

**Univerzita Hradec Králové**  
**Přírodovědecká fakulta**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2023**

**Bc. Dominika Dobrovolná**

**Univerzita Hradec Králové**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra biologie**

**Akumulace osmoticky aktivních látek  
v *in vitro* kulturách v podmínkách sucha**

**Diplomová práce**

Autor: Bc. Dominika Dobrovolná  
Studijní program: Učitelství pro střední školy  
Studijní obor: N3SBI-N3STV  
Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.



## Zadání diplomové práce

<b>Autor:</b>	<b>Dominika Dobrovolná</b>
Studium:	P21P0652
Studijní program:	N0114A300053 Učitelství pro střední školy
Studijní obor:	Biologie, Tělesná výchova
<b>Název diplomové práce:</b>	<b>Akumulace osmoticky aktivních látek v in vitro kulturách v podmínkách sucha.</b>
Název diplomové práce AJ:	Accumulation of osmotically active substances in in vitro cultures under water deficit.

### Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Za posledních 50 let se plocha uměle zavlažovaných polí zdvojnásobila, co vede k vyčerpávání zásob vody. Pro zajištění vysokého tržního výnosu při pěstování současných komerčních odrůd je ve většině případů nezbytné ovocné výsadby obstarat závlahovým systémem. Vzhledem k tomu roste v ovocnářském sektoru poptávka po suchovzdorných a mrazuvzdorných ovocných odrůdách, které by zmírnily ekologické i ekonomické dopady sucha v ovocnářství. Při poklesu vodního potenciálu v rostlině k hodnotám okolo  $-0,1$  MPa dochází k akumulaci prolinu a osmoticky aktivních látek (zejména glukóza, sacharóza a cukerné alkoholy) což jsou vhodné markéry pro identifikaci tolerance vůči suchu. Cílem práce je navodit osmotický vodní stres u ovocných plodin v prostředí *in vitro* kultur a monitorovat změny výše uvedených markerů.

odborné periodiká v dostupných databázích

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

# PROHLÁŠENÍ

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

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

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění 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 15. dubna 2023

Bc. Dominika Dobrovolná



## **PODĚKOVÁNÍ**

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

Děkuji Výzkumnému a šlechtitelskému ústavu ovocnářskému Holovousy s.r.o., především Mgr. Petře Jiroutové, Ph.D., za poskytnutí rostlinného materiálu a pomoc s některými analýzami.

Mé poděkování patří také RNDr. Jakubovi Tomanovi, Ph.D., z Katedry biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové, a PharmDr. Rudolfovi Andrásovi, Ph.D., z Katedry chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové, za pomoc s některými analýzami.

Chtěla bych poděkovat 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. *Akumulace osmoticky aktivních látek v in vitro kulturách v podmínkách sucha*. Hradec Králové, 2023. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Zuzana Kovalíková. 77 s.

Klimatické předpovědi varují před pokračujícím nárůstem průměrných teplot, změnami v rozložení a množství srážek a častějšími obdobími sucha. Sucho je považováno za rizikový faktor rostlinné produkce. Dopady změny klimatu spolu s rozrůstáním celosvětové populace představují pro budoucnost lidstva závažný problém. Možným řešením, jak předejít celosvětové potravinové krizi, bude pěstovat odolnější rostlinné odrůdy.

V diplomové práci byly hodnoceny vybrané biochemické parametry (akumulace osmoticky aktivních látek, syntéza kyseliny abscisové a antioxidační aktivita) u vybraných 5 odrůd jablek ('Malinové holovouské', 'Fragrance', 'Rubinstep', 'Idared', 'Car Alexander') a 5 odrůd třešní ('Regina', 'Napoleonova', 'Kaštánka', 'Sunburst', 'P-HL-C'). Vybrané tržní odrůdy byly převedeny do *in vitro* kultur. Podmínky sucha byly navozeny přidáním polyethylenglykolu (PEG) do kultivačních médií.

Stres ze sucha navozený PEG vedl u obou druhů ovoce ke zvýšené akumulaci osmotik a nárůstu hladiny kyseliny abscisové. Osmotický stres způsobil sekundární oxidační stres. V odpovědi na zvýšenou tvorbu reaktivních forem kyslíku u stresovaných rostlin vzrostla aktivita antioxidačních enzymů.

Na základě výsledků analýz byly vybrány odrůdy potenciálně odolné stresu ze sucha. Odrůdy 'Rubinstep' a 'Kaštánka' vykazovaly vyšší akumulaci osmolytů a antioxidační aktivitu. Výsledky byly porovnány s dříve publikovanými charakteristikami odrůd z hlediska odolnosti suchu a s výsledky bakalářské práce „Výzkum tolerance ovocných plodin na sucho v *in vitro* podmínkách“.

## KLÍČOVÁ SLOVA

sucho, osmotický stres, polyethylenglykol, *in vitro* kultura, jabloně, třešně, antioxidanty, osmotika, kyselina abscisová

## ANNOTATION

Dobrovolná, D. *Accumulation of osmotically active substances in in vitro cultures under water deficit*. Hradec Králové, 2023. Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Zuzana Kovalíková. 77 p.

Climate predictions warn of continued increase in average temperatures, changes in distribution and amount of precipitation and more frequent drought period in future. Drought is considered as a risk factor of crop production. Climate change impacts with global population growth represent serious problem for the future of humanity. Possible solution to avoid a global food crisis will be grow more tolerant plant cultivars.

In the Diploma Thesis selected biochemical parameters (accumulations of osmotica, synthesis of abscisic acid and antioxidant activity) of selected five apple ('Malinové holovouské', 'Fragrance', 'Rubinstep', 'Idared', 'Car Alexander') and five cherry ('Regina', 'Napoleonova', 'Kaštánka', 'Sunburst', 'P-HL-C') cultivars were evaluated. Selected market cultivars of apples and cherries were cultivated *in vitro* on medium containing different levels of polyethylene glycol (PEG). PEG simulated osmotic stress in plants.

PEG-induced water stress caused increased accumulation of osmolytes and content of abscisic acid in both fruit species. Drought stress caused secondary oxidative stress. In response to the increased production of reactive oxygen species in stressed plants antioxidant activity increased.

Based on the results of analysis potentially drought stress tolerant cultivars were determined. Cultivars 'Rubinstep' and 'Kaštánka' showed higher accumulations of osmotica and antioxidant activity. The results were compared with previous characteristics of cultivars in terms of drought resistance and with results of the Bachelor Thesis „Drought tolerance research of fruit crops in *in vitro* conditions“.

## KEY WORDS

drought, osmotic stress, polyethylene glycol, *in vitro* culture, apples, cherries, antioxidants, osmotics, abscisic acid

# OBSAH

ÚVOD .....	9
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	11
1.1 Sucho a jeho důsledky.....	11
1.2 Stres rostlin.....	12
1.3 Vodní stres .....	13
1.4 Vliv vodního stresu na morfologii rostlin .....	14
1.5 Vliv vodního stresu na fyziologii rostlin .....	15
1.5.1 Vodní stres a fotosyntetické procesy .....	15
1.5.2 Vodní stres a syntéza stresových hormonů .....	16
1.5.3 Vodní stres a syntéza stresových proteinů.....	20
1.5.4 Vodní stres a syntéza osmoticky aktivních sloučenin .....	20
1.6 Vodní stres a tvorba reaktivních forem kyslíku .....	24
1.7 Rostlinné strategie .....	28
2 PRAKTICKÁ ČÁST .....	29
2.1 Materiál a metodiky.....	29
2.1.1 Rostlinný materiál.....	29
2.1.2 Založení <i>in vitro</i> kultur, multiplikace explantátů, navození osmotického stresu.....	31
2.1.3 Stanovení cukrů a cukerných alkoholů .....	32
2.1.4 Stanovení obsahu kyseliny abscisové.....	33
2.1.5 Stanovení celkové antioxidační aktivity .....	34
2.1.6 Stanovení aktivity antioxidačních enzymů.....	35
2.1.7 Statistické zpracování dat .....	36
2.2 Výsledky .....	37
2.2.1 Změny v obsahu osmoticky aktivních sloučenin.....	37
2.2.2 Změny v obsahu kyseliny abscisové.....	40
2.2.3 Změny v kapacitě antioxidantů a aktivitě antioxidačních enzymů .....	41
3 DISKUSE .....	44
ZÁVĚR.....	51
SEZNAM ZKRATEK .....	53
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	54
PŘÍLOHY .....	62

## ÚVOD

Rostliny jsou permanentně vystaveny působení biotických a abiotických stresů. Stres ze sucha je považován za jeden z nejrizikovějších faktorů, které ovlivňují růst, vývoj a produkci rostlin (Anjum et al. 2011; Aroca 2012). V důsledku klimatické změny dochází ke zvyšování globální průměrné teploty, tání ledovců, vzestupu hladin oceánů, častějšímu výskytu extrémních jevů počasí, změnám ročních období a posunu vegetačních pásem a areálů rozšíření organismů (Ritchie et Roser 2017). Klimatické modely varují před pokračujícím nárůstem průměrných teplot, změnami v rozložení a množství srážek a častějším výskytem období sucha (IPCC 2018).

Dopady klimatické změny spolu s rozrůstáním celosvětové populace představují pro budoucnost lidstva významný problém. Dle Godfraye et al. (2010) celosvětová populace pravděpodobně do roku 2050 dosáhne 9 miliard. K zajištění dostatečného množství potravy a uspokojení zvyšující se poptávky po potravinách, bude nezbytné zvýšit jejich produkci, tedy i produkci zemědělských plodin. Jedním z možných řešení, jak se vyhnout celosvětové potravinové krizi, bude pěstování rostlinných odrůd s vyššími výnosy, které budou lépe odolávat nepříznivým klimatickým podmínkám (Wheeler et Braun 2013).

Rostliny reagují na stres ze sucha morfologickými, fyziologickými a biochemickými změnami. Prvotní reakcí rostlin na stres ze sucha je snížení buněčného turgoru. Pokles turgoru se projeví vadnutím rostlin. Vadnoucí rostliny stáčejí listy, čímž zmenšují plochu pro transpiraci. Pokles turgoru ve svěracích buňkách průduchů rostlin vede k uzavírání průduchových štěrbin. Suzavřením průduchů dojde k přerušení příjmu oxidu uhličitého, a tedy ke zpomalení jeho asimilace. Za velkého vodního stresu se fotosyntéza úplně zastavuje. V důsledku přerušení růstu a dělení buněk dochází k zastavení zvětšování listové plochy a ke snížení produkce čerstvé a suché hmoty (Farooq et al. 2009; Khoyerdi et al. 2016).

V důsledku stresu ze sucha na rostliny působí také sekundárního oxidační stres. Ve stresovaných rostlinách dochází ke zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS). Ty následně poškozují buňky rostlin, především lipidy, proteiny a nukleové kyseliny (Khoyerdi et al. 2016). V reakci na zvýšenou produkci ROS během stresu se u rostlin vyvinuly enzymatické a neenzymatické antioxidační systémy, které umožňují radikály odstraňovat. Neenzymatickými antioxidanty jsou např. kyselina askorbová, glutathion, karotenoidy, tokoferoly, flavonoidy a taniny. Mezi enzymatické antioxidanty lze zařadit např. superoxid dismutázu (SOD), katalázu (CAT), askorbát peroxidázu (APX) a glutathion reduktázu (GR) (Slováková et Mistrík 2007).

Významným mechanismem, kterým se rostliny brání poškození stresem ze sucha, je syntéza a akumulace osmoticky aktivních látek (aminokyseliny, rozpustné cukry, cukerné alkoholy). Tyto látky snižují osmotický potenciál buněk a udržují buněčný turgor (Anjum et al. 2011). Kompatibilní osmolyty jsou rovněž zdroji energie pro růst rostlin, stabilizují buněčné membrány a pravděpodobně mají význam také jako signální molekuly (Ovesná et Janská 2011).

Za vodního stresu rostliny syntetizují stresové hormony (kyselina abscisová, ethylen) a stresové proteiny (prolin, LEA proteiny, HSP proteiny). Kyselina abscisová (ABA) je fytohormon, který hraje důležitou roli v regulaci růstu, vývoje a vodního režimu rostlin. Stresové proteiny chrání rostliny před poškozením významných proteinů a buněčných membrán (Ashraf et al. 2011).

Cílem diplomové práce bylo vyhodnotit vybrané biochemické parametry (akumulace osmoticky aktivních látek, syntéza kyseliny abscisové, antioxidační aktivita) u vybraných 5 odrůd jabloní ('Malinové holovouské', 'Fragrance', 'Rubinstep', 'Idared', 'Car Alexander') a 5 odrůd třešní ('Regina', 'Napoleonova', 'Kaštánka', 'Sunburst', 'P-HL-C'). Vybrané tržní odrůdy jabloní a třešní byly převedeny do *in vitro* kultur. Osmotický stres byl navozen přidáním polyethylenglykolu (PEG) do kultivačních médií. Jednotlivé odrůdy na PEG indukovaný stres reagovaly odlišně. Prostřednictvím analýz proto bylo možné sledovat rozdíly v akumulaci osmolytů, syntéze kyseliny abscisové a aktivitě antioxidačních enzymů. Na základě výsledků analýz byly vybrány odrůdy potenciálně odolné vůči stresu ze sucha.

Diplomová práce navazuje na bakalářskou práci „Výzkum tolerance ovocných plodin na sucho v *in vitro* podmínkách“, ve které byly hodnoceny morfologické (čerstvá a suchá hmotnost, obsah vody, plocha listů), fyziologické (obsah chlorofylů a karotenoidů) a biochemické parametry (ROS, obsah malondialdehydu a prolinu) u vybraných odrůd jabloní a třešní. Výsledky diplomové práce byly porovnány s dřívějšími charakteristikami odrůd z hlediska odolnosti suchu a s výsledky, kterých bylo dosaženo v bakalářské práci.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Sucho a jeho důsledky

Voda je jednou ze základních podmínek života na Zemi. Všechny životní děje, které probíhají v živých organismech, jsou na vodě závislé. Voda je považována za nejvíce limitující faktor růstu, vývoje a produktivity rostlin (Anjum et al. 2011; Aroca 2012). Dostatečné zásobení rostlinných buněk vodou je nezbytné pro zachování fyziologických a biochemických procesů (fotosyntéza, respirace apod.). Voda je univerzálním rozpouštědlem organických a anorganických látek, složkou makromolekul, transportním médiem, stavební látkou (rostlinám dodává základní stavební prvky buněčných struktur vodík a kyslík) a činitelem, který ovlivňuje tepelný režim rostlin (Kincl et Krpeš 2000).

Deficit vody v prostředí, který vzniká v důsledku nedostatku atmosférických srážek a který negativně ovlivňuje růst a vývoj rostlin a jejich produkci, nazýváme sucho. Český hydrometeorologický ústav (ČHMÚ) (2022), který sucho definuje jako nedostatek vody v atmosféře, půdě nebo v rostlinách, rozlišuje sucho klimatické, půdní a hydrologické. Termín klimatické sucho vyjadřuje déletrvající srážkový deficit. Srážkové úhrny leží pod dlouhodobým průměrem. Půdní sucho značí stav, kdy jsou kořeny rostlin nedostatečně zásobeny vodou a u rostlin dochází k narušení vodního režimu. Vlhkost půdy závisí na množství, intenzitě a frekvenci srážkových úhrnů, na evaporaci a na vlastnostech půdy. Hydrologické sucho, které vzniká v důsledku nedostatku atmosférických srážek, vyjadřuje snížení stavu povrchových a podzemních zdrojů vody.

Wilhite (2005) rozlišuje 4 typy sucha: meteorologické, zemědělské, hydrologické a socioekonomické. Meteorologické sucho vzniká v důsledku dlouhodobého nedostatku atmosférických srážek. Vzhledem ke značným rozdílům srážkových úhrnů v jednotlivých oblastech nelze vyjádřit univerzální hodnotu srážkových úhrnů, která by vyjadřovala sucho. Závažnost sucha, kterému jsou rostliny vystaveny, lze spolehlivěji posoudit podle stavu vody v rostlině (např. vodní potenciál buněk ( $\psi_w$ ), vodní sytostní deficit (WD), relativní obsah vody (RWC) apod.). Hodnota vodního potenciálu listů do -0,5 MPa značí u běžných mezofytních rostlinných druhů mírný vodní stres. Rozmezí vodního potenciálu od -0,5 do -1,5 MPa vyjadřuje středně velký stres. Hodnoty nižší než -1,5 MPa značí velmi silný stres, při kterém dochází v rostlinných buňkách k poklesu turgoru a vadnutí (Procházka et al. 1998). Relativní obsah vody se při mírném stresu pohybuje v intervalu 60 až 70 %, při středním stresu 40 až 60 % a při silném stresu 0 až 40 % (Laxa et al. 2019). Meteorologické sucho je příčinou dalších typů sucha. Termínem zemědělské sucho označujeme stav, kdy je v půdě nedostatek vláhy pro růst, vývoj a produkci hospodářských plodin. Hydrologické sucho vyjadřuje snížení stavu povrchových a podzemních vod. Socioekonomické sucho zahrnuje všechny negativní vlivy srážkového deficitu na lidskou společnost (zemědělství, lesnictví,

dostatek pitné vody, energetika a průmysl, doprava, rekreace apod.) (Wilhite 2005).

Sucho lze dále charakterizovat dle intenzity, délky trvání a velikosti zasažené plochy. Důsledky sucha rovněž závisí na období jeho nástupu. Rostliny jsou vodnímu deficitu nejvíce náchylné v raných stádiích vývoje (Wilhite 2005; Laxa et al. 2011).

Nejzávažnější důsledky představuje sucho pro zemědělství a lesnictví. Nedostatek půdní vláhy se projeví snížením produktivity rostlin. Období beze srážek oslabuje stromy a podporuje šíření škůdců (např. kůrovcové kalamity). Podle Ashrafa et Foolada (2007) je 45 % zemědělské půdy vystaveno trvalému, nebo častému suchu. Podle Wilhita (2005) je ročně zasaženo velkým až extrémním suchem 14 % zemědělské půdy.

Nezanedbatelné jsou výdaje za vodu na zavlažování zemědělské půdy. Více než 40 % zemědělských plodin je v současnosti pěstováno na zavlažovaných půdách. Klimatické modely předpovídají pokračující nárůst průměrných teplot, úbytek srážek a jejich nerovnoměrné rozložení a častější výskyt období sucha (IPCC 2018). Do budoucna lze proto očekávat, že se bude plocha zavlažované zemědělské půdy zvětšovat a spotřeba vody poroste. Podle dat Českého statistického úřadu (ČSÚ) z roku 2010 (ČSÚ 2010) měla v České republice zavlažovaná půda rozlohu 19 196 ha, zatímco v roce 2020 byla rozloha zavlažované půdy 22 019,33 ha (ČSÚ 2020). V mnoha oblastech se spotřebuje na zavlažování více vody, než se obnoví z přirozených zdrojů. Nadměrné zavlažování je příčinou ztráty živin a špatného provzdušnění půd (Škodáček et al. 2011). Sucho má rovněž negativní vliv na kvalitu půdy. Nízké srážkové úhrny, vysoký povrchový výpar, zvětrávání hornin, zavlažování a nevhodné zemědělské postupy jsou příčinou snižování obsahu vody v půdě a narůstajícího zasolení půd (Ashraf et Foolad 2007). Dle IPCC 2022 bude v polovině 21. století 10 % rozlohy zemědělské půdy nevhodné pro pěstování zemědělských plodin.

## **1.2 Stres rostlin**

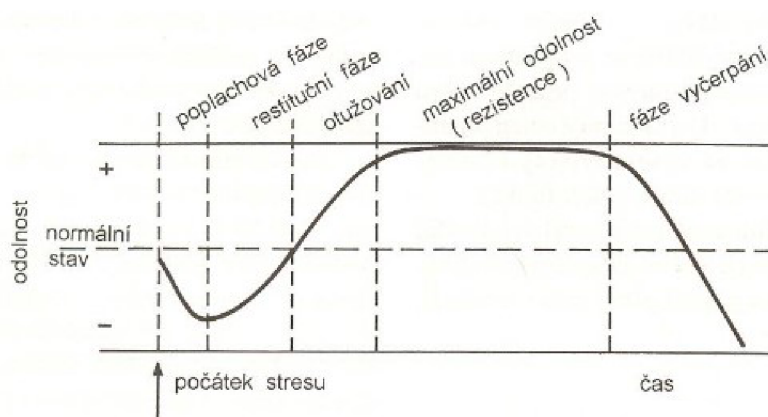
Rostliny jsou po celý život vystaveny proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Působení těchto podmínek může rostliny poškozovat. Vlivy prostředí, které působí nepříznivě na rostliny, označujeme jako stresové faktory (stresory). Termín stres vyjadřuje stav, během kterého je na rostlinu kladena zvýšená zátěž (Procházka et al. 1998).

Rostliny jsou nepřetržitě vystaveny působení biotických a abiotických stresových faktorů. Za biotické stresové faktory považujeme negativní vlivy jiných organismů na rostliny (viry, bakterie, houby, herbivoři, parazitické rostliny apod.). Příčinou



abiotického stresu je nadbytek, nebo nedostatek fyzikálního nebo chemického podnětu. Mezi fyzikální stresory lze zařadit mechanické účinky větru, nadměrné viditelné a UV záření, extrémní teploty (horko, chlad, mráz) apod. Chemickými stresory jsou nedostatek vody (sucho), kyslíku (hypoxie, anoxie), živin, nadbytek minerálních látek (zasolení), přítomnost toxických látek v půdě a ve vzduchu apod. (Procházka et al. 1998).

Vzhledem k přisedlému způsobu života si rostliny musely vyvinout obranné mechanismy, které je před působením nepříznivých vlivů prostředí chrání. Stresová reakce je soubor odpovědí, kterými rostliny reagují na změny podmínek vnějšího prostředí a na přítomnost stresorů (Obr. 1). Vlivem stresoru dojde k narušení buněčných struktur a fyziologických dějů (poplachová fáze). Informace o přítomnosti stresoru se mezi rostlinnými buňkami šíří prostřednictvím signálních molekul. Není-li působení stresorů pro rostlinu letální, dojde k mobilizaci obranných mechanismů, které rostlině pomohou obnovit narušenou homeostázu (restituční fáze). Díky obranným mechanismům je rostlina schopna odolávat stresovým podmínkám (fáze rezistence). Intenzivní a dlouhodobý stres vede k odumření rostliny (fáze vyčerpání). Průběh stresové reakce závisí na intenzitě a délce působení stresového faktoru a na druhu rostliny (odolnost vůči působení stresorů je druhově specifická), jejím zdravotním stavu, vývojové fázi apod. (Procházka et al. 1998).



Obrázek 1 Průběh stresové reakce (Procházka et al. 1998)

### 1.3 Vodní stres

Stres z nedostatku vody (vodní stres) vzniká v důsledku působení abiotických stresových faktorů sucha, zasolení a vysokých a nízkých teplot (Anjum et al. 2011; Aroca 2012). Vyjadřuje stav, při kterém dochází v rostlinných buňkách k narušení bilance mezi příjmem a výdejem vody. V podmínkách vodního deficitu je obsah vody v buňce nižší než při plné turgescenci. Vodní stres je doprovázen osmotickým stresem, který lze definovat jako vytékání vody z buněk v důsledku rozdílů v osmotických koncentracích mezi vnitřním prostředím buněk a vnějším

prostředím. Voda se pohybuje ve směru gradientu vodního potenciálu. Je-li v okolním prostředí vyšší koncentrace osmoticky aktivních látek než uvnitř buňky, vytéká voda skrze vakuolární membránu, cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu ven z buňky. U rostlin vyvolává vodní a osmotický stres řadu morfologických, fyziologických a biochemických změn (Kincl et Krpeš 2000; Jaleel et al. 2009).

