

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Dominika Dobrovolná

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

Výzkum tolerance ovocných plodin na sucho
v *in vitro* podmínkách

Bakalářská práce

Autor: Dominika Dobrovolná
Studijní program: Biologie
Studijní obor: BBI-TSB
Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.

Zadání bakalářské práce

Autor:	Dominika Dobrovolná
Studium:	S18BI053BP
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Biologie se zaměřením na vzdělávání, Tělesná výchova a sport se zaměřením na vzdělávání
Název bakalářské práce:	Výzkum tolerance ovocných plodin na sucho v in vitro podmínkách
Název bakalářské práce AJ:	Drought tolerance research of fruit crops in in vitro conditions

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Od roku 1950 se plocha uměle zavlažovaných polí zdvojnásobila, co vede k ohromnému vyčerpávání zásob vody, a to především podzemních zdrojů, které jsou sice obnovitelné, ale v horizontu stovek let. Adaptace hospodářsky významných rostlin na sucho je tedy aktuálním tématem. Je to zásadní pro minimalizaci jeho vlivů na rostlinnou produkci. Jádroviny a peckoviny jsou hlavními ovocnými plodinami v České republice i v Evropě, proto je výzkum sucha velice aktuálním a závažným tématem.

Cílem práce je navodit osmotický vodní stres u ovocných plodin v prostředí *in vitro* kultur. Mezi prvé příznaky osmotického stresu patří redukce dělení buněk a snížení obsahu vody v pletivech. Z toho důvodu budou v průběhu experimentu na rostlinách sledovány základní růstové parametry, a to délka, čerstvá hmotnost, sušina, obsah vody v pletivech, změny velikosti listové plochy, analýza kořenového systému. Získaný rostlinný materiál se pak dále využije na fyziologické a biochemické analýzy.

odborné publikace dostupné v databázích (Scopus, Web of Science)

Garantující pracoviště:	Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta
Vedoucí práce:	RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.
Oponent:	Mgr. Martina Komárková
Datum zadání závěrečné práce:	23.1.2020

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

Dále prohlašuji, že tištěná a elektronická verze bakalářské práce jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Hradci Králové dne 9. dubna 2021

Dominika Dobrovolná

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce RNDr. Zuzaně Kovalíkové, Ph.D., z Katedry biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové, za obětavou pomoc, podnětné připomínky a množství času, který mi při vedení práce věnovala.

Poděkování patří také Výzkumnému šlechtitelskému ústavu ovocnářskému Holovousy s.r.o., především Mgr. Petře Jiroutové Ph.D. a Ing. Lence Drbohlavové za poskytnutí rostlinného materiálu, pomoc s některými analýzami a poskytnutí fotografií.

Děkuji Technologické agentuře České republiky (TA ČR), program Zéta 2 za finanční pomoc v rámci grantu TJ02000066 (Výzkum laboratorní metody pro predikci tolerance ovocných plodin na sucho).

Můj dík patří i mé rodině, která mne v práci podporovala.

ANOTACE

Dobrovolná, D. *Výzkum tolerance ovocných plodin na sucho v in vitro podmínkách*. Hradec Králové, 2021. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Zuzana Kovalíková. 59 s.

Klimatické modely do budoucna předpovídají častější výskyt období sucha. Sucho představuje pro rostlinnou produkci závažný problém. Pro udržení potravinové bezpečnosti bude nutné přijmout opatření, která důsledky klimatu na zemědělskou produkci zvrátí. Pěstování odolných rostlinných odrůd je možným řešením.

V bakalářské práci byly hodnoceny vybrané morfologické (čerstvá a suchá hmotnost, obsah vody, plocha listů), fyziologické (obsah chlorofylů a karotenoidů) a biochemické parametry (reaktivní formy kyslíku (ROS), obsah malondialdehydu (MDA) a prolinu) u vybraných 5 odrůd jabloní ('Malinové holovouské', 'Fragrance', 'Rubinstep', 'Idared', 'Car Alexander') a 5 odrůd třešní ('Regina', 'Napoleonova', 'Kaštánka', 'Sunburst', 'P-HL-C'). Tržní odrůdy jabloní a třešní byly převedeny do *in vitro* kultur. Stres byl navozen přidáním polyethylenglykolu (PEG) do kultivačních médií.

Stres ze sucha negativně ovlivnil produkci čerstvé a suché hmoty, obsah vody, listovou plochu a obsah chlorofylů u obou ovocných druhů. Stres navozený přidávkem PEG způsobil oxidační stres. Zvýšené hodnoty ROS způsobile peroxidaci buněčných membrán a produkci MDA. Hodnoty MDA byly celkově vyšší u odrůd jabloní. Navozený stres dále způsobil změny koncentrací prolinu u odrůd jabloní a třešní. Hodnoty prolinu byly celkově vyšší u odrůd třešní.

Na základě výsledků analýz byly určeny odrůdy potenciálně odolné vůči stresu ze sucha. Výsledky byly porovnány s dřívějšími charakteristikami odrůd z hlediska odolnosti suchu.

KLÍČOVÁ SLOVA

sucho, osmotický stres, polyethylenglykol, *in vitro* kultura, jabloně, třešně

ANNOTATION

Dobrovolná, D. *Drought tolerance research of fruit crops in in vitro conditions*. Hradec Králové, 2021. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Zuzana Kovalíková. 59 p.

Climate models predict more frequent drought period in future. Drought is a serious problem, which affects plant productivity. Taking measures, which reverse the impact of climate changes on agricultural production, is necessary to keep global food safety. Possible solution is searching for tolerant plant cultivars.

In the Bachelor Thesis selected morphological (fresh and dry weight, water content, leaf area), physiological (chlorophyll and carotenoids content) and biochemical (reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and proline content) parameters of selected five apple ('Malinové holovouské', 'Fragrance', 'Rubinstep', 'Idared', 'Car Alexander') and five cherry ('Regina', 'Napoleonova', 'Kaštánka', 'Sunburst', 'P-HL-C') cultivars were evaluated. The market cultivars of apples and cherries were transferred to *in vitro* culture. Osmotic stress was simulated by increasing polyethylene glycol (PEG) concentration in medium.

PEG induced drought stress affected negatively the fresh and dry mass production, water content, leaf area and chlorophyll content in both fruit species. Drought stress caused oxidative stress. Increased ROS production resulted in peroxidation of cell membranes and MDA production. MDA content was overall higher in apples than in cherries. PEG induced drought stress also caused changes in proline concentration in apple and cherry cultivars. Proline content was overall higher in cherries than in apples.

Potentially drought stress tolerant cultivars were determined based on the results of analysis. The results were compared with previous characteristics of cultivars.

KEY WORDS

drought, osmotic stress, polyethylene glycol, *in vitro* culture, apples, cherries

OBSAH

ÚVOD	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	11
1.1 Sucho, důsledky sucha	11
1.2 Stres – definice stresu, fáze stresové reakce.....	12
1.3 Vodní stres	13
1.3.1 Definice vodního a osmotického stresu	13
1.3.2 Vliv vodního stresu na morfologické parametry rostlin	13
1.3.3 Vodní stres a tvorba reaktivních forem kyslíku	13
1.3.4 Vliv vodního stresu na fyziologické procesy v rostlinách.....	14
1.3.5 Strategie rostlin	15
2 PRAKTICKÁ ČÁST	16
2.1 Materiál a metodiky	16
2.1.1 Rostlinný materiál.....	16
2.1.2 Založení a multiplikace explantátů, navození osmotického stresu.....	18
2.1.3 Stanovení čerstvé a suché hmotnosti, obsahu vody a listové plochy	19
2.1.4 Stanovení obsahu asimilačních pigmentů.....	20
2.1.5 Stanovení obsahu reaktivních forem kyslíku	20
2.1.6 Stanovení obsahu malondialdehydu (MDA)	21
2.1.7 Stanovení obsahu prolinu	22
2.1.8 Statistické zpracování dat	23
2.2 Výsledky	24
2.2.1 Morfologické parametry	24
2.2.2 Fyziologické parametry.....	26
2.2.3 Biochemické parametry	28
3 DISKUSE	31
ZÁVĚR.....	34
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	36
PŘÍLOHY	41

ÚVOD

Stres ze sucha, který vzniká v důsledku nedostatku atmosférických srážek, představuje pro rostlinnou produkci velmi závažný problém. Voda je považována za nejvíce limitující faktor ze všech zdrojů nezbytných pro růst a metabolismus rostlin. Všechny životní procesy mohou v rostlinách probíhat pouze za dostatečného nasycení buněk vodou. Vzhledem ke klimatickým změnám, které vedou k oteplování planety, nárůstu počtu období beze srážek a snižování zásob povrchových a podzemních vod, bude v budoucnu problém pokrýt spotřebu vody pro rostlinnou závlahu (IPCC 2018). Celosvětová populace se navíc neustále rozrůstá a je pravděpodobné, že do roku 2050 dosáhne 9 miliard. Aby bylo možné uživit tak velkou populaci, bude nezbytné zvýšit produkci potravin, tedy i rostlinnou produkci. Jedním z možných řešení bude šlechtění nových rostlinných odrůd s vyššími výnosy, které budou lépe snášet abiotický a biotický stres (Godfray et al. 2010).

Při vodním stresu dochází v rostlinných buňkách k narušení vodní bilance a ke vzniku vodního deficitu. S vodním stresem úzce souvisí osmotický stres, tedy vytékání vody z buněk v důsledku rozdílných osmotických koncentrací mezi vnitřním prostředím buněk a vnějším prostředím. Vodní a osmotický stres jsou příčinami morfologických, fyziologických a biochemických změn v rostlinách.

Snížení buněčného turgoru je prvotní reakcí rostlin na stres ze sucha. Rostliny vadnou, a snižují tak transpirační plochu. Udržení plné turgescence buněk je základní podmínkou pro zachování růstu rostlin. Při poklesu turgoru v důsledku vodního deficitu se průduchy zavírají, a dochází k přerušení příjmu oxidu uhličitého (CO₂). Fotosyntéza se zastavuje, růst buněk je přerušen. Dochází k zastavení zvětšování listové plochy. Rostliny reagují na stres z nedostatku vody také snížením produkce čerstvé a suché hmoty (Farooq et al. 2009).

Stresované rostliny produkují reaktivní formy kyslíku (ROS). Jedná se o látky, které nepříznivě působí na buňky. Poškozují především lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Následkem degradace buněčných membrán je hromadění malondialdehydu (MDA) (Zhong et al. 2018). MDA lze proto využít jako indikátor stresu ze sucha.

Vodní stres způsobuje změny obsahu asimilačních pigmentů (chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, karotenoidy). Silně stresované rostliny snížením obsahu chlorofylu v listech absorbují menší množství fotonů, a sníží tak produkci reaktivních forem kyslíku (Khoyerdi et al. 2016). Vzhledem k antioxidační aktivitě karotenoidů může dojít ke zvýšení jejich koncentrace (Young et al. 2018).

Cílem bakalářské práce bylo vyhodnotit vybrané morfologické (čerstvá a suchá hmotnost, obsah vody, plocha listů), fyziologické (obsah chlorofylů a karotenoidů)

a biochemické parametry (reaktivní formy kyslíku, obsah MDA a prolinu) u vybraných 5 odrůd jablek ('Malinové holovouské', 'Fragrance', 'Rubinstep', 'Idared', 'Car Alexander') a 5 odrůd třešní ('Regina', 'Napoleonova', 'Kaštánka', 'Sunburst', 'P-HL-C'). Tržní odrůdy jablek a třešní byly převedeny do *in vitro* kultur. Stres byl navozen přidáním polyethylenglykolu (PEG) do kultivačních médií. Na základě výsledků byly určeny odrůdy potenciálně odolné vůči stresu ze sucha.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Sucho, důsledky sucha

Voda je pro život rostlin nezbytná. Všechny životní procesy v rostlinách probíhají jen při dostatečném množství vody v buňkách. Voda umožňuje optimální průběh biologických procesů v rostlinách (fotosyntéza, respirace, apod.), představuje univerzální rozpouštědlo, ve kterém se rozpouštějí organické i anorganické látky, transportní látku, složku makromolekul, látku s významným vlivem na tepelný režim rostlin, stavební látku rostlin (dodává dva základní biogenní prvky) i životní prostředí pro vodní rostliny (Kincl et Krpeš 2000). Pletiva rostoucích rostlin obsahují 80 až 95 % vody. V buňkách dřeva, které se skládá především z mrtvých buněk, je obsah vody nižší. U bělového dřeva se pohybuje v rozmezí 35 až 75 % vody. Nejméně vody obsahují semena rostlin, u kterých voda tvoří 5 až 15 % hmoty. Před začátkem klíčení musí semena absorbovat velké množství vody (Taiz et Zeiger 2006). Při snížení obsahu vody v listu na 60 % dochází k nevratnému poškození buněčných struktur (Procházka et al. 1998).

Vodní deficit, který vzniká v důsledku nedostatku atmosférických srážek, označujeme jako sucho. Rozlišujeme sucho meteorologické, zemědělské, hydrologické a socioekonomické. Meteorologické sucho lze charakterizovat jako nedostatek atmosférických srážek oproti normálu. Srážkové úhrny se v jednotlivých oblastech značně liší (tropický deštný les, poušť), a nelze tedy stanovit univerzální hodnotu srážkových úhrnů, která by značila sucho. Meteorologické sucho je příčinou dalších druhů sucha. Zemědělské sucho vyjadřuje nedostatek půdní vláhy pro růst hospodářských plodin. Hydrologické sucho značí nedostatek povrchové a podzemní vody. Negativní vliv sucha na lidskou společnost, tedy dopady sucha na zemědělství, lesnictví, vodohospodářství, dostatek pitné vody, energetiku, turistický ruch apod. vyjadřuje socioekonomické sucho (Wilhite 2005; Brázdil et Trnka 2015).

Asi vůbec největší dopady sucha představuje pro zemědělství a lesnictví. Vláhový deficit snižuje rostlinnou produkci a i v oblastech s relativně dobrou dostupností vody snižuje sucho zemědělské výnosy o 10 až 15%. Sucho nepříznivě ovlivňuje kvalitu půdy a podílí se na zasolení půd, větrné erozi a dehumifikaci. Teplá a suchá období vedou k oslabování stromů a podporují šíření invazních organismů (kůrovcové kalamity). Nezanedbatelné jsou též výdaje za vodu pro zavlažování (Brázdil et Trnka 2015). Odhaduje se, že jedna třetina světové rostlinné produkce je pěstována na zavlažované půdě (Tester et Langridge 2010). Podle Českého statistického úřadu (ČSÚ) (2010) měla v České republice zavlažovaná půda rozlohu 19 196 ha. Největší plocha zavlažované půdy připadala na zeleninu a jahody (25,0 %), brambory (17,3 %) a ovocné sady (15,3 %). Zdrojem vody byla podzemní a povrchová voda z vlastních zdrojů, nebo zdrojů mimo podnik, tedy veřejný vodovod, recyklovaná odpadní voda z čistíren, atd. Zavlažovalo se

postřikem, povrchovým zavlažováním (podmok, přeron, výtopy) a mikrozávlahami (kapková, bodová závlaha).

1.2 Stres – definice stresu, fáze stresové reakce

Rostliny neustále interagují s vnějším prostředím. Přijímají a vylučují látky a energii, rostou a vyvíjejí se. Životními pochody ovlivňují prostředí, ve kterém se nacházejí. Vnější prostředí současně ovlivňuje rostliny. Rostlinám poskytuje k životu nezbytné světlo, teplo, oxid uhličitý, kyslík, živiny, vodu a minerální látky. V důsledku nepřetržitě se měnících podmínek vnějšího prostředí se u rostlin vyvinula řada mechanismů a adaptací, které rostlinám umožňují udržet rovnovážný stav, homeostázu. Jestliže se ale charakter prostředí mění příliš rychle, s velkou intenzitou a rostlina se jeho proměnám nedokáže přizpůsobit, dochází v rostlinách k narušení biologických procesů, poruchám růstu a vývoje, poškozování orgánů a může dojít k odumření rostliny. Soubor faktorů prostředí, které nepříznivě ovlivňují rostliny, označujeme jako stresové faktory. Termín stres značí stav, ve kterém je na rostliny kladena nadměrná zátěž (Procházka et al. 1998).

Stresory, které nepříznivě ovlivňují životní pochody v rostlinách, lze rozdělit na biotické a abiotické. Zatímco biotickými stresory rozumíme negativní působení organismů na rostliny (viry, houby, bakterie, herbivoři, parazitické rostliny), abiotický stres vzniká v důsledku nadbytku nebo nedostatku fyzikálního nebo chemického podnětu. Fyzikálními stresovými faktory jsou nadbytečné viditelné záření, UV záření, extrémní teploty a mechanické vlivy větru. Chemickými stresory jsou nadbytek a nedostatek vody (sucho), minerálů v půdě, nedostatek kyslíku (hypoxie) a oxidu uhličitého (hypokapnie) (Procházka et al. 1998).

Jakmile rostlinné buňky zaznamenají změny ve vnějším prostředí, které nepříznivě ovlivňují rostlinu, je zahájena stresová reakce. Informace o stresu je ostatním buňkám rostliny předána prostřednictvím signálních molekul, např. hormony kyselina abscisová (ABA), kyselina salicylová, kyselina jasmonová nebo etylén (Slováková et Mistrík 2007). V počáteční reakci na stres (poplachová fáze) u rostlin dochází k narušení buněčného metabolismu. Jestliže není působení stresu pro rostlinu letální, jsou u ní mobilizovány mechanismy, které rostlinu chrání a pomáhají jí obnovit porušenou homeostázu (fáze aklimatizace). Jedná se o syntézu stresových proteinů, antioxidantů a osmoticky aktivních látek. Díky těmto ochranným mechanismům je rostlina schopna stresovým faktorům odolávat (fáze rezistence). Při intenzivním nebo dlouhotrvajícím stresu rostlina umírá (fáze vyčerpání) (Kosová et al. 2011).

1.3 Vodní stres

1.3.1 Definice vodního a osmotického stresu

Vyrovnaná vodní bilance, tedy poměr mezi příjmem a ztrátami vody, je zásadní pro fungování veškerých mechanismů v rostlinách. Vodní deficit je možné definovat jako stav, při kterém je obsah vody v buňce nižší než při maximálním nasycení (Taiz et Zeiger 2006). Osmotický stres lze charakterizovat jako odčerpávání vody z buněk. Děje se tak v důsledku rozdílných osmotických koncentrací uvnitř a vně buněk. Uvnitř buněk se nachází méně osmoticky aktivních látek než v okolním prostředí, a proto voda proniká přes tonoplast, cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu ven z buňky. Nejčastějšími příčinami osmotického stresu jsou sucho, zasolení a chlad. Při vodním stresu u rostlin dochází k fyziologickým a morfologickým změnám.

1.3.2 Vliv vodního stresu na morfologické parametry rostlin

Prvotním projevem stresu ze sucha je snížení buněčného turgoru, které se projeví vadnutím rostlin (Jaleel et al 2009). Stáčením listů při vadnutí rostliny zmenšují transpirační plochu. Pro zachování růstu rostlin je nezbytné udržování plně turgescenčních buněk. Při vodním stresu dochází ke snížení objemu cytoplazmy a turgoru ve svěracích buňkách. Průduchy se uzavírají a rostlina nepřijímá oxid uhličitý. Při velkém vodním stresu se fotosyntéza zastavuje. Buněčný růst je přerušen, a dochází k zastavení zvětšování listové plochy. Dělení buněk se rovněž zastavuje (Khoyardi et al. 2016). Rostliny reagují na stres z nedostatku vody snížením produkce čerstvé a suché hmoty (Farooq et al. 2009; Bhusal et al. 2019).

1.3.3 Vodní stres a tvorba reaktivních forem kyslíku

Vodní a osmotický stres jsou jednou z příčin vzniku sekundárního oxidačního stresu v rostlinách. Oxidační stres vzniká i v důsledku působení vysoké intenzity slunečního záření, tepla, chladu, patogenů apod. Snížením rychlosti fotosyntézy rostliny během primárních pochodů fotosyntézy absorbují více zářivé energie, než mohou následně využít pro fixaci uhlíku v sekundárních pochodech fotosyntézy (Wang et al. 2018). Přebytečná energie způsobuje oxidační stres a stresované rostliny produkují více reaktivních forem kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species). Mezi ROS lze zařadit peroxid vodíku, superoxidové radikály, singletový kyslík a hydroxylové radikály. Jedná se o látky, které nepříznivě působí na buňky. Poškozují především lipidy, proteiny a nukleové kyseliny a urychlují stárnutí buněk (Khoyardi et al. 2016). ROS způsobují peroxidaci buněčných membrán a produkci velkého množství malondialdehydu (MDA) (Zhong et al. 2018). V rostlinách ROS vznikají v různých buněčných organelách i za optimálních podmínek pro růst a vývoj. Mají význam v přenosu signálů a spouštění stresových

reakcí (Wang et al. 2012). Rostliny disponují antioxidantními mechanismy, díky kterým jsou schopny radikály odstraňovat, a udržovat tak rovnováhu. Při stresu se produkce ROS rychle zvyšuje a rostliny je nestíhají odstraňovat. Mezi látky, které zabraňují oxidačnímu stresu rostlin, patří antioxidanty jako např. kyselina askorbová, glutathion, karotenoidy, tokoferoly, flavonoidy a taniny, enzymy superoxiddismutáza (SOD), peroxidáza (POX) a kataláza (CAT) (Slováková et Mistrík 2007; Šircelj et al. 2007).

