. Li. 2016. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in Plant Science*. 7:26.
- Schwartz, S.H., and J.A.D. Zeevaart. 2010. Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In *Plant hormones, biosynthesis, signal transduction, action!* P.J. Davies, editor. Springer, Dordrecht. 137-155.
- Shen, W.Y., K. Nada, and S. Tachibana. 1999. Effect of cold treatment on enzymic and nonenzymic antioxidant activities in leaves of chilling-tolerant and chilling-sensitive cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 68:967-973.
- Sillmann, J., and E. Roeckner. 2008. Indices for extreme events in projections of anthropogenic climate change. *Climatic Change*. 86:83-104.
- Simon, E. 1974. Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytologist* 73:377-420.
- Soualiou, S., F.Y. Duan, X. Li, and W.B. Zhou. 2022. Crop production under cold stress: An understanding of plant responses, acclimation processes, and management strategies. *Plant Physiology and Biochemistry*. 190:47-61.
- Sowiński, P., A. Rudzińska-Langwald, J. Adamczyk, W. Kubica, and J. Fronk. 2005. Recovery of maize seedling growth, development and photosynthetic efficiency after initial growth at low temperature. *J. Plant Physiol.* 162:67-80.
- Starck, Z., D. Choluj, and D. Niemyska. 1995. Fizjologiczne reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiska. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- Stoffer, R.V., and G.E.V. Riper. 1963. Effect of soil temperature and soil moisture on the physiology of sorghum. *Agronomy Journal*. 55:447-450.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2010. Responses and adaptations to abiotic stress. In *Plant Physiology*. M.A. Sunderland, editor. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts. 755-778.
- Tari, I., G. Laskay, Z. Takács, and P. Poór. 2013. Response of sorghum to abiotic stresses: A review. *J. Agron. Crop Sci.* 199:264-274.
- Todorova, D., T. Genkov, F. Vaseva-Gemisheva, V. Alexieva, E. Karanov, A. Smith, and M. Hall. 2005. Effect of temperature stress on the endogenous cytokinin content in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 27:13-18.
- Turner, N.C. 2017. Turgor maintenance by osmotic adjustment, an adaptive mechanism for coping with plant water deficits. *Plant Cell and Environment*. 40:1-3.
- Turner, N.C., and M.M. Jones. 1980. Turgor maintenance by osmotic adjustment: A review and evaluation. In *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. Vol. 87-103. N.C. Turner and P.J. Kramer, editors. John Wiley and Sons, Inc., New York.