#### **1.4 Vliv vodního stresu na morfologii rostlin**

V důsledku půdního a atmosférického sucha dochází ke snížení obsahu vody v rostlinách. Voda je základní podmínkou života rostlin. Je nezbytná pro optimální průběh metabolických procesů. Akutní reakcí rostlin na přítomnost vodního deficitu je pokles buněčného turgoru. Snížená turgescence rostlinných buněk se projeví vadnutím rostlin, uzavřením listových průduchů a snížením expanze, prodlužování a dělení buněk. Vadnoucí rostliny stáčíjí listy, čímž zmenšují plochu pro transpiraci a současně zachycují menší množství slunečního záření (vodní stres působí často v kombinaci s vysokým ozářením) (Anjum et al. 2017).

Uzavřením průduchových štěrbin v důsledku snížení objemu cytoplazmy a turgoru ve svěracích buňkách rostliny předcházejí nadměrným ztrátám vody transpirací. Uzavřenými průduchy ale rostliny nemohou přijímat oxid uhličitý, čímž je jeho fixace v Calvinově cyklu narušena a akumulace asimilátů se sníží. V podmínkách silného nebo dlouhodobého vodního stresu může dojít k úplnému zastavení fotosyntézy. Zachování plné turgescence je proto hlavním předpokladem pro udržení dělení a růstu buněk (Farooq et al. 2009). U stresovaných rostlin je možné pozorovat menší listovou plochu, sníženou produkci čerstvé a suché biomasy, nižší počet listů a zvýšení poměru podzemních částí rostlin k nadzemním. Zmenšením velikosti listové plochy a počtu listů rostliny ztrácí méně vody transpirací. Za vodního stresu dochází ke změnám v distribuci a akumulaci asimilátů. Produkty fotosyntetických reakcí jsou transportovány ke kořenům, kde se hromadí a podporují růst kořenového systému. Kořeny zastávají u vyšších rostlin hlavní úlohu v příjmu vody. Velký kořenový systém má přístup k většímu objemu půdy (Anjum et al. 2017; Laxa et al. 2019).

Vodní stres ovlivňuje životní cyklus rostlin. Má vliv na nástup a délku trvání vývojových fází. Indukuje dřívější senescenci a odumírání listů. Živiny z odumřelých vegetativních orgánů jsou transportovány ke generativním orgánům, a rostlina tak může dokončit vegetační cyklus. Reprodukce je v podmínkách sucha opožděna (Anjum et al. 2017).

## 1.5 Vliv vodního stresu na fyziologii rostlin

V reakci na vodní deficit dochází v rostlinách ke změnám koncentrací asimilačních pigmentů, syntetizují se stresové hormony kyselina abscisová (ABA) a ethylen, aminokyselina prolin a stresové proteiny, LEA proteiny (Late Embryogenesis Abundant Proteins), proteiny teplotního šoku (Heat Shock Proteins) a další ochranné proteiny (Ashraf et al. 2011).

### 1.5.1 Vodní stres a fotosyntetické procesy

Asimilační pigmenty (chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a karotenoidy) jsou přítomny v chloroplastech, kde absorbují sluneční záření a podílí se na produkci redukčních sil. V důsledku vodního stresu dochází v rostlinách ke snížení koncentrace chlorofylů v listech, čímž se sníží i obsah zachycených fotonů. Rostliny se takto brání nadměrné produkci kyslíkových radikálů, které poškozují rostlinné buňky (Jaleel et al. 2009; Khoyerdi et al. 2016). Karotenoidy jsou významnými neenzymatickými antioxidanty. Za vodního stresu může jejich koncentrace vzrůst. Např.  $\beta$ -karoten vázaný na fotosystémy I a II (PS I a II) v chloroplastech brání tvorbě singletového kyslíku ( $^1O_2$ ), a chrání tak chlorofyly před oxidativním poškozením (Šircelj et al. 2007; Jaleel et al. 2009). Vlivem úbytku asimilačních pigmentů dochází u stresovaných rostlin ke žloutnutí a hnědnutí listů (Khoyerdi et al. 2016).

Samotné fotosyntetické procesy nereagují na vodní deficit tak citlivě jako například růst a expanze listů. Vodní stres může redukovat fotosyntézu třemi způsoby: 1. Uzavřením listových průduchů rostliny v podmínkách stresu ze sucha snižují transpiraci. Současně ale dochází k omezení výměny plynů, což vede ke snížení asimilace  $CO_2$ . 2. Redukcí aktivity chloroplastů a toku elektronů ve světelných reakcích fotosyntézy. Dlouhodobé snížení obsahu vody vede ke značnému vyčerpání jádra PS II. 3. Snížením syntézy a aktivity enzymů, které se uplatňují v tmavých procesech fotosyntézy. Množství a aktivita enzymu ribulóza-1,5-bisfosfátcarboxyláza (Rubisco), jehož syntéza je v podmínkách sucha snížena v důsledku nedostatečného zásobování ATP a NADPH, ovlivňuje rychlost fotosyntetické asimilace uhlíku. Dále může být narušena aktivita thylakoidní ATP-syntázy (Reddy et al. 2004; Slováková et Mistrík 2007; Farooq et al. 2009; Zargar et al. 2017).

Vodní stres je často doprovázen stresem z nadměrného ozáření. Nadbytek zachyceného slunečního záření u rostlin vyvolává fotooxidační stres a může vést k přehřátí rostlinných pletiv. Nadměrné ozáření je příčinou tzv. fotoinhibice, která vede k narušení fyziologických a biochemických procesů světelné fáze fotosyntézy. Poškozuje PS II a způsobuje změny ve struktuře a funkcích elektronového transportního řetězce. Účinnost fotosyntézy klesá (Procházka et al. 1998).

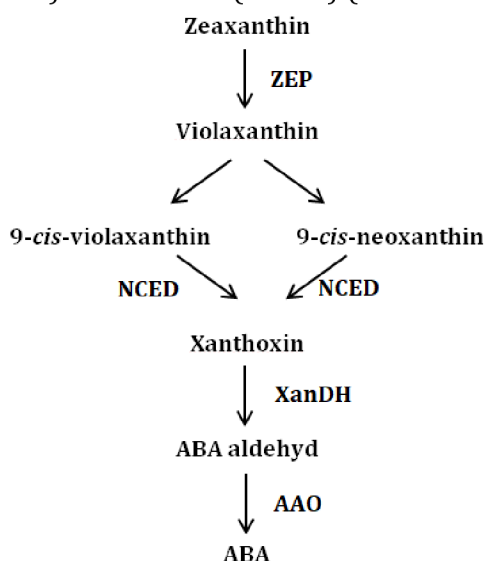
## 1.5.2 Vodní stres a syntéza stresových hormonů

Fytohormony jsou rostlinné růstové regulátory. V rostlinách jsou zastoupeny v nízkých koncentracích. Ovlivňují růst a vývoj rostlin, metabolické procesy a v neposlední řadě také reakce rostlin na stresové podmínky. Jsou významnými signálními molekulami, které spouštějí a zprostředkovávají stresové reakce. Rostlinné hormony spolu vzájemně interagují. V reakci rostlin na sucho jsou významné především fytohormony kyselina abscisová (ABA) a ethylen (Ashraf et al. 2011).

### Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (Abscisic acid, ABA) je rostlinný hormon, který hraje zásadní roli v regulaci růstu a vývoje rostlin za stresových podmínek. Lze ji považovat za nejvýznamnější stresový fytohormon. Po chemické stránce se jedná o C<sub>15</sub> seskviterpen (Ashraf et al. 2011; Dar et al. 2017).

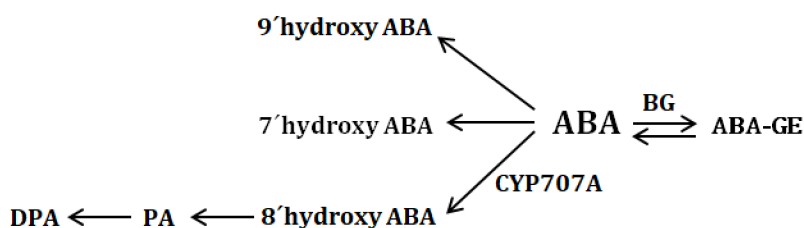
Za stresových podmínek je ABA syntetizována v různých orgánech rostlin (v kořenových čepičkách, dospělých listech, plodech apod.). Syntéza ABA probíhá intracelulárně v chloroplastech a dalších plastidech (Zhang et al. 2019). Signálem pro počátek syntézy je změna turgoru a zvýšení záporného vodního potenciálu v rostlinných pletivech. Působením enzymu zeaxanthin epoxidázy (ZEP) dochází v plastidech k přeměně karotenoidu zeaxanthinu na violaxanthin. Violaxanthin je přeměněn na neoxanthin, a následně jsou oba izomerizovány na 9-*cis*-violaxanthin a 9-*cis*-neoxanthin. Enzymy, které katalyzují tuto reakci, zatím nebyly identifikovány. Jejich oxidačním štěpením katalyzovaným enzymem 9-*cis*-epoxykarotenová dioxygenáza (NCED) vzniká karotenoid xanthoxin, který je následně translokován z plastidů do cytoplazmy, kde je působením xanthoxin dehydrogenázy (XanDH) přeměněn na ABA aldehyd. Následně působením enzymu ABA aldehyd oxidáza (AAO) vzniká ABA (Obr. 2) (Perin et al. 2019; Jia et al. 2022).



Obrázek 2 *De novo* syntéza kyseliny abscisové (ABA) dle Perina et al. (2019)

Během osmotického stresu (sucho, chlad, zasolení) dochází v rostlinách ke zvýšení hladiny ABA (během 4 až 8 hodin se může zvýšit až 50krát) a jejích derivátů kyseliny fázové (PA), kyseliny dehydrofázové (DPA) a  $\beta$ -D-glukopyranosyl abscisátu (ABA-GE) (Daszowska-Golec 2016; Perin et al. 2019). Po skončení vláhového deficitu se její hladina vrací do normálu (Taiz et Zeiger 2006). Význam derivátů ABA v reakci rostlin na vodní deficit dosud nebyl zcela objasněn. Tyto látky umožňují rychlou resyntézu ABA za stresových podmínek a napomáhají utváření rovnováhy vnitřního prostředí (Perin et al. 2019).

Jsou známy dvě hlavní cesty katabolismu ABA – katabolismus ABA a konjugace s glukózou (glc-konjugace) (Obr. 3). Katabolismem ABA vznikají hydroxylované ABA, PA a DPA. Reakci katalyzuje enzym ABA-8-hydroxyláza (CYP707A). Cestou glc-konjugace dochází glykosylací enzymem  $\beta$ -glukosidázou (BG) ke vzniku neaktivní ABA. Tato reakce je reverzibilní (Perin et al. 2019). Za stresových podmínek rovněž dochází k nárůstu hladin enzymů podílejících se na syntéze ABA (ZEP, NCED apod.) a ke zvýšení exprese genů spojených se syntézou ABA (AAO, CYP707A apod.) (Dar et al. 2017; Zhang et al. 2019).



**Obrázek 3 Katabolismus kyseliny abscisové (ABA) a glc-konjugace dle Perina et al. (2019)**

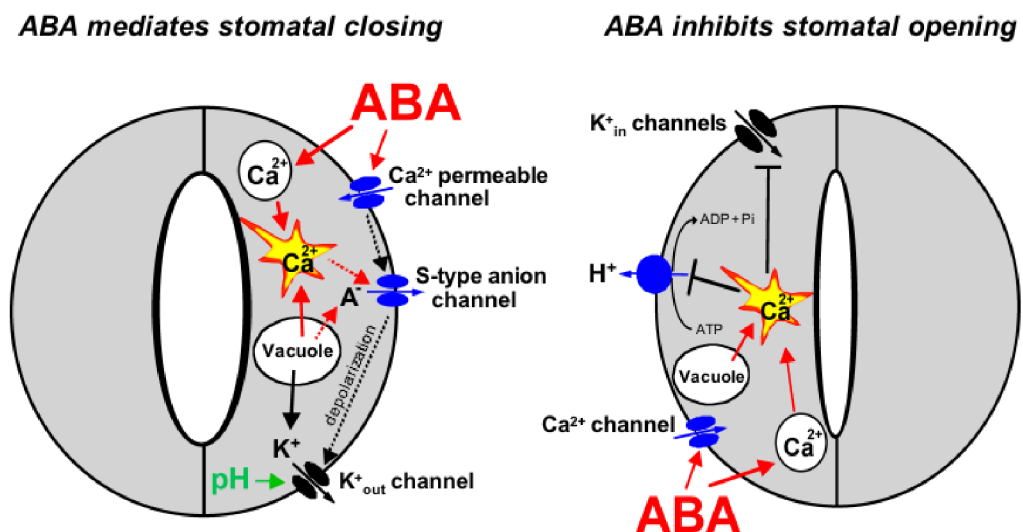
Z míst syntézy je ABA transportována vodivými pletivy xylému (ABA syntetizovaná v kořenech) a floému (ABA syntetizovaná v listech). Transport probíhá pasivně i aktivně. Je-li ABA protonizovaná, může jako slabá kyselina pasivně procházet biologickými membránami. Aktivní transport se uskutečňuje prostřednictvím transportérů (Daszowska-Golec 2016; Dar et al. 2017; Zhang et al. 2019).

ABA ovlivňuje růst a vývoj rostlin. Brzdí prodlužovací růst nadzemních částí rostlin a vývoj embrya (inhibuje přechod z embryonální fáze do fáze klíčení, inhibicí růstu způsobuje zmenšení listové plochy), navozuje dormanci, inhibuje kvetení, stimuluje syntézu zásobních proteinů a lipidů, zvyšuje akumulaci osmoticky aktivních látek, reguluje hladinu ROS, ovlivňuje interakce mezi rostlinou a mikroorganismy a stavbu kořenů (stimuluje prodlužování kořenů). Vytvořením velkého kořenového systému rostlina získá přístup květšímu objemu půdy. Vysoké hladiny ABA dále způsobují senescenci listů (inhibicí uzavírání průduchů dojde k rychlým ztrátám vody v listech) a opad listů (Tworkoski et al. 2016; Dar et al. 2017).

Velmi významný je účinek ABA na průduchy. Mechanismus otevírání a zavírání průduchů probíhá na základě změn turgoru svěřacích buněk. Svěřací buňky reagují

na světlo, především na modré záření, které aktivuje iontové pumpy. Do svěracích buněk proudí draselné kationty  $K^+$ , zatímco vodíkové kationty  $H^+$  proudí ven. Zvýšená koncentrace  $K^+$  iontů uvnitř svěracích buněk způsobí pokles vodního potenciálu. Voda proudí do buněk, zvyšuje se turgor, a průduchy se otevřou. K jejich uzavření dochází při snížení turgoru způsobeného efluxem iontů  $K^+$ , štěpením sacharózy a paralelní přeměnou malátu na osmoticky neaktivní škrob (Kincl et Krpeš 2000; Campos et al. 2011; Daszowska-Golec 2016).

Při velkých vodních ztrátách a půdním suchu se na regulaci otevírání/zavírání průduchů podílí ABA. Ta je syntetizována v kořenech a transpiračním proudem vedena do svěracích buněk, kde mění transport iontů. Po navázání ABA na specifický receptor dochází k otevírání kanálů pro vápenaté ionty  $Ca^{2+}$ . Zvýšená hladina  $Ca^{2+}$  v buňce aktivuje dva různé typy aniontových kanálů: pomalu se aktivující trvalé (S-tyt) a rychlé přechodné (R-tyt). Oba zprostředkovávají uvolňování aniontů ze svěracích buněk, což způsobuje depolarizaci (Obr. 4, vlevo). Tato změna membránového potenciálu deaktivuje dovnitř usměřňující  $K^+$  kanály ( $K^+_{in}$ ) a aktivuje  $K^+$  kanály směrem ven ( $K^+_{out}$ ), což má za následek výtok  $K^+$  ze svěracích buněk. Navíc ABA způsobuje alkalizaci cytosolu svěracích buněk, což přímo zvyšuje aktivitu  $K^+_{out}$  kanálu a snižuje aktivitu kanálů typu R. Trvalý výtok aniontů a  $K^+$  přispívá ke ztrátě turgoru svěracích buněk, což vede k uzavření průduchů. Protože vakuoly mohou zabírat více než 90 % objemu svěrací buňky, přes 90 % iontů exportovaných z buňky musí být během uzavírání průduchů nejprve transportováno z vakuol do cytosolu. Zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$  aktivuje draselné vakuolární kanály. Uvolňování aniontů z vakuol naopak není aktivováno. Otevírání průduchů je řízeno výtokem  $H^+$  přes  $H^+$ -ATPázy umístěné v plazmatické membráně. Ty mohou zároveň řídit příjem  $K^+$  prostřednictvím  $K^+_{in}$  kanálů (Obr. 4, vpravo). Cytosolické zvýšení  $Ca^{2+}$  v průvodních buňkách negativně reguluje jak  $K^+_{in}$  kanály, tak  $H^+$ -ATPázy plazmatické membrány, což poskytuje mechanický základ pro ABA a  $Ca^{2+}$  inhibici vychytávání  $K^+$  během otevírání průduchů (Mäser et al. 2003).



Obrázek 4 Vliv ABA na zavírání a otevírání průduchů (Mäser et al. 2003)



ABA je významnou signální molekulou. Za přítomnosti stresových faktorů spouští kaskádu obranných mechanismů. Řídí expresi genů kódující proteiny, které jsou významné v akumulaci osmolytů (prolin), syntéze LEA proteinů, proteinů teplotního šoku a dalších ochranných proteinů (Zhang et al. 2019).

Vodní deficit spouští 2 signální dráhy aktivující expresi genů podílejících se na adaptaci abiotickým stresům – ABA-dependentní (ABRE) a ABA-independentní (DRE/CRT), které se liší svými komponenty. ABA-dependentní signální dráha zahrnuje ABA responzivní element (ABRE) a transkripční faktory ABRE-binding protein/ABRE-binding factors (AREB/ABFs), které se uplatňují v expresi genů závislých na ABA. V expresi genů nezávislých na ABA jsou významné transkripční faktory dehydration-responsive element/C-repeat (DRE/CRT) a DRE-/CRT-binding protein 2 (DREB2). Všechny tyto faktory se podílejí na genové expresi v podmínkách osmotického stresu (Yoshida et al. 2014). Významné je vzájemné působení mezi ABA a dalšími fytohormony ve stresové signalizaci, čímž vzniká složitá signální síť (např. antagonistické účinky ABA a cytokininů na listové průduchy) (Ashraf et al. 2011).

## **Ethylen**

Ethylen je plynný fytohormon, který ovlivňuje růstové a vývojové procesy rostlin a toleranci rostlin působení abiotických stresových faktorů. Je syntetizován v cytoplazmě z aminokyseliny L-metioninu. Většina ethyleny difunduje do mezibuněčných prostor a průduchy do vnějšího prostředí. Zbýlý ethylen se částečně rozpouští v cytoplazmě, kde se váže na specifické vazebné bílkoviny a vyvolává účinky (Procházka et al. 1998). Ethylen stimuluje respiraci, senescenci, dozrávání plodů, uzavírání průduchů a opad listů (snížení vodních ztrát transpirací). Jeho hladina u rostlin vystavených vodnímu stresu narůstá. Zvýšená hladina ethyleny dále stimuluje syntézu fytoalexinů a zvyšuje aktivitu enzymů, které se podílejí na stresových reakcích rostlin (Ashraf et al. 2011).

Dalšími hormony, které se uplatňují v reakcích rostlin na působení abiotických stresových faktorů včetně sucha jsou cytokininy, jasmonáty, kyselina salicylová, auxiny a brassinosteroidy. Cytokininy chrání buněčné struktury, stimulují syntézu aminokyselin (prolin) a proteinů a zpomalují stárnutí buněk. Vzhledem k indukci otevírání průduchů (cytokininy působí antagonisticky na ABA) dochází za vláhového deficitu ke snížení jejich hladiny (Ashraf et al. 2011; Peleg et al. 2011). Jasmonáty inhibují otevírání průduchů, klíčení semen, růst rostlin a fotosyntetickou aktivitu a naopak stimulují senescenci listů a jejich opad, dozrávání plodů a biosyntézu karotenoidů (Ashraf et al. 2011). Uzavírání stomat indukuje rovněž kyselina salicylová. Její hladina se během stresu zvyšuje. Auxiny zvyšují účinnost ochranných LEA proteinů a ovlivňují biosyntézu ethyleny.

Brassinosteroidy indukují akumulaci osmoprotektantů, expresi genů, které napomáhají zachování fotosyntézy, a aktivují antioxidantní enzymy (Peleg et Blumwald 2011).

### **1.5.3 Vodní stres a syntéza stresových proteinů**

#### **LEA proteiny (Late Embryogenesis Abundant Proteins)**

LEA proteiny jsou proteiny s nízkou molekulovou hmotností, složené z hydrofilních aminokyselin. Vyskytují se především v semenech rostlin. Podílejí se na ochraně rostlin před poškozením suchem, chladem a zasolením. Dle molekulárních vlastností je lze rozdělit do 5 skupin. Proteiny jsou aktivovány při vodním a osmotickém stresu. Jejich tvorba je závislá na zvýšené koncentraci ABA a je orgánově specifická. Chrání cytoplazmu a buněčné membrány před dehydratací a vychytávají ROS, které poškozují rostlinné buňky (Procházka et al. 1998; Hong-Bo et al. 2005; Zhang et al. 2019).

#### **HSP proteiny (Heat Shock Proteins)**

Proteiny teplotního šoku (Heat Shock Proteins, HSPs) jsou skupinou ochranných proteinů, jejichž tvorba je stimulována zvýšenou teplotou. Fungují jako molekulární chaperony, proteázy a ubikvitiny. Skládají proteiny a stabilizují jejich prostorové uspořádání v podmínkách vysokých teplot a oxidativního poškození. Poškozené proteiny jsou ubikvitiny označeny a prostřednictvím proteáz rozloženy na aminokyseliny, které jsou následně využity pro syntézu nových proteinů (Procházka et al. 1998). HSPs mohou vychytávat kyslíkové radikály, a chránit tak lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny před oxidativním poškozením (Ďurech et al. 2012).

### **1.5.4 Vodní stres a syntéza osmoticky aktivních sloučenin**

Osmotické přizpůsobení (osmoregulace), tedy akumulace nízkomolekulárních rozpustných organických látek (kompatibilních osmolytů) v buňkách v podmínkách vodního deficitu, je významnou fyziologickou adaptací rostlin. Jedná se o látky, které ani ve vysokých koncentracích nenarušují buněčný metabolismus a nepůsobí toxicky. Zvýšená syntéza a akumulace těchto látek zvyšuje odolnost rostlin vůči vodnímu stresu (Ashraf et al. 2011).