1.3.4 Vliv vodního stresu na fyziologické procesy v rostlinách

Vodní stres snižuje koncentraci fotosyntetických pigmentů chlorofylů (chlorofyl *a*, chlorofyl *b*) a karotenoidů v chloroplastech (Jaleel et al. 2009; Bhusal et al. 2019). Chlorofyly jsou hlavními rostlinnými fotosyntetickými pigmenty. Rostlinám umožňují zachytit energii slunečního záření a převést ji na redukční koenzymy (Liu et al. 2019). Silně stresované rostliny snížením obsahu chlorofylu v listech absorbují menší množství fotonů, a sníží tak produkci ROS v tylakoidních membránách chloroplastů během primárních pochodů fotosyntézy (Khoyerdi et al. 2016). Úbytek chlorofylu se projevuje žloutnutím listů.

Karotenoidy jsou rostlinné pigmenty s důležitou světlosběrnou funkcí. Zároveň představují důležité neenzymatické antioxidanty. Karotenoidy dokáží převést nadbytečnou energii zachycenou chloroplasty na teplo, a zabraňují tak vzniku ROS. Jejich množství se proto může při reakci rostlin na stres zvyšovat (Šircelj et al. 2007; Young et al. 2018).

V reakci na vodní stres rostliny produkují a akumulují velké množství osmoticky aktivních látek. Syntéza těchto látek je důležitá pro zvýšení osmotického tlaku v buňkách a pro zachování funkcí buněk (Procházka et al. 1998; Rahayu et al. 2015). Shromažďování těchto látek ve vakuolách a cytosolu rostlinných buněk rostlinám umožňuje přijímat vodu, udržovat buněčný turgor a má význam i pro stabilizaci buněčných membrán (Khoyerdi et al. 2016). Jedná se o netoxické látky s nízkou molekulovou hmotností. Jednou z nich je aminokyselina prolin ($C_5H_9NO_2$) (Farooq et al. 2009). Za normálních podmínek je prolin syntetizován v cytosolu. Za stresových podmínek může jeho syntéza probíhat také v chloroplastech (Per et al. 2017). Prolin je důležitou součástí antioxidantního systému rostlin. Jedná se o molekulární chaperon, který stabilizuje strukturu proteinů, a chrání tak rostlinné buňky před oxidativním poškozením (Šircelj et al. 2007; Vendruscolo et al. 2007; Zhong et al. 2018). Zvýšenou akumulací prolinu dokáží rostliny udržet integritu buněčných membrán (pokles obsahu H_2O_2 , a tedy snížení peroxidace membránových lipidů) a zvyšovat čerstvou a suchou hmotnost, obsah chlorofylů, rychlost čisté fotosyntézy, účinnost fotosystému II a aktivitu enzymů SOD, CAT, glutathion reductázy (GR), apod. Za stresových podmínek regulují metabolismus prolinu v rostlinách fytohormony (Per et al. 2017).

Vodní stres indukuje syntézu stresových hormonů kyseliny abscisové (ABA) a etylénu a stresových proteinů dehydrinů. ABA je fytohormon, který je zodpovědný za růstové a vývojové procesy v rostlinách a reakce rostlin na proměny vnějšího prostředí, kam lze zahrnout i stresové reakce. Množství ABA v rostlinách se v závislosti na podmínkách vnějšího prostředí dramaticky mění. ABA je za vodního deficitu syntetizována v kořenech rostlin, odkud je cévními svazky vedena do listů. V listech ABA způsobí uzavření stomat. Uzavřením průduchů dojde ke zpomalení transpirace, a tedy ke snížení vodních ztrát. ABA dále stimuluje transkripci LEA proteinů (Late Embryogenesis Abundant Proteins). Tyto proteiny chrání buněčné membrány a proteiny před poškozením v důsledku vyschnutí (Pavlová 2006). Během 4 až 8 hodin může vzrůst hladina ABA až 50krát. Po dodání vody rostlině se hladina ABA vrátí do normálu (Taiz et Zeiger 2006). Při dlouhodobém vystavení rostliny vodnímu deficitu ABA inhibuje růst nadzemních částí rostlin a stimuluje růst kořenů. Osmotický stres indukuje syntézu etylénu. Jeho zvýšená hladina způsobí opad listů.

1.3.5 Strategie rostlin

Geneticky naprogramované pochody, kterými rostliny reagují na přítomnost stresoru, označujeme jako rostlinné strategie. Reakce rostlin na stresory jsou druhově specifické. Dle závislosti na vlhkosti prostředí lze rostliny rozdělit na poikilohydrické a homoiohydrické. Poikilohydrické rostliny jsou zcela závislé na vlhkosti vnějšího prostředí. Nedokáží účinně regulovat vodní stav ve svých tělech. Buňky jejich pletiv neobsahují vakuoly. Při nedostatku vody u nich dochází k zastavení životních pochodů a buňky vysychají, aniž by u nich došlo k poškození vnitřních struktur. Rostliny jsou tolerantní k vyschnutí. Po dodání vody se v rostlinách životní procesy obnoví. Mezi poikilohydrické rostliny patří některé řasy, mechy a kapradiny. Homoiohydrické rostliny mají naopak schopnost zadržovat vodu, a nejsou proto zcela závislé na vlhkosti prostředí. Pro buňky jejich pletiv jsou charakteristické velké vakuoly. U homoiohydrických rostlin se vyvinula řada přizpůsobení, která jim umožňují vypořádat se s nepříznivými vodními poměry prostředí a přežít. Jsou jimi např. silná kutikula a průduchy omezující transpiraci a kořenový systém, kterým jsou schopny pronikat do hlubších vrstev půdy a nasávat vodu. Mezi homoiohydrické rostliny lze zařadit téměř všechny vyšší rostliny (Pavlová 2006). Podle vztahu k vlhkosti lze rostliny rozdělit na hydrofyty, hygropyty, mezofyty a xerofyty. Hydrofyty jsou vodní rostliny. Jsou pro ně charakteristická provětrávací pletiva (aerenchym) a menší podíl oporných struktur. Hygropyty jsou bahenní rostliny s vysokými nároky na vlhko. Mezofyty jsou rostliny, které osidlují středně vlhká stanoviště. Xerofyty jsou rostliny tolerantní k suchu (Kincl et Krpeš 2000). Pro tyto rostliny je typické ochlupení listů, které zvyšuje odražení dopadajícího slunečního záření a snižuje tak teplotu listů.

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Materiál a metodiky

2.1.1 Rostlinný materiál

Pro morfologické, fyziologické a biochemické analýzy odolnosti vůči stresu ze sucha bylo vybráno 5 odrůd jableň ('Malinové holovouské', 'Fragrance', 'Rubinstep', 'Idared', 'Car Alexander') a 5 odrůd třešň ('Regina', 'Napoleonova', 'Kaštánka', 'Sunburst', 'P-HL-C'). Výzkumný soubor zahrnoval běžné tržní i nově vyšlechtěné odrůdy. Rostlinný materiál poskytl Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. (VŠÚO Holovousy).

Charakteristika vybraných odrůd

Jabloně

'Malinové holovouské'

Odrůda byla vyšlechtěna v Holovousích v 18. století. Jedná se o odrůdu jableň s kulovitými, středně velkými až velkými plody sladce malinové chuti (VŠÚO Holovousy 2019). Odrůda dobře odolává mrazu (Říha 1919; Boček et al. 2008). Nesnáší přísušek (Archiv starých odrůd ovoce 2016).

'Fragrance'

Odrůda byla vyšlechtěna ve VŠÚO Holovousy. Jedná se o ranou odrůdu jableň, odolnou vůči strupovitosti, se středně velkými až velkými, sladšími, aromatickými plody kulovitého tvaru (VŠÚO Holovousy 2019). Odrůda je odolná vůči mrazům (Kolektiv autorů VŠÚO Holovousy 2007).

'Rubinstep'

Odrůda byla vyšlechtěna ve VŠÚO Holovousy. Jedná se o velmi ranou odrůdu jableň, středně odolnou vůči strupovitosti a padlí, se sladkými, aromatickými, středně velkými plody. Vyžaduje živinami bohatou půdu s dostatečnou závlahou (VŠÚO Holovousy 2019). Odrůda je odolná vůči zimním a jarním mrazům (Blažek 2001).

'Idared'

Odrůda byla vyšlechtěna v USA. Jedná se o ranou odrůdu jableň, citlivější vůči mrazům, trpící padlím a strupovitostí, se středně velkými až velkými, sladce navinulými, aromatickými plody ploše kulovitého tvaru (Kutina et Holeček 1992; VŠÚO Holovousy 2019).

‘Car Alexander‘

Odrůda byla vyšlechtěna v Rusku v 19. století. Jedná se o mrazuvzdornou podzimní odrůdu jabloně s velkými, široce kuželovitými plody (VŠÚO Holovousy 2019). Odrůda je vysoce odolná vůči mrazu (Říha 1919; Vaněk 1936; Říha 1937; Boček 2008). Nesnáší sucho (Boček 2008; Archiv starých odrůd ovoce 2016).

Třešně

‘Regina‘

Odrůda byla vyšlechtěna v Německu. Jedná se o ranou odrůdu třešně, s velkými, tmavě červenými plody a tuhou dužninou. Plody jsou sladké, vhodné pro přímou konzumaci (VŠÚO Holovousy 2019). V deštivém počasí plody pukají (Wociór 2008).

‘Napoleonova‘

Původ odrůdy není známý. Pravděpodobně byla vyšlechtěna v Německu. Její středně velké, světle žluté plody s červeným mramorováním jsou sladké, aromatické (VŠÚO Holovousy 2019). V deštích plody pukají. Odrůda je silně mrazuvzdorná (Vaněk 1938). Toleruje přísušek (Kutina et al. 1991; Archiv starých odrůd ovoce 2016).

‘Kaštánka‘

Odrůda byla vyšlechtěna v Anglii. Jedná se o ranou odrůdu třešně se středně velkými plody srdcovitého tvaru a tmavě červenou, měkkou, aromatickou a sladkou dužninou. Plody ‘Kaštánky‘ jsou odolné praskání (VŠÚO Holovousy 2019). Odrůda odolává mrazu (Kamenický 1941). Kratší období sucha toleruje (Archiv starých odrůd ovoce 2016).

‘Sunburst‘

Odrůda byla vyšlechtěna v Kanadě. Její plody jsou velmi velké a aromatické (VŠÚO Holovousy 2019). Plody jsou odolné praskání. Odrůda je odolná vůči mrazu (Lane 1984).

‘P-HL-C‘

Jedná se o podnož pro třešně, která byla poprvé vypěstována ve VŠÚO Holovousy. Podnož roste pomalu. V dospělosti vyžaduje oporu. Její kořenový systém je mělký (VŠÚO Holovousy 2019). Podnož je středně odolná mrazu. Vůči suchu je mírně citlivá (Blažková 2004).

2.1.2 Založení a multiplikace explantátů, navození osmotického stresu

Pro založení počátečních explantátů byly použity výhony vybraných odrůd jableň a třešň, které poskytl VŠÚO Holovousy. Tyto byly následně převedeny do *in vitro* kultur. Explantáty (narašené pupeny dormantních výhonů) byly nasazeny do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml na sterilní agarové Murashige & Skoog (MS) medium (Murashige et Skoog 1962) s přidavkem vitamínů (MS medium bylo sterilizováno v parním tlakovém autoklávu 5075 ELV (Tuttnauer) (Obrázek 1) při 120 °C po dobu 20 minut) a překryty hliníkovou fólií. (Přesné složení média je uvedeno v Příloze 1). Jedna kultivační nádoba obsahovala 25-30 ml media a 3-5 explantátů. *In vitro* kultury byly 4 týdny kultivovány při teplotě 22±1 °C, za světelných podmínek 16 hodin světlo/8 hodin tma (Obrázek 2). Explantáty byly následně přeneseny na multiplikační MS medium obohacené o růstový stimulant 6-benzylaminopurin (BAP) o koncentraci 1,5 mg.l⁻¹. Po 4 týdnech kultivace za stejných podmínek byly explantáty přeneseny na čerstvé medium.

Stres byl navozen přidáním polyethylenglykolu (PEG 6000) do základního kultivačního média v koncentraci 0, 5, 10, 25 a 50 g.l⁻¹ (0%, 0,5%, 1%, 2,5 % a 5% PEG 6000). PEG je vysokomolekulární látka, která snižuje vodní potenciál živného roztoku a u rostlin navozuje osmotický stres. Pro rostliny není toxický (Rahayu et al. 2015; Masoabi et al. 2018). Rostliny byly 4 týdny kultivovány za stejných podmínek.

Rostlinný materiál byl kultivován a v pravidelných intervalech dovážen ke zpracování z VŠÚO Holovousy.



Obrázek 1 Sterilizátor 5075 ELV (Tuttnauer). Foto Petra Jiroutová

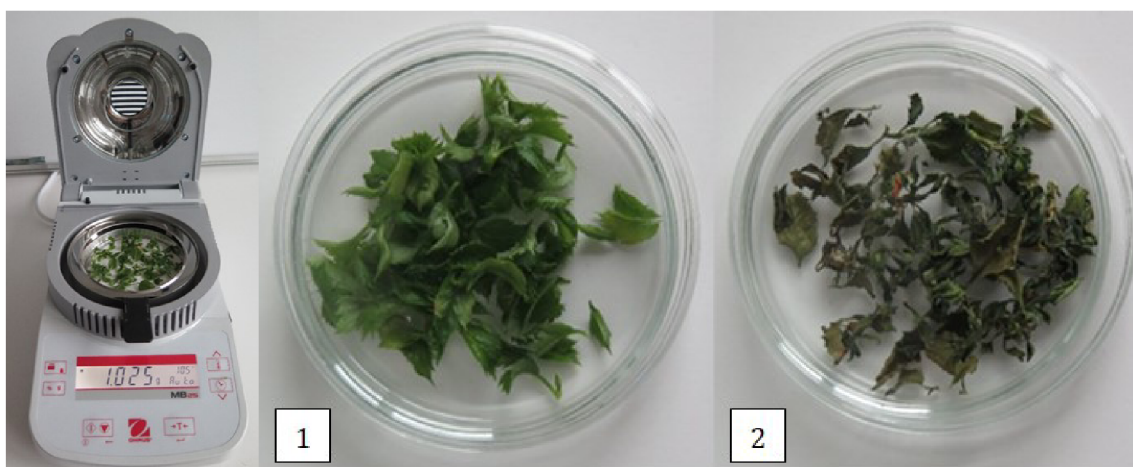


Obrázek 2 Kultivační místnost s *in vitro* kulturami. Foto Petra Jiroutová

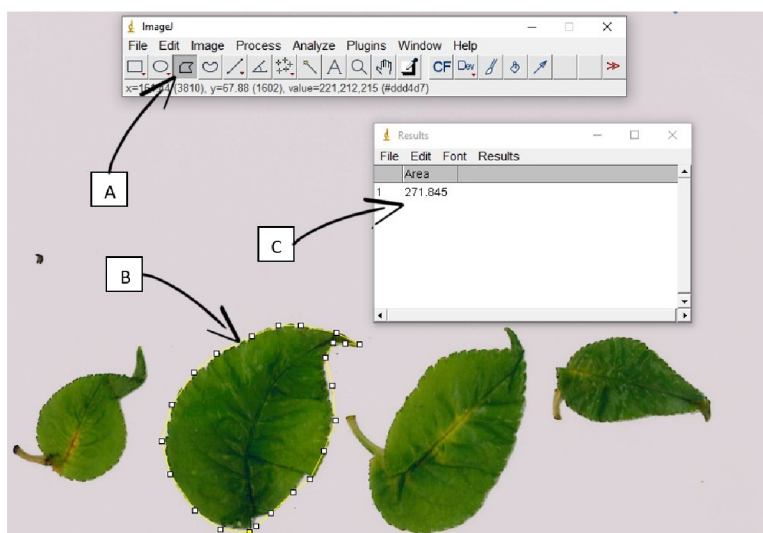
2.1.3 Stanovení čerstvé a suché hmotnosti, obsahu vody a listové plochy

Čerstvá hmotnost explantátů kultivovaných za shodných podmínek byla určena analytickými vahami (AS 220.R2, Radwag, Polsko). Suchá hmotnost a obsah vody byly stanoveny pomocí analyzátoru vlhkosti (MB27, Ohaus, NJ, USA) (Obrázek 3). Velikost listové plochy explantátů byla určena vyfotografováním jednotlivých listů (PowerShot G16, Canon, Japonsko) a vyhodnocením v programu ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) pomocí nástroje „polygon selections“ (Obrázek 4).

Analýzy morfologických parametrů byly provedeny ve spolupráci s Dr. Petrou Jiroutovou z VŠÚO Holovousy.



Obrázek 3 Analyzátor vlhkosti MB27, Ohaus, NJ, USA; 1. Čerstvé segmenty explantátů; 2. Suché segmenty explantátů. Foto Petra Jiroutová



Obrázek 4 Určení velikosti listové plochy pomocí softwaru ImageJ. A - nástroj „polygon selections“ k výběru listové plochy; B - listová plocha ohraničená pomocí nástroje „polygon selections“; C - automaticky vypočítaná listová plocha v mm². Foto Petra Jiroutová

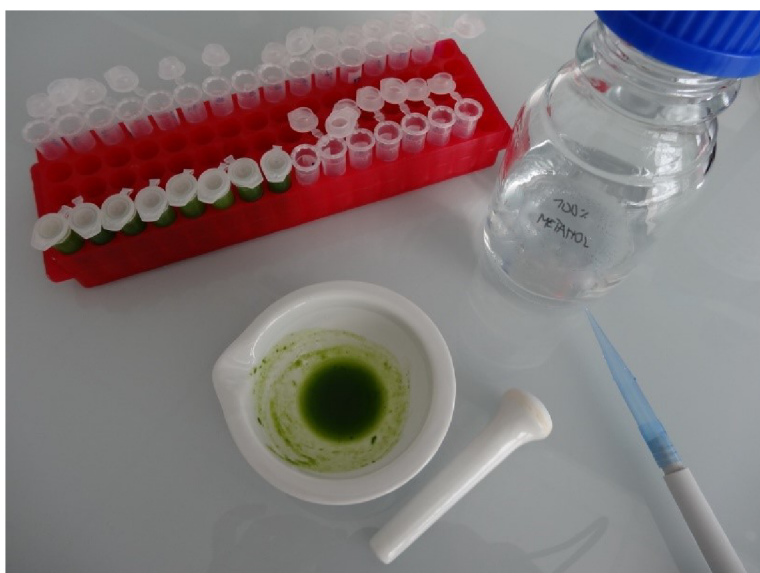
2.1.4 Stanovení obsahu asimilačních pigmentů

Obsah asimilačních pigmentů byl stanoven spektrofotometricky v metanolvém extraktu. Extrakt byl zhotoven homogenizací 0,1 g čerstvého explantátu se 2 ml 100% metanolu v třecí misce (Obrázek 5). Výsledný homogenát byl centrifugován 15 minut (MPW-55 Microcentrifuge, MPW, Polsko) (Obrázek 6) při 3500 rpm. Následně byla spektrofotometricky měřena absorbance supernatantu při vybraných vlnových délkách - pro chlorofyl *a* 666 nm, chlorofyl *b* 653 nm, celkové karotenoidy 470 nm a pro korekci nespecifické absorbance 750 nm (spektrofotometr Cintra 101, Francie). Jako blank byl použit čistý metanol. Obsah pigmentů byl stanoven dle rovnic odvozených Wellburnem (1994):

$$\text{Koncentrace chlorofylu } a: C_a = 15,65A_{666} - 7,34A_{653} \text{ (mg.l}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Koncentrace chlorofylu } b: C_b = 27,05A_{653} - 11,21A_{666} \text{ (mg.l}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Koncentrace karotenoidů: } C_{x+c} = (1000A_{470} - 2,86C_a - 129,2C_b)/221 \text{ (mg.l}^{-1}\text{)}$$



Obrázek 5 Homogenizace explantátů se 100% metanolem v třecí misce. Foto Dominika Dobrovolná



Obrázek 6 Mikrocentrifuga MPW-55. Foto Dominika Dobrovolná

2.1.5 Stanovení obsahu reaktivních forem kyslíku

Obsah H₂O₂ a superoxidového radikálu byl stanoven homogenizací 0,1 g čerstvého explantátu s 2 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0) ve vychlazené třecí misce. Vzniklý homogenát byl vložen na 15 min do chlazené centrifugy (Eppendorf 5804 R, Německo) při 14000 rpm a teplotě 4 °C (Obrázek 7).