- Tyree, M.T., A. Nardini, S. Salleo, L. Sack, and B. El Omari. 2005. The dependence of leaf hydraulic conductance on irradiance during HPFM measurements: any role for stomatal response? *Journal of Experimental Botany*. 56:737-744.
- Tyree, M.T., S. Patino, J. Bennink, and J. Alexander. 1995. Dynamic measurements of root hydraulic conductance using a high-pressure flowmeter in the laboratory and field. *Journal of Experimental Botany*. 46:83-94.
- Vaitkevičiūtė, G., A. Aleliūnas, Y. Gibon, and R. Armonienė. 2022. Comparative analysis of antioxidant accumulation under cold acclimation, deacclimation and reacclimation in winter wheat. *Plants-Basel*. 11:2818.
- Venzhik, Y., V. Talanova, and A. Titov. 2016. The effect of abscisic acid on cold tolerance and chloroplasts ultrastructure in wheat under optimal and cold stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*. 38:63.
- Verheul, M.J., C. Picatto, and P. Stamp. 1996. Growth and development of maize (*Zea mays* L.) seedlings under chilling conditions in the field. *European Journal of Agronomy*. 5:31-43.
- Verma, V., P. Ravindran, and P.P. Kumar. 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *Bmc Plant Biology*. 16:86.
- Vernieri, P., A. Pardossi, and F. Tognoni. 1991. Influence of chilling and drought on water relations and abscisic-acid accumulation in bean. *Aust J Plant Physiol*. 18:25-35.
- Vigh, L., I. Horvath, T. Farkas, L.A. Mustardy, and A. Faludidaniel. 1981. Stomatal behavior and cuticular properties of maize leaves of different chilling-resistance during cold treatment. *Physiologia Plantarum*. 51:287-290.
- Vishwakarma, K., N. Upadhyay, N. Kumar, G. Yadav, J. Singh, R.K. Mishra, V. Kumar, R. Verma, R.G. Upadhyay, M. Pandey, and S. Sharma. 2017. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science*. 8:161.
- Walker-Simmons, M.K., and S.R. Abrams. 1991. Use of ABA immunoassays. In *Abscisic acid, physiology and biochemistry*. W.J. Davies and H.G. Jones, editors. Bios Scientific Publishers, Oxford. 53-63.
- Wani, S.H., V. Kumar, V. Shriram, and S.K. Sah. 2016. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop Journal*. 4:162-176.
- Wilkinson, S. 1999. PH as a stress signal. *Plant Growth Regulation*. 29:87-99.
- Wilkinson, S., and W.J. Davies. 2002. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell and Environment*. 25:195-210.
- Willmer, C., and M. Fricker. 1996. *Stomata*, Chapman and Hall, London
- Wilson, J.M., and A.C. McMurdo. 1981. Chilling injury in plants. In *Effects of low temperatures on biological membranes*. G.J. Morris and A. Clarke, editors. Academic Press Inc., London. 145-172.
- 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. *Ann Bot*. 67:205-212.
- Wright, S., and R. Hiron. 1969. (+) -Abscisic acid, the growth inhibitor induced in detached wheat leaves by a period of wilting. *Nature* 224:719-720.
- Yu, J., M.R. Tuinstra, M.M. Claassen, W.B. Gordon, and M.D. Witt. 2004. Analysis of cold tolerance in sorghum under controlled environment conditions. *Field Crops Research*. 85:21-30.

- Zegada-Lizarazu, W., D.F. Luna, and A. Monti. 2016. Differential characteristics of photochemical acclimation to cold in two contrasting sweet sorghum hybrids. *Physiologia Plantarum*. 157:479-489.
- Zhang, J.H. 1994. Accumulation of ABA in maize roots in response to root severing. *New Phytologist*. 127:309-314.
- Zhang, J.H., W.S. Jia, J.C. Yang, and A.M. Ismail. 2006. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*. 97:111-119.
- Zhang, J.H., U. Schurr, and W.J. Davies. 1987. Control of stomatal behavior by abscisic-acid which apparently originates in the roots. *Journal of Experimental Botany*. 38:1174-1181.
- Zhang, W.J., Z.L. Huang, Q. Wang, and Y.N. Guan. 2015. Effects of low temperature on leaf anatomy and photosynthetic performance in different genotypes of wheat following a rice crop. *Int. J. Agric. Biol.* 17:1165-1171.
- Zhou, Y.P., M.L. Sommer, and F. Hochholdinger. 2021. Cold response and tolerance in cereal roots. *Journal of Experimental Botany*. 72:7474-7481.
- Zou, J.P., L. Yang, Y.H. Li, M.X. Piao, Y.X. Li, N. Yao, X.H. Zhang, Q. Zhang, G.H. Hu, D.G. Yang, and Z.C. Zuo. 2022. Comparative proteomics combined with morphophysiological analysis revealed chilling response patterns in two contrasting maize genotypes. *Cells*. 11:1321.
- Zribi, L., G. Fatma, R. Fatma, R. Salwa, N. Hassan, and R.M. Nejjib. 2009. Application of chlorophyll fluorescence for the diagnosis of salt stress in tomato "*Solanum lycopersicum* (variety Rio Grande)". *Scientia Horticulturae*. 120:367-372.

8. ŹRÓDŁA INTERNETOWE

www.asch-online.eu/downloads/hormones/ELISA%20Manual.pdf

www.delta-t.co.uk/index.html

www.ekoziem.com.pl

www.fao.org

www.faostat.fao.org, 2022

www.konicaminolta.eu/en/measuring-instruments/products/colour-measurement/chlorophyll-meter/spad-502plus/introduction.html

www.walz.com