Osmoregulace vede ke zvýšení osmotického tlaku, a tedy ke snížení vodního potenciálu rostlinných buněk (Majumder et al. 2010). Transport vody do buňky probíhá na základě rozdílu vodního potenciálu mezi vnějším a vnitřním



prostředím. Vodní potenciál ( $\psi_w$ ) lze charakterizovat jako schopnost buněk nasávat vodu. Jedná se o veličinu, která je pro vodní režim rostlin zcela zásadní. Udává totiž molekulám vody v rostlině směr pohybu. Vodní potenciál nabývá záporných hodnot, protože aktivita molekul vody v buňce je nižší než aktivita čisté vody. Lze jej vyjádřit jako rozdíl osmotického potenciálu a tlakového potenciálu. Osmotický potenciál ( $\psi_s$ ) vyjadřuje osmotický tlak buněčné šťávy a nabývá záporných hodnot. Tlakový potenciál ( $\psi_p$ ) odpovídá turgoru, tlaku buněčné stěny, a nabývá kladných hodnot. Voda se pohybuje ve směru klesajícího vodního potenciálu (Kincl et Krpeš 2000). V důsledku osmoregulace se osmotický potenciál rostlinných buněk snižuje. Buňky tak mohou přijímat a zadržovat vodu v podmínkách sucha a nedochází u nich k poklesu buněčného turgoru, který je důležitý pro zachování metabolismu a růstu rostlin (Farooq et al. 2009; Ashraf et al. 2011).

Kompatibilní osmolyty akumulované v rostlinných buňkách hrají dále nezastupitelnou roli v ochraně buněčných membrán a biomolekul. Udržují integritu enzymů a hormonů. Působí jako molekulární chaperony, které stabilizují strukturu proteinů a současně umožňují skládání nově vzniklých proteinů a opětovné skládání poškozených proteinů. Chrání rostliny před poškozením ROS (Ashraf et Foolad 2007; Majumder et al. 2010; Ashraf et al. 2011).

Mezi kompatibilní osmolyty akumulované v rostlinných buňkách řadíme glycin betain, rozpustné sacharidy, polyoly (polyhydrické alkoholy) a aminokyseliny (zejména prolin). Tyto látky jsou přítomny v cytosolu, chloroplastech a dalších buněčných kompartmentech (Majumder et al. 2010).

### **Glycin betain**

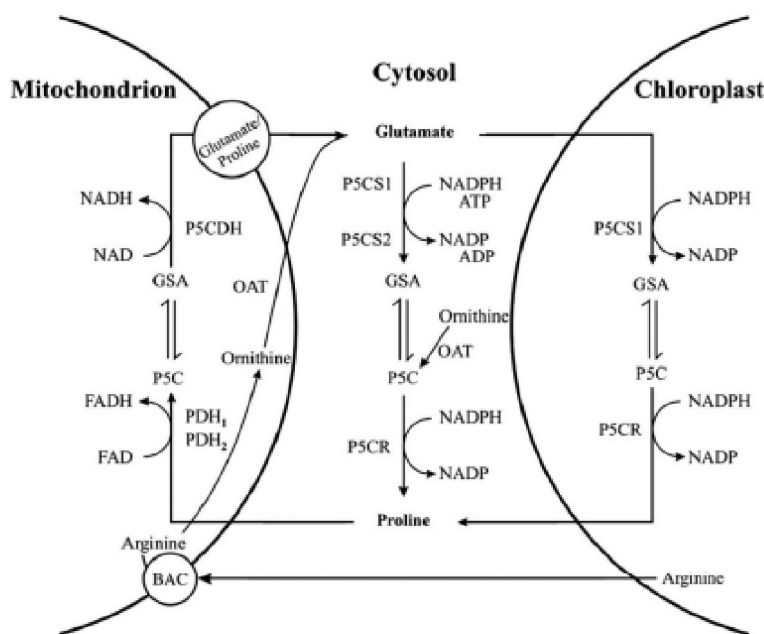
Glycin betain (GB) je významná kvartérní amoniová sloučenina, která se v podmínkách stresu ze sucha, zasolení, vysokých teplot, UV záření a těžkých kovů akumuluje v rostlinných pletivech. Je syntetizován ve stromatu chloroplastů dvěma cestami – dehydrogenací cholinu, nebo N-methylací glycinu. GB zvyšuje osmotický tlak a podílí se tak na osmotických úpravách, chrání thylakoidní membrány chloroplastů, čímž udržuje účinnost fotosyntézy, stabilizuje enzymy a buněčné membrány a má protektivní účinek i na další buněčné struktury (Ashraf et Foolad 2007; Majumder et al. 2010; Ashraf et al. 2011).

### **Prolin**

V reakci na vodní a oxidační stres dochází v rostlinách k akumulaci aminokyseliny prolin. Jedná se o neenzymatický antioxidant, který zmírňuje škodlivé účinky ROS a zvyšuje aktivitu antioxidantních enzymů (Filippou et al. 2014). Prolin působí jako zhášec singletového kyslíku a je schopen zachycovat hydroxylové radikály, čímž brání poškození nukleových kyselin, proteinů a buněčných membrán (Campos

et al. 2011). Prolin je považován za významný molekulární chaperon, který stabilizuje strukturu proteinů. Podílí se také na genové expresi ochranných proteinů a signalizaci stresové reakce. Prolin představuje pro rostliny zdroj energie. Oxidací jedné molekuly prolinu se uvolní 30 molekul adenosintrifosfátu (ATP) (Kaur et al. 2015). Prolin dále hraje klíčovou roli jako kompatibilní osmolyt v osmotickém přizpůsobení. Syntéza a akumulace prolinu proto souvisí s odolností rostlin vůči vodnímu stresu (Campos et al. 2011; Kaur et al. 2015; Khoyerdi et al. 2016).

Prolin je syntetizován glutamátovou, nebo ornitinovou cestou v chloroplastech a cytosolu (Obr. 5). Glutamátová cesta syntézy je klíčová. Glutamát je dvěma po sobě jdoucími redukcemi, katalyzovanými enzymy 1-pyrrolin-5-karboxylát syntetázou (P5CS) a 1-pyrrolin-5-karboxylát reduktázou (P5CR), přeměněn na prolin. K akumulaci prolinu za stresových podmínek dochází v důsledku zvýšení aktivity klíčového regulačního enzymu v biosyntéze prolinu P5CR, nebo snížení aktivity prolindehydrogenázy (PDH) (Ashraf et al. 2011; Filippou et al. 2014).



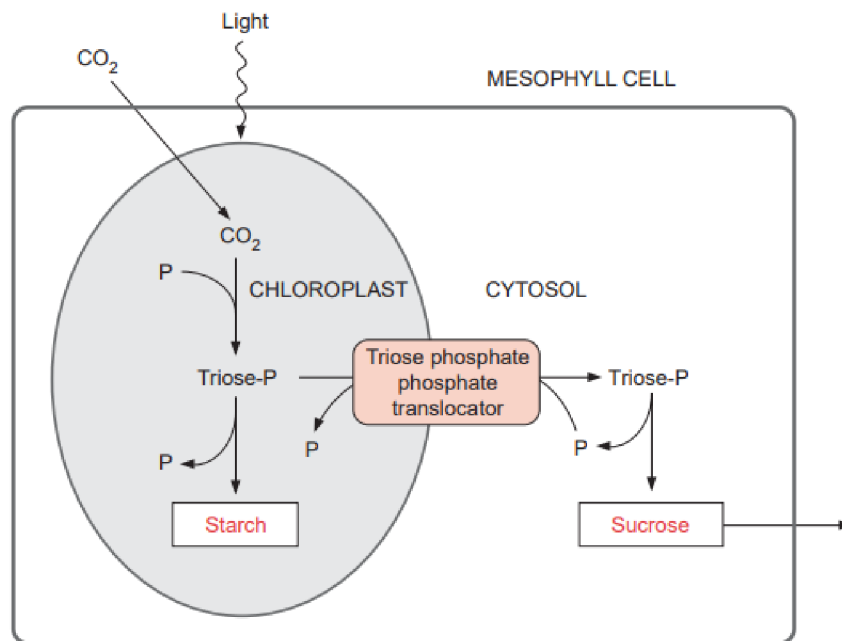
**Obrázek 5 Metabolismus prolinu v různých buněčných organelách – biosyntéza v chloroplastech a cytosolu, katalýza v mitochondriích (Kaur et al. 2015)**

## Rozpustné sacharidy

Sacharidy jsou syntetizovány v listech rostlin během fotosyntézy. Jsou zdroji energie pro metabolismus a stavebními složkami rostlin. Rozpustné cukry (např. sacharóza, fruktóza, glukóza, trehalóza) jsou významnými osmoregulačními látkami. Udržují buněčný turgor v podmínkách osmotického stresu (sucho, zasolení), stabilizují proteiny a buněčné membrány, vylučují ROS, ovlivňují expresi genů, které se podílejí na obranných reakcích rostlin, a mohou působit také

jako signální molekuly. V podmínkách sucha dochází v listech k jejich akumulaci. Ta je druhově specifická a lze ji považovat za přizpůsobení se rostlin stresovým podmínkám (Ashraf et al. 2011; Yang et al. 2019).

V Calvinově cyklu dochází za účasti enzymu Rubisco k navázání  $\text{CO}_2$  na primární akceptor ribulóza-1,5-bisfosfát (Ru-1,5-DP). Vzniká nestabilní šestiuhlíkatý meziprodukt, který se sledem reakci mění na triózofosfáty. Ty jsou výchozími látkami pro syntézu fruktózy-6-fosfátu (F-6-P), která pak může být v chloroplastech využita pro syntézu škrobu, nebo je transportována do cytosolu a využita pro syntézu sacharózy (Suc) (Obr. 6). Triózofosfáty se podílejí rovněž na regeneraci primárního akceptoru  $\text{CO}_2$  (Procházka et al. 1998).



**Obrázek 6 Triózofosfáty mohou být v chloroplastech využity pro syntézu škrobu, nebo v cytosolu pro syntézu sacharózy, která je následně transportována z mezofylových buněk (Heldt et al. 2005)**

Suc je hlavním produktem fotosyntézy. Jedná se o neredukující disacharid glukózy a fruktózy, který je hlavním transportním sacharidem vyšších rostlin (Procházka et al. 1998). Je syntetizována v cytosolu mezofylových buněk, odkud je transportována do míst spotřeby, nebo akumulace (Yang et al. 2019).

Suc může být invertázou přeměněna na fruktózu (Fru) a glukózu (Glc), nebo sacharóza syntázou na Fru a UDP-glukózu. Po vstupu do vakuoly může být Suc přeměněna vakuolární kyselou invertázou na Fru a Glc. Vzájemné přeměny sacharidů jsou reverzibilní a umožňují rostlinám udržet osmotický tlak a turgor buněk (Heldt et al. 2005; Yang et al. 2019).

V důsledku vodního deficitu dochází v listech stresovaných rostlin ke snížení fixace uhlíku fotosyntézou. Rostliny jsou ale přesto schopny akumulovat velké množství

rozpuštěných sacharidů. Míra akumulace kompatibilních osmolytů odráží schopnost rostlin vyrovnat se stresu ze sucha (Yang et al. 2019).

### **Polyoly (polyhydrické alkoholy)**

Polyoly (syn. polyhydrické alkoholy, cukerné alkoholy) jsou redukovanými formami cukrů aldóz a ketóz. Jedná se o primární produkty fotosyntézy, které jsou významnými kompatibilními osmolyty. V podmínkách stresu ze sucha, zasolení a nízkých teplot se akumulují v cytosolu rostlinných buněk a pomáhají udržovat vodní bilanci a chránit enzymy a buněčné membrány. V rostlinách se nejběžněji vyskytují polyoly mannitol a sorbitol (Noiraud et al. 2001; Ashraf et al. 2011).

Nejjednodušším alditolem je glycerol. Uplatňuje se při osmotickém přizpůsobení, stabilizuje proteiny a buněčné membrány a chrání rostlinné buňky před oxidativním poškozením (snižuje produkci kyslíkových radikálů). Za běžných podmínek je koncentrace glycerolu v rostlinách nízká. Ke zvýšené akumulaci glycerolu dochází u naklíčených semen. Akumulace zvyšuje odolnost rostlin vůči působení abiotických stresů (sucho, zasolení, nízké teploty) (Eastmond 2004).

Manitol je nejběžnější hexitol přítomný ve vyšších rostlinách. Jedná se o hlavní produkt fotosyntézy. Jeho syntéza probíhá v mezofylových buňkách z F-6-P, přes manózu-6-fosfát a manitol-1-fosfát. V podmínkách vodního deficitu jeho koncentrace narůstá. Podílí se na ochraně buněčných enzymů a membrán (Noiraud et al. 2001).

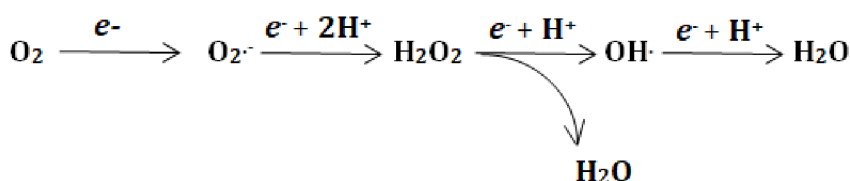
Dalším polyolem akumulovaným rostlinami v podmínkách sucha je sorbitol. Jedná se o hlavní produkt fotosyntézy ovocných stromů z čeledi *Rosaceae* (Yang et al. 2019). V podmínkách vodního deficitu se zvyšuje aktivita hlavního enzymu syntézy sorbitolu sorbitol-6-fosfát dehydrogenázy (S6PDH). Sorbitol je významným kompatibilním osmolytem a zdrojem energie pro růst a vývoj rostlin a pro průběh metabolických pochodů. Akumulací sorbitolu se rostliny brání působení kyslíkových radikálů (Lo Bianco et al. 2000).

## **1.6 Vodní stres a tvorba reaktivních forem kyslíku**

Sekundární oxidativní stres vzniká v důsledku nerovnováhy mezi produkcí reaktivních forem kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS) v rostlinách a schopností rostlin odstraňovat ROS prostřednictvím antioxidantních systémů. Nejvýznamnějšími ROS jsou singletový kyslík ( $^1O_2$ ), superoxidový radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a hydroxylový radikál ( $OH^{\cdot}$ ) (Ashraf et al. 2011).

ROS vznikají během metabolických pochodů v rostlinách jako vedlejší produkty aerobního metabolismu (fotorespirace, fotosyntéza, mitochondriální dýchání).

Vznikají v chloroplastech, mitochondriích a mikrotělískách (peroxizomy, glykozomy a glyoxyzomy). Jejich tvorba je součástí normálního buněčného metabolismu (Wang et al. 2012).  $^1\text{O}_2$  vzniká absorpcí elektromagnetické energie z fotoexcitovaných sloučenin přítomných v rostlinách. Redukcí molekuly kyslíku čtyřmi elektrony vznikají postupně  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$  a dvě molekuly vody (Obr. 7). Produktem první redukce je silný akceptor protonů  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Přijetím elektronu se  $\text{O}_2^{\cdot-}$  redukuje na  $\text{H}_2\text{O}_2$ , který je považován za první stabilní meziprodukt redukce kyslíku. Třetí elektron redukuje  $\text{H}_2\text{O}_2$  na vodu a  $\text{OH}^{\cdot}$ , který je vysoce účinným oxidantem.  $\text{OH}^{\cdot}$  je redukován posledním elektronem na molekulu vody (Pessarakli 1999; Wang et al. 2012).



**Obrázek 7 Vznik ROS postupnou čtyřelektronovou redukcí kyslíku (Pessarakli 1999)**

ROS se uplatňují jako signální molekuly, podílejí se na řízení růstu a vývoje rostlin, programované buněčné smrti (apoptóze), spouštějí obranné reakce, čímž umožňují rostlinám přizpůsobit se stresovým podmínkám apod. (Wang et al. 2012).

V rostlinných buňkách je udržována nízká koncentrace ROS. Jsou-li rostliny vystaveny stresovým faktorům, dochází k narušení rovnováhy mezi tvorbou a eliminací ROS, což vede k jejich prudkému nárůstu (Laxa et al. 2019).

Za vodního deficitu klesá turgor rostlinných buněk a dochází k uzavírání průduchů. Rostlina přijímá méně  $\text{CO}_2$  a fotosyntéza se zpomaluje. Snížení rychlosti fotosyntézy způsobí, že rostlina ve světelné fázi absorbuje více zářivé energie, než může využít pro karboxylaci  $\text{CO}_2$  v temnostní fázi (Wang et al. 2018). V elektronovém transportním řetězci dochází k narušení přenosu elektronů a nadměrné redukci za vzniku ROS. Snížený příjem  $\text{CO}_2$  je příčinou zvýšené oxidace primárního akceptoru  $\text{CO}_2$  Ru-1,5-DP, a tedy aktivace fotorespirace, během které aktivitou glykolát oxygenázy v peroxizomech vzniká množství  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Fotorespirací je fixace  $\text{CO}_2$  pozastavena. Dochází ke zpomalení oxidace NADPH. Nedostatek  $\text{NADP}^+$  (oxidovaná forma NADPH) narušuje transport elektronů a způsobuje nadměrnou redukci kyslíku během Mehlerovy reakce. Produkty této reakce jsou  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Narušení transportu elektronů ve fotosyntéze se projeví také v přenosu elektronů v dýchacím řetězci v mitochondriích. V oxidačním systému dochází k nadměrným redukcím v komplexu I (NADH dehydrogenáza) a III (cytochromreduktáza). Vzniklý  $\text{O}_2^{\cdot-}$  je převeden na  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Za nadměrnou tvorbu ROS rovněž odpovídá enzym alternativní oxidáza, který je součástí mitochondriálního

elektronového transportního řetězce a jehož aktivita během stresu ze sucha narůstá (Laxa et al. 2019).

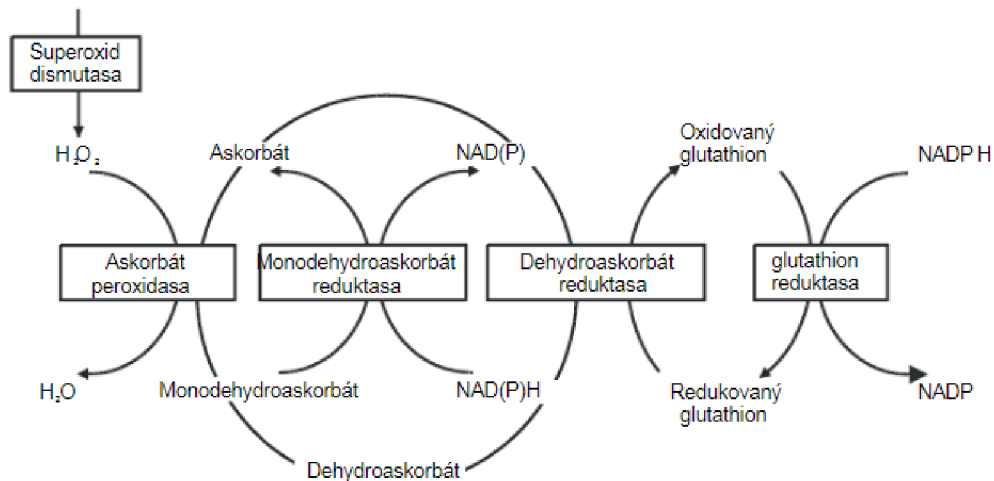
Vzniklé ROS poškozují rostlinné buňky. Působí nepříznivě především na lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. ROS jsou příčinou inhibice řady enzymů, degradace chlorofylu, narušení integrity buněčných membrán, ztráty funkcí buněčných organel apod. (Campos et al. 2011). ROS indukují peroxidaci lipidů a produkci malondialdehydu (MDA), který lze považovat za indikátor poškození buněčných membrán v období sucha (Laxa et al. 2019).

Rostliny se s negativními účinky ROS vyrovnávají pomocí antioxidačních mechanismů. Lze rozlišit enzymatické a neenzymatické antioxidační systémy. Jejich působením rostliny předcházejí vzniku oxidačního stresu a udržují optimální hladinu ROS pro funkci metabolismu. Enzymatický systém je výsledkem sekvenčního a souběžného působení několika antioxidačních enzymů. Mezi enzymatické antioxidy lze zařadit enzymy superoxid dismutázu (SOD), peroxidázy (POX), katalázu (CAT), glutathion peroxidázu (GPX) a enzymy askorbát-glutathionového cyklu (AsA – GSH). Za neenzymatické antioxidy jsou považovány tokoferoly, karotenoidy, kyselina askorbová (AsA), glutathion (GSH) a fenolické sloučeniny (flavonoidy, třísloviny, lignin apod.). Množství antioxidy a aktivita antioxidačních enzymů se v podmínkách stresu zvyšuje (Ashraf et al. 2011; Wang et al. 2012).

SOD je antioxidační enzym přítomný v subcelulárních kompartmentech, které podléhají oxidačnímu stresu. V živých organismech jsou přítomny 3 typy tohoto enzymu. Liší se kovovým kofaktorem – FeSOD, MnSOD a Cu/ZnSOD. V podmínkách sucha se koncentrace SOD významně zvyšuje. Katalyzuje přeměnu  $O_2^-$  na kyslík a méně toxický  $H_2O_2$  (Tab. 1) (Blokhina et al. 2003). Vzniklý  $H_2O_2$  je následně vychytáván enzymy CAT a POX, a přeměněn na vodu a kyslík (Tab. 1). Vzhledem k lokalizaci CAT v peroxizomech a glyoxyzomech je její ochranná funkce omezena. Zatímco CAT nevyžaduje specifický donor elektronů, POX využívá specifická redukční činidla. CAT a POX regulují vnitrobuněčnou koncentraci  $H_2O_2$  (Ashraf et al. 2011; Wang et al. 2012).

Dalšími enzymy, které se podílejí na eliminaci  $H_2O_2$  jsou GPX a enzymy AsA – GSH cyklu. GPX katalyzuje redukci hydroperoxidů (ROOH) na alkohol a vodu za využití redukovaného glutathionu (GSH) jako kofaktoru. Během reakce tak vzniká také oxidovaná forma glutathionu (GSSG) (Tab. 1) (Matoušková et al. 2014). GPX hraje významnou roli v ochraně buněčných membrán vystavených oxidačnímu stresu. AsA – GSH cyklus je hlavní složkou enzymatické obrany rostlin (Obr. 8). Je tvořen 4 enzymy: askorbát peroxidáza (APX), monodehydroaskorbát reductáza (MDHAR), dehydroaskorbát reductáza (DHAR) a glutathion reductáza (GR) a 2 neenzymatickými antioxidy: AsA a GSH. Antioxidy AsA a GSH dokáží vychytávat ROS samostatně a zároveň v AsA – GSH cyklu odvádějí přebytečnou

excitační energii v chloroplastech (Piterková et al. 2005; Campos et al. 2011; Wang et al. 2012). GSH je přítomný ve všech buněčných kompartmentech. Jedná se o významný antioxidant, který se podílí na eliminaci  $H_2O_2$  a volných radikálů, a napomáhá tak udržování redoxní rovnováhy v buňce. Vzhledem k přítomnosti molekul síry v GSH je současně její zásobní formou v rostlině. AsA je lokalizovaná ve většině buněčných organel a v apoplastu. Eliminuje  $H_2O_2$ , volné radikály a singletový kyslík. Její další, neantioxidační funkcí je regulace buněčného cyklu a dlouhivého růstu buněk (Blokhina et al. 2003).