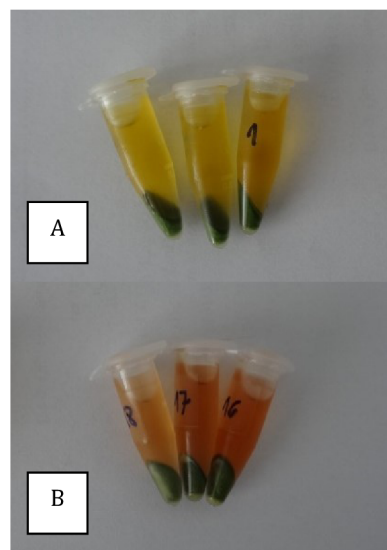
Pro stanovení obsahu H₂O₂ bylo 500 µl supernatantu přeneseno do čisté Eppendorfovy zkumavky a smícháno s 250 µl 0,5% roztoku chloridu titaničitého (TiCl₄) v 20% kyselině sírové (H₂SO₄). Po opakované centrifugaci 15 minut při

14000 rpm a teplotě 4 °C se vzorky nechaly ohřát na laboratorní teplotu. U vzorků (Obrázek 8) byla spektrofotometricky měřena absorbance při vlnové délce 410 nm (spektrofotometr Cintra 101, Francie). Jako slepý vzorek bylo použito 500 µl fosfátového pufru a 250 µl 0,5% roztoku TiCl_4 v 20% H_2SO_4 . Jako standard pro sestavení kalibrační křivky byl použit 30% H_2O_2 o různé koncentraci. Skutečný obsah peroxidu vodíku ve vzorku byl přepočítán dle sestavené kalibrační křivky a vyjádřen v $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ na 1 g čerstvé hmotnosti (Dučaiová et al. 2016).

Pro stanovení obsahu superoxidového radikálu bylo 300 µl supernatantu smícháno s 250 µl fosfátového pufru a 30 µl 10 mM hydroxylaminu. Vzorky byly ponechány 15 min při laboratorní teplotě. Následně bylo ke vzorkům v 15-ti minutových intervalech postupně přidáváno 300 µl 17mM sulfanylaminu, 300 µl 7 mM α -naftylaminu a 300 µl dietyléteru. U vzorků byla spektrofotometricky měřena absorbance při vlnové délce 530 nm. Ve slepém vzorku byl vzorek nahrazen 300 µl fosfátového pufru. Jako standard pro sestavení kalibrační křivky byl použit NaNO_2 o různé koncentraci. Obsah superoxidového radikálu ve vzorku byl přepočítán dle sestavené kalibrační křivky a vyjádřen v μg radikálu na 1 g čerstvé hmotnosti (Dučaiová et al. 2016).



Obrázek 7 Chlazená centrifuga Eppendorf 5804 R, Německo.
Foto Zuzana Kovalíková



Obrázek 8 Vzorky jabloní (A) a třešní (B) po centrifugaci, připravené ke spektrofotometrickému stanovení absorbance. Foto Dominika Dobrovolná

2.1.6 Stanovení obsahu malondialdehydu (MDA)

Obsah MDA byl stanoven homogenizací 0,2 g čerstvého explantátu s 2 ml 0,1% kyseliny trichloroctové (TCA) ve třetí misce. Vzniklý homogenát byl umístěn do zkumavky a vložen na 15 min do centrifugy (MPW-55 Microcentrifuge, MPW, Polsko) při 14000 rpm a teplotě 20 °C. Supernatant (0,5 ml) byl smíchán s 1,5 ml

0,5% kyseliny 2-tiobarbiturové (TBA) v 20% TCA. Reakční směs byla promíchána a inkubována 30 minut v sušárně při teplotě 90 °C (Memmert UF450, Německo) (Obrázek 9). Následně byly zkumavky se vzorky prudce ochlazeny ve vodě s ledovou drtí (Obrázek 10). Po opakované centrifugaci 15 minut při 14000 rpm a teplotě 20 °C byla spektrofotometricky měřena absorbance při vlnové délce 532 nm pro komplex MDA – TBA a 600 nm pro korekci nespecifického zákalu (spektrofotometr Cintra, Francie). Jako slepý vzorek bylo použito 1,5 ml 0,5% TBA v 20% TCA s 0,5 ml 0,1% TCA. Koncentrace MDA ve vzorku byla určena jako rozdíl absorbancí $A_{532} - A_{600}$, s využitím molárního absorpčního koeficientu $155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Výsledky byly vyjádřeny v μmol MDA na 1 g čerstvé hmotnosti (Dučaiová et al. 2016).



Obrázek 9 Sušárna Memmert UF450, Německo. Foto Zuzana Kovalíková



Obrázek 10 Ochlazení vzorků v ledové drti. Foto Dominika Dobrovolná

2.1.7 Stanovení obsahu prolinu

Obsah aminokyseliny prolinu byl stanoven homogenizací 0,3 g čerstvého explantátu (Obrázek 11) s 5 ml 3% kyseliny sulfosalicylové (SSA) ve třecí misce. Vzniklý homogenát byl umístěn do 15 ml zkumavky a vložen na 20 min do centrifugy (MPW 351e Centrifuge, MPW, Polsko) při 4500 rpm a teplotě 20 °C. Supernatant (2 ml) byl smíchán se 2 ml ledové kyseliny octové a 2 ml kyselého ninhydrinu. Směs byla promíchána a ponechána 1 hodinu ve vodní lázni při teplotě 90-100 °C. Následně byly zkumavky prudce ochlazeny ve vodě s ledovou drtí na teplotu cca 25 °C. K ochlazeným vzorkům byly přidány 3 ml toluenu a směs byla důkladně protřepána. Poté byl vzorek uložen na 24 hodin do tmy při laboratorní teplotě. U vzorků byla spektrofotometricky měřena absorbance vrchní toluenové vrstvy při vlnové délce 520 nm (spektrofotometr Cintra 101, Francie) (Obrázek 12). Jako blank byl použit čistý toluen. Jako standard pro sestavení kalibrační křivky byl použit prolin o různé koncentraci. Obsah prolinu ve vzorku byl přepočítán dle sestavené kalibrační křivky a vyjádřen v μmol prolinu na 1 g čerstvé hmotnosti (Bates et al. 1973).



Obrázek 11 *In vitro* kultury odrůdy Fragrance v MS mediu s koncentrací 25 g.l⁻¹ (vlevo) a 5 g.l⁻¹ (vpravo) PEG 6000. Foto Dominika Dobrovolná



Obrázek 12 Spektrofotometrické stanovení absorbance. Foto Zuzana Kovalíková

2.1.8 Statistické zpracování dat

U všech analýz byla pro každou odrůdu a koncentraci PEG provedena 3 měření. Naměřené hodnoty morfologických a fyziologických parametrů byly přepočítány na procenta. Hodnoty kontrolních rostlin, pěstovaných na mediu bez přídavku PEG, představují 100%. Vyhodnocení odolnosti odrůd vůči stresu ze sucha bylo provedeno porovnáním hodnot kontrolních rostlin s hodnotami rostlin pěstovaných na mediu s přídavkem PEG o různé koncentraci.

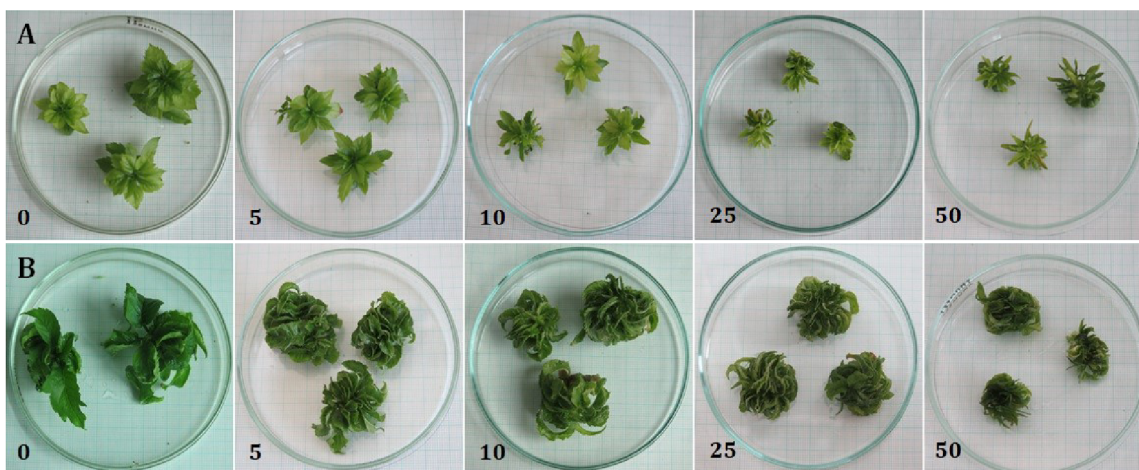
Statistické zpracování dat proběhlo s pomocí programu Statistica (Statsoft, ČR, verze 10), použita byla jednorozměrná analýza variance (Anova) s Tukeyho testem na hladině významnosti $P = 0,05$. Tabulky a grafy byly zpracovány v programu MS Excel (Microsoft, USA).

2.2 Výsledky

2.2.1 Morfologické parametry

Změny v čerstvé hmotnosti a obsahu vody

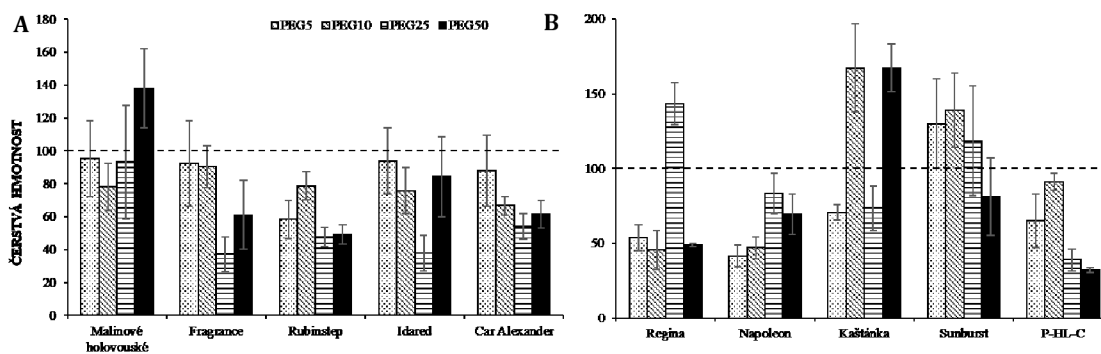
Osmotický stres navozený PEG 6000 se projevilo u obou ovocných druhů. U explantátů rostlin kultivovaných v mediu s přídatkem PEG 6000 bylo možné sledovat vadnutí rostlin a stáčení jejich listů, zastavení zvětšování listové plochy a žloutnutí nebo hnědnutí listů. Změny byly dříve pozorovány u odrůd jablek (Obrázek 13).



Obrázek 13 Vliv různých koncentrací PEG 6000 na *in vitro* kultury jablečné odrůdy 'Fragrance' (A) a třešňové odrůdy 'Sunburst' (B). Čísla značí koncentraci PEG v kultivačním mediu v g.l⁻¹. Foto Petra Jiroutová

Mezi odrůdami jablek dosáhly nejvyšší čerstvé hmotnosti při PEG0 odrůdy 'Rubinstep' a 'Car Alexander'. Nejvýraznější snížení čerstvé hmotnosti u rostlin pěstovaných na mediu s přídatkem PEG bylo zaznamenáno u odrůd 'Fragrance' a 'Idared' při PEG25 (Obrázek 14). Významnější snížení čerstvé hmotnosti bylo dále zjištěno u odrůd 'Rubinstep' při PEG25 a PEG50 a 'Car Alexander' při PEG25. Nejnižší čerstvé hmotnosti při PEG0 dosáhla odrůda 'Malinové holovouské', u které bylo současně zaznamenáno nejnižší snížení čerstvé hmotnosti. U odrůd s vyšší čerstvou hmotností při PEG0 došlo k většímu snížení čerstvé hmotnosti při stresu.

U odrůd třešní nebylo možné vzhledem ke značně proměnlivým hodnotám určit závislost čerstvé hmotnosti na rostoucí koncentraci PEG. Nejvýraznější snížení čerstvé hmotnosti u rostlin pěstovaných na mediu s přídatkem PEG bylo zaznamenáno u odrůd 'P-HL-C' při PEG50 a PEG25 a 'Napoleonova' při PEG5. Nejnižší snížení čerstvé hmotnosti bylo zjištěno u odrůd 'Sunburst' a 'Kaštánka'.



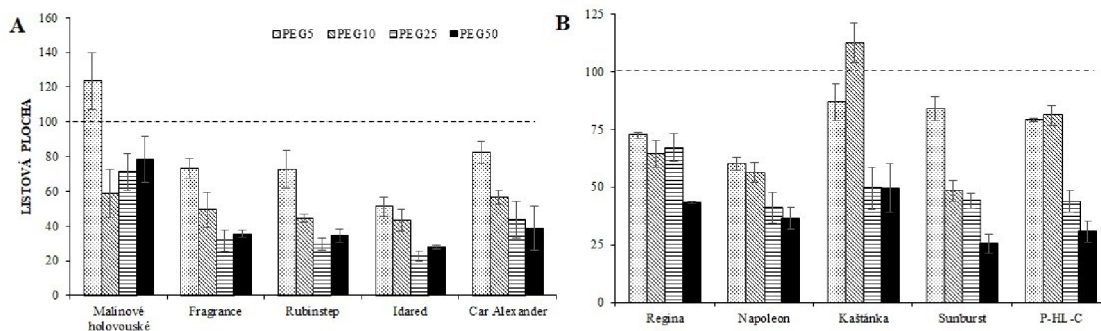
Obrázek 14 Vliv různých koncentrací PEG 6000 na čerstvou hmotnost (g) odrůd jabloní (A) a třešní (B). Naměřené hodnoty byly přepočítány na procenta. 100% představují hodnoty kontrolních rostlin při PEG0.

Pokles obsahu vody (Tabulka 3 a 4 v Příloze 2) se vzrůstající koncentrací PEG 6000 v kultivačním mediu byl pozorován u odrůd jabloní i třešní. Nejvyšší obsah vody při PEG0 byl zjištěn u jabloňových odrůd 'Car Alexander' a 'Fragrance'. U obou odrůd byl současně zaznamenán vyšší úbytek vody při PEG50. Nejvýraznější snížení obsahu vody bylo zjištěno u odrůd 'Idared' při PEG25 a 'Fragrance' při PEG50. Nejnížší snížení obsahu vody bylo zaznamenáno u odrůd 'Malinové holovouské' a 'Rubinstep'.

Mezi třešněmi měla nejvyšší obsah vody při PEG0 odrůda 'Sunburst', u které byl rovněž zaznamenán nejvyšší úbytek vody při PEG50. Nejnížší snížení obsahu vody bylo zjištěno u odrůdy Napoleonova.

Změny velikosti listové plochy

Zmenšování listové plochy se vzrůstající koncentrací PEG 6000 v kultivačním mediu bylo pozorováno u odrůd jabloní i třešní (Obrázek 15). Nejvýraznější zmenšení plochy bylo zaznamenáno při PEG25 a PEG50. U jabloňové odrůdy 'Idared' bylo při PEG25 pozorováno největší snížení listové plochy vůči kontrolní rostlině. Listová plocha se zmenšila na 22,62% (4,4-krát). U třešňové odrůdy 'Sunburst' bylo při PEG50 pozorováno největší snížení listové plochy vůči kontrolní rostlině. Listová plocha se zmenšila na 25,57% (3,9-krát). Významnější snížení listové plochy bylo dále zaznamenáno u odrůdy 'P-HL-C' při PEG50. Listová plocha odrůd třešní byla celkově větší než listová plocha odrůd jabloní. Míra zmenšování listové plochy se mezi ovocnými druhy významně nelišila. Absolutně nejmenší listovou plochu měla jabloňová odrůda 'Malinové holovouské'. Zde bylo současně zaznamenáno i nejnižší snížení listové plochy.



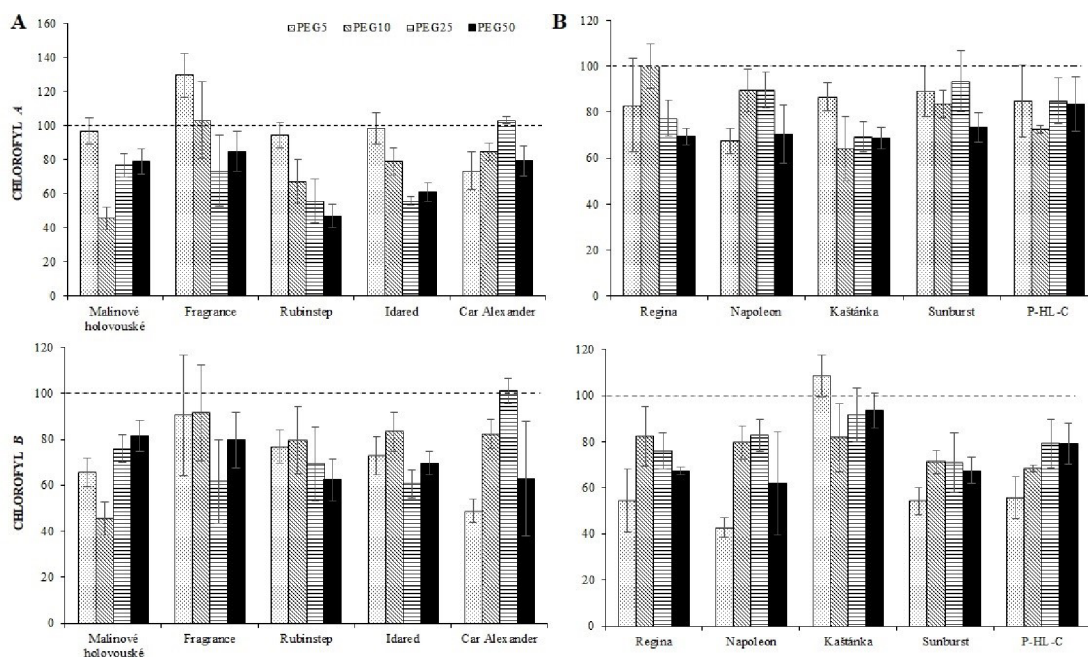
Obrázek 15 Vliv různých koncentrací PEG 6000 na velikost listové plochy (mm²) odrůd jableň (A) a třešň (B). Naměřené hodnoty byly přepočítány na procenta. 100% představují hodnoty kontrolních rostlin při PEG0.

2.2.2 Fyziologické parametry

Změny v obsahu asimilačních pigmentů

Osmotický stres navozený PEG 6000 způsobil změny koncentrací asimilačních pigmentů u odrůd jableň i třešň (Tabulka 5 a 6 v Příloze 2). U rostlin s přidavkem PEG 6000 v kultivačním mediu byl pozorován pokles obsahu chlorofylů *a* a *b* (Obrázek 16). Nejvýraznější snížení obsahu chlorofylů bylo zaznamenáno u jableňových odrůd 'Malinové holovouské' při PEG10 a 'Rubinstep' při PEG50, naopak nejnižší snížení u odrůd 'Fragrance' a 'Car Alexander'. Nejvyšší obsah chlorofylu *a* u kontrolních rostlin byl zjištěn u odrůdy 'Car Alexander', nejnižší u odrůdy 'Fragrance'. Shodné výsledky byly zjištěny u chlorofylu *b*. Míra snížení obsahu chlorofylů při stresu nezávisela na obsahu chlorofylů při PEG0.