**Obrázek 8 Askorbát - glutathionový cyklus (Piterková et al. 2005)**

APX využívá AsA jako specifický donor elektronů k redukci  $H_2O_2$  na vodu. Během reakce vzniká monodehydroaskorbát (MDHA). Jeho přeměna na AsA a dehydroaskorbát (DHA) probíhá spontánně (Tab. 1). MDHA je rovněž redukován DHAR na AsA. Redukci MDHA předchází redukce DHA za využití GSH. GSH je regenerován z GSSG za působení GR a využití redukčního činidla NAD(P)H (Piterková et al. 2005; Wang et al. 2012). GR napomáhá udržení rovnováhy mezi GSH a GSSG (Tab. 1) (Matoušková et al. 2014). Syntéza MDHAR, DHAR a GR je primární reakcí rostlinných buněk na vodní deficit. Regenerací antioxidantů AsA a GSH rostliny zmírňují oxidační poškození. Za silného vodního stresu dochází k poklesu aktivit enzymů AsA – GSH cyklu. Vyšší koncentrace ROS způsobují oxidaci enzymů a jejich inaktivaci (Wang et al. 2012).

Rostliny disponují mnoha složitými antioxidačními systémy, prostřednictvím kterých jsou schopny eliminovat ROS a zamezit jejich akumulaci v pletivech. Kooperace mezi antioxidanty umožňuje rostlinám přežít v podmínkách stresu (Blokhina et al. 2003).

**Tabulka 1 Antioxidační enzymy vychytávající ROS a jimi katalyzované reakce (převzato z Blokhina et al. 2003; Matoušková et al. 2014)**

Enzym	Katalyzovaná reakce
Superoxid dismutáza (SOD)	$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Kataláza (CAT)	$2H_2O_2 \leftrightarrow O_2 + 2H_2O$
Glutathion peroxidáza (GPX)	$2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + H_2O + ROH$
Askorbát peroxidáza (APX)	$AsA + H_2O_2 \leftrightarrow DHA + 2H_2O$
Glutathion reduktáza (GR)	$NADPH + GSSG \leftrightarrow NADP^+ + 2GSH$

## 1.7 Rostlinné strategie

U rostlin se jako odpověď na nepříznivé podmínky prostředí vyvinuly modifikace v životních cyklech, morfologické a anatomické stavbě a fyziologii. Tyto druhově specifické modifikace rostlinám umožňují odolávat stresovým podmínkám. U rostlin rozlišujeme tři základní obranné strategie, kterými rostliny čelí podmínkám s omezenou dostupností vody. První strategií je snaha vyhnout se období sucha. Pro rostliny s touto strategií jsou charakteristické krátké životní cykly. Vegetační cyklus je dokončen před nástupem sucha v podmínkách s dobrou dostupností vody. Druhou obrannou strategií je odklad dehydratace. Rostliny s touto strategií disponují morfologickými a fyziologickými modifikacemi, které jim umožňují zachovat životní procesy v podmínkách sucha. Za morfologické adaptace považujeme zmenšení listové plochy, zvětšení tloušťky listů, ochlupení listů (zvyšuje odrážení slunečního záření a snižuje teplotu listů), voskovou kutikulu na povrchu listů (snížení transpirace), bezlistost, nárůst podílu sklerenchymatických pletiv, zdužnatění listů a stonků, zvýšení poměru kořenů k nadzemním částem (kořeny u těchto rostlin tvoří 60 až 90 % rostlinné biomasy) apod. Za fyziologické adaptace považujeme uzavírání průduchů (velká mezidruhová variabilita v reakcích průduchů na vodní stres), změny v produkci a aktivitě enzymů a hormonů, osmotické úpravy, metabolické adaptace (fotosyntetické cesty CAM a C<sub>4</sub>) apod. U rostlin adaptovaných na podmínky sucha se často objevuje mykorhizní symbióza, která zlepšuje zásobování rostlin vodou a živinami. Třetí strategií jsou rostliny tolerantní dehydrataci. Tyto rostliny jsou zcela závislé na vlhkosti prostředí a snášejí dehydrataci. V podmínkách vodního deficitu se jejich životní procesy zastavují. Dehydratace u nich nezpůsobuje vážná poškození buněčných membrán a organel. Po obnovení dodávek vody rostliny pokračují v životních cyklech. S touto strategií se setkáváme u řas, mechů, kapradin a cca 70 druhů vyšších rostlin (Pessaraki 1999).



## 2 PRAKTICKÁ ČÁST

### 2.1 Materiál a metodiky

#### 2.1.1 Rostlinný materiál

Pro biochemické analýzy tolerance vodnímu deficitu bylo vybráno 5 odrůd jabloní ('Malinové holovouské', 'Fragrance', 'Rubinstep', 'Idared', 'Car Alexander') a 5 odrůd třešní ('Regina', 'Napoleonova', 'Kaštánka', 'Sunburst', 'P-HL-C'). Výzkumný vzorek byl zvolen tak, aby obsahoval běžné tržní i nově vyšlechtěné odrůdy. Rostlinný materiál pro analýzy poskytl Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. (VŠÚO Holovousy).

#### Charakteristiky vybraných odrůd

##### **Jabloně**

###### 'Malinové holovouské'

Odrůda pochází z Holovous, kde byla vyšlechtěna na počátku 19. století. Plody jsou kulovité, středně velké až velké, nachově červené, s narůžovělou dužninou sladce malinové chuti. Odrůda je mrazuvzdorná (Říha 1919; Boček 2008). Ve vyšších a vlhčích polohách plodí více. Netoleruje kratší období sucha (Databáze odrůd ovocných dřevin 2010; Archiv starých odrůd ovoce 2016).

###### 'Fragrance'

Odrůda byla vyšlechtěna ve VŠÚO Holovousy. Odrůda vstupuje raně do plodnosti. Plody jsou kulovité, středně velké až velké, karmínově červené, s krémově žlutou, aromatickou dužninou sladké chuti. Jedná se o odrůdu odolnou strupovitosti a mrazům (Kolektiv autorů VŠÚO Holovousy 2007; Databáze odrůd ovocných dřevin 2010; VŠÚO Holovousy 2019).

###### 'Rubinstep'

Odrůda pochází z VŠÚO Holovousy. Jedná se o podzimní odrůdu jabloně. Plody jsou kulovité, středně velké, oranžově červené, s krémově žlutou, aromatickou, sladkou dužninou. Odrůda je středně odolná vůči strupovitosti a padlí. Vyžaduje dobře zavlažovanou a živinami bohatou půdu (Databáze odrůd ovocných dřevin 2010; VŠÚO Holovousy 2019). Odolává zimním a jarním mrazům (Blažek 2001).

###### 'Idared'

Odrůda byla vyšlechtěna v USA. Vstupuje raně do plodnosti. Plody jsou ploše kulovité, středně velké až velké, žlutozelené s červeným mramorováním, s bílou, aromatickou dužninou sladké chuti. Odrůda je citlivější vůči mrazům. Často trpí

strupovitostí a padlím (Kutina et Holeček 1992; Databáze odrůd ovocných dřevin 2010; VŠÚO Holovousy 2019).

#### ‘Car Alexander‘

Jedná se o starou odrůdu jabloně, která byla vyšlechtěna v Rusku na konci 18. století (Říha 1919). Plodí na podzim. Plody jsou široce kuželovité, velké, karmínově červené, s nažloutlou dužninou sladké chuti. Vzhledem k náchylnosti k plísním a hnití se odrůdě dobře daří na vyšších, chladnějších stanovištích. Je vysoce odolná vůči mrazu (Říha 1919; Vaněk 1936; Říha 1937; Boček 2008). Je náchylná k suchu (Boček 2008; Archiv starých odrůd ovoce 2016).

### **Třešně**

#### ‘Regina‘

Odrůda pochází z Německa. Jedná se o pozdní odrůdu třešně s velmi velkými plody tmavě červené barvy a tuhou, aromatickou dužninou sladké chuti. Pro svou nenáročnost vůči klimatu a kvalitě půdy je odrůda hojně vysazována (Databáze odrůd ovocných dřevin 2010; VŠÚO Holovousy 2019). Za deště plody pukají (Wociór 2008).

#### ‘Napoleonova‘

Odrůda byla vyšlechtěna v Německu na konci 18. století. Plody jsou kulovité, středně velké, světle žluté s červeným mramorováním a sladkou, světle žlutou dužninou s červenými žilkami (Databáze odrůd ovocných dřevin 2010; VŠÚO Holovousy 2019). Odrůda není odolná praskání. Je silně mrazuvzdorná (Vaněk 1938). Toleruje kratší období sucha (Kutina et al. 1991; Archiv starých odrůd ovoce 2016).

#### ‘Kaštánka‘

Odrůda pochází z Anglie. Vstupuje raně do plodnosti. Plody jsou srdcovité, středně velké, leskle tmavě červené, s měkkou, aromatickou dužninou sladké chuti. Odolávají praskání za deště (Databáze odrůd ovocných dřevin 2010; VŠÚO Holovousy 2019). Odrůda je mrazuvzdorná (Kamenický 1941; Databáze odrůd ovocných dřevin 2010) a toleruje přísušek (Archiv starých odrůd ovoce 2016).

#### ‘Sunburst‘

Odrůda pochází z Kanady. Jedná se o odrůdu se srdcovitými, velmi velkými, tmavě červenými a aromatickými plody sladké chuti (VŠÚO Holovousy 2019). Odrůda je odolná praskání a mrazuvzdorná (Lane 1984).

#### ‘P-HL-C‘

Jedná se o vegetativně množeno podnož pro třešně, která byla vyšlechtěna ve VŠÚO Holovousy v 70. letech 20. století. Kořenový systém podnože je mělký.

Vyžaduje zavlažované, úrodné půdy a oporu (VŠÚO Holovousy 2019). Je středně odolná vůči mrazu a mírně citlivá vůči suchu (Blažková 2004).

### 2.1.2 Založení *in vitro* kultur, multiplikace explantátů, navození osmotického stresu

Pro založení počátečních *in vitro* kultur byly použity růstové vrcholy z narašených pupenů dormantních výhonů vybraných ovocných odrůd. Vrcholy byly následně po dobu cca 1 minuty sterilizovány v 0,15% roztoku chloridu rtuťnatého s přídavkem Tween 20. Po sterilizaci byly opláchnuty destilovanou vodou a nasazeny do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml na sterilní agarové Murashige & Skoog (MS) médium (Murashige et Skoog 1962) s přídavkem vitamínů a zakryty hliníkovou fólií. (Přesné složení média je uvedeno v Tab. 2.)

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

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

MS médium bylo před nasazením explantátů po dobu 20 minut sterilizováno v parním tlakovém autoklávu 5075 ELV (Tuttnauer) při teplotě 120 °C. V jedné kultivační nádobě bylo pěstováno 3 až 5 explantátů na 25 až 30 ml média. Po 4 týdnech kultivace při teplotě 22±1 °C a za světelných podmínek dlouhého dne (16 hodin světlo/8 hodin tma) byly počáteční *in vitro* kultury přeneseny na multiplikační MS médium s přídavkem stimulatoru růstu cytokininu 6-benzylaminopurinu (BAP) o koncentraci 1,5 mg·l<sup>-1</sup> a pěstovány za stejných teplotních a světelných podmínek. Každé 4 týdny pak byly explantáty přenášeny na čerstvé médium (Jiroutová et Kovalíková 2021).

Osmotický stres byl v *in vitro* kulturách navozen přidáním polyethylenglykolu (PEG 6000) do kultivačního média. PEG je vysokomolekulární polymer. Snižuje

vodní potenciál média, a u rostlin vyvolává osmotický stres. Vzhledem ke své vysoké molekulové hmotnosti neprostupuje buněčnými stěnami. Pro rostliny není toxický (Rahayu et Sudarsono 2015). PEG byl rozpuštěn v destilované vodě a přidán do základního MS média před sterilizací v koncentraci 0, 5, 10, 25 a 50 g·l<sup>-1</sup> (0 %, 0,5 %, 1 %, 2,5 % a 5 % PEG 6000). Explantáty byly na médiu s přísadkou PEG pěstovány za výše uvedených teplotních a světelných podmínek po 4 týdny. Následně u nich byly provedeny biochemické analýzy (Jiroutová et Kovalíková 2021).

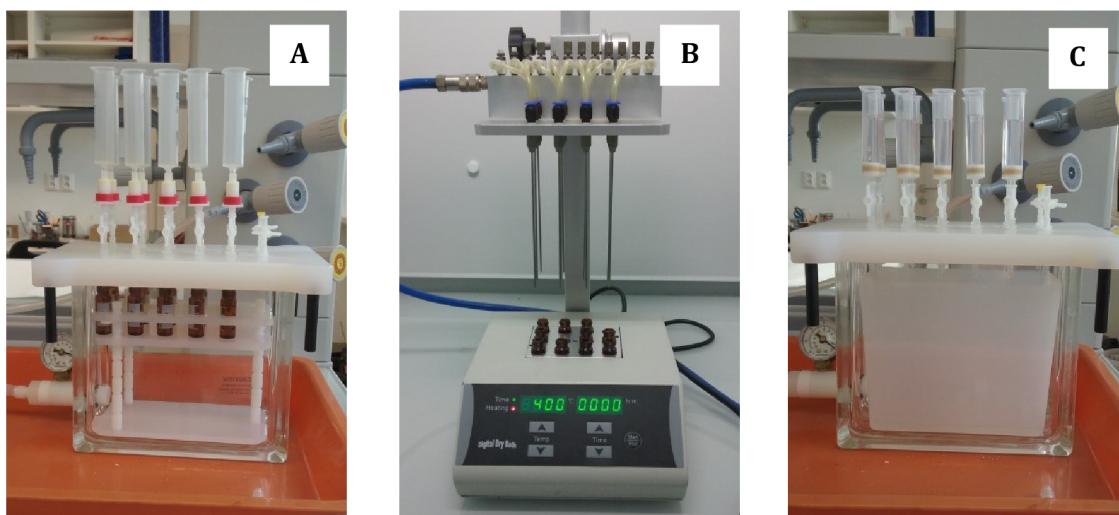
Rostlinný materiál byl pěstován ve VŠÚO Holovousy, odkud byl v pravidelných intervalech dodáván k laboratorním analýzám.

### **2.1.3 Stanovení cukrů a cukerných alkoholů**

Pro analýzu cukrů (glukóza, fruktóza, sacharóza) a cukerných alkoholů (sorbitol, glycerol) bylo ve třetí misce homogenizováno 0,2 g čerstvé hmotnosti explantátu se 2 ml 80% ethanolu. Homogenát byl přenesen do 2ml mikrozkušavky, ve které byl zahříván při 80 °C po dobu 30 minut a následně 10 minut centrifugován při 4500 rpm (MPW-55 Microcentrifuge, MPW, Polsko). Supernatant byl odebrán do čisté zkumavky. Pelet byl resuspendován s 0,75 ml 50% ethanolu a následně opět zahříván při 80 °C po dobu 30 minut a 10 minut centrifugován při 4500 rpm. Vzniklý supernatant byl smíchán s dříve odebraným supernatantem. Pelet byl znovu resuspendován s 0,75 ml 50% ethanolu, zahříván při 80 °C po dobu 30 minut a 10 minut centrifugován při 4500 rpm. Vzniklý supernatant byl odebrán a přidán ke směsi supernatantů. Ve směsi supernatantů byl stanoven obsah cukrů a cukerných alkoholů pomocí ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie UHPLC Infinity II 1290 v kombinaci s hmotnostním spektrometrem Triple Quadrupole 6470 (elektronová ionizace ESI, negativní polarita) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Separace probíhala na koloně BEH Amide (2,1 mm x 150 mm, 2,6 μm; Waters, Milford, MA, USA) využitím isokratické eluce mobilní fáze: směs 0,05% kyseliny mravenčí a acetonitrilu/methanolu (8:2) v poměru 20:80 %. Průtok byl nastaven na 0,4 ml·l<sup>-1</sup>. Parametry iontového zdroje: teplota plynu 150 °C, průtok plynu 6 l·min<sup>-1</sup>, nebulizér 40 psi, teplota plynového pláště 300 °C, průtok plynu 12 l·min<sup>-1</sup>, kapilární napětí 2500 V a napětí trysky 0 V. Nástřik vzorků byl 1 μl. Všechny použité standardy cukrů byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Darmstadt, Německo) (Jiroutová et Kovalíková 2021).

#### 2.1.4 Stanovení obsahu kyseliny abscisové

Obsah kyseliny abscisové byl stanoven v 0,2 g čerstvé hmotnosti explantátu, které byly po odběru okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby se předešlo degradaci fytohormonu. Zmražený rostlinný materiál byl homogenizován s tekutým dusíkem v třecí misce na jemný prášek, který byl následně přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky vychlazené v tekutém dusíku. Do zkumavky bylo přidáno 0,5 ml roztoku pro extrakci kyseliny abscisové. Extrakční roztok tvořila směs methanolu, destilované vody a kyseliny mravenčí v poměru 15:4:1, podchlazená na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzorky byly ponechány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 1 hodiny a následně 30 minut centrifugovány při 15000 rpm a teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Eppendorf 5804 R, Německo). Supernatant byl odebrán do čisté zkumavky. Pelet byl resuspendován s 0,25 ml extrakčního činidla a ponechán při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 minut. Následně byl opět 30 minut centrifugován při 15000 rpm a teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzniklý supernatant byl smíchán s dříve odebraným supernatantem a čištěn pomocí 2 typů SPE kolonek (Solid Phase Extraction; extrakce na tuhé fázi) - C18 (Sep-Pak® Plus Short tC18; Waters, Dublin, Irsko), které zadržují nepolární sloučeniny, a MCX (Strata™ -XC 33  $\mu\text{m}$  kolona; Phenomenex, CA, Torrance, USA), které rozdělí vyizolované fytohormony do frakcí (Obr. 9). SPE C18 kolonky byly nejprve promyty 5 ml methanolu. Poté bylo na kolonky nanášeno 5 ml extrakčního roztoku, který byl ponechán prokapávat. Následně byl na kolonku nanášen vzorek, který byl po prokapání kolonkou odpařen ve vakuové odparce SpeedVac (Huanyu NK200-1B, Zhejiang, Čína) při  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  na cca 1/10 objemu. Odpařený vzorek byl rozpuštěn v 1 ml 1M kyseliny mravenčí a nanášen na aktivovanou kolonku MCX. Kolonka MCX byla dříve aktivována promytím 5 ml methanolu a 5 ml 1M kyseliny mravenčí. Po prokapání vzorku byla kolonka opět promyta 5 ml 1M kyseliny mravenčí. Následně byly pod kolonky umístěny čisté zkumavky a kolonky byly promyty 5 ml 100% methanolu. Prokapávaný roztok, který obsahoval extrahovanou kyselinu abscisovou, byl ve zkumavkách odpařen do sucha vakuovou odparkou SpeedVac při  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před analýzou byl odparek rozpuštěn v 50  $\mu\text{l}$  10% acetonitrilu a 10 minut centrifugován při 15000 rpm a teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzniklý supernatant byl analyzován pomocí ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (systém UHPLC-MS - UHPLC Infinity II 1290 a Triple Quadrupole 6470; Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA). Separace probíhala na koloně Zorbax RRHD Eclipse plus C18 (2,1 x 50 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ; Agilent Technologies) vyhřáté na  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Gradient mobilní fáze s průtokem 0,4  $\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$  byl následující: 0 min - 10 % A, 1.0 min - 10 % A, 4.0 min - 95 % A, 5.0 min - 94 % A, 5.1 min - 10 % A, a 6.0 min - 10 % A v B, kde A: voda Milli-Q a B: acetonitril. Parametry iontového zdroje: teplota plynu  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ , průtok plynu 6  $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , nebulizér 40 psi, teplota plynového pláště  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ , průtok plynu 12  $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , kapilární napětí 2000 V a napětí trysky 1200 V. Nástřik vzorků byl 1  $\mu\text{l}$ . Monitorovány byly dva MRM posuny: 263.1→219.1, 153.1. Standard kyseliny abscisové byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich (Darmstadt, Německo) (Jiroutová et Kovalíková 2021).



**Obrázek 9 Stanovení obsahu kyseliny abscisové pomocí SPE vakuového rozdělovače pro 12 kolonek (CHROMABOND SPE vacuum manifold for 12 positions, Macherey-Nagel, Düren, Německo). A - kondicionace SPE C18 kolonek; B - odpařování vzorků pomocí vakuové odparky SpeedVac; C - promývání pomocí MCX kolonek. Foto Dominika Dobrovolná**

### 2.1.5 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla testována reakcí vzorků se stabilním radikálem 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylem (DPPH). Směs 60 $\mu$ M DPPH v methanolu byla připravena rozpuštěním 2,4 mg DPPH ve 100 ml 100% methanolu. Tato směs byla fialová. Roztok podléhal světelné degradaci, a proto jej bylo nezbytné uchovávat ve tmě. Vzorky ovocných odrůd byly připraveny homogenizací 0,1 g čerstvého explantátu se 2 ml 100% methanolu ve třecí misce. Vzhledem k vysokému odparu bylo nutné pracovat rychle. Homogenát byl přenesen do mikrozkušavky a 15 minut centrifugován při 3500 rpm (MPW-55 Microcentrifuge, MPW, Polsko). K 1,5 ml roztoku radikálu DPPH bylo přidáno 30  $\mu$ l supernatantu. Po promíchání byly vzorky inkubovány 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Během inkubace došlo k redukci radikálu volným atomem vodíku na difenylpikrylhydrazin (DPPH-H). Redukce způsobila ztrátu fialového zbarvení. Barevná změna značila vyšší celkovou antioxidační aktivitu. Absorbance byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm (spektrofotometr Cintra 101, Francie). Antioxidační aktivita byla vypočítána v procentech dle vzorce (Jiroutová et Kovalíková 2021):

$$\% \text{ zhášení DPPH} = [(A_B - A_S) / A_B] \times 100,$$

$A_B$  – absorbance slepého vzorku (100% methanol),

$A_S$  – absorbance vzorku po 30 minutách ve tmě.

### **2.1.6 Stanovení aktivity antioxidantních enzymů**

Pro analýzu vybraných antioxidantních enzymů (SOD, CAT, APX) bylo ve vychlazené třecí misce (miska byla ponořena do ledové drti) homogenizováno 0,2 g čerstvé hmotnosti explantátu v 1,5 ml 50mM fosfátového pufru (pH 7,0). Pracovní roztok 50mM fosfátového pufru bylo nutné připravit před každou analýzou smícháním zásobních roztoků  $K_2HPO_4$  a  $KH_2PO_4$  v poměru 1:1. Do připraveného pufru byl pro udržení funkčnosti proteinů přidán 1% polyvinylpolypyrrolidon (1 g na 100 ml). Vzniklý homogenát byl přenesen do mikrozkušavky a 15 minut centrifugován v chlazené centrifuzě při 14000 rpm a teplotě 4 °C (Eppendorf 5804 R, Německo). Po celou dobu práce byly vzorky uchovávány na ledu (Jiroutová et Kovalíková 2021).

#### **Stanovení aktivity superoxid dismutázy (SOD)**

Aktivita SOD byla stanovena komerční diagnostickou soupravou pro stanovení aktivity SOD (Sigma-Aldrich SOD Determination Kit, kat. číslo 19160). Prostřednictvím diagnostické soupravy byla určena inhibice tvorby superoxidových radikálů vzniklých oxidací xantinu. Superoxidové radikály redukovaly tetrazolium nitroblue na tetrazolium nitroblue – diformazán. V důsledku přítomnosti SOD došlo k poklesu hladiny superoxidového radikálu, a tedy ke snížení tvorby tetrazolium nitroblue – diformazánu. Analýza byla vyhodnocena přístrojem Spark® multimode microplate reader (Jiroutová et Kovalíková 2021).

#### **Stanovení aktivity katalázy (CAT)**

Aktivita CAT byla stanovena ve 4ml skleněné kyvetě postupným přidáváním 2,94 ml fosfátového pufru a 0,05 ml dříve připraveného supernatantu. Enzymatická reakce byla zahájena přidáním 0,01 ml 35%  $H_2O_2$ . Odbouráváním  $H_2O_2$  aktivitou CAT došlo ke změně absorbance. Absorbance byla měřena při vlnové délce 240 nm na začátku reakce a po 1 minutě (spektrofotometr Genesis 150, Thermoscientific, Madison, USA). Jako slepý vzorek byl použit fosfátový pufr. Aktivita CAT byla vypočítána s využitím molárního absorpčního koeficientu  $\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  a vyjádřena jako  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  na mg proteinů (Jiroutová et Kovalíková 2021).

## **Stanovení aktivity askorbát peroxidázy (APX)**

Aktivita APX byla stanovena sledováním poklesu absorbance při oxidaci askorbátu. Do 4ml skleněné kvvety byly postupně přidány 2 ml fosfátového pufru, 0,55 ml 0,5mM kyseliny askorbové a 0,225 ml 250mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Enzymatická reakce byla zahájena přidáním 0,225 ml dříve připraveného supernatantu. Odbouráváním H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktivitou APX došlo ke změně absorbance. Absorbance byla měřena při vlnové délce 290 nm na začátku reakce a po 1 minutě (spektrofotometr Genesis 150, Thermoscientific, Madison, USA). Jako slepý vzorek byl použit fosfátový pufr. Aktivita APX byla vypočítána s využitím molárního absorpčního koeficientu  $\varepsilon = 2,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  a vyjádřena jako nmol·min<sup>-1</sup> na mg proteinů (Jiroutová et Kovalíková 2021).

Obsah proteinů byl stanoven pomocí metodiky dle Bradfordové (1976). Ke 30  $\mu\text{l}$  dříve připraveného supernatantu bylo přidáno 970  $\mu\text{l}$  činidla Bradfordové. Absorbance byla měřena po 10 min při 595 nm (spektrofotometr Genesis 150, Thermoscientific, Madison, USA). Jako standard byl použit bovinní sérový albumin (Bio-Rad).

### **2.1.7 Statistické zpracování dat**

Pro každou odrůdu ovocných dřevin a koncentraci PEG v kultivačním médiu byla provedena 3 měření. Biochemické analýzy odolnosti stresu ze sucha byly vyhodnoceny porovnáním hodnot kontrolních rostlin, pěstovaných na MS médiu bez přídavku PEG, s hodnotami stresovaných rostlin. Data byla zpracována pomocí statistického programu GraphPad Prism 9 (LLC, San Diego, CA, USA) s využitím jednorozměrné analýzy variance (Anova) a Tukeyho testu na hladině významnosti  $p < 0,05$ . Tabulky a grafy byly vytvořeny v programu MS Excel (Microsoft, USA).

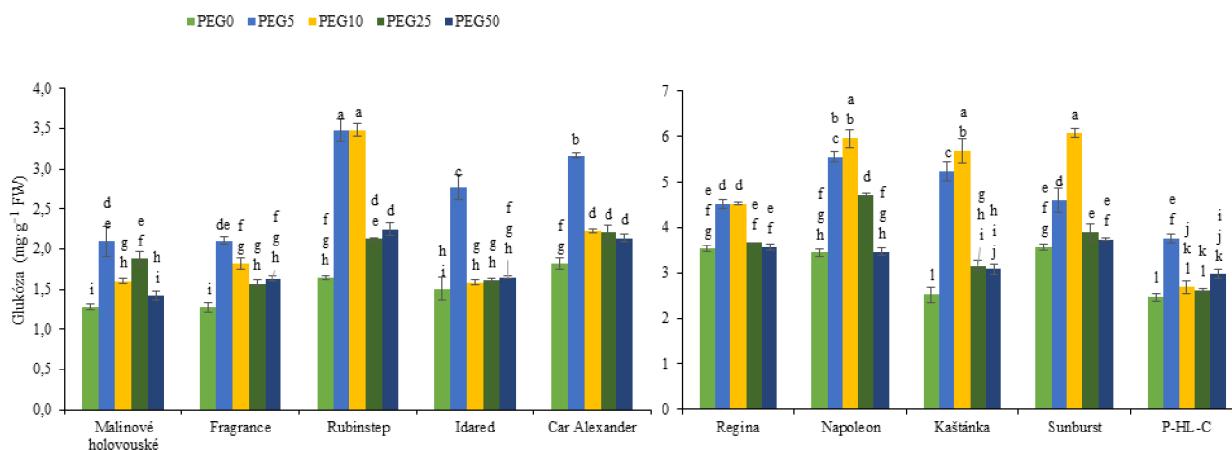


## 2.2 Výsledky

### 2.2.1 Změny v obsahu osmoticky aktivních sloučenin

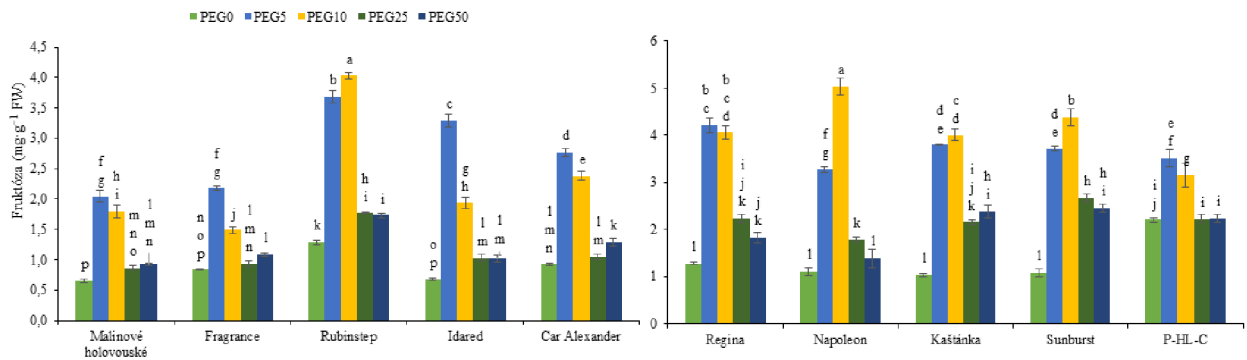
Osmotický stres navozený PEG 6000 způsobil změny koncentrací osmoticky aktivních sloučenin u všech odrůd jableň i třešní. U rostlin s přídatkem PEG 6000 v kultivačním médiu byl pozorován nárůst koncentrace rozpustných sacharidů (glukózy, fruktózy a sacharózy) a cukerných alkoholů (glycerolu a sorbitolu) oproti kontrolním rostlinám, pěstovaným na kultivačním médiu bez přídatku PEG.

U odrůd jableň bylo nejvýraznější zvýšení koncentrace glukózy zaznamenáno při nejnižší koncentraci PEG v kultivačním médiu (Obr. 10). Nejvyšší nárůsty byly pozorovány u odrůd 'Rubinstep' (2,1krát) a 'Idared' (1,8krát). Při vyšších koncentracích PEG bylo zaznamenáno jen mírné zvýšení koncentrace glukózy oproti kontrolním rostlinám. U třešní byly nejvyšší nárůsty glukózy pozorovány při dvou nejnižších koncentracích PEG v kultivačním médiu. Nejvyšší nárůsty byly naměřeny při PEG10 u odrůdy 'Kaštánka' (2,2krát) a u odrůd 'Napoleonova' a 'Sunburst' (u obou 1,7krát).



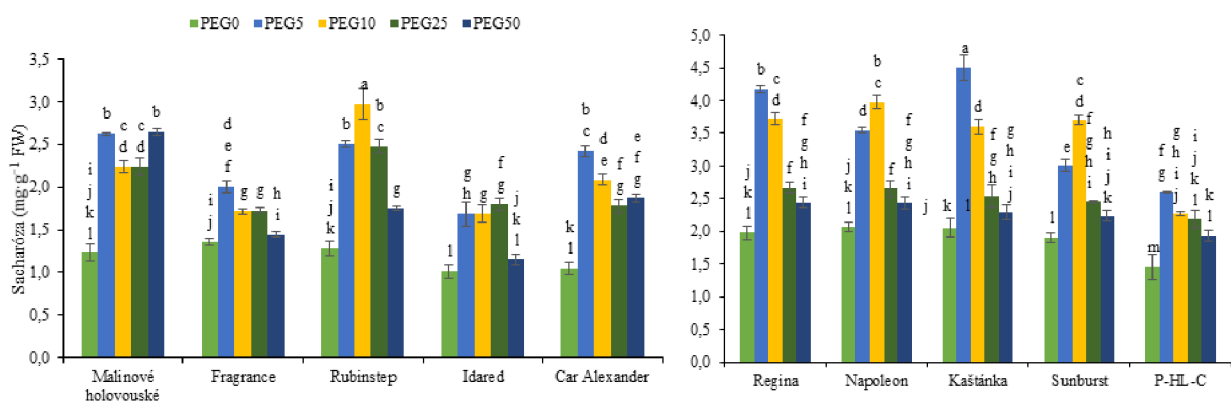
**Obrázek 10** Vliv různých koncentrací PEG 6000 na koncentraci glukózy ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti) u odrůd jableň (vlevo) a třešní (vpravo). Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka ( $n = 6$ ). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

Nejvýraznější vzestup koncentrace fruktózy u jableň byl naměřen u odrůd 'Idared' při PEG5 (4,8krát), 'Malinové holovouské' při PEG5 a 'Rubinstep' při PEG10 (u obou 3,1krát) a 'Car Alexander' při PEG5 (3krát) (Obr. 11). Nejvyšší nárůsty fruktózy u třešní byly zaznamenány při PEG10 u odrůd 'Napoleonova' (4,6krát), 'Sunburst' (4krát) a 'Kaštánka' (3,9krát).



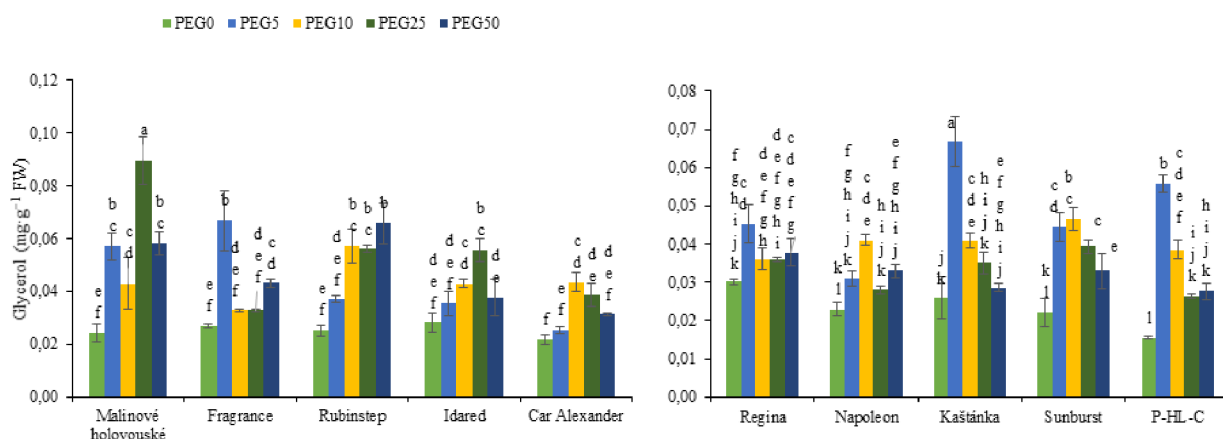
**Obrázek 11** Vliv různých koncentrací PEG 6000 na koncentraci fruktózy ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti) u odrůd jableň (vlevo) a třešň (vpravo). Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka ( $n = 6$ ). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

U jableň bylo nejvýraznější zvýšení koncentrace sacharózy naměřeno u odrůd 'Rubinstep' při PEG10 a 'Car Alexander' při PEG5 (u obou 2,3krát) a 'Malinové holovouské' při PEG50 (2,2krát) (Obr. 12). U odrůd třešň byly nejvyšší nárůsty sacharózy zaznamenány při dvou nejnižších koncentracích PEG v kultivačním médiu. Nejvyšší nárůsty sacharózy byly sledovány při PEG5 u odrůd 'Kaštánka' (2,2krát) a 'Regina' (2,1krát).



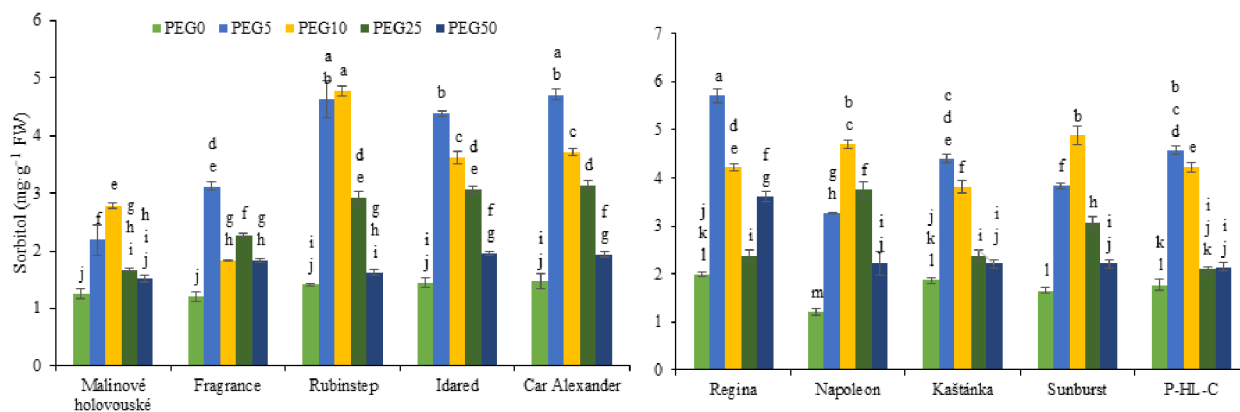
**Obrázek 12** Vliv různých koncentrací PEG 6000 na koncentraci sacharózy ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti) u odrůd jableň (vlevo) a třešň (vpravo). Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka ( $n = 6$ ). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

Výraznější vzestup glycerolu byl u odrůd jableň zaznamenán při vyšších koncentracích PEG v kultivačním médiu (Obr. 13). Nejvyšší nárůsty byly pozorovány u odrůd 'Malinové holovouské' při PEG25 (3,8krát), 'Rubinstep' při PEG50 (2,6krát) a 'Fragrance' při PEG10 (2,5krát). U odrůd třešň byly nejvyšší nárůsty glycerolu zaznamenány při dvou nejnižších koncentracích PEG v kultivačním médiu. Nejvýraznější zvýšení koncentrace glycerolu bylo naměřeno při PEG5 u podnože 'P-HL-C' (3,5krát) a u kultivaru 'Kaštánka' (2,6krát).



**Obrázek 13** Vliv různých koncentrací PEG 6000 na koncentraci glycerolu ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti) u odrůd jableň (vlevo) a třešň (vpravo). Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka ( $n = 6$ ). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

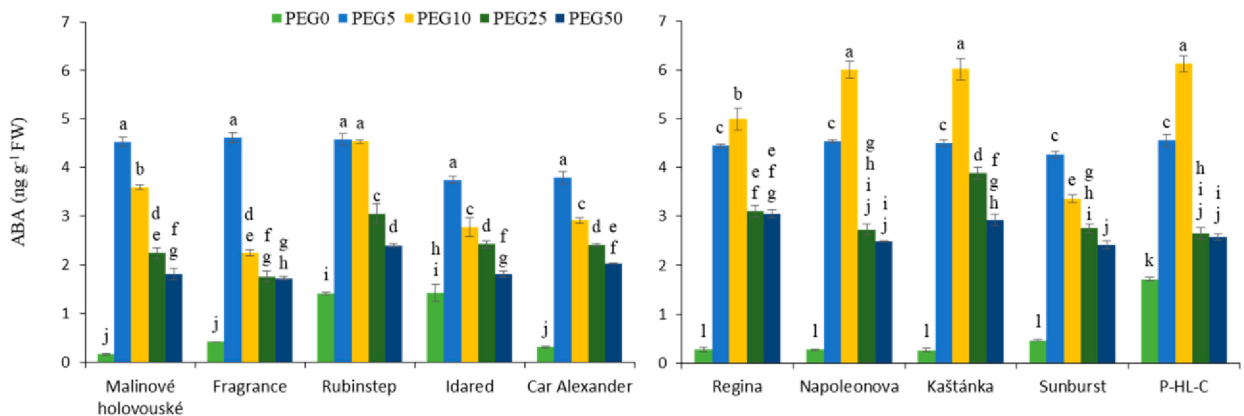
Nejvyšší koncentrace sorbitolu byly u obou ovocných druhů naměřeny při PEG5 a PEG10 (Obr. 14). U jableň byly nejvyšší nárůsty pozorovány u odrůd 'Rubinstep' při PEG10 (3,4krát) a při PEG5 u odrůd 'Car Alexander' (3,2krát) a 'Idared' (3krát). U třešň byly nejvyšší nárůsty naměřeny při PEG10 u odrůd 'Napoleonova' (3,9krát) a 'Sunburst' (3krát) a u odrůdy 'Regina' při PEG5 (2,9krát).



**Obrázek 14** Vliv různých koncentrací PEG 6000 na koncentraci sorbitolu ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti) u odrůd jableň (vlevo) a třešň (vpravo). Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka ( $n = 6$ ). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

## 2.2.2 Změny v obsahu kyseliny abscisové

Stres ze sucha navozený přidavkem PEG 6000 vyvolal u všech stresovaných rostlin významné zvýšení hladiny ABA (Obr. 15). Nejvyšší koncentrace ABA byly u odrůd jabloní zaznamenány při PEG5 a u odrůd třešní při PEG10. U jabloňových odrůd se koncentrace ABA nejvíce zvýšila u odrůd 'Malinové holovouské' (27krát) a 'Fragrance' (12krát). U odrůd třešní byly nejvyšší nárůsty ABA zjištěny u odrůd 'Kaštánka' (24,5krát) a 'Napoleonova' (22,5krát). Nejnižší vzestup ABA byl zaznamenán u odrůd jabloní 'Idared' (2,6krát) a 'Rubinstep' (3,3krát) a u třešňové podnože 'P-HL-C' (3,7krát). U těchto odrůd byly současně naměřeny nejvyšší koncentrace ABA u kontrolních rostlin, pěstovaných na kultivačním médiu bez přidavku PEG.

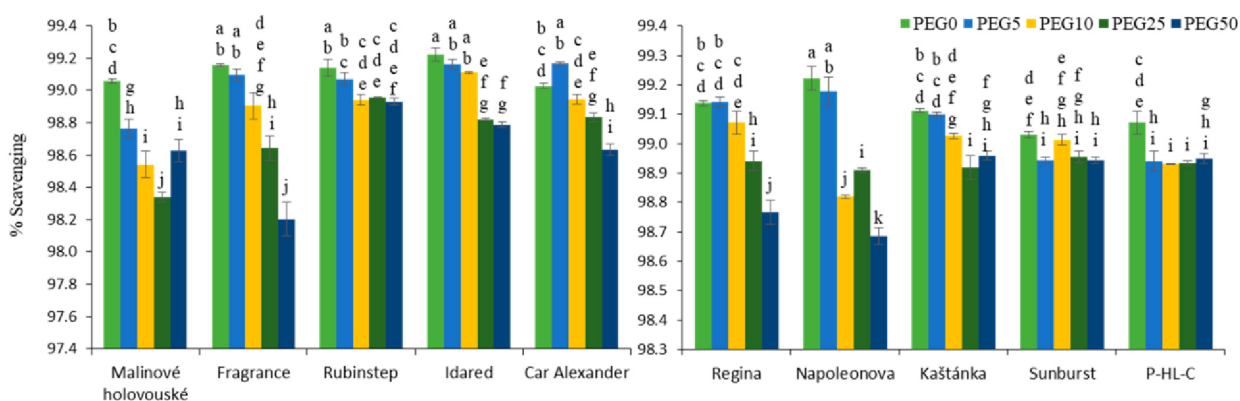


Obrázek 15 Vliv různých koncentrací PEG 6000 na koncentraci kyseliny abscisové (ABA) ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti) u odrůd jabloní (vlevo) a třešní (vpravo). Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka ( $n = 6$ ). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.3 Změny v kapacitě antioxidantů a aktivitě antioxidantních enzymů

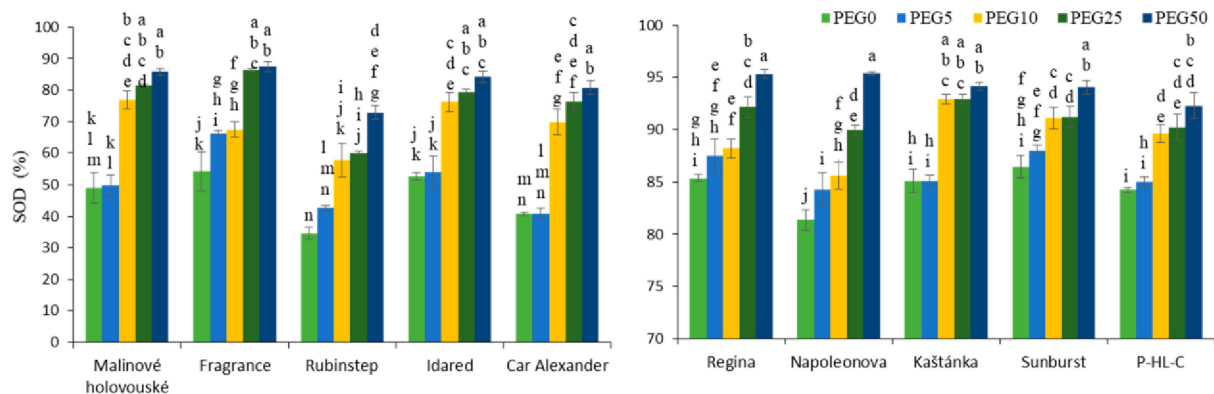
Stres ze sucha navozený přídávkem PEG 6000 způsobil sekundární oxidační stres. V odpovědi na zvýšenou tvorbu ROS stresované rostliny syntetizovaly enzymatické a neenzymatické antioxidanty.

Celková antioxidantní kapacita, vyjádřená redukcí radikálu DPPH, se s narůstající koncentrací PEG v kultivačním médiu mírně snižovala (Obr. 16). Nejvýraznější pokles celkové antioxidantní kapacity byl zaznamenán u jabloňových odrůd 'Fragrance' a 'Malinové holovouské' a u odrůd třešňí 'Napoleonova' a 'Regina'. Vysokou antioxidantní kapacitu si udržely odrůdy 'Rubinstep' a 'Sunburst'.