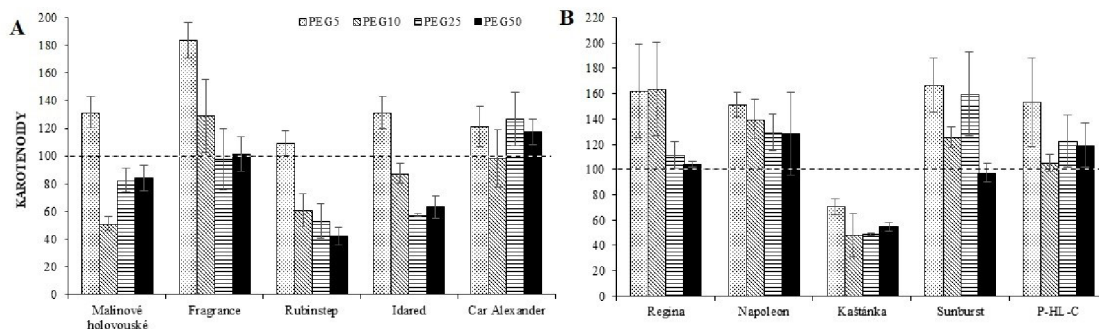
U odrůd třešň byl obsah chlorofylu *a* a *b* vyšší než u odrůd jableň. Nejvyšší obsah chlorofylu *a* u kontrolních rostlin byl zjištěn u odrůdy 'Kaštánka', naopak nejnižší u odrůdy 'P-HL-C'. Nejvýraznější snížení koncentrace chlorofylu *b* u odrůd třešň bylo zaznamenáno u explantátů pěstovaných v mediu s přidavkem PEG5. Pouze u odrůdy 'Kaštánka' byly nejnižší hodnoty chlorofylu *b* naměřeny při PEG10. Ze všech odrůd třešň bylo nejvýraznější snížení obsahu chlorofylů zjištěno u odrůdy 'Napoleonova' při PEG 5, naopak nejnižší snížení u odrůd 'P-HL-C' a 'Sunburst'.



Obrázek 16 Vliv různých koncentrací PEG 6000 na obsah chlorofylu *a* a *b* ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) u odrůd jableň (A) a třešní (B). Naměřené hodnoty byly přepočítány na procenta. 100% představují hodnoty kontrolních rostlin při PEG0.

U odrůd jableň bylo při PEG5 zaznamenáno zvýšení koncentrace karotenoidů oproti kontrolním rostlinám (Obrázek 17). S dalším zvyšováním koncentrace PEG 6000 v kultivačním mediu byl zjištěn pokles obsahu karotenoidů. Nejvýraznější pokles karotenoidů v rámci odrůd jableň byl zaznamenán u odrůdy ‘Rubinstep’ při PEG50. U stresovaných rostlin odrůdy ‘Fragrance’ nedošlo ke snížení koncentrace karotenoidů pod hodnotu kontrolních rostlin. Podobný výsledek byl zjištěn u odrůdy ‘Car Alexander’.

Jiný průběh změn koncentrací karotenoidů byl sledován u odrůd třešní, kde až na odrůdu ‘Kaštánka’ došlo u všech při koncentracích PEG5, PEG10 a PEG25 ke zvýšení obsahu karotenoidů v porovnání s kontrolními rostlinami. Významnější vzestup obsahu karotenoidů byl zaznamenán u odrůd ‘Sunburst’ a ‘Regina’. Nejvyšší hodnoty karotenoidů u kontrolních rostlin byly změřeny u odrůdy ‘Kaštánka’, u které byl současně zjištěn nejvýraznější pokles při PEG10.



Obrázek 17 Vliv různých koncentrací PEG 6000 na obsah karotenoidů (mg.g^{-1}) u odrůd jableň (A) a třešní (B). Naměřené hodnoty byly přepočítány na procenta. 100% představují hodnoty kontrolních rostlin při PEG0.

2.2.3 Biochemické parametry

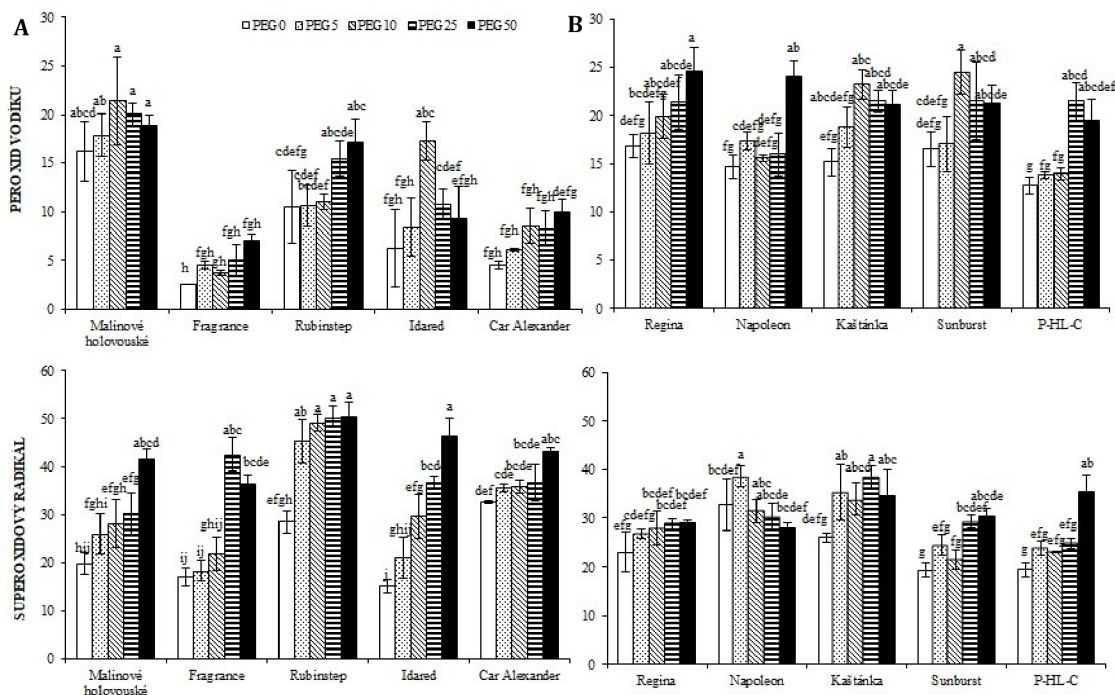
Změny v obsahu reaktivních forem kyslíku

Stres ze sucha navozený přidavkem PEG 6000 způsobil oxidační stres. Stresované rostliny produkovaly reaktivní formy kyslíku. Hodnoty H_2O_2 byly celkově vyšší u odrůd třešní (Obrázek 18). Vysoké hodnoty H_2O_2 byly zjištěny pouze u jableňové odrůdy 'Malinové holovouské'. Nejvýraznější skokové zvýšení obsahu H_2O_2 vůči kontrolní rostlině v rámci odrůd jableň bylo zaznamenáno u odrůdy 'Idared' při PEG10 (2,8-krát). Výraznější vzestup H_2O_2 byl dále zjištěn u odrůdy 'Rubinstep' při PEG50. U ostatních odrůd byly nárůsty obsahu H_2O_2 méně výrazné a pozvolné.

Mezi odrůdami třešní byl největší vzestup H_2O_2 zjištěn u odrůdy 'P-HL-C' při PEG25 (1,7-krát) a 'Napoleonova' při PEG50 (1,6-krát). U ostatních odrůd nebyly rozdíly v nárůstech významné.

Nárůst hodnot superoxidového radikálu se vzrůstající koncentrací PEG 6000 v kultivačním mediu byl pozorován u odrůd jableň i třešní. U všech jableňových odrůd, s výjimkou odrůdy 'Fragrance', byly nejvyšší hodnoty superoxidového radikálu pozorovány při PEG50. Pro odrůdu 'Fragrance' byly naměřeny nejvyšší hodnoty při PEG25. Největší zvýšení obsahu superoxidového radikálu bylo zaznamenáno u odrůdy 'Idared' při PEG50 (3,1-krát). Nejvyšší celkový vzestup obsahu v rámci odrůd jableň byl zaznamenán u odrůdy 'Rubinstep', naopak nejnižší vzestup u odrůdy 'Car Alexander'.

Mezi odrůdami třešní byl největší nárůst superoxidového radikálu zjištěn u odrůdy 'P-HL-C' při PEG50. Překvapivé výsledky byly zaznamenány u odrůdy 'Napoleonova', u které došlo při PEG10, PEG25 a PEG50 ke snížení obsahu superoxidového radikálu oproti kontrolní rostlině.

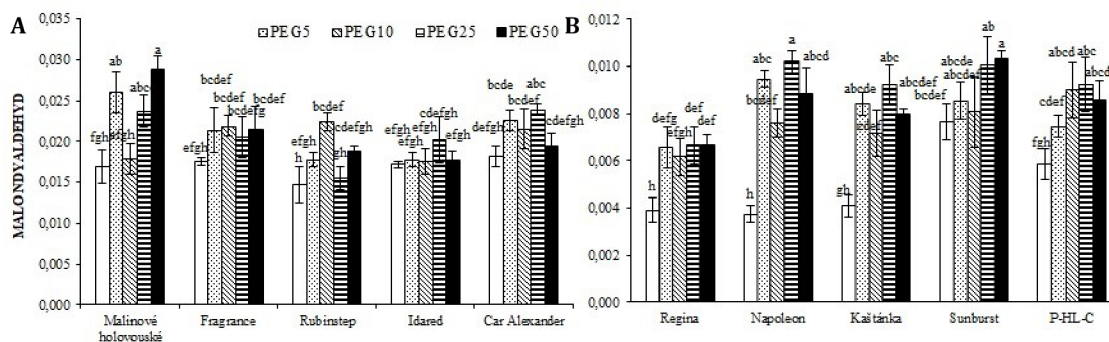


Obrázek 18 Vliv různých koncentrací PEG 6000 na obsah peroxidu vodíku ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ na 1 g čerstvé hmotnosti) a superoxidového radikálu (μg radikálu na 1 g čerstvé hmotnosti) u odrůd jableň (A) a třešň (B).

Změny v obsahu malondialdehydu (MDA)

Zvýšené hodnoty ROS způsobily peroxidaci buněčných membrán a produkci MDA. Hodnoty MDA byly celkově vyšší u odrůd jableň (Obrázek 19). Kontrolní rostliny odrůd jableň se v obsahu MDA významně nelišily. Nejvyšší zvýšení obsahu MDA bylo zaznamenáno u jableňové odrůdy 'Malinové holovouské' při PEG50. Nejnižší celkový nárůst obsahu MDA v rámci odrůd jableň byl zaznamenán u odrůdy 'Idared'.

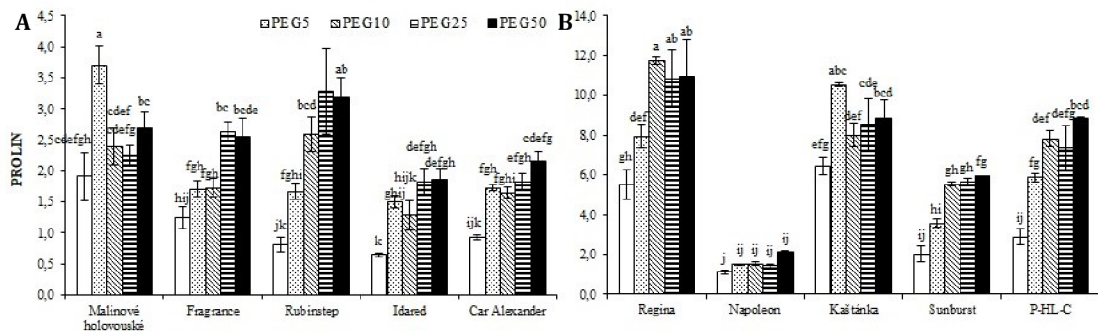
U odrůd třešň bylo nejvýraznější zvýšení koncentrace MDA zjištěno u odrůd 'Napoleonova' a 'Kaštánka' při PEG25. Nejnižší celkový nárůst obsahu MDA v rámci odrůd třešň byl zaznamenán u odrůdy 'Sunburst'.



Obrázek 19 Vliv různých koncentrací PEG 6000 na obsah malondialdehydu ($\mu\text{mol MDA}$ na 1 g čerstvé hmotnosti) u odrůd jableň (A) a třešň (B).

Změny v obsahu prolinu

Stres ze sucha navozený přídávkem PEG 6000 způsobil změny koncentrací prolinu u odrůd jableň a třešň. Hodnoty prolinu byly celkově vyšší u odrůd třešň (Obrázek 20). U odrůd jableň byly zjištny vyšší hodnoty pouze u odrůdy 'Malinové holovouské'. Nejvyšší zvýšení obsahu prolinu bylo zaznamenáno u jableňové odrůdy 'Rubinstep' při PEG25 (4,1-krát) a PEG50 (3,9-krát). U odrůd třešň bylo nejvýraznější zvýšení koncentrace prolinu pozorováno u odrůd 'P-HL-C' (3,0-krát) a 'Regina' (2,1-krát).



Obrázek 20 Vliv různých koncentrací PEG 6000 na obsah prolinu (μmol prolinu na 1 g čerstvé hmotnosti) u odrůd jableň (A) a třešň (B).

3 DISKUSE

V důsledku klimatických změn dochází k nárůstu globální průměrné teploty, k častějšímu výskytu extrémních jevů počasí, k posunu vegetačních pásem a ke změnám ročních období (Ritchie et Roser 2017). Klimatické modely do budoucna předpovídají častější výskyt období sucha (IPCC 2018). Sucho představuje pro rostlinnou produkci závažný problém. Ze všech zdrojů nezbytných pro růst a metabolismus rostlin je voda považována za nejvíce limitující faktor (Šircelj et al. 2007; Bhusal et al. 2019; Zhong et al. 2018). Celosvětová populace se navíc rychle rozrůstá. Pro zabezpečení dostatečného množství potravin bude nutné přijmout opatření, která nepříznivý vývoj klimatu a jeho důsledků na zemědělskou produkci zvrátí. Pěstování rostlinných odrůd odolných vůči abiotickému a biotickému stresu je možným řešením.

V bakalářské práci byla hodnocena odolnost vybraných odrůd jabloní a třešní vůči stresu ze sucha. Stres byl navozen přidáním polyethylenglykolu (PEG) do kultivačních médií podobně jako v dřívějších studiích s jablky a hruškami (Gharbia et al. 2013) nebo s kiwi (Zhong et al. 2018). Následně byly u rostlin hodnoceny morfologické, fyziologické a biochemické parametry, u kterých se předpokládalo, že prokáží odolnost, nebo citlivost rostlin vůči stresu ze sucha.

U rostlin pěstovaných na médiu s přídatkem PEG bylo pozorováno vadnutí rostlin, stáčení jejich listů, zastavení zvětšování listové plochy a žloutnutí nebo hnědnutí listů. Podobně jako ve studiích vodního stresu s pistáciemi (Khoyerdí et al. 2016) nebo s kiwi (Zhong et al. 2018) míra poškození korelovala se vzrůstající koncentrací PEG v kultivačních médiích. Rostliny dále reagovaly na stres z nedostatku vody snížením produkce čerstvé a suché hmoty (Farooq et al. 2009; Bolat et al. 2015). Odolnější odrůdy vykazovaly menší pokles čerstvé a suché hmotnosti, obsahu vody a listové plochy.

Vodní stres navozený PEG způsobil změny koncentrací asimilačních pigmentů u odrůd jabloní i třešní. U rostlin s přídatkem PEG v kultivačním mediu byl pozorován pokles obsahu chlorofylů *a* a *b* oproti kontrolním rostlinám. Úbytek chlorofylů se projevil žloutnutím nebo hnědnutím listů. Shodný výsledek byl potvrzen ve studiích s odrůdami meruněk a švestek (Bolat et al. 2015) a s podnožemi ořešáků (Liu et al. 2019). Příčinou poklesu obsahu chlorofylů u stresovaných rostlin je poškození chloroplastů způsobené vyšším obsahem ROS. ROS vznikají v tylakoidních membránách chloroplastů během primárních pochodů fotosyntézy. Snížením obsahu chlorofylů v listech rostliny absorbují menší množství fotonů, a sníží tak produkci ROS (Khoyerdí et al. 2016). Podobně jako ve studii Šircelj et al. (2007) došlo u odrůd jabloní při mírném stresu ke zvýšení obsahu karotenoidů, které mimo jiné představují důležité neenzymatické antioxidanty. S dalším zvyšováním koncentrace PEG v kultivačních médiích obsah karotenoidů klesal. Jiný průběh změn koncentrací karotenoidů byl sledován

u odrůd třešní, kde až na odrůdu 'Kaštánka' došlo u všech při koncentracích PEG5, PEG10 a PEG25 ke zvýšení obsahu karotenoidů v porovnání s kontrolními rostlinami.

Stresované rostliny produkovaly větší množství ROS. ROS působí negativně na rostlinné buňky. Poškozují především lipidy, proteiny a nukleové kyseliny a urychlují stárnutí buněk (Khoyardi et al. 2016). Podobně jako ve studii s jabloňovými podnožemi (Wang et al. 2012) bylo u odrůd jabloní i třešní zjištěno zvýšení peroxidu vodíku a superoxidového radikálu. Zvýšené hodnoty ROS u stresovaných rostlin způsobují peroxidaci buněčných membrán a produkci MDA (Zhong et al. 2018). Podobně jako ve studiích s banány (Bidabadi et al. 2012) a s pistáciemi (Khoyardi et al. 2016) byl u stresovaných odrůd jabloní a třešní zaznamenán nárůst obsahu MDA. V reakci na vodní stres rostliny ve větší míře produkují a akumulují osmoticky aktivní látky (Procházka et al. 1998, Rahayu et al. 2015). Významnou osmoticky aktivní látkou akumulovanou rostlinami je prolin. U stresovaných odrůd jabloní a třešní byl zaznamenán nárůst obsahu prolinu. Shodný výsledek byl potvrzen ve studiích s odrůdami banánů (Bidabadi et al. 2012), meruněk a švestek (Bolat et al. 2015) a pistácií (Khoyardi et al. 2016).

Z jabloňových odrůd byla určena potenciálně nejvíce odolná vůči stresu ze sucha odrůda 'Malinové holovouské'. U odrůdy sice bylo zaznamenáno v porovnání s ostatními odrůdami výrazné snížení obsahu chlorofylů a vysoké hodnoty H_2O_2 . Nárůst H_2O_2 nebyl skokový. V morfologických parametrech, které charakterizují celkový stav rostliny, ale dosáhla odrůda 'Malinové holovouské' nejlepších výsledků. U odrůdy bylo zaznamenáno nejnižší snížení čerstvé hmotnosti, obsahu vody a listové plochy. Navíc pouze u odrůdy 'Malinové holovouské' byly zjištěny vyšší hodnoty prolinu, který je důležitou součástí antioxidantního systému rostlin. V tomto ohledu se výsledky práce neshodují s dříve publikovanou charakteristikou odrůdy, která považuje odrůdu 'Malinové holovouské' za málo odolnou vůči suchu (Archiv starých odrůd ovoce 2016). Odrůdou potenciálně nejméně odolnou vůči stresu ze sucha byla určena odrůda 'Idared'. V morfologických parametrech dosáhla nejhorších výsledků ze všech odrůd jabloní. U odrůdy bylo zaznamenáno nejvýraznější snížení čerstvé hmotnosti, obsahu vody a listové plochy vůči kontrolní rostlině. U odrůdy bylo dále zjištěno nejvýraznější skokové zvýšení obsahu H_2O_2 vůči kontrolní rostlině a největší zvýšení obsahu superoxidového radikálu. Tyto parametry signalizují vysokou míru oxidativního poškození.

Mezi odrůdami třešní byla určena potenciálně nejvíce odolná vůči stresu ze sucha odrůda 'Kaštánka'. Přestože u odrůdy došlo v porovnání s ostatními odrůdami k výraznému poklesu karotenoidů a významnému zvýšení koncentrace MDA, dosáhla odrůda nejlepších výsledků v morfologických parametrech. U odrůdy bylo zjištěno nejnižší snížení čerstvé hmotnosti a listové plochy. Hodnoty prolinu byly vyšší. Výsledky práce se shodují s dříve publikovanou charakteristikou odrůdy, která považuje odrůdu 'Kaštánka' za tolerantní vůči suchu (Archiv starých odrůd

ovoce 2016). Odrůda 'P-HL-C' byla určena odrůdou potenciálně nejméně odolnou vůči stresu ze sucha. Ačkoli bylo u odrůdy zjištěno nejnižší snížení obsahu chlorofylů a nejvýraznější zvýšení koncentrace prolinu mezi odrůdami třešní, výsledky morfologických parametrů naznačovaly nízkou toleranci vůči suchu. U odrůdy 'P-HL-C' bylo zaznamenáno nejvýraznější snížení čerstvé hmotnosti a významnější snížení listové plochy. U odrůdy byl dále zjištěn největší vzestup H_2O_2 a superoxidového radikálu. V tomto ohledu se výsledky práce částečně rozcházejí s dříve publikovanou charakteristikou odrůdy, která popisuje odrůdu jako mírně citlivou vůči suchu (Blažková 2004).

V charakteristikách odrůd jabloní a třešní byla zmiňována odolnost rostlin vůči mrazu. V obranných mechanismech rostlin vůči stresu z mrazu a sucha lze totiž nalézt mnoho společného. Poškození rostlin mrazem souvisí s tvorbou ledu a mrazovou dehydratací buněk. Led se zpočátku tvoří v mezibuněčných prostorech, při delším trvání mrazu se mohou krystalky ledu vytvářet také v buňkách. Nezbytná je přítomnost krystalizačních jader. Syntézou osmoticky aktivních látek rostliny snižují bod tuhnutí. Voda začíná v mezibuněčných prostorech mrznout při teplotě -1 až -3 °C. Mráz způsobuje nevratné poškození buněk. Rostlinné buňky jsou silně dehydratovány a dochází k poškození buněčných stěn a membrán. Mrazuvzdornost je schopnost zabránit vzniku ledu uvnitř buněk a snášet dehydrataci buněk (Procházka et al. 1998). Tato souvislost byla potvrzena u jabloňových odrůd. Odrůda 'Malinové holovouské' byla popisována jako velmi odolná mrazu (Říha 1919; Boček et al. 2008). Odrůda byla určena jako potenciálně odolná vůči stresu ze sucha. Odrůda 'Idared' je citlivá na zimní mrazy (Kutina et Holeček 1992; VŠÚO Holovousy 2019). Odrůda byla ze všech testovaných jabloňových odrůd nejméně tolerantní vůči suchu.

Mezi odrůdami třešní je možné pozorovat rozdíly v odolnosti vůči praskání. Rozdíly jsou dány genetickou výbavou odrůd. Míru tendence k praskání ovlivňuje velikost a tvar plodů, tloušťka kutikuly, obsah cukrů a podmínky pěstování (vlhkost, teplota). V odolnosti rostlin vůči suchu hraje schopnost akumulovat osmoticky aktivní látky také významnou roli (Khadivi-Khub 2015). Vztah odolnosti vůči praskání a stresu ze sucha byl potvrzen u odrůdy 'Kaštánka'. Plody 'Kaštánky' jsou odolné praskání (VŠÚO Holovousy 2019). Odrůda byla určena jako potenciálně odolná vůči stresu ze sucha.

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo vyhodnotit vybrané morfologické (čerstvost a suchá hmotnost, obsah vody, plocha listů), fyziologické (obsah chlorofylů a karotenoidů) a biochemické parametry (reaktivní formy kyslíku, obsah MDA a prolinu) u vybraných 5 odrůd jablek ('Malinové holovouské', 'Fragrance', 'Rubinstep', 'Idared', 'Car Alexander') a 5 odrůd třešní ('Regina', 'Napoleonova', 'Kaštánka', 'Sunburst', 'P-HL-C'), převedených do *in vitro* kultur, u kterých byl navozen osmotický stres přidáním polyethylenglykolu (PEG) do kultivačních médií.

Osmotický stres navozený PEG 6000 se projevil u obou ovocných druhů. U explantátů rostlin kultivovaných v mediu s přídavkem PEG byl pozorován pokles obsahu vody, který se projevil vadnutím rostlin a stáčením jejich listů. U stresovaných rostlin došlo k zastavení zvětšování listové plochy. Míra zmenšování listové plochy se mezi ovocnými druhy významně nelišila. U stresovaných explantátů bylo dále sledováno žloutnutí nebo hnědnutí listů.

Stres ze sucha způsobil změny koncentrací asimilačních pigmentů u odrůd jablek i třešní. U rostlin s přídavkem PEG 6000 v kultivačním mediu byl pozorován pokles obsahu chlorofylů *a* a *b*. U odrůd jablek bylo při PEG5 zaznamenáno zvýšení koncentrace karotenoidů oproti kontrolním rostlinám. S dalším zvyšováním koncentrace PEG 6000 v kultivačním mediu byl zjištěn pokles obsahu karotenoidů. Jiný průběh změn koncentrací karotenoidů byl sledován u odrůd třešní, kde u všech odrůd s výjimkou odrůdy 'Kaštánka' došlo při koncentracích PEG5, PEG10 a PEG25 ke zvýšení obsahu karotenoidů v porovnání s kontrolními rostlinami.

Osmotický stres navozený přídavkem PEG způsobil oxidační stres. Zvýšené hodnoty ROS u stresovaných rostlin způsobily peroxidaci buněčných membrán a produkci MDA. Hodnoty MDA byly celkově vyšší u odrůd jablek. Stres ze sucha dále způsobil změny koncentrací prolinu u odrůd jablek a třešní. Hodnoty prolinu byly celkově vyšší u odrůd třešní.

Na základě výsledků hodnocení morfologických, fyziologických a biochemických parametrů byly určeny odrůdy potenciálně odolné vůči stresu ze sucha. Výsledky analýz jsou shrnuty v Tabulce 1. Pořadí ovocných odrůd bylo odhadnuto následovně: odrůdy jablek 'Malinové holovouské' > 'Car Alexander' > 'Fragrance' > 'Rubinstep' > 'Idared' a odrůdy třešní 'Kaštánka' > 'Regina' > 'Napoleonova' > 'Sunburst' > 'P-HL-C'.

Výsledky jsou však předběžné. Pro lepší charakteristiku odrůd z hlediska odolnosti vůči stresu ze sucha bude v budoucnosti nezbytné provést další analýzy zaměřené na stanovení obsahu antioxidantních enzymů, stresových hormonů a osmoticky aktivních látek.

Tabulka 1 Odolnost odrůd jableň a třešň vůči stresu ze sucha

Druh ovoce	Odrůda	Čerstvá hmotnost	Obsah vody	Listová plocha	Chlorofyl <i>a + b</i>	Karotenoidy	Peroxid vodíku	Superoxidový radikál	MDA	Prolin	Odolnost suchu
Jabloň	'Malinové holovouské'	✓	✓	✓	x				x		✓
	'Fragrance'	x	x		✓	✓	✓				
	'Rubinstep'		✓		x	x	✓	x		✓	
	'Idared'	x	x	x			x	x	✓		x
	'Car Alexander'				✓	✓		✓			✓
Třešeň	'Regina'					✓	x			✓	
	'Napoleonova'	x	✓		x		✓	✓	x		
	'Kaštánka'	✓		✓		x	x		x		✓
	'Sunburst'	✓	x	x	✓	✓	x		✓		
	'P-HL-C'	x		x	✓			x		✓	x

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Bates, L. S.; Waldren, R. P.; Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*. 39: 205–207. DOI: 10.1007/BF00018060.
2. Bhusal, N.; Han, S.; Yoon, T. (2019). Impact of drought stress on photosynthetic response, leaf water potential, and stem sap flow in two cultivars of bi-leader apple trees (*Malus × domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*. 246: 535-543. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.11.021.
3. Bidabadi, S. S.; Meon, S.; Wahab, Z.; Subramaniam, S.; Mahmood, M. (2012). In vitro selection and characterization of water stress tolerant lines among ethyl methanesulphonate (EMS) induced variants of banana (*Musa* spp., with AAA genome). *Australian Journal of Crop Science*. 6(3): 567-575. ISSN:1835-2707.
4. Blažek, J. 2001. Odrůda jabloně Rubinstep. *Vědecké práce ovocnářské*. 17: 163–165. ISSN 0231-6900.
5. Blažková, J. (2004). Resistance to abiotic and biotic stressors in sweet cherry rootstocks and cultivars from The Czech Republic. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 12: 303-311.
6. Boček, S. 2008. *Ovocné dřeviny v krajině. Sborník přednášek a seminárních prací*. Hostětín. 185 s. ISBN: 978-80-904109-2-3.
7. Bolat, I.; Dikilitas, M.; Ikinici, A.; Ercisli, S.; Tonkaz, T. 2015. Morphological, physiological, biochemical characteristics and bud success responses of myrobolan 29 c plum rootstock subjected to water stress. *Canadian Journal of Plant Science*. 96(3): 485-493. DOI: 10.1139/cjps-2015-0260.
8. Brázdil, R.; Trnka, M. 2015. *Historie počasí a podnebí v českých zemích XI: Sucho v českých zemích: minulost, současnost a budoucnost*. Brno: Centrum výzkumu globální změny Akademie věd České republiky, v. v. i. 402 s. ISBN 978-80-87902-11-0.
9. Český statistický úřad. 2011. *Agrocensus 2010 regiony - Strukturální šetření v zemědělství a metody zemědělské výroby - 2010*. [online]. [cit. 2020-09-01]. Dostupné z: https://www.czso.cz/csu/czso/2129-11-n_2011-10
10. Český svaz ochránců přírody. 2016. *Archiv starých odrůd ovoce*. 2016. [databáze online]. [cit. 2021-03-14]. <http://www.plantsdata.com/Webovoce.aspx>
11. Dučaiová, Z.; Sajko, M.; Mihaličová, S.; Repčák, M. (2016). Dynamics of accumulation of coumarin-related compounds in leaves of *Matricaria chamomilla* after methyl jasmonate elicitation. *Plant Growth Regulation*. 79: 81–94. DOI: 10.1007/s10725-015-0114-2.

12. Farooq, M.; Wahid, A.; Kobayashi, N.; Fujita, D.; Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*. 29(1): 185-212. DOI: 10.1051/agro:2008021.
13. Gharbia, D.; Diaa, I.; Belan, K. (2013). In vitro Drought Tolerant of Rootstock Apple (*Malus domestica* Borkh.) and Pear (*Pyrus calleryana*). *Journal of Zankoy Sulaimani - Part A*. 16: 109-116. DOI: 10.17656/jzs.10314.
14. Godfray, H. C. J.; Beddington, J. R.; Crute, I. R.; Haddad, L.; Lawrence, D.; Muir, J. F.; Pretty, J.; Robinson, S.; Thomas, S. M.; Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*. 327: 812-818. DOI: 10.1126/science.1185383.
15. IPCC. 2018. Global Warming of 1.5 °C.° [online]. [cit. 2020-10-30] Dostupné z: <https://www.ipcc.ch/sr15/>
16. Jaleel, C. A.; Manivannan, P.; Wahid, A.; Farooq, M.; Al-Juburi, H. J.; Somasurdaram, R.; Panneerselvam, R. (2009). Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *International Journal of Agriculture and Biology*. 11: 100-105. ISSN Print: 1560-8530.
17. Kamenický, K. 1941. Atlas tržních odrůd ovocných. Praha: Československá grafická unie. 123 s. Dostupné z: <https://www.webycsop.cz/stareodrudy/wp-content/uploads/sites/2/2016/04/kamenicky-karel-atlas-trznich-odrud-ovocnych-1.pdf>
18. Khadivi-Khub, A. 2015. Physiological and genetic factors influencing fruit cracking. *Acta Physiologiae Plantarum*. 37(1): 1718-1732. DOI: 10.1007/s11738-014-1718-2.
19. Khojerdi, F. F.; Shamshiri, M. H.; Estaji, A. (2016). Changes in some physiological and osmotic parameters of several pistachio genotypes under drought stress. *Scientia Horticulturae*. 198: 44-51. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.11.028 0304-4238.
20. Kincl, M.; Krpeš, V. 2000. *Základy fyziologie rostlin*. Ostrava: Montanex, a. s. 221 s. ISBN 80-7225-041-8.
21. Kolektiv autorů VŠÚO Holovousy. 2007. *Nové odrůdy ovoce: New cultivars of fruit*. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský. 91 s. ISBN 978-80-87030-04-2.
22. Kosová, K.; Vítámvás, P.; Prášil, I. T.; Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*. 74(8): 1301-1322. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.02.006.
23. Kovalčková, Z.; Jiroutová, P.; Toman, J.; Dobrovolná, D.; Drbohlavová, L. (2020). Physiological Responses of Apple and Cherry In Vitro Culture under Different Levels of Drought Stress. *Agronomy*. 10: 1689. DOI: 10.3390/agronomy10111689.

24. Kutina, J.; Dvorský, P.; Vanek, G.; Suchardová, M. 1991. Pomologický Atlas 1. Praha: Brázda. 287 s. ISBN 80-209-0089-6.
25. Kutina, J.; Holeček, S. 1992. Pomologický Atlas 2. Praha: Brázda. 300 s. ISBN 978-80-209-0192-7.
26. Lane, W. D.; Schmid, H. (1984). Lapins and Sunburst sweet cherry. Canadian Journal of Plant Science. 64(1): 211-214. DOI: 10.4141/cjps84-029.
27. Liu, B.; Liang, J.; Tang, G.; Wang, X.; Liu, F.; Zhao, D. (2019). Drought stress affects on growth, water use efficiency, gas exchange and chlorophyll fluorescence of Juglans rootstocks. Scientia Horticulturae. 250: 230–235. DOI: 10.1016/j.scienta.2019.02.056.
28. Masoabi, M.; Lloyd, J.; Kossmann, J.; Vyver, C. (2018). Ethyl Methanesulfonate Mutagenesis and In Vitro Polyethylene Glycol Selection for Drought Tolerance in Sugarcane (*Saccharum* spp.). Sugar Tech. 20: 50–59. DOI: 10.1007/s12355-017-0524-8.
29. Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 15: 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
30. Pavlová, L. 2006. Fyziologie rostlin. Praha: Karolinum. 254 s. ISBN 80-246-0985-1.
31. Per, T. S.; Khan, N. A.; Reddy P. S.; Masood, A.; Hasanuzzaman, M.; Khan, M. I. R.; Anjum, N. A. (2017). Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. Plant Physiology and Biochemistry. 115: 126-140. DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.03.018.
32. Procházka, S.; Macháčková, I.; Krekule, J.; Šebánek, J. 1998. Fyziologie rostlin. Praha: Academia. 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
33. Rahayu, E.; Sudarsono, S. (2015). In-vitro selection of drought tolerant peanut embryogenic calli on medium containing polyethylene glycol and regeneration of drought tolerant plants. Emirates Journal of Food and Agriculture. 27(6): 475-487. DOI: 10.9755/ejfa.2015.04.062.
34. Říha, J. 1919. České Ovoce–díl III. Jablka. Praha: Československá pomologická společnost. 248 s. Dostupné z: <https://kramerius5.nkp.cz/uuid/uuid:65eeced0-2c2c-11e4-8e0d-005056827e51>
35. ŘÍHA, J. 1937. České ovoce III. Jablka 2. nezměněné vyd. Praha: Československá grafická unie. 1. část, s. 1–150. Dostupné z: <https://www.weby-csop.cz/stareodrudy/wp-content/uploads/sites/2/2016/04/riha-jan-ceske-ovoce-iii-jablka-1cast-str1-150.pdf>
36. Slováková, L.; Mistrík, I. 2007. Fyziologické procesy rastlín. Bratislava: Vydavateľstvo UK. 238 s. ISBN 978-80-223-2322-2.

37. Šircelj, H.; Tausz, M.; Grill, D.; Batič, F. (2007). Detecting different levels of drought stress in apple trees (*Malus domestica* Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters. *Scientia Horticulturae*. 113: 362-369. DOI: 10.1016/j.scienta.2007.04.012.
38. Taiz, L.; Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*, 4th Edition. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. 700 s. ISBN 978-0878938568.
39. Tester, M.; Langridge, P. (2010). Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World. *Science*. 327(5967): 818–822. DOI:10.1126/science.1183700.
40. Vaněk, J. 1936. Lidová pomologie I. Jablka 100 nejdůležitějších odrůd. Chrudim: Nakladatelství zahradnické literatury Josef Vaněk. 111 s. Dostupné z: <https://www.weby-csop.cz/stareodrudy/wp-content/uploads/sites/2/2016/03/vanek-josef-lidova-pomologie-i-jablka-100-nejdulezitejsich-odrud.pdf>
41. Vaněk, J. 1938. Lidová pomologie IV. Třešně a višně 100 nejdůležitějších odrůd. Chrudim: Nakladatelství zahradnické literatury Josef Vaněk. 118 s. Dostupné z: <https://www.weby-csop.cz/stareodrudy/wp-content/uploads/sites/2/2016/03/vanek-josef-lidova-pomologie-iv-tresne-a-visne-100-nejdulezitejsich-odrud.pdf>
42. Vendruscolo, E. C. G.; Schuster, I.; Pileggic, M.; Scapim, C. A.; Molinari, H. B. C.; Morur, C. J.; Viera, L. G. E. (2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology*. 164: 1367–1376. DOI: 10.1016/j.jplph.2007.05.001.
43. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. 2019. Odborná zpráva o postupu prací a dosažených výsledcích za rok 2019; popisy odrůd VŠÚO Holovousy [online]. [cit. 2021-01-25]. Dostupné z: <https://www.vsu.cz/de/ovocnarska-produkce-a-prodej/stromky-a-kere-prostokorenne-i-kontejnerovane>
44. Wang, Z.; Li, G.; Sun, H.; Ma, L.; Guo, Y.; Zhao, Z.; Gao, H.; Mei, L. (2018). Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biology Open*. 7(11): bio035279 DOI: 10.1242/bio.035279.
45. Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophyll *a* and *b*, as well as total Carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolutions. *Journal of Plant Physiology*. 144: 307–313. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2.
46. Wilhite, D. A. 2005. *Drought and water crises: science, technology, and management issues*. Boca Raton: CRC Press. 432 s. ISBN 9781420028386.
47. Wociór, S. (2008). The effect of rootstock on the growth and yielding of 'Regina' cherry trees. *Folia Horticulturae*. 20(1): 15–22. DOI: 10.2478/fhort-2013-0102.

48. Young, A. J.; Lowe, G. L. (2018). Carotenoids-Antioxidant Properties. *Antioxidants*. 7(2): 28. DOI:10.3390/antiox7020028.
49. Zhong, Y.; Li, Z.; Bai, D.; Qi, X.; Chen, J.; Wei, C.; Lin, M.; Fang, J. (2018). In Vitro Variation of Drought Tolerance in Five Actinidia Species., *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 143(3): 226-234. DOI: 10.21273/JASHS04399-18.

PŘÍLOHY

1. Příloha 1 Složení základního pevného Murashige & Skoog (MS) media pro kultivaci *in vitro* kultur (Murashige et Skoog 1962). s. 18
2. Příloha 2 Vliv různé koncentrace PEG 6000 na vybrané morfologické a fyziologické parametry (Kovalíková et al. 2020). s. 25, 26
3. Příloha 3 Physiological Responses of Apple and Cherry In Vitro Culture under Different Levels of Drought Stress (Kovalíková et al. 2020).

Tabulka 2 Složení základního pevného Murashige & Skoog (MS) media pro kultivaci *in vitro* kultur (Murashige et Skoog 1962).

Složka	mg.l⁻¹	Složka	mg.l⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
KNO ₃	1900	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,3
H ₃ BO ₃	6,2	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8
KH ₂ PO ₄	170	Thiamin	0,1
KI	0,83	Pyridoxin	0,5
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	Kyselina nikotinová	0,5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	Glycin	2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	Sacharóza	30000
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	Myo-inositol	100
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	Agar	7000
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	pH	5,8

Tabulka 3 Vliv různé koncentrace PEG 6000 na čerstvou hmotnost, obsah vody a listovou plochu u *in vitro* kultur 5 odrůd jableň. Data znamenají \pm SDs ($n = 3$). Hodnoty ve sloupci se stejným písmenem (písmeny) se podle Tukeyova testu významně neliší ($P < 0,05$) (Kovalíková et al. 2020).