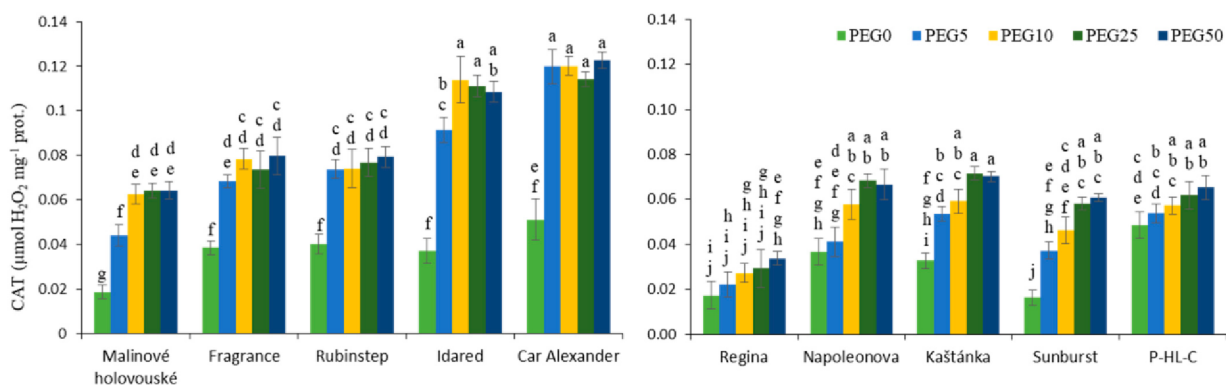
**Obrázek 16** Vliv různých koncentrací PEG 6000 na vychytávání radikálu DPPH (%) u odrůd jableň (vlevo) a třešňí (vpravo). Údaje představují průměrnou hodnotu  $\pm$  směrodatná odchylka ( $n = 6$ ). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

U všech sledovaných ovocných odrůd byl s narůstající koncentrací PEG v kultivačním médiu zaznamenán nárůst koncentrací antioxidantních enzymů SOD, CAT a APX. Aktivita enzymu SOD byla vyjádřena jako inhibice tvorby superoxidových radikálů (Obr. 17). U obou druhů ovoce vzestup aktivity enzymu koreloval se vzrůstající koncentrací PEG. U odrůd jableň byl nejvýraznější vzestup aktivity SOD zaznamenán u odrůd 'Rubinstep' (2,1krát) a 'Car Alexander' (2krát). U kontrolních rostlin těchto odrůd byla současně naměřena nejnižší aktivita enzymu. Nejnižší nárůst aktivity SOD byl sledován u odrůd 'Fragrance' a 'Idared' (u obou 1,6krát). Jejich kontrolní rostliny měly nejvyšší aktivitu enzymu. U třešňových odrůd byly nárůsty aktivity SOD méně výrazné. Nejvýraznější vzestup aktivity SOD byl zaznamenán u odrůdy 'Napoleonova' (1,2krát), u které byla rovněž zjištěna nejnižší aktivita enzymu při PEG0. U odrůd třešňí byla v porovnání s odrůdami jableň aktivity SOD celkově vyšší.



Obrázek 17 Vliv různých koncentrací PEG 6000 na aktivitu superoxid dismutázy (SOD) (%) u odrůd jableň (vlevo) a třešň (vpravo). Údaje představují průměrnou hodnotu ± směrodatná odchylka (n = 6). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl (p < 0,05).

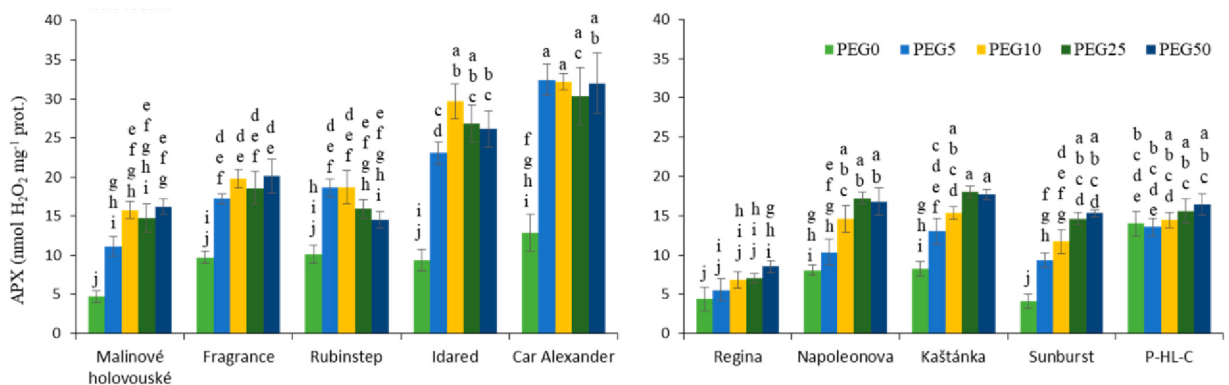
Aktivita enzymu CAT byla vyjádřena odbouráváním  $H_2O_2$  (Obr. 18). Největší aktivita enzymu byla zaznamenána u jableňové odrůdy 'Car Alexander' při PEG50. U této odrůdy byla rovněž zjištěna nejvyšší aktivita CAT u kontroly. Největší nárůst aktivity enzymu byl zaznamenán u odrůdy 'Malinové holovouské' při PEG25 a PEG50 (3,4krát). U této odrůdy byla současně naměřena nejnižší aktivita CAT při PEG0. Nejmenší nárůst aktivity CAT byl zjištěn u odrůd 'Rubinstep' (2krát) a 'Fragrance' (2,1krát) (u obou při PEG5). U kontrolních rostlin těchto odrůd byla současně naměřena vysoká aktivita CAT. U odrůd třešň byla v porovnání s odrůdami jableň aktivita CAT celkově nižší. Největší nárůst enzymu byl zaznamenán u odrůd 'Sunburst' při PEG50 (3,6krát) a 'Kaštánka' při PEG25 (2,2krát). Naopak nejmenší nárůst aktivity CAT byl zjištěn u podnože P-HL-C při PEG5 (1,3krát). U této podnože byly naměřeny vyšší hodnoty aktivity CAT. Nízká enzymatická aktivita CAT byla zaznamenána u odrůdy 'Regina'.



Obrázek 18 Vliv různých koncentrací PEG 6000 na aktivitu katalázy (CAT) ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  na mg proteinů) u odrůd jableň (vlevo) a třešň (vpravo). Údaje představují průměrnou hodnotu ± směrodatná odchylka (n = 6). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl (p < 0,05).



Aktivita enzymu APX byla vyjádřena odbouráváním  $H_2O_2$  (Obr. 19). U odrůd jablek došlo po aplikaci PEG ke skokovému zvýšení aktivity APX. Největší nárůst byl zaznamenán u odrůdy 'Malinové holovouské' při PEG50 (3,3krát). U této odrůdy byla současně naměřena nejnižší aktivita APX u kontroly. Výrazný nárůst enzymatické aktivity byl rovněž zjištěn u odrůd 'Idared' při PEG10 (3,1krát) a 'Car Alexander' při PEG5 (2,4krát). U odrůd třešní byly zaznamenány celkově nižší hodnoty aktivity APX. Aktivita enzymu se s rostoucí koncentrací PEG pozvolna zvyšovala. Nejvýraznější nárůst enzymatické aktivity byl zjištěn u odrůdy 'Sunburst' při PEG50 (3,8krát). Nízké hodnoty aktivity APX byly zaznamenány u odrůdy 'Regina'.



**Obrázek 19** Vliv různých koncentrací PEG 6000 na aktivitu askorbát peroxidázy (APX) ( $nmol \cdot min^{-1}$  na  $mg$  proteinů) u odrůd jablek (vlevo) a třešní (vpravo). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

### 3 DISKUSE

Současná změna klimatu vede k oteplování planety, častějšímu výskytu extrémního počasí, ke změnám ročních období a k posunu vegetačních pásem (Ritchie et Roser 2017). Klimatologové předpovídají pokračující nárůst průměrných teplot, změny v rozložení a množství srážkových úhrnů a častější výskyt období beze srážek (IPCC 2018). Sucho je přitom považováno za vůbec nejrizikovější faktor, který ovlivňuje růst, vývoj a produkci rostlin. Voda je základní podmínkou života na Zemi. Veškeré životní děje v živých organismech mohou probíhat jen za dostatečného zásobení vodou (Anjum et al. 2011; Aroca 2012). Důsledky klimatické změny spolu s rychle se rozrůstající celosvětovou populací představují pro udržení potravinové bezpečnosti značné riziko. Možným řešením, jak předejít nedostatku potravin a vzniku hladomoru, bude šlechtění a pěstování rostlinných odrůd, které budou lépe odolávat působení abiotických a biotických stresových faktorů (Wheeler et Braun 2013).

V diplomové práci byla hodnocena odolnost vůči působení sucha u vybraných tržních odrůd jablek a třešní. Stres ze sucha byl navozen přidáním polyethylenglykolu (PEG) do kultivačních médií, podobně jako v dřívějších studiích s podzemnicí olejnou (Rahayu et Sudarsono 2015), mandloněmi (Akbarpour et al. 2017), kiwi (Zhong et al. 2018), lipnicí luční (Chen et al. 2019), jahodníkem (Yosefi et al. 2020), myrtou (Tafreshi et al. 2021), „mexickou limetkou“ *Citrus aurantifolia* (Christ.) Swingle (Jafari et Shahsavari 2022), růžemi (Hajizadeh et al. 2022) nebo bramborami (Sajid et Aftab 2022). PEG je vysokomolekulární látka, která snižuje vodní potenciál kultivačního média, a u rostlin vyvolává osmotický stres. Pro rostliny není toxický, a proto jej lze využít pro selekci tolerantních odrůd (Rahayu et Sudarsono 2015). Prostřednictvím biochemických analýz byly u ovocných odrůd sledovány rozdíly v syntéze a akumulaci osmoticky aktivních látek, syntéze kyseliny abscisové, kapacitě antioxidantů a aktivitě antioxidantních enzymů. U těchto parametrů se očekávalo, že prokáží odolnost, nebo citlivost rostlin vůči stresu ze sucha.

Stres ze sucha navozený PEG vedl u všech odrůd jablek i třešní ke zvýšené syntéze a akumulaci rozpustných sacharidů (glukózy, fruktózy a sacharózy) a polyhydrických alkoholů (glycerolu a sorbitolu). U odrůd jablek byly nejvyšší nárůsty glukózy, fruktózy, sacharózy a sorbitolu zaznamenány v podmínkách mírného vodního stresu. Shodné výsledky byly sledovány u odrůd třešní, kde navíc došlo při dvou nejnižších koncentracích PEG v kultivačním médiu k významnému nárůstu koncentrace glycerolu. Vyšší koncentrace PEG vedly u jablek ke zvýšené syntéze a akumulaci glycerolu. Rozpustné sacharidy a polyoly jsou látky, které se uplatňují jako zdroje energie pro metabolické procesy, slouží jako stavební složky rostlin, snižují osmotický potenciál rostlinných buněk, čímž brání poklesu buněčného turgoru, chrání buněčné membrány a biomolekuly a stabilizují



strukturu proteinů, enzymů a hormonů. Zvýšená syntéza a akumulace těchto osmoticky aktivních látek významně zvyšuje odolnost rostlin působení vodního stresu (Farooq et al. 2009; Majumder et al. 2010; Ashraf et al. 2011). Tolerantní odrůdy reagovaly na PEG indukovaný vláhový deficit vyšší syntézou a akumulací rozpustných sacharidů a polyolů. Ve studii s pistáciemi (Khoyerdí et al. 2016) byl po aplikaci PEG do kultivačních médií rovněž zaznamenán významný nárůst rozpustných sacharidů. Jejich akumulace se zvyšovala se vzrůstající koncentrací PEG v kultivačním mediu a u tolerantních odrůd byl jejich vzestup výraznější. Podobných výsledků bylo dosaženo také ve studiích s olivami (Karimi et al. 2018), jabloněmi (Ma et al. 2019) nebo jahodníkem (Yosefi et al. 2020). V další studii s jabloněmi (Yang et al. 2019) vedl stres ze sucha k akumulaci sorbitolu, glukózy, fruktózy, galaktózy a škrobu. Současně došlo k významnému snížení fotosyntézy a akumulace sacharózy. Sorbitol a sacharóza jsou hlavními produkty fotosyntézy ovocných stromů z čeledi *Rosaceae*. Vysoké koncentrace sorbitolu v listech stresovaných rostlin a současně nízká akumulace sacharózy při snížené fotosyntéze vedly autory studie k závěru, že sorbitol funguje jako místo ukládání uhlíku v rostlinách, zatímco sacharóza jako cukr dostupný pro metabolické procesy.

V reakci na PEG indukovaný osmotický stres došlo u všech stresovaných rostlin k výraznému zvýšení hladiny stresového fytohormonu ABA. ABA je klíčová v regulaci růstu a vývoje rostlin za stresových podmínek (Ashraf et al. 2011; Dar et al. 2017). Vyšší koncentrace ABA v rostlinách je spojována s vyšší odolností suchu vzhledem k jejím účinkům na listové průduchy, indukci tvorby velkého kořenového systému, inhibici dlouhivého růstu nadzemních částí rostlin, zvýšení akumulace osmoticky aktivních látek a regulaci hladiny ROS (Tworkoski et al. 2016; Dar et al. 2017). Za stresových podmínek rovněž dochází k nárůstu hladin enzymů, které se podílejí na syntéze ABA, a ke zvýšení exprese genů spojených s její syntézou (Dar et al. 2017; Zhang et al. 2019). Například ve studii s broskvoněmi (Bielsa et al. 2016) exprese genů souvisejících s biosyntézou ABA korelovala s poklesem intenzity fotosyntézy způsobeným uzavřením listových průduchů. Jejich exprese byla vyšší po 15 dnech vystavení podmínkám vláhového deficitu. U odrůd jabloní i třešní byly nejvyšší koncentrace ABA zaznamenány při dvou nejnižších koncentracích PEG. Podobné výsledky byly zaznamenány ve studii Tworkoskiho et al. (2016) s jabloňovými odrůdami, kde v podmínkách sucha rovněž došlo ke zvýšení koncentrace ABA a jejích metabolitů DPA a PA. Shodných výsledků bylo dosaženo také ve studiích s jabloněmi (Kowitcharoen et al. 2015; Yang et al. 2022), jahodníky (Perin et al. 2019), lipnicí roční (Chen et al. 2019), rajčaty (Zhang et al. 2019) a rýží (Wang et al. 2020). Tworkoski et al. (2016) ve své studii rovněž zmiňuje vliv podnože na výslednou odolnost suchu. Různé kultivary akumulovaly na tolerantnějších podnožích více ABA.

Vláhový deficit u rostlin vyvolal sekundární oxidační stres. Stresované rostliny produkovaly a akumulovaly velké množství ROS. V rostlinných buňkách je za

optimálních růstových podmínek udržována nízká koncentrace kyslíkových radikálů (Laxa et al. 2019). ROS se uplatňují jako signální molekuly a podílejí se na řízení růstu a vývoje rostlin. V důsledku stresu ze sucha došlo k nerovnováze mezi jejich tvorbou a eliminací. Vysoké koncentrace ROS poškozují rostlinné buňky. Působí nepříznivě na lipidy, proteiny a nukleové kyseliny, inhibují enzymy a narušují celistvost buněčných membrán (Campos et al. 2011; Khoyerdí et al. 2016). V odpovědi na zvýšenou tvorbu ROS se v listech stresovaných rostlin zvýšila syntéza antioxidantů a aktivita antioxidantních enzymů. U druhů tolerantních k suchu bylo zvýšení aktivity enzymů výraznější (Ashraf et al. 2011; Wang et al. 2012). Celková antioxidační kapacita byla vyjádřena redukcí radikálu DPPH. S narůstající koncentrací PEG v kultivačním médiu se u odrůd jabloní i třešní mírně snižovala. U všech sledovaných ovocných odrůd byl s narůstající koncentrací PEG v kultivačním médiu zaznamenán nárůst koncentrací antioxidantních enzymů SOD, CAT a APX. Aktivita SOD byla vyjádřena jako inhibice tvorby superoxidových radikálů, podobně jako ve studiích s transgenními 'Swingle' citrusy (Campos et al. 2011) a pajasanem žláznatým (Filippou et al. 2014). U jabloňových i třešňových odrůd vzestup aktivity enzymu koreloval se vzrůstající koncentrací PEG v kultivačním médiu. U odrůd třešní byla v porovnání s odrůdami jabloní aktivita SOD celkově vyšší. Významný nárůst aktivity SOD v podmínkách sucha byl zaznamenán také ve studiích s pajasanem žláznatým (Filippou et al. 2014), kiwi (Zhong et al. 2018), jabloněmi (Wang et al. 2018; Yang et al. 2022), jahodníkem (Yosefi et al. 2020), myrtou (Tafreshi et al. 2021), růžemi (Hajizadeh et al. 2022), bramborami (Sajid et Aftab 2022) a „mexickou limetkou“ *Citrus aurantifolia* (Christ.) Swingle (Jafari et Shahsavari 2022). Ve studii Patadeho et al. (2011) s cukrovou třtinou zůstala aktivita SOD v podmínkách PEG indukovaného vodního deficitu beze změny, zatímco ve studii s citrusem (Campos et al. 2011) se její aktivita za nedostatku vody dokonce výrazně snížila. Aktivita CAT a APX byla vyjádřena odbouráváním H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podobně jako ve studii Campos et al. (2011). V reakci na stres ze sucha došlo k nárůstu enzymatické aktivity CAT u obou ovocných odrůd. U odrůd třešní byla v porovnání s odrůdami jabloní aktivita CAT celkově nižší. Významný nárůst aktivity CAT byl sledován také ve studiích s pajasanem žláznatým (Filippou et al. 2014), jabloněmi (Wang et al. 2018; Yang et al. 2022), myrtou (Tafreshi et al. 2021), růžemi (Hajizadeh et al. 2022) a „mexickou limetkou“ *Citrus aurantifolia* (Christ.) Swingle (Jafari et Shahsavari 2022). U odrůd jabloní došlo po aplikaci PEG ke skokovému zvýšení aktivity APX, zatímco u odrůd třešní se aktivita enzymu s rostoucí koncentrací PEG pozvolna zvyšovala. U třešňových odrůd byly, podobně jako u CAT, zaznamenány celkově nižší hodnoty aktivity APX. Nárůst enzymatické aktivity APX v podmínkách sucha byl sledován také ve studiích s jabloněmi (Wang et al. 2012) a myrtou (Tafreshi et al. 2021). Naopak výrazný pokles aktivity enzymu byl zaznamenán za silného stresu ve studiích s citrusem (Campos et al. 2011), cukrovou třtinou (Patadeho et al. 2011) a jabloněmi (Wang et al. 2018). Pokles aktivity antioxidantních enzymů

v podmínkách vláhového deficitu může být způsoben interakcemi enzymů s ROS, které vedou k oxidaci enzymů a jejich deaktivaci (Wang et al. 2012).

Na základě výsledků biochemických analýz provedených v diplomové práci byly určeny jako potenciálně nejvíce odolné vůči stresu ze sucha jabloňové odrůdy 'Rubinstep' a 'Malinové holovouské'. Navzdory tomu, že byl u odrůdy 'Rubinstep' zjištěn v porovnání s ostatními jabloňovými odrůdami méně výrazný vzestup hladiny fytohormonu ABA a aktivit antioxidantních enzymů CAT a APX, byla u ní zaznamenána vyšší akumulace rozpustných sacharidů (glukózy, fruktózy a sacharózy) a cukerných alkoholů (glycerolu a sorbitolu). Odrůda si navíc v podmínkách vodního deficitu udržela vysokou antioxidantní aktivitu a byl u ní rovněž zaznamenán významný vzestup aktivity SOD. Syntéza a akumulace osmoticky aktivních látek a vyšší antioxidantní kapacita jsou považovány za klíčové parametry určující odolnost rostlin vůči působení sucha (Eastmond 2004; Ashraf et al. 2011; Wang et al. 2012; Yang et al. 2019). V bakalářské práci (Dobrovolná 2021) bylo u odrůdy zjištěno významnější snížení čerstvé hmotnosti, obsahu chlorofylů a karotenoidů a výraznější vzestup  $H_2O_2$  a superoxidového radikálu. Tyto výsledky se přiklánějí k možné citlivosti odrůdy vůči suchu. U odrůdy ale bylo současně zaznamenáno málo významné snížení obsahu vody a výrazný nárůst obsahu prolinu. Obsah vody charakterizuje celkový stav rostliny a prolin je považován za důležitou součást antioxidantního systému rostlin. Odrůda byla proto vyhodnocena jako potenciálně odolná suchu. V tomto ohledu se výsledky neshodují s dřívějšími popisy odrůdy. Odrůdu 'Rubinstep' charakterizují jako odolnou zimním a jarním mrazům, která ale vyžaduje dobře zavlažovanou půdu (Blažek 2001; VŠÚO Holovousy 2019).

U odrůdy 'Malinové holovouské' byl sice zaznamenán pokles celkové antioxidantní kapacity, současně u ní ale byla sledována vyšší akumulace rozpustných sacharidů (fruktózy a sacharózy) a polyhydrického alkoholu glycerolu, výrazný nárůst hladiny stresového hormonu ABA a aktivit antioxidantních enzymů CAT a APX. V bakalářské práci (Dobrovolná 2021) byla odrůda navzdory tomu, že u ní bylo zaznamenáno snížení obsahu chlorofylů a výraznější vzestup  $H_2O_2$  a MDA, vyhodnocena jako potenciálně nejvíce odolná vůči stresu ze sucha ze všech testovaných odrůd jabloní. Odrůda totiž dosáhla nejlepších výsledků v preferovaných morfologických parametrech (čerstvá hmotnost, obsah vody a velikost listové plochy) a byly u ní sledovány i vyšší hodnoty aminokyseliny prolinu. Dříve publikované charakteristiky o odrůdě hovoří jako o mrazuvzdorné odrůdě, která netoleruje kratší období sucha (Říha 1919; Boček 2008; Databáze odrůd ovocných dřevin 2010; Archiv starých odrůd ovoce 2016). Na základě výsledků provedených analýz lze ale odrůdu považovat za potenciálně odolnou stresu ze sucha.

Z odrůd třešní dosáhly v biochemických analýzách, které byly provedeny v diplomové práci, nejlepších výsledků odrůdy 'Kaštánka' a 'Sunburst'. U odrůdy

‘Kaštánka’ byla zaznamenána vyšší akumulace rozpustných sacharidů (glukózy, fruktózy a sacharózy) a cukerného alkoholu glycerolu, významný vzestup koncentrace ABA a aktivity antioxidačního enzymu CAT. V bakalářské práci (Dobrovolná 2021) byla odrůda vyhodnocena jako potenciálně nejvíce odolná stresu ze sucha ze všech testovaných odrůd třešní i přes to, že u ní byl zjištěn vyšší nárůst koncentrace MDA a byla jedinou třešňovou odrůdou, u které nebyl zaznamenán v reakci na PEG indukovaný osmotický stres nárůst obsahu karotenoidů. Odrůda totiž dosáhla nejlepších výsledků v morfologických parametrech (čerstvá hmotnost a velikost listové plochy). U odrůdy byly dále zaznamenány vyšší hodnoty prolinu. Na základě těchto výsledků lze odrůdu považovat za potenciálně odolnou vůči suchu v souladu s dřívějšími charakteristikami, které odrůdu popisují jako mrazuvzdornou a suchu tolerantní (Kamenický 1941; Databáze odrůd ovocných dřevin 2010; Archiv starých odrůd ovoce 2016).