Odrůda	Koncentrace PEG ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Čerstvá hmotnost (g)	Hmotnost sušiny (g)	Obsah vody (%)	Listová plocha (mm^2)
<i>Malinové Holovouské</i>	0	0.29 \pm 0.01 cdef	0.11 \pm 0.04 ab	85.91 \pm 1.11 defghi	214.6 \pm 10.6 ghi
	5	0.28 \pm 0.07 def	0.12 \pm 0.01 ab	84.88 \pm 1.06 efghij	264.9 \pm 35.0 fghi
	10	0.23 \pm 0.04 ef	0.12 \pm 0.01 ab	83.49 \pm 0.56 ijk	126.4 \pm 29.5 i
	25	0.27 \pm 0.10 def	0.14 \pm 0.03 ab	83.03 \pm 0.22 jklm	152.8 \pm 22.7 i
	50	0.40 \pm 0.07 abcdef	0.14 \pm 0.01 ab	81.24 \pm 1.07 klm	167.6 \pm 28.3 hi
<i>Fragrance</i>	0	0.45 \pm 0.08 abcde	0.11 \pm 0.03 ab	89.95 \pm 0.41 ab	720.0 \pm 90.8 b
	5	0.41 \pm 0.12 abcdef	0.16 \pm 0.02 ab	87.23 \pm 0.73 cdef	527.4 \pm 42.1 cd
	10	0.40 \pm 0.06 abcdef	0.10 \pm 0.001 b	86.75 \pm 0.63 cdefg	356.5 \pm 71.6 efg
	25	0.17 \pm 0.05f	0.11 \pm 0.01 ab	83.17 \pm 0.93 jklm	227.7 \pm 43.3 ghi
	50	0.27 \pm 0.09 def	0.14 \pm 0.02 ab	82.94 \pm 1.27 jklm	254.7 \pm 14.1 fghi
<i>Rubinstep</i>	0	0.60 \pm 0.15 a	0.16 \pm 0.01 ab	88.59 \pm 0.73 abcd	451.9 \pm 87.0 de
	5	0.35 \pm 0.07 abcdef	0.19 \pm 0.02 a	88.48 \pm 0.59 abcd	327.6 \pm 49.2 efgh
	10	0.47 \pm 0.05 abcde	0.16 \pm 0.02 ab	87.30 \pm 0.39 bcde	201.3 \pm 11.3 ghi
	25	0.29 \pm 0.04 cdef	0.16 \pm 0.01 ab	84.01 \pm 0.73 hij	134.0 \pm 16.2 i
	50	0.30 \pm 0.04 cdef	0.14 \pm 0.01 ab	84.22 \pm 0.62 ghij	156.4 \pm 17.2 i
<i>Idared</i>	0	0.55 \pm 0.17 abc	0.17 \pm 0.04 ab	87.62 \pm 0.98 abcd	952.1 \pm 110.5 a
	5	0.52 \pm 0.11 abcd	0.16 \pm 0.01 ab	87.93 \pm 0.56 cdef	487.9 \pm 52.7 cde
	10	0.42 \pm 0.08 abcdef	0.18 \pm 0.03 a	83.55 \pm 1.24 ijk	412.0 \pm 59.7 def
	25	0.21 \pm 0.06 ef	0.11 \pm 0.02 ab	80.47 \pm 1.28 m	215.4 \pm 26.7 ghi
	50	0.47 \pm 0.13 abcde	0.19 \pm 0.04 a	80.56 \pm 1.17 lm	265.8 \pm 11.7 fghi
<i>CAR Alexander</i>	0	0.58 \pm 0.09 ab	0.16 \pm 0.04 ab	90.02 \pm 0.73 a	634.2 \pm 26.2 bc
	5	0.51 \pm 0.13 abcd	0.19 \pm 0.06 a	88.61 \pm 1.07 abc	521.9 \pm 38.9 cd
	10	0.39 \pm 0.03 abcdef	0.14 \pm 0.01 ab	86.41 \pm 0.85 cdefgh	358.8 \pm 26.9 efg
	25	0.31 \pm 0.05 bcdef	0.13 \pm 0.02 ab	86.62 \pm 0.51 cdefgh	278.2 \pm 67.7 fghi
	50	0.36 \pm 0.05 abcdef	0.15 \pm 0.01 ab	84.54 \pm 0.62 fghij	245.0 \pm 80.5 ghi

Tabulka 4 Vliv různé koncentrace PEG 6000 na čerstvou hmotnost, obsah vody a listovou plochu u *in vitro* kultur 5 odrůd třešní. Data znamenají ± SDs (n = 3). Hodnoty ve sloupci se stejným písmenem (písmeny) se podle Tukeyova testu významně neliší (P <0,05) (Kovalíková et al. 2020).

Odrůda	Koncentrace PEG (g·l ⁻¹)	Čerstvá hmotnost (g)	Hmotnost sušiny (g)	Obsah vody (%)	Listová plocha (mm ²)
<i>Regina</i>	0	1.32±0.14 bc	0.16±0.003 bcd	88.49±0.84 ab	1030.3±4.1 c
	5	0.71±0.12 efghij	0.14±0.03 d	86.96±1.12 abcde	745.6±14.0 fghi
	10	0.60±0.12 ghij	0.16±0.04 bcd	87.14±0.58 abcde	662.8±58.0 hi
	25	1.89±0.21 a	0.15±0.03 bcd	87.31±1.06 abcd	689.8±62.7 ghi
	50	0.65±0.02 fghij	0.18±0.03 abcd	84.73±1.03 cdefg	447.5±6.0 jk
<i>Napoleonova</i>	0	1.59±0.20 ab	0.23±0.03 abc	86.55±1.19 abcde	1586.9±17.9 a
	5	0.66±0.16 fghij	0.18±0.08 abcd	85.61±1.00 bcdefg	951.7±46.5 cde
	10	0.75±0.17 defghij	0.16±0.01 bcd	85.76±0.81 bcdefg	892.9±69.9 cdef
	25	1.33±0.19 bc	0.18±0.003 abcd	86.20±0.87 abcdefg	650.9±104.1 hi
	50	1.10±0.02 bcdefg	0.19±0.01 abcd	85.15±1.06 cdefg	567.9±76.6 ij
<i>Kaštánka</i>	0	0.58±0.10 ghij	0.15±0.02 bcd	88.74±0.83 ab	879.6±7.9 cdefg
	5	0.41±0.03 j	0.18±0.01 abcd	86.39±1.14 abcdef	762.9±70.0 efghi
	10	0.97±0.17 cdefghi	0.20±0.05 abcd	87.16±0.66 abcde	989.0±76.9 cd
	25	0.43±0.09 j	0.13±0.02 d	84.10±0.93 efgh	435.8±80.1 jkl
	50	0.97±0.09 cdefghi	0.24±0.04 abc	83.27±0.86 fgh	436.2±92.8 jkl
<i>Sunburst</i>	0	0.89±0.10 cdefghij	0.20±0.02 abcd	89.12±1.01 a	1534.1±108.6 a
	5	1.16±0.27 bcdef	0.20±0.01 abcd	85.30±1.20 cdefg	1286.5±81.1 b
	10	1.24±0.22 bcde	0.19±0.01 abcd	84.22±1.19 defgh	742.0±72.2 fghi
	25	1.05±0.33 cdefgh	0.19±0.02 abcd	83.15±1.23 gh	677.3±50.2 hi
	50	0.72±0.23 defghij	0.15±0.03 bcd	81.52±1.03 h	392.2±64.0 jkl
<i>P-HL-C</i>	0	1.37±0.19 abc	0.17±0.04 abcd	88.58±0.66 ab	823.1±53.0 defgh
	5	0.89±0.25 cdefghij	0.24±0.02 ab	88.49±1.35 ab	649.9±4.7 hi
	10	1.25±0.08 bcd	0.15±0.03 bcd	87.59±0.96 abc	667.7±35.5 hi
	25	0.54±0.10 hij	0.18±0.03 abcd	85.94±0.93 bcdefg	360.4±38.7 kl
	50	0.44±0.02 ij	0.26±0.01 a	85.64±1.04 bcdefg	252.4±39.0 l

Tabulka 5 Vliv různé koncentrace PEG 6000 na obsah chlorofylů a karotenoidů u *in vitro* kultur 5 odrůd jablek. Data znamenají \pm SDs (n = 3). Hodnoty ve sloupci se stejným písmenem (písmeny) se podle Tukeyova testu významně neliší (P <0,05). FW(čerstvá hmotnost) (Kovalíková et al. 2020).

Odrůda	Koncentrace PEG (g l ⁻¹)	Chlorophyl <i>a</i> (mg g ⁻¹ FW)	Chlorophyl <i>b</i> (mg g ⁻¹ FW)	Chlorophyly <i>a + b</i> (mg g ⁻¹ FW)	Karotenoidy (mg g ⁻¹ FW)
<i>Malinové Holovouské</i>	0	0.82±0.06 cdef	0.33±0.05 abcd	1.15±0.11 bcd	0.15±0.01 abcdefghi
	5	0.80±0.06 cdefg	0.22±0.02 def	1.01±0.08 bcdefg	0.19±0.02 abcd
	10	0.37±0.05 j	0.15±0.02 def	0.52±0.08 h	0.07±0.01 i
	25	0.63±0.06 fghi	0.25±0.02 cdef	0.88±0.08 defgh	0.12±0.01 defghi
	50	0.65±0.06 efgh	0.27±0.02 cdef	0.92±0.08 cdefg	0.12±0.01 defghi
<i>Fragrance</i>	0	0,53±0.06 hij	0.24±0.03 def	0.76±0.09 efgh	0.08±0.01 hi
	5	0,68±0.07 cdefgh	0.21±0.06 def	0.90±0.13 cdefgh	0.15±0.01 abcdefgh
	10	0,54±0.12 ghij	0.22±0.05 def	0.76±0.17 efgh	0.11±0.02 efghi
	25	0,39±0.11 ij	0.15±0.04 f	0.53±0.15 h	0.08±0.02 hi
	50	0,45±0.06 hij	0.19±0.03 def	0.64±0.09 gh	0.08±0.01 ghi
<i>Rubinstep</i>	0	0.96±0.05 abc	0.31±0.11 cd	1.28±0.15 abc	0.20±0.05 abc
	5	0.91±0.07 bcd	0.24±0.02 cdef	1.15±0.13 bcd	0.21±0.02 a
	10	0.65±0.13 efgh	0.25±0.05 cdef	0.90±0.17 cdefgh	0.12±0.02 defghi
	25	0.54±0.13 hij	0.22±0.05 def	0.75±0.17 efgh	0.10±0.02 efghi
	50	0.45±0.07 hij	0.19±0.03 def	0.65±0.10 gh	0.08±0,01 ghi
<i>Idared</i>	0	0.87±0.05 cdef	0.33±0.10 bcd	1.20±0.15 bcd	0.16±0.04 abcdefg
	5	0.86±0.08 cdef	0.24±0.03 cdef	1.10±0.11 bcde	0.21±0.02 ab
	10	0.69±0.07 defgh	0.27±0.03 cdef	0.97±0.10 cdefg	0.14±0.01 bcdefghi
	25	0.49±0.02 hij	0.20±0.02 def	0.69±0.04 fgh	0.09±0.001 fghi
	50	0.53±0.05 hij	0.23±0.02 def	0.76±0.06 efgh	0.10±0.01efghi
<i>CAR Alexander</i>	0	1.13±0.11 ab	0.48±0.02 ab	1.61±0.13 a	0.17±0.05 abcde
	5	0.83±0.13 cdef	0.23±0.02 def	1.06±0.15 bcdef	0.20±0.02 ab
	10	0.96±0.06 abc	0.39±0.03 abc	1.35±0.07 ab	0.16±0.03 abcdef
	25	1.17±0.02 a	0.48±0.03 a	1.65±0.04 a	0.21±0.03 a
	50	0.90±0.10 bcde	0.30±0.12 cde	1.20±0.22 bcd	0.20±0.02 abc

Tabulka 6 Vliv různé koncentrace PEG 6000 na obsah chlorofylů a karotenoidů u *in vitro* kultur 5 odrůd třešní. Data znamenají \pm SDs (n = 3). Hodnoty ve sloupci se stejným písmenem (písmeny) se podle Tukeyova testu významně neliší (P <0,05). FW(čerstvá hmotnost) (Kovalíková et al. 2020).

Odrůda	Koncentrace PEG (g l ⁻¹)	Chlorophyl <i>a</i> (mg g ⁻¹ FW)	Chlorophyl <i>b</i> (mg g ⁻¹ FW)	Chlorophyly <i>a + b</i> (mg g ⁻¹ FW)	Karotenoidy (mg g ⁻¹ FW)
<i>Regina</i>	0	1.16±0.04 abc	0.47±0.01 abcd	1.63±0.05 abcd	0.14±0.01 c
	5	0.96±0.23 bc	0.26±0.06 ef	1.22±0.30 cd	0.23±0.05 abc
	10	1.16±0.11 abc	0.39±0.06 abcdef	1.55±0.13 abcd	0.23±0.05 abc
	25	0.90±0.09 bc	0.36±0.04 cdef	1.26±0.12 bcd	0.16±0.01 bc
	50	0.80±0.04 c	0.32±0.01 cdef	1.12±0.05 d	0.15±0.001 bc
<i>Napoleonova</i>	0	1.32±0.21 ab	0.56±0.08 a	1.89±0.29 a	0.15±0.02 bc
	5	0.89±0.07 c	0.24±0.02 f	1.13±0.10 d	0.23±0.01 abc
	10	1.19±0.12 abc	0.45±0.04 abcd	1.63±0.16 abcd	0.21±0.02 abc
	25	1.19±0.10 abc	0.46±0.04 abcd	1.65±0.14 abcd	0.20±0.02 abc
	50	0.93±0.17 bc	0.35±0.13 cdef	1.28±0.29 bcd	0.20±0.05 abc
<i>Kaštánka</i>	0	1.39±0.13 a	0.42±0.06 abcde	1.82±0.09 ab	0.30±0.08 a
	5	1.21±0.09 abc	0.46±0.04 abcd	1.67±0.12 abcd	0.21±0.02 abc
	10	0.89±0.19 abc	0.35±0.06 cdef	1.24±0.26 bcd	0.14±0.05 c
	25	0.97±0.09 abc	0.39±0.05 abcdef	1.36±0.14 abcd	0.15±0.001 bc
	50	0.96±0.07 abc	0.40±0.03 abcdef	1.36±0.10 abcd	0.16±0.01 bc
<i>Sunburst</i>	0	1.22±0.18 abc	0.55±0.09 ab	1.76±0.27 abc	0.15±0.02 bc
	5	0.98±0.09 abc	0.30±0.03 def	1.38±0.17 abcd	0.25±0.03 ab
	10	1.02±0.07 abc	0.39±0.03 abcdef	1.41±0.10 abcd	0.19±0.01 bc
	25	1.14±0.16 abc	0.39±0.07 abcdef	1.53±0.20 abcd	0.24±0.05 abc
	50	0.89±0.08 bc	0.37±0.03 cdef	1.26±0.11 bcd	0.15±0.01 bc
<i>P-HL-C</i>	0	1.12±0.23 abc	0.48±0.09 abc	1.60±0.33 abcd	0.14±0.03 c
	5	0.95±0.18 bc	0.27±0.04 ef	1.22±0.22 cd	0.21±0.05 abc
	10	0.82±0.02 c	0.33±0.01 cdef	1.14±0.02 d	0.15±0.01 bc

Article

Physiological Responses of Apple and Cherry In Vitro Culture under Different Levels of Drought Stress

Zuzana Kovalikova ^{1,†}, Petra Jiroutova ^{2,*†} , Jakub Toman ¹, Dominika Dobrovolna ¹ and Lenka Drbohlavova ²

¹ Department of Biology, Faculty of Science, University of Hradec Kralove, Rokitanskeho 62, 50003 Hradec Kralove, Czech Republic; zuzana.kovalikova@uhk.cz (Z.K.); jakub.toman@uhk.cz (J.T.); dominika.dobrovolna@uhk.cz (D.D.)

² Research and Breeding Institute of Pomology Ltd., Holovousy 129, 50801 Hořice, Czech Republic; lenka.drbohlavova@vsuo.cz

* Correspondence: petra.jiroutova@vsuo.cz

† These authors contributed equally to this work.

Received: 5 October 2020; Accepted: 28 October 2020; Published: 30 October 2020



Abstract: Drought stress is a serious threat. Therefore, improvements in crop productivity under conditions of limited water availability are vital to keep global food security. Apples and cherries belong to the most produced fruit worldwide. Thus, searching for their tolerant or resistant cultivars is beneficial for crop breeders to produce more resistant plants. We studied five apple (“Malinové holovouské”, “Fragrance”, “Rubinstep”, “Idared”, “Car Alexander”) and five cherry (“Regina”, “Napoleonova”, “Kaštánka”, “Sunburst”, “P-HL-C”) cultivars for their adaptation in response to progressive drought stress. The reaction of an in vitro culture to osmotic stress simulated by increasing polyethylene glycol (PEG) concentration in medium was evaluated through the morphological (fresh and dry weight, water content, leaf area), physiological (chlorophyll and carotenoids content), and biochemical (reactive oxygen species and malondialdehyde content) parameters. Drought-like stress negatively affected the water content, leaf areas, and chlorophyll content in both fruit species. Oxidative status and membrane damage of plants under water deficiency conditions occurred to be important indicators of stress tolerance mechanism. Cherries exhibited higher hydrogen peroxide levels compared to apples, whereas their malondialdehyde values were generally lower. The overall results indicated wide tolerance range to water deficit among apple and cherry in vitro culture as well as among cultivars within single plant species.

Keywords: drought stress; in vitro culture; apple; cherries; oxidative stress

1. Introduction

Drought stress is a major environmental stress negatively affecting growth, development, and the agricultural production of many plants worldwide. Low water availability can be chronic in dry climate regions or unpredictable due to the changes in weather conditions during the period of plant development. It is expected that the areas suffering from water deficiency will be increasing due to global warming. Thus, searching for drought tolerant plant species and cultivars could be beneficial for crop breeders to produce more resistant plants, which could help to maintain the food security under the conditions of the warming world [1]. Selection or breeding of drought resistant fruit species and cultivars in combination with new approaches in effective use of water are considered to improve the crop production and quality under the drought stress conditions [2].

The responses of plants to water deficit depend upon the intensity and duration of the stress conditions as well as plant species/cultivar and its stage of development. In plants, drought

negatively affects several physiological processes including photosynthesis, respiration, nutrient uptake, and metabolism and causes a complex of physio-biochemical responses [3].

Under water deficit conditions, water uptake by the roots is impaired. This causes the reduction in turgor pressure, resulting in suppression of cell elongation and expansion growth [4]. Decreased leaf size is one of the first and most obvious plant responses to water stress. It is caused by both decreased cell development and reduced photosynthesis rate. Reduction in the leaf area associated with decrease in the transpiration surface presents a very important water saving mechanism. Recovery leaf growth is dependent on phases of leaf development and on intensity of stress conditions. Stress occurring at the early phase can be recovered. However, this phenomenon does not occur in later stages of development. Severe drought stress stops both leaf development and the production of new leaves, and accelerates the leaf senescence [5].

Reduction in fresh and dry biomass is another typical physiological response of plants to drought stress that represents unfavorable impact of water stress, especially on crop plants. On the contrary, maintaining fresh and dry weight under water deficit conditions is a desirable character trait of plants, especially of agriculturally important crops because of its impact on yield [6].

Drought stress also affects photosynthetic pigment composition in terms of changing the ratio of chlorophyll *a* and *b*, and carotenoids [7]. A significant reduction in chlorophyll content under water stress conditions has been reported for many plant species [8–10]. Aside from their essential role in photosynthesis, carotenoids are important non-enzymatic antioxidants playing an essential role in response to various stress conditions [11]. Hence, their level and ratio can increase as a reaction to drought stress [4].

A decrease in leaf size, biomass, photosynthetic pigments, and water availability leads to reduction in the photosynthesis rate, resulting in absorption of more light energy than could be consumed by photosynthetic carbon fixation. This excess energy has the potential to cause an oxidative stress and increase the production of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂) or superoxide radicals (O²⁻). These species react with proteins and lipids, causing damage of cellular structures and the photosynthesis related metabolism [12]. For example, ROS destroy the cellular membrane through lipid peroxidation. During this process, malondialdehyde (MDA) as a product of acid peroxidation is accumulated in the plant. Thus, the determination of the MDA content can be used as a measure of membrane damage-induced oxidative stress during water stress [13].

Polyethylene glycol (PEG) is described as water-soluble, high molecular weight polymers, widely used to induce water stress in higher plants through lowering the water potential of the nutrient solution [14]. PEG is widely used for identification of drought tolerant genotypes under stimulated osmotic stress [14,15]. The major advantage of using *in vitro* based techniques with the PEG enriched medium is the rapid screening of diverse plant cultures in laboratory conditions. On the other hand, the main limitation of this method is simulation of drought stress conditions by application of osmotic stress, contrary to withhold irrigation methods based on whole plants experiments [16]. Although, the results of Kautz et al. [17] indicate that physiological responses of plants subjected to PEG-induced osmotic stress are similar to physical water deficit, PEG cannot be considered as an unconditional equivalent for natural drought. The objective of this *in vitro* study was evaluation of selected morphological, physiological, and biochemical characteristics in five different apple ("Malinové holovouské", "Fragrance", "Rubinstep", "Idared", "Car Alexander") and five cherry ("Regina", "Napoleonova", "Kaštánka", "Sunburst", "P-HL-C") cultivars under drought-like stress conditions induced by polyethylene glycol (PEG). We focused on expanding the available information on selected cultivars (Table 1) with respect to their drought tolerance.

Table 1. Main features of examined apple and cherry cultivars in relation to abiotic stress.

Cultivar (Apple)	Main Feature in Relation to Abiotic Stress	Cultivar (Cherry)	Main Feature in Relation to Abiotic Stress
Malinové holovouské	Low drought resistance [18]. Sufficient frost resistance [19].	Regina	High resistance to rain-induced splitting [20].
Fragrance	Resistant to winter and spring frosts [21].	Napoleonova	Low resistance to rain-induced splitting [20]. Tolerant to drought [22].
Rubinstep	Resistant to winter and spring frosts [23].	Kaštánka	High resistance to rain-induced splitting [20].
Idared	Sensitive to winter frosts [24].	Sunburst	Very resistant to frosts. High resistance to rain-induced splitting [25].
Car Alexander	Very low drought resistance. High frost resistance [19].	P-HL-C	Resistant to winter frosts [26].

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Experimental Conditions

Selected genotypes of apple (*Malus × domestica*) and cherry (*Prunus avium*) were produced in vitro from donor shoots collected in the Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd., Czech Republic. In vitro explants were cultured on 25 mL of modified solid (7.0 g L⁻¹ agar) Murashige and Skoog (MS) medium [27] with 6-aminobenzylpurine (BAP) as the shoot growth stimulant at a concentration of 1.5 mg L⁻¹ in 100 mL Erlenmeyer flasks capped with aluminum foil. pH was adjusted to 5.7 before autoclaving at 121 °C for 15 min. Growth room conditions were: temperature 22 ± 1 °C, photoperiod 16 h light/8 h dark. Viable cultures were transferred to fresh MS medium at 30-day intervals. Osmotic stress was induced by adding polyethylene glycol (PEG-6000) at a concentration of 0, 5, 10, 25, and 50 g L⁻¹ to the basal medium (which is equivalent to 0%, 0.5%, 1%, 2.5%, and 5% (w/v) PEG-6000), labelled as PEG0, PEG5, PEG10, PEG25, and PEG50, respectively. All parameters were measured in plants cultivated at a rate 4 pieces per flask on media (with or without PEG-6000) for 30 days. At least three independent measurements were carried out for each cultivar and each concentration.

2.2. Determination of Fresh and Dry Weight, Water Content, Leaf Area

Each explant cultivated under the same conditions was weighed on analytical balance (AS 220.R2, Radwag, Poland) for determination of fresh weight. For determination of both dry weight and moisture content, explants grown under the same conditions were pooled to reach fresh weight 0.7–1.3 g and then analyzed by a moisture analyzer (MB27, Ohaus, NJ, USA). The leaves were photographed (PowerShot G16, Canon, Japan) for leaf area determination immediately after collection one by one from the explant and the entire leaf area of the single explant was measured by using ImageJ software [28].

2.3. Determination of the Chlorophyll and Carotenoids Content

The contents of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and total carotenoids were determined in methanolic extracts analyzed at 666, 653, and 480 nm, respectively. Contents were calculated according to the equation published in ref. [29].

2.4. Determination of Reactive Oxygen Species and Malondialdehyde

Homogenates in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) were used for determination of reactive oxygen species. The content of hydrogen peroxide was determined using the TiCl_4 method (410 nm) with H_2O_2 as a standard. Superoxide radical was measured as a nitrite produced by the reaction in a mixture of homogenate, 10 mM hydroxylamine, 17 mM sulfanilamid, 7 mM α -naphthylamine, and diethyl ether (530 nm). Sodium nitrite was used for calibration [30].

The extent of membrane lipid peroxidation was expressed as the amount of MDA. Trichloroacetic acid (TCA) homogenates were mixed with TCA-thiobarbituric acid (TBA) solution and heated for 30 min at 90 °C. The samples were analyzed after rapid cooling at a wavelength of 532 nm. The MDA contents were calculated using the extinction coefficient of MDA-TBA complex ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and expressed as $\mu\text{mol MDA g}^{-1} \text{ FW}$ [30].

2.5. Statistical Analysis

Statistical differences among the treatments and cultivars were evaluated using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test ($p < 0.05$) in Minitab v. 19 software (Minitab LLC, Coventry, UK). Number of replications (*n*) in tables/figures denotes individual samples measured for each parameter.

3. Results

3.1. Plant Growth, Water Content, and Leaf Area

The overall appearance of the *in vitro* explants in both fruit species was affected by the increasing concentration of PEG. Figure 1 shows in the most pronounced manifestations that leaf drooping, wilting, browning, and reduction in area were induced by water stress in both plant species. These symptoms occurred earlier in apples, whereas the cherries displayed better growth and more green leaves. The growth of *in vitro* plant explants was determined based on fresh weight (FW), dry weight (DW), water content, and leaf area. Our results are summarized in Figure 2 (detailed data are given in Supplementary Materials—Tables Supplementary Materials—Tables S1 and S2).

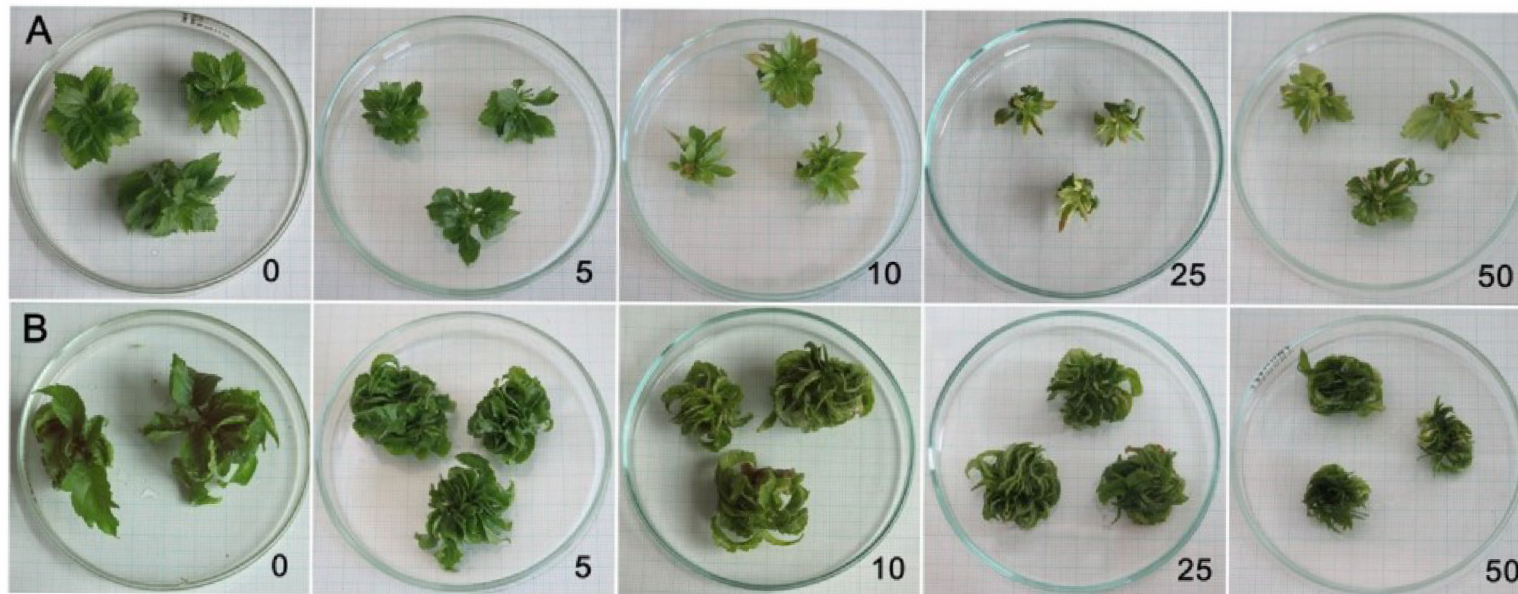


Figure 1. Effect of different concentration of polyethylene glycol (PEG-6000) on the growth and appearance of the in vitro culture of apple cultivar “Idared” (A) and cherry cultivar “Sunburst” (B); Numbers indicate PEG concentration in g L⁻¹.

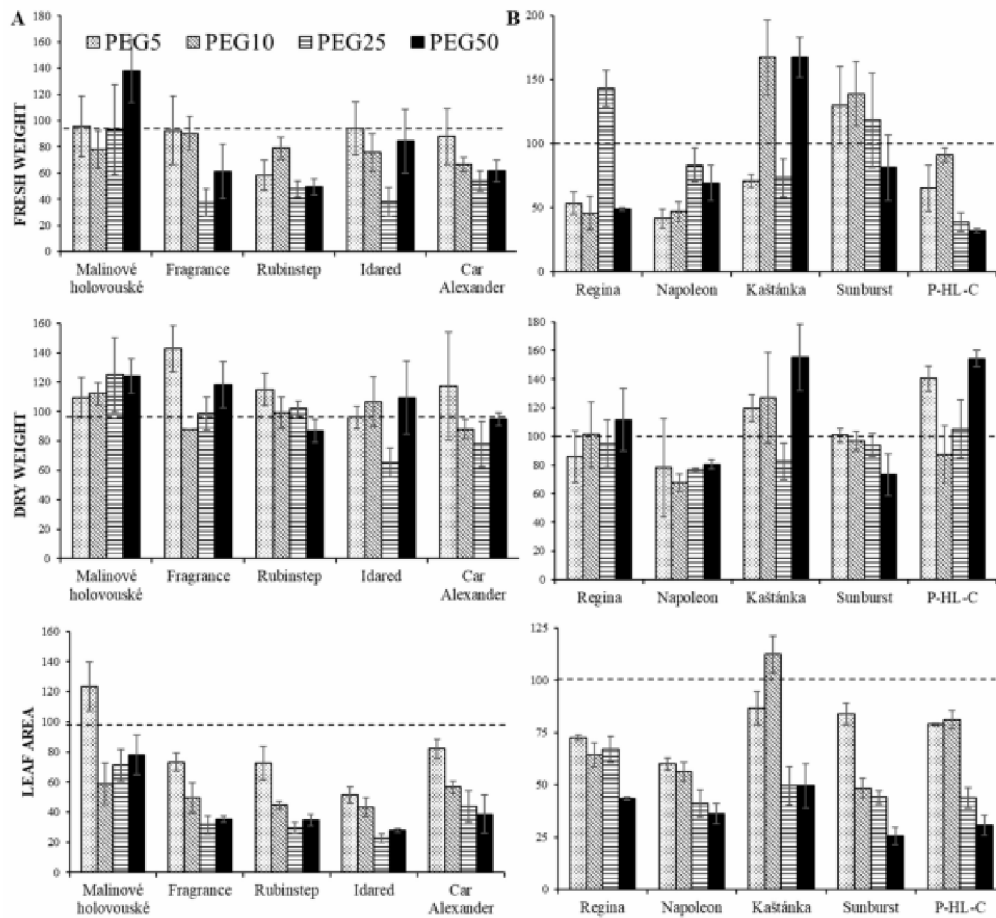


Figure 2. Effect of different concentration of PEG-6000 on content of fresh weight (g), dry weight (g), and leaf area (mm²) in in vitro culture of apple (A) and cherry (B) cultivars. All bar values were recalculated relative to the compound content in untreated samples taken as 100% (dashed line). Error bars represent means ± SDs (n = 3).

A decrease in FW with increasing concentration of PEG in comparison with plants grown in medium containing no PEG (PEG0) was observed for apple cultivars most significantly for “Fragrance” in PEG25 and PEG50, for “Rubinstep” in PEG25 and PEG50, for “Idared” in PEG25, and for “Car Alexander” in PEG25. Within the cultivars themselves, the lowest FW in PEG0 plants was recorded for cultivar “Malinové holovouské” for which we also observed the lowest decrease. In contrast, the FW of PEG0 plants was the highest for the “Rubinstep” and “Car Alexander” cultivars and, at the same time, the decrease was more pronounced with the increasing concentration of PEG. A considerable variability in FW content was monitored for cherry plants, meaning it was not possible to unambiguously determine the interdependence between increasing PEG concentration and FW. A significant decrease in FW compared to PEG0 plants was observed in cultivars “Regina” (PEG 5, PEG 10, and PEG25), “Napoleona” (PEG5 and PEG10), and “P-HL-C” (PEG 5, PEG25, and PEG50).

The decrease in FW was directly related to the decrease in the leaf area. Increasing PEG concentration led to a significant decrease in the leaf area of all tested cultivars, notably at PEG25 and PEG50. Figure 1 illustrated the most significant decrease (compared to control plants) observed for the apple cultivar “Idared” which was 4.2 times. The decrease (compared to control plants) in cherry cultivar “Sunburst” was 4 times. Overall, cherries exhibited larger leaf areas compared to apples, but the area decrease was more pronounced. The smallest leaf area was observed in “Malinové holovouské” and at the same

time, the lowest decrease in leaf area was recorded here. The water content in the tissues was also significantly negatively affected with an increase in PEG concentration.

3.2. Chlorophyll and Carotenoids Content

Drought stress induced by PEG negatively influenced the content of chlorophylls in all cultivars of both tested species. Figure 3 and Table S3 show that increased concentration of PEG in apple cultivars resulted in simultaneous depression of chlorophyll *a* and *b*. The lowest level of chlorophyll *a* in PEG0 plants was observed in the cultivar “Fragrance”, whereas the “Car Alexander” featured the highest 2 times higher concentration. The most significant decrease of 53% was observed in “Rubinstep”. A similar trend was also observed for chlorophyll *b*. For the cherry cultivars, the concentrations of chlorophyll *a* and *b* were generally higher compared to apple cultivars (Table S4). At the same time, the differences in chlorophyll levels between individual cultivars were not significant. The highest value of chlorophyll *a* in PEG0 plants was observed in “Kaštánka” while the 1.2 times lower one in the “P-HL-C” cultivar. An approximately 1.4 times decrease in the content due to increased PEG concentration was similar within all cultivars. The decrease in contents of chlorophyll *b* was always the most pronounced in PEG5 plants, with the exception of the cultivar “Kaštánka”, where it was observed at the concentration PEG10.

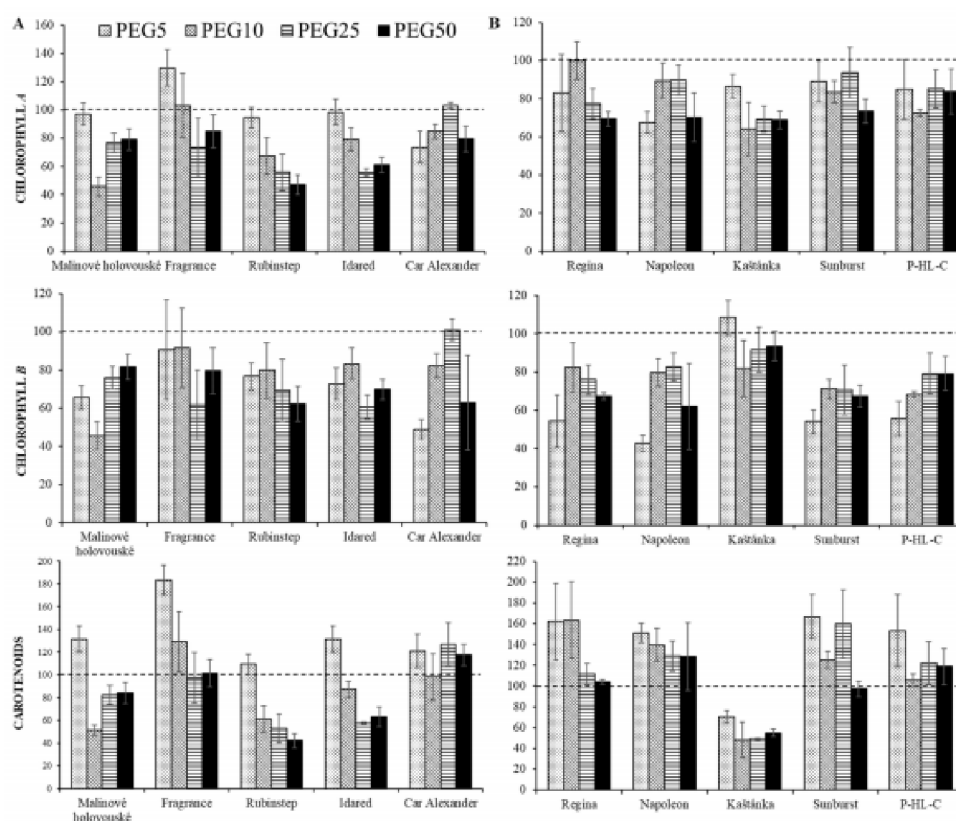


Figure 3. Effect of different concentration of PEG-6000 on content of chlorophyll *a* (mg g^{-1} FW), chlorophyll *b* (mg g^{-1} FW) and total carotenoids (mg g^{-1} FW) in *in vitro* culture of apple (A) and cherry (B) cultivars. All bar values were recalculated relative to the compound content in untreated samples taken as 100% (dashed line). Error bars represent means \pm SDs ($n = 3$).

Simulated water deficit affected the content of total carotenoids differently as demonstrated in Figure 3 (Tables S3 and S4). Compared to PEG0, all apple cultivars displayed an increase in total carotenoids when the lowest concentration of PEG (PEG5) was used with most significant effect only in “Fragrance”. A similar accumulation trend was also recorded for cherries. A significant increase was observed only in “Sunburst”. In contrast, the highest values were reached in “Kaštánka” PEG0 plants. Higher PEG concentrations led in apples to a decrease in carotenoids content below the level of control plants (PEG0).

3.3. Oxidative Status and Membrane Damage

Figure 4 showed that PEG-induced osmotic stress slightly affected the overall oxidation status of the plants. H_2O_2 levels were generally higher in both PEG0 and stressed cherry plants compared to apples. The apple cultivars differed considerably from each other. Relatively low values measured for control and stressed plants were recorded for “Fragrance”, “Car Alexander”, and “Idared”. However, a 2.7 times H_2O_2 increase due to PEG was pronounced. On the contrary, relatively high values with their increase comparable to cherries, were found in the cultivar “Malinové holovouské”. Due to PEG treatment, a simultaneous increase in amounts of superoxide radicals was typical of all cultivars. The only exception was the cultivar “Napoleonova” which featured a decrease below the values monitored in PEG0 plants. Low levels of superoxide radical in PEG0 plants were recorded in apple cultivars “Fragrance” and “Idared”, but at the same time, the most noticeable increase was recorded here, 2.5 times (PEG25) and 3.1 times (PEG50), respectively. Within cherries, the most significant increase in superoxide radical was recorded in the cultivar ‘P-HL-C’, amounting for 1.8 times compared to PEG0 plants.

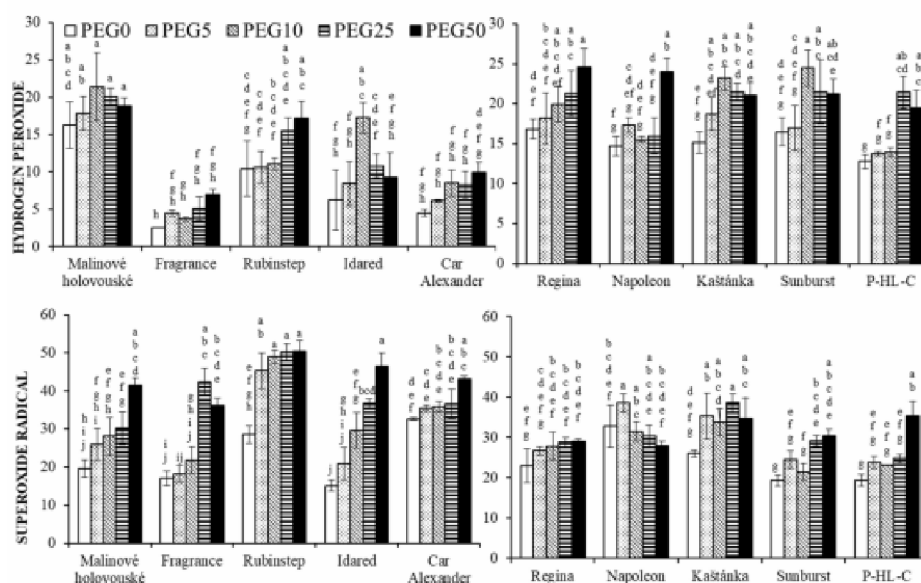


Figure 4. Effect of different concentration of PEG-6000 on content of hydrogen peroxide ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) and superoxide radicals ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW) in vitro culture of apple and cherry cultivars. Error bars represent means \pm SDs ($n = 3$). Values within column, followed by the same letter(s), are not significantly different according to Tukey’s test ($p < 0.05$).

The accumulation of reactive oxygen species led to damage of membrane lipids expressed as a change in the content of MDA (Figure 5). The values in the PEG0 plants did not differ significantly within the apple cultivars. The highest increase of 1.7 times for PEG50 was observed in “Malinové holovouské”. The MDA levels in cherries were generally lower for both non-treated and PEG treated cultivars. However, even the highest values observed in stressed plants did not reach the PEG0 values

found for apple cultivars. The increase due to the increasing concentration of PEG was 2.3 and 2.7 times more pronounced for “Kaštánka” and “Napoleonova”, respectively.