U odrůdy ‘Sunburst’ byla zjištěna vyšší akumulace rozpustných sacharidů glukózy a fruktózy a polyolu sorbitolu. Odrůda si navíc v podmínkách stresu ze sucha udržela vysokou antioxidační aktivitu a byl u ní sledován i významný vzestup aktivit enzymů CAT a APX. V bakalářské práci (Dobrovolná 2021) bylo ale u odrůdy zjištěno významné snížení obsahu vody. Naopak snížení čerstvé hmotnosti a velikosti listové plochy nebylo významné. U odrůdy bylo rovněž sledováno nevýrazné snížení obsahu chlorofylů, významný vzestup karotenoidů a malý nárůst MDA. Odrůdu lze proto považovat za potenciálně tolerantní suchu. Dřívější charakteristiky odrůdy ji považují za mrazuvzdornou (Lane 1984).

O souvislosti mezi tolerancí k suchu a mrazu u jabloní a třešní a odolností k suchu a praskání u třešní bylo pojednáno v bakalářské práci (Dobrovolná 2021). V obranných mechanismech rostlin lze nalézt mnoho společného a akumulace osmoticky aktivních látek zde hraje významnou roli (Procházka et al. 1998). Vztah odolnosti vůči suchu a mrazu byl potvrzen u jabloňových odrůd ‘Malinové holovouské’, ‘Rubinstep’ a ‘Car Alexander’ a u odrůd třešní ‘Napoleonova’, ‘Kaštánka’ a ‘Sunburst’. Naopak souvislost mezi nízkou odolností vůči suchu a citlivostí k mrazu byla potvrzena u jabloňové odrůdy ‘Idared’.

Na základě výsledků provedených analýz byly vybrány odrůdy potenciálně odolné vůči stresu ze sucha. Výsledky byly porovnány s výsledky, kterých bylo dosaženo v bakalářské práci „Výzkum tolerance ovocných plodin na suchu v *in vitro* podmínkách“. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 3. Pořadí ovocných odrůd z hlediska potenciální odolnosti vůči stresu ze sucha bylo odhadnuto následovně: jabloňové odrůdy ‘Malinové holovouské’ > ‘Rubinstep’ > ‘Car Alexander’ > ‘Idared’ > ‘Fragrance’ a třešňové odrůdy ‘Kaštánka’ > ‘Sunburst’ > ‘Napoleonova’ > ‘Regina’ > ‘P-HL-C’. Za klíčové parametry určující odolnost působení sucha byly považovány výsledky morfologických parametrů (čerstvá hmotnost, obsah vody, listová plocha), hodnoty prolinu, syntéza a akumulace rozpustných sacharidů (glukóza,

fruktóza a sacharóza) a polyhydrických alkoholů (glycerol, sorbitol) a syntéza antioxidantů a aktivita antioxidantních enzymů (SOD, CAT, APX) (Ashraf et al. 2011; Campos et al. 2011; Wang et al. 2012; Khoyerdi et al. 2016; Anjum et al. 2017; Yang et al. 2019).

Tabulka 3 Odolnost odrůd jableň a třešň vůči stresu ze sucha

Druh ovoce	Odrůda	Výsledky bakalářské práce									Výsledky diplomové práce										
		Morfologické parametry			Fyziologické parametry			Biochemické parametry			Osmoticky aktivní sloučeniny					Syntéza ABA	Antioxidační aktivita			Odolnost suchu	
		Čerstvá hmotnost	Obsah vody	Listová plocha	Chlorofyl <i>a + b</i>	Karotenoidy	Peroxid vodíku	Superoxidový radikál	MDA	Prolin	Glukóza	Fruktóza	Sacharóza	Glycerol	Sorbitol	ABA	Celková antioxidační aktivita	SOD	CAT		APX
Jabloň	'Malinové holovouské'	✓	✓	✓	x				x			✓	✓	✓		✓	x		✓		✓
	'Fragrance'	x	x		✓	✓	✓						✓		✓	x	x	x			X
	'Rubinstep'		✓		x	x	✓	x		✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	x			✓
	'Idared'	x	x	x			x	x	✓		✓	✓		✓	x		x		✓		X
	'Car Alexander'				✓	✓		✓			✓	✓		✓			✓	✓	✓		✓
Třešň	'Regina'					✓	x		✓			✓		✓		x		x	x		X
	'Napoleonova'	x	✓		x		✓	✓	x		✓	✓		✓	✓	x	✓				✓
	'Kaštánka'	✓		✓		x	x		x		✓	✓	✓		✓			✓			✓
	'Sunburst'	✓	x	x	✓	✓	x		✓		✓	✓		✓		✓		✓	✓		✓
	'P-HL-C'	x		x	✓			x		✓			✓		x			x			X

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vyhodnotit vybrané biochemické parametry (akumulace osmoticky aktivních látek, syntéza kyseliny abscisové, antioxidační aktivita) u vybraných 5 odrůd jabloní ('Malinové holovouské', 'Fragrance', 'Rubinstep', 'Idared', 'Car Alexander') a 5 odrůd třešní ('Regina', 'Napoleonova', 'Kaštánka', 'Sunburst', 'P-HL-C'). Vybrané odrůdy byly převedeny do *in vitro* kultur. Osmotický stres byl navozen přidáním polyethylenglykolu (PEG) do kultivačních médií.

Stres ze sucha navozený PEG se projevil u všech testovaných odrůd ovoce. Jednotlivé odrůdy na stres reagovaly odlišně. U všech odrůd jabloní i třešní došlo ke zvýšené syntéze a akumulaci rozpustných sacharidů (glukózy, fruktózy a sacharózy) a polyhydrických alkoholů (glycerolu a sorbitolu) oproti kontrolním rostlinám, pěstovaným na kultivačním médiu bez přídavku PEG. Zvýšená syntéza a akumulace osmoticky aktivních látek je spojena s odolností rostlin vůči působení stresu ze sucha. Vyšší akumulace rozpustných sacharidů a polyolů byla zaznamenána u jabloňové odrůdy 'Rubinstep' a třešňové odrůdy 'Kaštánka'.

V reakci na PEG indukovaný vláhový deficit došlo u všech stresovaných rostlin k výraznému zvýšení hladiny stresového fytohormonu ABA. Vyšší koncentrace ABA byla sledována u odrůd tolerantních suchu. Nejvyšší koncentrace ABA byly u odrůd jabloní i třešní zaznamenány při dvou nejnižších koncentracích PEG. Nejvýraznější nárůsty ABA byly zjištěny u jabloňové odrůdy 'Malinové holovouské' při PEG5 a u třešňové odrůdy 'Kaštánka' při PEG10.

Osmotický stres u rostlin vyvolal sekundární oxidační stres. Stresované rostliny produkovaly a akumulovaly velké množství ROS. V reakci na zvýšenou tvorbu ROS se v listech stresovaných rostlin zvýšila syntéza antioxidantů a aktivita antioxidačních enzymů SOD, CAT a APX. Celková antioxidační kapacita se s narůstající koncentrací PEG v kultivačním médiu mírně snižovala. Vysokou antioxidační kapacitu si udržela jabloňová odrůda 'Rubinstep' a třešňová odrůda 'Sunburst'. U odrůd tolerantních k suchu byl zaznamenán vyšší nárůst aktivity antioxidačních enzymů. U obou ovocných druhů vzestup aktivity enzymu SOD koreloval se vzrůstající koncentrací PEG. Nejvýraznější vzestup aktivity SOD byl zaznamenán u jabloňové odrůdy 'Rubinstep' a třešňové odrůdy 'Napoleonova'. Aktivita enzymů CAT a APX byla u odrůd třešní v porovnání s odrůdami jabloní celkově nižší. Největší nárůst aktivity CAT byl zaznamenán u jabloňové odrůdy 'Malinové holovouské' při PEG25 a PEG50 a u třešňové odrůdy 'Sunburst' při PEG50. U odrůd jabloní bylo sledováno skokové zvýšení aktivity APX. Největší nárůst byl zaznamenán u odrůdy 'Malinové holovouské' při PEG50. U odrůd třešní se aktivita enzymu s rostoucí koncentrací PEG pozvolna zvyšovala. Nejvýraznější nárůst enzymatické aktivity byl zaznamenán u odrůdy 'Sunburst' při PEG50.

Na základě výsledků analýz byly vybrány odrůdy potenciálně odolné vůči stresu ze sucha. Výsledky byly porovnány s výsledky, kterých bylo dosaženo v bakalářské práci „Výzkum tolerance ovocných plodin na sucho v *in vitro* podmínkách“. Pořadí ovocných odrůd z hlediska potenciální odolnosti vůči stresu ze sucha bylo odhadnuto následovně: jabloňové odrůdy ‘Malinové holovouské’ > ‘Rubinstep’ > ‘Car Alexander’ > ‘Idared’ > ‘Fragrance’ a třešňové odrůdy ‘Kaštánka’ > ‘Sunburst’ > ‘Napoleonova’ > ‘Regina’ > ‘P-HL-C’. Výsledky byly porovnány s dříve publikovanými charakteristikami odrůd z hlediska odolnosti suchu.

Vzhledem k rychle se rozrůstající celosvětové populaci a nepříznivým klimatickým předpovědím, které varují před pokračujícím nárůstem průměrných teplot, změnami v rozložení a množství srážek a častějším výskytem období sucha, bude v blízké budoucnosti nezbytné přijmout opatření, která sníží negativní vliv klimatu na rostlinnou produkci a zamezí celosvětové potravinové krizi. Šlechtění a pěstování rostlinných odrůd, které budou lépe odolávat nepříznivým růstovým podmínkám, je možným řešením.



## SEZNAM ZKRATEK

ABA	abscisic acid, kyselina abscisová
APX	askorbát peroxidáza
AsA – GSH cyklus	enzymy askorbát-glutathionového cyklu
AsA	kyselina askorbová
ATP	adenosintrifosfát
C <sub>4</sub>	C <sub>4</sub> -cyklus (Hatch-Slackův cyklus)
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
CAT	kataláza
DPA	kyselina dehydrofázová
Fru	fruktóza
GB	glycin betain
Glc	glukóza
HSPs	Heat Shock Proteins, proteiny teplotního šoku
LEA proteiny	Late Embryogenesis Abundant Proteins
MDA	malondialdehyd
NADP <sup>+</sup>	oxidovaná forma nikotinamidadendinukleotidfosfátu
NADPH	nikotinamidadendinukleotidfosfát
PA	kyselina fázová
PEG	polyethylenglykol
PS I, PS II	fotosystém I, fotosystém II
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktivních formy kyslíku
Rubisco	ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza
SOD	superoxid dismutáza
Suc	sacharóza
UDP-glukóza	uridindifosfoglukóza

Pozn. V seznamu zkratk nejsou uvedeny zkratky, které se v textu vyskytují ojediněle. Tyto zkratky jsou vysvětleny pouze v textu.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Akbarpour, E.; Imani, A.; Yeganeh, S. F. (2017). Physiological and Morphological Responses of Almond Cultivars under In Vitro Drought Stress. *Journal of Nuts*. 8(1): 61–72. ISSN: 2383 – 319X.
2. Anjum, S. A.; Ashraf, U.; Zohaib, A.; Tanveer, M.; Naeem, M.; Ali, I.; Nazir, U.; Tabassum, T. (2017). Growth and developmental responses of crop plants under drought stress: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*. 104(3): 267–276. DOI: 10.13080/z-a.2017.104.034.
3. Anjum, S. A.; Xie, X.; Wang, L.; Saleem, M. F.; Man, Ch.; Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*. 6: 2026–2032. DOI: 10.5897/AJAR10.027.
4. Aroca, R. [ed.] 2012. *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features*. Berlin: Springer. 466 s. ISBN 978-3-642-32652-3.
5. Ashraf, M.; Akram, N. A.; Al-Qurainy, F.; Foolad, M. R. (2011). Chapter five – Drought Tolerance: Roles of Organic Osmolytes, Growth Regulators, and Mineral Nutrients. *Advances in Agronomy*. 111: 249–296. DOI: 10.1016/B978-0-12-387689-8.00002-3.
6. Ashraf, M.; Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 59: 206–216. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2005.12.006.
7. Bielsa Pérez, B.; Leida, C.; Rubio-Cabetas, M. J. (2016). Physiological characterization of drought stress response and expression of two transcription factors and two LEA genes in three *Prunus* genotypes. *Scientia Horticulturae*. 213: 260–269. DOI: 10.1016/j.scienta.2016.11.006.
8. Blažek, J. 2001. Odrůda jabloně Rubinstep. *Vědecké práce ovocnářské*. 17: 163–165. ISSN 0231-6900.
9. 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.
10. Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation. *Annals of Botany*. 91: 179–194. DOI: 10.1093/aob/mcfl8.
11. Boček, S. 2008. *Ovocné dřeviny v krajině. Sborník přednášek a seminárních prací*. Hostětín. 185 s. ISBN: 978-80-904109-2-3.
12. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1–2): 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

13. Campos, M. K. F.; Carvalho, K.; Souza, F. S.; Marur, C. J.; Pereira, L. F. P.; Filho, J. C. B.; Vieira, L. G. E. (2011). Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic "Swingle" citrumelo plants over-accumulating proline. *Environmental and Experimental Botany*. 72(2): 242–250. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2011.03.009.
14. Český hydrometeorologický ústav. 2022. Monitoring sucha. [online]. [cit. 2022-09-10]. Dostupné z: <https://www.chmi.cz/aktualni-situace/sucho#>
15. Český statistický úřad. 2010. Zavlažování. [online]. [cit. 2022-09-10]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/documents/10180/24149533/212911045.pdf/85a61b82-148a-451b-b257-a295ea0cb5be?version=1.0>
16. Český statistický úřad. 2020. Zavlažování. [online]. [cit. 2022-09-10]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/documents/10180/142813731/27016621023.pdf/1d4f293c-744d-48f7-894e-ca45f158f834?version=1.1>
17. Český svaz ochránců přírody. 2016. Archiv starých odrůd ovoce. 2016. [databáze online]. [cit. 2022-06-10]. <http://www.plantsdata.com/Webovoce.aspx>
18. Dar, N. A.; Amina, I.; Wania, W.; Wania, S. A.; Shikarib, A. B.; Wanic, S. H.; Masoodi, K. Z. (2017). Abscisic acid: A key regulator of abiotic stress tolerance in plants. *Plant Gene*. 11: 106–111. DOI: 10.1016/j.plgene.2017.07.003.
19. Daszkowska-Golec, A. (2016). The Role of Abscisic Acid in Drought Stress: How ABA Helps Plants to Cope with Drought Stress. *Drought Stress Tolerance in Plants*. 2: 123–151. DOI: 10.1007/978-3-319-32423-4\_5.
20. 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.
21. Ďurech, M.; Vojtěšek, B.; Müller, P. (2012). The Many Roles of Molecular Chaperones and Co-chaperones in Tumour Biology. *Klin. Onkol.* 25(2): 45–49. DOI: 10.14735/amko20122S45.
22. Eastmond, P. J. (2004). Glycerol-insensitive Arabidopsis mutants: gli1 seedlings lack glycerol kinase, accumulate glycerol and are more resistant to abiotic stress. *The Plant Journal*. 37: 617–625. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2003.01989.x.
23. 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.
24. Filippou, P.; Bouchagier, P.; Skotti, E.; Fotopoulos, V. (2014). Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and

- salinity. *Environmental and Experimental Botany*. 97: 1–10. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2013.09.010.
25. 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.
  26. Hajizadeh, H. S.; Azizi, S.; Rasouli, F.; Okatan, V. (2022). Modulation of physiological and biochemical traits of two genotypes of *Rosa damascena* Mill. by SiO<sub>2</sub>-NPs under *In vitro* drought stress. *BMC Plant Biology*. 22: 538. DOI: 10.1186/s12870-022-03915-z.
  27. Heldt, H. W.; Piechulla, B.; Heldt, F. 2005. *Plant Biochemistry*, 3th Edition. USA: Academic Press. 647 s. ISBN: 0-12-088391-033.
  28. Hong-Bo, S.; Zong-Suo, L.; Ming-An, S. (2005). LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 45: 131–135. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2005.07.017.
  29. Chen, Y.; Chen, Y.; Shi, Z.; Jin, Y.; Sun, H.; Xie, F.; Zhang, L. (2019). Biosynthesis and Signal Transduction of ABA, JA, and BRs in Response to Drought Stress of Kentucky Bluegrass. *International Journal of Molecular Sciences*. 20: 1289. DOI: 10.3390/ijms20061289.
  30. IPCC. 2018. Global Warming of 1.5 °C. [online]. [cit. 2022-09-10]. Dostupné z: <https://www.ipcc.ch/sr15/>
  31. IPCC. 2022. Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. [online]. [cit. 2022-09-10]. Dostupné z: <https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg2/>
  32. Jafari, M.; Shahsavari, A. R. (2022). Sodium nitroprusside: its beneficial role in drought stress tolerance of “Mexican lime” (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swingle) under *in vitro* conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 58: 155–168. DOI: 10.1007/s11627-021-10218-9.
  33. 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.
  34. Jia, K.; Mi, J.; Ali, S.; Ohyanagi, H.; Moreno, J. C.; Ablazov, A.; Balakrishna, A.; Berqdar, L.; Fiore, A.; Diretto, G.; Mart´nez, C.; Lera A. R.; Gojobori, T.; Al-Babili, S. (2022). An alternative, zeaxanthin epoxidase-independent abscisic acid biosynthetic pathway in plants. *Molecular Plant*. 15: 151–166. DOI: 10.1016/j.molp.2021.09.008.
  35. Jiroutová, P.; Kovalíková, Z. 2021. Certifikovaná metodika odolnosti ovocných plodín k suchu v *in vitro* podmínkách. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. 33 s. ISBN 978-80-87030-81-3.

36. Jiroutová, P.; Kovalíková, Z.; Toman, J.; Dobrovolná, D.; Andrys, R. (2021). Complex Analysis of Antioxidant Activity, Abscisic Acid Level, and Accumulation of Osmotica in Apple and Cherry In Vitro Cultures under Osmotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 22: 7922. DOI: 10.3390/ijms22157922.
37. Kamenický, K. 1941. Atlas tržních odrůd ovocných. Praha: Československá grafická unie. 123 s. Dostupné z: <https://www.weby-csop.cz/stareodrudy/wp-content/uploads/sites/2/2016/04/kamenicky-karel-atlas-trznich-odrud-ovocnych-1.pdf>
38. Karimi, S.; Rahemi, M.; Rostami, A. A.; Sedaghat, S. (2018). Drought Effects on Growth, Water Content and Osmoprotectants in Four Olive Cultivars with Different Drought Tolerance. *International Journal of Fruit Science*. 18(3): 254–267. DOI: 10.1080/15538362.2018.1438328.
39. Kaur, G.; Asthir, B. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum*. 59(4): 609–619. DOI: 10.1007/s10535-015-0549-3.
40. Khoyerdi, 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.
41. Kincl, M.; Krpeš, V. 2000. *Základy fyziologie rostlin*. Ostrava: Montanex, a. s. 221 s. ISBN 80-7225-041-8.
42. 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.
43. Kowitcharoen, L.; Wongs-Aree, Ch.; Seta, S.; Komkhuntod, R.; Srilaong, V.; Kondo, S. (2015). Changes in abscisic acid and antioxidant activity in sugar apples under drought conditions. *Scientia Horticulturae*. 193: 1–6. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.06.043.
44. Kutina, J.; Dvorský, P.; Vanek, G.; Suchardová, M. 1991. *Pomologický Atlas 1*. Praha: Brázda. 287 s. ISBN 80-209-0089-6.
45. Kutina, J.; Holeček, S. 1992. *Pomologický Atlas 2*. Praha: Brázda. 300 s. ISBN 978-80-209-0192-7.
46. 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.
47. Laxa, M.; Liebthal, M.; Telman, W.; Chibani, K.; Dietz, K.-J. (2019). The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. *Antioxidants*. 8(4): 94. DOI: 10.3390/antiox8040094.
48. Lo Bianco, R.; Rieger, M.; Sung, S. S.-J. (2000). Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach. *Physiologia Plantarum*. 108(1): 71–78. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2000.108001071.x.
49. Ma, Q.-J.; Sun, M.-H.; Lu, J.; Kang, H.; You, Ch.-X.; Hao, Y.-J. (2019). An apple sucrose transporter MdSUT2.2 is a phosphorylation target for protein

- kinase MdCIPK22 in response to drought. *Plant Biotechnology Journal*. 17: 625–637. DOI: 10.1111/pbi.13003.
50. Majumder, A. L.; Sengupta, S.; Goswami, L. 2010. Osmolyte Regulation in Abiotic Stress. – In: Pareek, A.; Sopory, S. K.; Bohnert, H. J.; Govindjee [eds.] 2010. *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*. Berlin: Springer. ISBN: 9048131111.
  51. Mäser, P.; Leonhardt, N.; Schroeder, J. (2003). The Clickable Guard Cell: Electronically Linked Model of Guard Cell Signal Transduction Pathways. *The Arabidopsis Book*. 32(1). DOI: 10.1199/tab.0099.
  52. Matoušková, M.; Ruttkay-Nedecký, B.; Kizeka, R. 2014. Antioxidační enzymy – biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 3: 53–56. ISSN 2336-3940.
  53. 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.
  54. Noiraud, N.; Maurousset, L.; Lemoine, R. (2001). Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39(9): 717–728. DOI: 10.1016/s0981-9428(01)01292-x.
  55. Ovesná, J.; Janská, A. 2011. Co poskytuje biotechnologie současnému šlechtění. - In: Bláha, L.; Hnilička, F. [eds.] 2011. *Aktuální kapitoly z fyziologie rostlin a zemědělského výzkumu 2011*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2011. ISBN 978-80-7427-069-7.
  56. Patade, V. Y.; Bhargava, S.; Suprasanna, P. (2011). Effects of NaCl and iso-osmotic PEG stress on growth, osmolytes accumulation and antioxidant defense in cultured sugarcane cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 108: 279–286. DOI: 10.1007/s11240-011-0041-5.
  57. Peleg, Z.; Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 14(3): 290–295. DOI: 10.1016/j.pbi.2011.02.001.
  58. Perin, E. C.; Messias, R. S.; Borowski, J. M.; Crizel, R. L.; Schott, I. B.; Carvalho, I. R.; Rombaldi, C. V.; Galli, V. (2019). ABA-dependent salt and drought stress improve strawberry fruit quality. *Food Chemistry*. 271: 516–526. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.07.213.
  59. Pessarakli, M. [ed.] 1999. *Handbook of Plant and Crop Stress*, 2th Edition. New York: Marcel Dekker. 1254 s. ISBN: 0-8247-1948-4.
  60. Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M.; Peč, P. (2005). Oxidative Stress: Localisation of Reactive Oxygen Species Formation and Degradation in Plant Tissue. *Chemické Listy*. 99(7): 455–466.
  61. Procházka, S.; Macháčková, I.; Krekule, J.; Šebánek, J. 1998. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia. 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
  62. 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.
63. Reddy, A. R.; Chaitanya, K. V.; Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*. 161(11): 1189–1202. DOI:10.1016/j.jplph.2004.01.013.
64. Ritchie, H.; Roser, M. CO<sub>2</sub> and Greenhouse Gas Emissions. In: *Our World in Data* [online]. [cit. 10. 03. 2022]. Dostupné z: <https://ourworldindata.org/co2-and-other-greenhouse-gas-emissions#citation>
65. 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>
66. Říha, J. 1937. *České ovoce III. Jablka*. 2. nezměněné vydání. 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>
67. Sajid, Z. A.; Aftab, F. (2022). Improvement of Polyethylene Glycol, Sorbitol, Mannitol, and Sucrose-Induced Osmotic Stress Tolerance through Modulation of the Polyamines, Proteins, and Superoxide Dismutase Activity in Potato. *International Journal of Agronomy*. 5158768. DOI: 10.1155/2022/5158768.
68. Slováková, L.; Mistrík, I. 2007. *Fyziologické procesy rostlín*. Bratislava: Vydavateľstvo UK. 238 s. ISBN 978-80-223-2322-2.
69. 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.
70. Škodáček, Z.; Vlasáková, E.; Prášil, I. T.; Vejl, P. 2011. Fenomén proteinů a kyseliny abscisové ve vztahu k abiotickému stresu u rostlin, zejména k suchu. - In: Bláha, L.; Hnilička, F. [eds.] 2011. *Aktuální kapitoly z fyziologie rostlin a zemědělského výzkumu 2011*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2011. ISBN 978-80-7427-069-7.
71. Tafreshi, S. A. H.; Aghaie, P.; Momayez, H. R.; Hejaziyan, S. A. (2021). Response of in vitro-regenerated *Myrtus communis* L. shoots to PEG-induced water stress. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 34: 102033. DOI: 10.1016/j.bcab.2021.102033.
72. Taiz, L.; Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*, 4th Edition. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. 700 s. ISBN 978-0878938568.