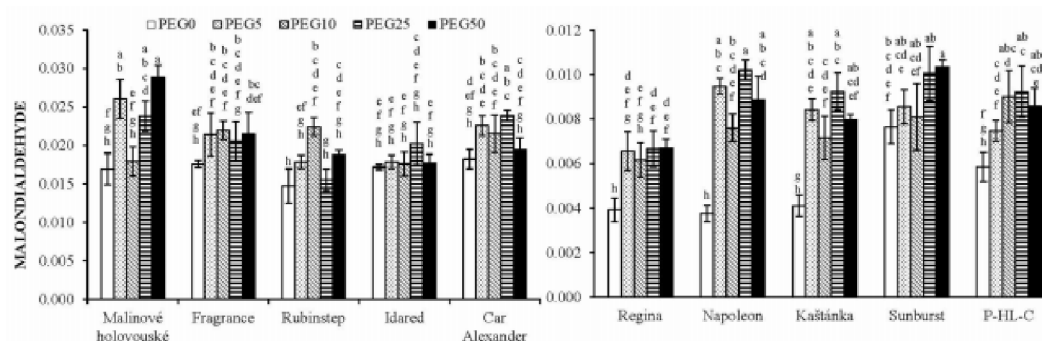


Figure 5. Effect of different PEG-6000 concentration on content of malondialdehyde ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) in vitro culture of apple and cherry cultivars. Error bars represent means \pm SDs ($n = 3$). Values within column, followed by the same letter(s), are not significantly different according to Tukey's test ($p < 0.05$).

4. Discussion

Apple and cherry are important fruit trees grown predominantly in temperate regions of the world. Limited water availability is a serious threat of production. Therefore, improvements in crop productivity under drought conditions are vital to keep global food security. The reactions of plants to the limited water regime are usually monitored at several levels, based on selected morphological, physiological, and biochemical parameters that have proven to be good indicators of drought sensitivity/tolerance. We tested, via induced osmotic stress, drought tolerance of five apple and five cherry cultivars by examining their physiological and biochemical parameters under progressive drought-like stress conditions.

Plant wilting, leaf twisting, and reduction in water content, are among the primary manifestations of drought stress. Shortage in water content and the associated decrease in nutrient availability lead to a reduction in cell division and cell proliferation resulted in overall reduction of leaf area [31]. A significant reduction in leaf area and total fresh and dry weight with increasing level of water stress was observed [32,33]. Moreover, several studies confirmed with sorghum [34], guava [35], grass pea [36], apples [37], and almonds [38] that drought tolerant genotypes displayed less damage than the susceptible counterparts. The results of our study demonstrate a negative relationship between water stress and growth parameters such as FW, DW, and leaf area although the response of tested cultivars differed in comparison to previously published studies. Cultivars “Malinové holovouské” and “Car Alexander” are thought to be varieties of low drought resistance [18]. We confirmed this only for “Car Alexander” in which we observed a significant decrease in FW and leaf area. However, these differences were minimal for “Malinové holovouské”. “Napoleonova” is reported as a tolerant cherry to drought [22]. Here, we recorded a significant decrease in FW and leaf area but the water content remained constant.

Structural damages to chloroplasts due to ROS formation and/or photodegradation of the pigments probably led to loss of chlorophylls in dehydrated plants. The rootstock chloroplasts became deform in the water stressed apple, stacking of grana was less frequent, and thylakoids were loosened and distorted [37]. Decrease in photosynthetic pigments resulting in leaf yellowing or in an extreme case in leaf necrosis are common visual symptoms under severe water deficit. We noticed in our experiments a reduction in chlorophyll that was accompanied by yellowing and browning of the leaves at the highest concentrations of PEG as shown in Figure 1. Similar responses were also reported in cherry [39] and *Prunus* [40]. However, none of these studies focused in detail on individual types of chlorophylls. A detailed analysis of pigments is given in Šircelj et al. [41] who noticed a significant decrease in

chlorophyll *a* and *b* after severe water deficit for apple cultivar “Jonagold Wilmuta”. Similar to our study, mild stress led to a significant increase in carotenoids, specifically β -carotene [41] that is a major defense to generation of singlet oxygen in photosynthetic tissue through direct quenching of triplet chlorophyll. Severe stress reduced β -carotene level [6]. Of the other pigments, there was an increase in content of zeaxanthin, a member of the xanthophyll cycle which being a stimulant of non-photochemical quenching and lipid-protective antioxidant plays a direct photoprotective role [41]. Simultaneously with a decrease in chlorophyll, fluorescence of the chlorophyll also changed, namely the maximum photochemical efficiency and effective PSII quantum yield [12,42]. The drop in content of photosynthetic pigments accompanied with inhibition of chlorophyll fluorescence, electron transport rate, and photochemical quenching is a reliable indicator of limited capacity of the photosynthetic system [43]. A decrease in the photosynthetic rate, transpiration rate, and stomatal conductance has been observed in several species [40–42].

One of the many manifestations of negative environmental stimuli is the formation of ROS, including hydrogen peroxide, superoxide, and hydroxyl radicals. Their overproduction can lead to protein degradation, lipid peroxidation, and enzyme inhibition [44]. Besides their toxic properties, they often appear as signaling molecules in mediating adequate defense responses [45]. We found that water limitation caused significant growth in H_2O_2 and superoxide radical concentrations in all cultivars of both species. Enhanced production of ROS was also detected by others in apple leaves [12,37] or cherry rootstock [39].

The degree of oxidative damage can usually be expressed as a change in MDA content, a product of ROS-mediated oxidation of polyunsaturated membrane lipids. Oxidative damage to membranes disrupts the complexity of cellular structures [37]. Electron flux occurs [2], which in turn disrupts the homeostasis of the internal environment and the complexity of individual metabolic pathways. Here, a gradual increment of MDA content as the effects of water shortage indicates that this parameter was directly related to drought similar to previous reports [39,46]. It is well known that different plants and even cultivars of a single plant respond to stress differently. This can result in a different accumulation of monitored ROS and MDA as in the present study. Zhong et al. [46] studied five kiwifruit species that differed significantly in MDA accumulation. Drought-sensitive *Malus hupehensis* apples had a higher H_2O_2 rate and superoxide radical generation and subsequent lipid peroxidation in comparison with drought-tolerant *M. prunifolia* [37]. In our case, the increase in H_2O_2 and MDA content was more pronounced for cherries. This means that cherries reacted more sensitively compared to apples. On the other hand, the increment in the superoxide radical was more pronounced in apple cultivars. These differences can be related to the different activity of antioxidant enzymes and other antioxidants. For a better understanding, it is necessary to determine the activity of enzymes such as catalase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, as well as levels of other antioxidants such as ascorbic acid, phenolic substances, and total plant antioxidant activity.

In vitro tissue culture represents a biotechnological technique that has been used to genetically improve cultivars and rootstocks. Another option enabling an increase in the stress resistance in many plant species is the so-called polyploidization. For example, Zhang et al. [47] showed that autotetraploid apple cultivar “Hanfu” and “Gala” had, under drought stress, higher relative water content and chlorophyll fluorescence parameters, and lower MDA and proline levels compared to diploid apple.

5. Conclusions

Our work proposes the use of in vitro cultivation of fruit plants with subsequent evaluation of selected physiological parameters as a useful tool in the search for drought resistant or tolerant fruit cultivars. In this study, we examined the reaction of in vitro apple and cherry culture to drought-like stress simulated by enhancing polyethylene glycol concentration in the growing medium. The water content, leaf areas, and chlorophyll content in both fruit species was negatively affected by water deficit conditions. Interestingly, under drought stress, cherries and apples showed different changes in

ROS production that could be related to different antioxidant strategies. Based on the data from our study, we can only roughly estimate the tolerance order of individual cultivars as follows: for apple “Malinové holovouské” > “Fragrance” > “Car Alexander” ≥ “Rubinstep” > “Idared”; and for cherry “Napoleonova” > “Regina” > “Kaštánka” ≥ “P-HL-C” ≥ “Sunburst”. However, it should be noted the conclusion is very preliminary and future research focused on determination of the antioxidant enzyme activity and levels of antioxidants will be helpful for better understanding of the mechanism of drought stress in the apple and cherry trees. As well as future research focused on implementation of the acquired knowledge in vitro to ex vitro environment would be beneficial.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4395/10/11/1689/s1>, Table S1: Effect of different concentration of PEG-6000 on fresh weight, dry weight, water content, and leaf area of in vitro culture of apple cultivars. Data are means ± SD (n = 3). Values within column, followed by the same letter(s), are not significantly different according to Tukey’s test ($p < 0.05$)., Table S2: Effect of different concentration of PEG-6000 on fresh weight, dry weight, water content, and leaf area of in vitro culture of cherry cultivars. Data are means ± SD (n = 3). Results of statistic are the same as in Table S1, Table S3: Effect of PEG-6000 concentration on chlorophylls and total carotenoids contents in in vitro culture of apple cultivars. Data are means ± SDs (n = 3). Results of statistic are the same as in Table S1, Table S4: Effect of PEG-6000 concentration of on chlorophylls and total carotenoids contents in in vitro culture of cherry cultivars. Data are means ± SDs (n = 3). Results of statistic are the same as in Table S1.

Author Contributions: Conceptualization, Z.K. and P.J.; methodology, Z.K. and P.J.; investigation, Z.K., P.J., J.T. and D.D.; resources, P.J. and L.D.; data curation, Z.K. and P.J.; writing—original draft preparation, Z.K., P.J. and L.D.; writing—review and editing, Z.K. and P.J.; supervision Z.K. and P.J.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Technology Agency of the Czech Republic (programme ZETA 2), grant number TJ02000066 (Research of laboratory method for prediction of tolerance of fruit crops to drought).

Acknowledgments: The authors would like to thank Jiřina Rachotová for her technical assistance on this research.

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

References

1. Alizadeh, V.; Shokri, V.; Soltani, A.; Yousefi, M.A. Effects of Climate Change and Drought-Stress on Plant Physiology. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res* **2015**, *3*, 38–42.
2. Bolat, I.; Dikilitas, M.; Ikinci, A.; Ercisli, S.; Tonkaz, T. Morphological, physiological, biochemical characteristics and bud success responses of myrobolan 29 c plum rootstock subjected to water stress. *Can. J. Plant Sci.* **2016**, *96*, 485–493. [[CrossRef](#)]
3. Tuna, A.L.; Kaya, C.; Ashraf, M. Potassium sulfate improves water deficit tolerance in melon plants grown under glasshouse conditions. *J. Plant Nutr.* **2010**, *33*, 1276–1286. [[CrossRef](#)]
4. Jaleel, C.A.; Manivannan, P.; Wahid, A.; Farooq, M.; Al-Juburi, H.J.; Somasundaram, R.; Panneerselvam, R. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* **2009**, *11*, 100–105.
5. Anjum, S.A.; Ashraf, U.; Zohaib, A.; Tanveer, M.; Naeem, M.; Ali, I.; Tabassum, T.; Nazir, U. Growth and developmental responses of crop plants under drought stress: A review. *Zemdirb. Agric.* **2017**, *104*, 267–276. [[CrossRef](#)]
6. Farooq, M.; Wahid, A.; Kobayashi, N.; Fujita, D.; Basra, S.M.A. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* **2009**, *29*, 185–212. [[CrossRef](#)]
7. Mibei, E.K.; Ambuko, J.; Giovannoni, J.J.; Onyango, A.N.; Owino, W.O. Carotenoid profiling of the leaves of selected African eggplant accessions subjected to drought stress. *Food Sci. Nutr.* **2016**, *5*, 113–122. [[CrossRef](#)]
8. Khayatmezhad, M.; Gholamin, R. The effect of drought stress on leaf chlorophyll content and stress resistance in maize cultivars (*Zea mays*). *Afr. J. Microbiol. Res.* **2012**, *6*, 2844–2848. [[CrossRef](#)]
9. Li, R.; Guo, P.; Michael, B.; Stefania, G.; Salvatore, C. Evaluation of Chlorophyll Content and Fluorescence Parameters as Indicators of Drought Tolerance in Barley. *Agric. Sci. China* **2006**, *5*, 751–757. [[CrossRef](#)]

10. Meher; Shivakrishna, P.; Ashok Reddy, K.; Manohar Rao, D. Effect of PEG-6000 imposed drought stress on RNA content, relative water content (RWC), and chlorophyll content in peanut leaves and roots. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**, *25*, 285–289. [CrossRef]
11. Young, A.; Lowe, G. Carotenoids—Antioxidant Properties. *Antioxidants* **2018**, *7*, 28. [CrossRef] [PubMed]
12. Wang, Z.; Li, G.; Sun, H.; Ma, L.; Guo, Y.; Zhao, Z.; Gao, H.; Mei, L. Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biol. Open* **2018**, *7*, bio035279. [CrossRef] [PubMed]
13. Farooq, M.; Wahid, A.; Lee, D.-J.; Cheema, S.A.; Aziz, T. DROUGHT STRESS: Comparative Time Course Action of the Foliar Applied Glycinebetaine, Salicylic Acid, Nitrous Oxide, Brassinosteroids and Spermine in Improving Drought Resistance of Rice: Improving rice drought tolerance. *J. Agron. Crop Sci.* **2010**, *196*, 336–345. [CrossRef]
14. Bhadra, S.; Roy, B.; Ghimiray, T.S. Polyethyleneglycol mediated rapid in vitro screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for drought tolerance. *Ind. J. Gen. Plnt. Breed.* **2017**, *78*, 142. [CrossRef]
15. Sakthivelu, G.; Akitha Devi, M.K.; Giridhar, P.; Rajasekaran, T.; Nedev, T.; Kosturkova, G. Drought-induced alterations in growth, osmotic and in vitro regeneration of soybean cultivars. *Genet. Appl. Plant Physiol.* **2008**, *34*, 103–112.
16. Osmolovskaya, N.; Shumilina, J.; Kim, A.; Didio, A.; Grishina, T.; Bilova, T.; Keltsieva, O.A.; Zhukov, V.; Tikhonovich, I.; Tarakhovskaya, E.; et al. Methodology of Drought Stress Research: Experimental Setup and Physiological Characterization. *IJMS* **2018**, *19*, 4089. [CrossRef]
17. Kautz, B.; Noga, G.; Hunsche, M. PEG and drought cause distinct changes in biochemical, physiological and morphological parameters of apple seedlings. *Acta Physiol. Plant.* **2015**, *37*, 162. [CrossRef]
18. Říha, J. *České Ovoce—díl III. Jablka*; České nakladatelství: Praha, Czech Republic, 1919.
19. Boček, S. *Ovocné Dřeviny v Krajině: Pilotní vZdělávací Program, Hostětín 2007/8: Sborník Přednášek a Seminárních Prací*; ZO ČSOP Veronica: Brno, Czech Republic, 2008; ISBN 978-80-904109-2-3.
20. Richter, M. *Malý Obrazový Atlas Odrůd Ovoce. 3*; TG tisk: Lanškroun, Czech Republic, 2004; ISBN 978-80-903487-2-1.
21. *Nové Odrůdy Ovoce = New Cultivars of Fruit*; Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnarský Holovousy: Holovousy, Czech Republic, 2007; ISBN 978-80-87030-04-2.
22. Kutina, J. *Pomologický Atlas 1*; Brázda: Praha, Czech Republic, 1991; ISBN 80-209-0089-6.
23. Blažek, J. Odrůda jabloně Rubinstep. *Vědecké Práce Ovocnářské* **2001**, *17*, 163–165.
24. Kutina, J.; Holeček, S. *Pomologický Atlas 2*; Brázda: Praha, Czech Republic, 1992; ISBN 978-80-209-0192-7.
25. Lane, W.D.; Schmid, H. Lapins and Sunburst sweet cherry. *Can. J. Plant Sci.* **1984**, *64*, 211–214. [CrossRef]
26. Blažková, J. *Pěstování Třešní na Slabě Rostoucích Podnožích*; Výzkumný a šlechtitelský Ústav Ovocnářský Holovousy: Holovousy, Czech Republic, 2005; ISBN 978-80-902636-8-0.
27. Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 473–497. [CrossRef]
28. ImageJ Home Page. Available online: <http://rsbweb.nih.gov/ij> (accessed on 30 October 2020).
29. Wellburn, A.R. The spectral determination of chlorophyll *a* and *b*, as well as total Carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolutions. *J. Plant. Physiol.* **1994**, *144*, 307–313. [CrossRef]
30. Ducaiova, Z.; Sajko, M.; Mihalicova, S.; Repcak, M. Dynamics of accumulation of coumarin-related compounds in leaves of *Matricaria chamomilla* after methyl jasmonate elicitation. *Plant Growth Regul.* **2016**, *79*, 81–94. [CrossRef]
31. Tardieu, F. Plant response to environmental conditions: Assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. *Front. Plant Physiol.* **2013**, *4*, 1–11. [CrossRef]
32. Karimi, S.; Hojati, S.; Eshghi, S.; Moghaddam, R.N.; Jandoust, S. Magnetic exposure improves tolerance of fig ‘Sabz’ explants to drought stress induced in vitro. *Sci. Hortic.* **2012**, *137*, 95–97. [CrossRef]
33. Turhan, H.; Baser, I. In vitro and in vivo water stress in sunflower. *Helia* **2004**, *27*, 227–236. [CrossRef]
34. Tsago, Y.; Andargie, M.; Takele, A. In vitro selection of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) for polyethylene glycol (PEG) induced drought stress. *Plant Sci. Today* **2014**, *1*, 62–68. [CrossRef]
35. Abouzaid, E.; El-Sayed, E.S.N.; Mohamed, E.S.A.; Youseff, M. Molecular Analysis of Drought Tolerance in Guava Based on In Vitro PEG Evaluation. *Trop. Plant Biol.* **2016**, *9*, 73–81. [CrossRef]
36. Piwowarczyk, B.; Kamińska, I.; Rybiński, W. Influence of PEG Generated Osmotic Stress on Shoot Regeneration and Some Biochemical Parameters in Lathyrus Culture. *Czech J. Genet. Plant Breed.* **2014**, *50*, 77–83. [CrossRef]

37. Wang, W.; Liang, D.; Li, C.; Hao, Y.; Ma, F.; Shu, F. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. *Plant Physiol. Bioch.* **2012**, *51*, 81–89. [[CrossRef](#)]
38. Gikloo, S.T.; Elhami, B. Physiological and morphological responses of two almond cultivars to drought stress and cycocel. *Int. Res. J. Appl. Bas. Sci.* **2012**, *3*, 1000–1004.
39. Sivritepe, N.; Erturk, U.; Yerlikaya, C.; Turkan, I.; Bor, M.; Ozdemir, F. Response of the cherry rootstock to water stress induced in vitro. *Biol. Plant.* **2008**, *52*, 573–576. [[CrossRef](#)]
40. Jiménez, S.; Dridi, J.; Gutiérrez, D.; Moret, D.; Irigoyen, J.J.; Moreno, M.A.; Gogorcena, Y. Physiological, biochemical and molecular responses in four *Prunus* rootstocks submitted to drought stress. *Tree Physiol.* **2013**, *33*, 1061–1075. [[CrossRef](#)]
41. Šircelj, H.; Tausz, M.; Grill, D.; Batič, F. Detecting different levels of drought stress in apple trees (*Malus domestica* Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters. *Sci. Hortic.* **2007**, *113*, 362–369. [[CrossRef](#)]
42. Liu, B.; Liang, J.; Tang, G.; Wang, X.; Liu, F.; Zhao, D. Drought stress affects on growth, water use efficiency, gas exchange and chlorophyll fluorescence of *Juglans* rootstocks. *Sci. Hortic.* **2019**, *250*, 230–235. [[CrossRef](#)]
43. Baker, N.R.; Rosenqvist, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 1607–1621. [[CrossRef](#)]
44. Appel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 373–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pérez-Pérez, M.E.; Lemaire, S.D.; Crespo, J.L. Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiol.* **2012**, *160*, 156–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zhong, Y.-P.; Li, Z.; Bai, D.-F.; Qi, X.-J.; Chen, J.-Y.; Wei, C.-G.; Lin, M.-M.; Fang, J.-B. In Vitro Variation of Drought Tolerance in Five *Actinidia* Species. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2018**, *143*, 226–234. [[CrossRef](#)]
47. Zhang, F.; Xue, H.; Lu, X.; Zhang, B.; Wang, F.; Ma, Y.; Zhang, Z. Autotetraploidization enhances drought stress tolerance in two apple cultivars. *Trees* **2015**, *29*, 1773–1780. [[CrossRef](#)]

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



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).