73. Tworkoski, T.; Fazio, G.; Glenn, D. M. (2016). Apple rootstock resistance to drought. *Scientia Horticulturae*. 204: 70–78. DOI: 10.1016/j.scienta.2016.01.047.
74. 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>
75. 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>
76. Vysloužil, J.; Nečas, T.; Vysloužil, M. 2010. Databáze odrůd ovocných dřevin. 2010. [databáze online]. [cit. 2022-06-10]. [Databáze odrůd ovocných dřevin – Databáze odrůd ovocných dřevin \(jirivysluzil.cz\)](https://www.jirivysluzil.cz/)
77. 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. 2022-06-10]. Dostupné z: <https://www.vsu.cz/de/ovocnarska-produkce-a-prodej/stromky-a-kere-prostokorene-i-kontejnerovane>
78. Wang, Ch.; Chen, S.; Dong, Y.; Ren, R.; Chen, D.; Chen, X. (2020). Chloroplastic Os3BGlu6 contributes significantly to cellular ABA pools and impacts drought tolerance and photosynthesis in rice. *New Phytologist*. 226: 1042–1054. DOI: 10.1111/nph.16416.
79. Wang, S.; Liang, D.; Li, C.; Hao, Y.; Ma, F.; Shu, H. (2012). Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*. 51: 81–89. DOI: 10.1016/j.plaphy.2011.10.014.
80. 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.
81. Wheeler, T.; Braun, J. (2013). Climate Change Impacts on Global Food Security. *Science*. 341: 508–513. DOI: 10.1126/science.1239402.
82. Wilhite, D. A. [ed.] 2005. Drought and Water Crises: Science, Technology, and Management Issues, 1st Edition. New York: CRC Press. ISBN: 978-1-4200-2838-6.
83. 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.
84. Yang, J.; Wang, M.; Zhou, S.; Xu, B.; Chen, P.; Ma, F.; Mao, K. (2022). The ABA receptor gene MdPYL9 confers tolerance to drought stress in transgenic



- apple (*Malus domestica*). Environmental and Experimental Botany. 194: 104695. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2021.104695.
85. Yang, J.; Zhang, J.; Li, C.; Zhang, Z.; Ma, F.; Li, M. (2019). Response of sugar metabolism in apple leaves subjected to short-term drought stress. Plant Physiology and Biochemistry. 141: 164–171. DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.05.025.
  86. Yosefi, A.; Mozafari, A.; Javadi, T. (2020). Jasmonic acid improved in vitro strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.) resistance to PEG-induced water stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 142: 549–558. DOI: 10.1007/s11240-020-01880-9.
  87. Yoshida, T.; Mogami, J.; Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. Current Opinion in Plant Biology. 21: 133–139. DOI: 10.1016/j.pbi.2014.07.009.
  88. Zargar, S. M.; Gupta, N.; Nazir, M.; Mahajan, R.; Malik, F. A.; Sofi, N. R.; Salgotra, R. K. (2017). Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. Plant Gene. 11: 154–159. DOI: 10.1016/j.plgene.2017.04.003.
  89. Zhang, Z.; Cao, B.; Li, N.; Chen, Z.; Xu, K. (2019). Comparative transcriptome analysis of the regulation of ABA signaling genes in different rootstock grafted tomato seedlings under drought stress. Environmental and Experimental Botany. 166: 103814. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.1038.
  90. Zhong, Y.-P.; Li, Z.; Bai, D.-F.; Qi, X.-J.; Chen, J.-Y.; Wei, C.-G.; Lin, M.-M.; Fang, J.-B. (2018). In Vitro Variation of Drought Tolerance in Five *Actinidia* Species. Journal of the American Society for Horticultural Science 143: 226–234. DOI: 10.21273/JASHS04399-18.

## **PŘÍLOHY**

1. Příloha 1 Complex Analysis of Antioxidant Activity, Abscisic Acid Level, and Accumulation of Osmotica in Apple and Cherry In Vitro Cultures under Osmotic Stress. International Journal of Molecular Sciences (Jiroutová et al. 2021).



## Article

# Complex Analysis of Antioxidant Activity, Abscisic Acid Level, and Accumulation of Osmotica in Apple and Cherry In Vitro Cultures under Osmotic Stress

Petra Jiroutova <sup>1,\*</sup>, Zuzana Kovalikova <sup>2,†</sup>, Jakub Toman <sup>2</sup>, Dominika Dobrovolna <sup>2</sup> and Rudolf Andrys <sup>3</sup><sup>1</sup> Research and Breeding Institute of Pomology Ltd., Holovousy 129, 50801 Hořice, Czech Republic<sup>2</sup> 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.)<sup>3</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Kralove, Rokitanskeho 62, 50003 Hradec Kralove, Czech Republic; rudolf.andrys@uhk.cz

\* Correspondence: petra.jiroutova@vsuo.cz

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Jiroutova, P.; Kovalikova, Z.; Toman, J.; Dobrovolna, D.; Andrys, R. Complex Analysis of Antioxidant Activity, Abscisic Acid Level, and Accumulation of Osmotica in Apple and Cherry In Vitro Cultures under Osmotic Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7922. <https://doi.org/10.3390/ijms22157922>

Academic Editors: Giampiero Cai, Luigi Parrotta and Lavinia Maseri

Received: 31 May 2021

Accepted: 19 July 2021

Published: 25 July 2021

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



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

**Abstract:** Plant response to osmotic stress is a complex issue and includes a wide range of physiological and biochemical processes. Extensive studies of known cultivars and their reaction to drought or salinity stress are very important for future breeding of new and tolerant cultivars. Our study focused on the antioxidant activity, accumulations of osmotica, and the content of abscisic acid in apple (cv. “Malinové holovouské”, “Fragrance”, “Rubinstep”, “Idared”, “Car Alexander”) and cherry (cv. “Regina”, “Napoleonova”, “Kaštánka”, “Sunburst”, “P-HL-C”) cultivated in vitro on media containing different levels of polyethylene glycol PEG-6000. Our results indicated that the studied genotypes responded differently to osmotic stress manifested as reduction in the leaf relative water content (RWC) and increment in the activities of antioxidant enzymes, proline, sugars, and abscisic acid content. Overall, cherry cultivars showed a smaller decrease in percentage RWC and enzymatic activities, but enhanced proline content compared to the apple plants cultivars. Cultivars “Rubinstep”, “Napoleonova”, and “Kaštánka” exhibited higher antioxidant capacity and accumulation of osmoprotectants like proline and sorbitol that can be associated with the drought-tolerance system.

**Keywords:** abiotic stress; in vitro culture; antioxidants; sugar alcohols; proline; abscisic acid

## 1. Introduction

Plants are constantly exposed to various types of stress, of which the most severe is stress produced by water imbalance in the ecosystem. Both decreasing rainfall and rising average temperatures reduce water storage in soil and cause drought stress. Moreover, irrigation with high ion content water and overuse of chemical fertilizers significantly contributes to soil salinization. Drought and high soil salinity lead to osmotic stress in plants and represent the major abiotic stress factor that affects the growth of plants and agricultural production worldwide [1]. Responses to abiotic stress in plants are complex and include numerous physiological and biochemical processes affecting their growth and productivity. This complexity makes selection and breeding of tolerant cultivars extremely difficult [2].

In general, osmotic stress causes a wide range of morphological, physiological, and biochemical changes that are crucial for mitigating the negative effect of water deficiency. One of the known mechanisms that plants use to avoid water deficit in salt or drought stress environment is osmotic adjustments which are crucial for maintaining cell turgor and plant metabolic activity. Plants synthesize osmotica such as proline or soluble sugars to establish osmotic balance at the cellular level [3]. Proline is a cyclic amino acid with low molecular weight and high water solubility. Under the normal conditions, it is an important part of

many proteins and under various stress conditions proline has an essential role as one of the most abundant osmoprotectants. Proline accumulation can be used as a physiological indicator of plant resistance to stress tolerance [4]. Soluble sugars like glucose, fructose, sucrose, and sugars like glycerol or sorbitol represent an essential metabolite complex playing various roles in plant development. They are a fuel for plant growth, signalling molecules, and precursors for metabolism. They can stabilize the cell membrane or protect plants from oxidative stress under the stress conditions by being part of the reactive oxygen species scavenging system [5]. Similar to accumulation of proline, the accumulation of sugars can be used as a physiological indicator for evaluation of stress tolerance [3].

All stress conditions can induce an accumulation of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide  $H_2O_2$  and superoxide  $\cdot O_2^-$ , in plant cells. Overproduction of ROS is toxic for plants because they cause the oxidation of lipids, proteins, nucleic acids, and carbohydrates that can result in irreversible changes in plants or lethality. Plants have evolved complex antioxidant system to protect cellular membranes and organelles from the damaging effect of ROS that consists of both enzymatic and non-enzymatic mechanisms of detoxification. Non-enzymatic antioxidant system includes both water soluble low molecular mass compounds, such as ascorbic acid or glutathione, and lipid soluble antioxidants such as  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene [6]. Enzymatic antioxidant system in plants includes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR) [7]. Superoxide dismutase belongs to the first line of enzymatic defence against enhanced level of ROS with its ability to catalyse conversion of superoxide  $\cdot O_2^-$  to  $O_2$  and  $H_2O_2$  in all subcellular compartments. In plants, several distinct types of SOD can occur, each varying with respect to the metal at the active site [8]. Catalase is present in the peroxisomes, and as a key antioxidant enzyme plays a fundamental role in the catalytic scavenging of  $H_2O_2$  and its decomposition to water and oxygen. An increase in catalase activity is often part of the adaptive response of plants to abiotic stress. It is assumed that without increase in catalase activity, plant growth would be more reduced and damaged under the stress conditions [9]. Ascorbate peroxidase presents another key antioxidant enzyme involved in scavenging  $H_2O_2$  by its conversion to  $H_2O$  using ascorbate as the source of reducing power. The level of expression of APX tightly correlates with the intensity and duration of applied stress. It is suggested that crosstalk amongst various antioxidant enzymes does exist in plants. For example, activity of APX increases in the presence of other antioxidant enzymes like SOD and GR [10].

In addition to antioxidants and osmotica, the phytohormones also remarkably contribute to the adaptation of plants in response to osmotic stress. Among plant hormones, abscisic acid (ABA) plays a central role in the regulation of stress responses via regulation of several physiological processes such as opening and closure of stomata or helping the roots to increase their absorption area. The level of endogenous ABA as well as the ABA associated enzymes sharply increases during water deficit [11,12].

Assessing plant response to osmotic stress can be achieved by using water-soluble, high molecular weight polymer polyethylene glycol (PEG). In the present study, PEG-6000 was added to the cultivation medium. Previously, it has been reported that PEG does not enter the cell wall space and that PEG molecules with a molecular weight greater than 3000 are evidently not absorbed. Apparently, PEG also does not have any toxic effects on plants, and it is widely used to induce drought or salinity stress in higher plants through lowering the water potential of the nutrient solution [13].

Apple is one of the most consumed and widespread agricultural commodities around the world, primarily because of its texture, flavour, and nutritive values [14]. As well as apples, cherries are a popular fruit, valued for both their taste and nutrients with plenty of beneficial health effects [15]. In this study, five apple and cherry cultivars were cultivated at different levels of PEG in medium and their physiological and biochemical responses were monitored. Such a comprehensive analysis of versatile responses to osmotic stress in apple and cherry *in vitro* culture has not been carried out previously. In addition, this study aims to help breeders find a quick laboratory tool for initial screening of varieties in breeding of

new cultivars. Thus, we provide fundamental information for breeding of new resistant or tolerant cultivars. In terms of breeding programs, *in vitro* based techniques with PEG enriched medium are able to screen diverse plant cultures in laboratory conditions in a short time. On the other hand, the major disadvantage of this method is simulation of drought stress via osmotic stress, contrary to withholding irrigation methods based on whole plants. Therefore, the combination of both methods could be beneficial for future breeding programs.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material and Experimental Conditions

All the 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. Cultivars were selected to include a representative of the commercial varieties (“Idared”, “Rubinstep”, “Regina”) but also landraces (“Malinové holovouské”, “Car Alexander”, “Napoleonova”). According to stress tolerance of selected cultivars, apple cultivars “Fragrance”, “Rubinstep”, and “Car Alexander” are considered to be frost resistant [16–18] contrary to “Idared”, which is ranked among the sensitive varieties [19]. In case of cherry cultivars, “Sunburst” and “P-HL-C” are resistant to frost [20,21] and “Napoleonova” is known for its drought resistance [22]. *In vitro* explants were cultivated in 100 mL Erlenmeyer flasks capped with aluminium foil, each flask contained 25 mL of solid (7.0 g L<sup>-1</sup> agar) Murashige and Skoog (MS) medium [23] with the shoot growth stimulant 6-aminobenzylpurine (BAP) at a concentration of 1.5 mg L<sup>-1</sup>. pH was adjusted to 5.7 before autoclaving at 121 °C for 15 min. The growth conditions were as follows: photoperiod 16 h light/8 h dark and a temperature 22 ± 1 °C. Well established *in vitro* cultures were transferred in the fresh medium every 30 days. Different levels of osmotic stress were achieved by adding polyethylene glycol (PEG-6000) at a concentration of 0, 5, 10, 25, and 50 g L<sup>-1</sup> to the basal medium labelled as PEG0, PEG5, PEG10, PEG25, and PEG50, respectively. These concentrations represent water potential of the medium as follow 0.002 MPa, 0.004 MPa, 0.01 MPa, 0.02 MPa. Explants were treated with PEG-6000 for 30 days, which is a standard subcultivation period for this kind of plant material. After 30 days of cultivation on media (with or without PEG-6000), *in vitro* explants were used as plant material for following analysis. At least three independent measurements were carried out for each cultivar and each concentration.

### 2.2. Determination of Relative Water Content

Six explants from two independent experiments for each cultivar were weighed immediately (FW) after harvesting to determine the relative water content (RWC). Explants were submerged in distilled water for 4 h and then turgid weight (TW) was measured. Afterwards, the explants were dried in oven at 105 °C to the constant weight to obtain their dry weight (DW). Relative water content was calculated using the following formula [24]:

$$\text{RWC (\%)} = \frac{\text{fresh weight (FW)} - \text{dry weight (DW)}}{\text{turgid weight (TW)} - \text{dry weight (DW)}} \times 100$$

### 2.3. Determination of Osmotic Regulating Compounds

#### 2.3.1. Proline Content

The content of proline was determined via the sulfosalicylic acid/ninhydrin reaction method described by Bates et al. [25]. Fresh leaf material (300 mg) was extracted in 5 mL of 3% sulfosalicylic acid. After centrifugation at 4500 rpm (10 min), 2 mL supernatant were mixed with 2 mL glacial acetic acid and 2 mL acidified ninhydrin reagent and left incubated for 60 min in a boiling water bath. After rapid cooling to 25 °C, 3 mL toluene was added. The absorbance of coloured toluene fractions was read at 520 nm. Proline (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) was used as a standard.



### 2.3.2. Simple Sugars and Sugar Alcohols Content

An aliquot of fresh leaves (300 mg) was homogenized in 80% ethanol and heated at 80 °C for 20 min. The homogenate was centrifuged at 4500 rpm for 10 min. The supernatant was collected in a clean tube, the pellet was resuspended in 50% ethanol and reheated at 80 °C for 20 min. After centrifugation, the supernatants were pooled. This step was repeated once more. The content of sugars (glucose, fructose, sucrose) and sugar alcohols (sorbitol, glycerol) in the combined supernatants determined using UHPLC Infinity II 1290 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a 6470 Series Triple Quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies; electrospray ionization, negative polarity) as detector. The method used a BEH Amide column (2.1 mm × 150 mm, 2.6 µm, Waters, Milford, MA, USA). An isocratic elution program was used for chromatographic separation applying mobile phase comprising 20:80% mixture of 0.05% formic acid in water and 8:2 acetonitrile/methanol mixture. The flow rate was 0.4 mL min<sup>-1</sup>. Ion source parameters: gas temperature 150 °C, gas flow 6 L min<sup>-1</sup>, nebulizer 40 psi, sheath gas temperature 300 °C, sheath gas flow 128 L min<sup>-1</sup>, capillary voltage 2500 V, and nozzle voltage 0 V. The sample injection volume was 1 µL. All standards used were purchased from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany).

### 2.4. Determination of Antioxidant Capacity and Antioxidant Enzymes Activity

Antioxidant capacity of plant extracts was assayed using previously reported [26] discoloration of a purple-coloured solution of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) with some modifications. The mixture of 60 µmol L<sup>-1</sup> DPPH in methanol (1.5 mL) and the sample extract (30 µL) was left at room temperature in the dark for 30 min and evaluated spectrophotometrically at 517 nm. The percentage of DPPH scavenging effect was calculated using the formula: % Scavenging = [(A<sub>control</sub> - A<sub>sample</sub>)/A<sub>control</sub>] × 100, where A<sub>control</sub> is the absorbance of the solution without extract and A<sub>sample</sub> is the absorption of the solution with extract.

For detection of enzymatic activities, 200 mg of fresh leaves was homogenized in cooled potassium phosphate buffer (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7.0). The homogenates were centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 4 °C. The SOD activity (EC 1.15.1.1) was determined following the manufacturer instructions of SOD assay kit (Sigma-Aldrich, catalogue number 19160) and expressed as inhibition rate (%). Superoxide anions generated by oxidation of xanthine reduce nitroblue tetrazolium to nitroblue tetrazolium formazan. The presence of SOD reduces the level of superoxide, which also decreases the level of formazan derivative. The activities of CAT (EC 1.11.1.6) and APX (EC 1.11.1.1) were measured at 240 and 290 nm following the decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and oxidation of ascorbic acid, respectively, and expressed as µmol mg<sup>-1</sup> proteins and nmol mg<sup>-1</sup> proteins, respectively [27].

Proteins were quantified according to Bradford's method [28] at 595 nm with bovine serum albumin (Bio-Rad) as a standard.

### 2.5. Determination of Abscisic Acid Content

Fresh plant material (100 mg) was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until used. The extraction of abscisic acid (ABA) was carried out as described previously [29]. Briefly, the extraction used precooled 15:4:1 mixture methanol/water/formic acid at -20 °C. The prepared samples were purified using a Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Short tC18 column (Waters, Dublin, Ireland) and a Strata<sup>™</sup>-X-C 33 µm column (Phenomenex, CA, Torrance, USA) via elution with methanol. The desired fraction was evaporated to dryness and subsequently analysed using UHPLC-MS. Concentration of abscisic acid in all samples was determined using UHPLC Infinity II 1290 system coupled to a 6470 Series Triple Quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) with negative electrospray ionization (ESI). The method included a Zorbax RRHD Eclipse plus C18 column (2.1 × 50 mm, 1.8 µm, Agilent Technologies), column temperature 40 °C, injection volume 1 µL, the mobile phase flow rate 0.40 mL min<sup>-1</sup>, and a gradient elution program 0 min-10% A, 1.0 min-10% A, 4.0 min-95% A, 5.0 min 94% A, 5.1 min-10% A, and 6.0 min-10% A in

B, where A was Milli-Q water and B was acetonitrile. MS conditions were as follow: gas temperature 300 °C, gas flow 6 L min<sup>-1</sup>, nebulizer 40 psi, sheath gas temperature 400 °C, sheath gas flow 12 L min<sup>-1</sup>, capillary voltage 2000 V, and nozzle voltage 1200 V. Two MRM transitions were monitored: 263.1→219.1, 153.1.

### 2.6. Statistical Analysis

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

### 3. Results

Generally, the appearance of the in vitro explants changed with the increasing concentration of PEG in culture medium. Rising levels of oxidative stress caused obvious pigment loss and reduction in the explant size, as shown in Figure 1.

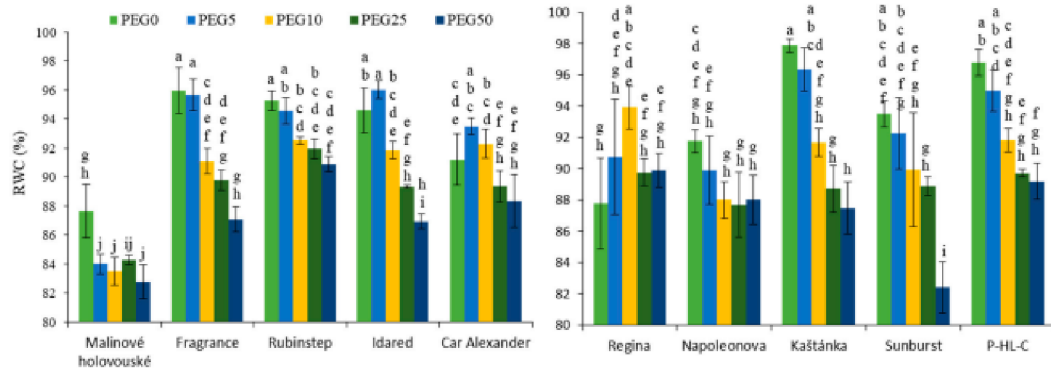


**Figure 1.** Effect of different concentration of polyethylene glycol (PEG-6000) on the growth and appearance of the in vitro culture of apple cultivar “Rubinstep” (A) and cherry cultivar “Kaštánka” (B); PEG concentration in g L<sup>-1</sup> increasing from left to right (PEG0, PEG5, PEG10, PEG25, PEG50).

#### 3.1. Relative Water Content (RWC)

Increasing concentration of PEG in the medium led to a simultaneous decrease in RWC, except for the cultivars “Car Alexander” and “Regina”, where the two lowest concentrations of PEG resulted in a slight enhancement (significantly only in “Regina” PEG10 plants) (Figure 2). Overall, cherry cultivars displayed a decrease to a lower percentage in the tissues RWC than the apple cultivars. The lowest RWC values in control and PEG treated plants of all tested cultivars were monitored in “Malinové holovouské”. A significant decrease

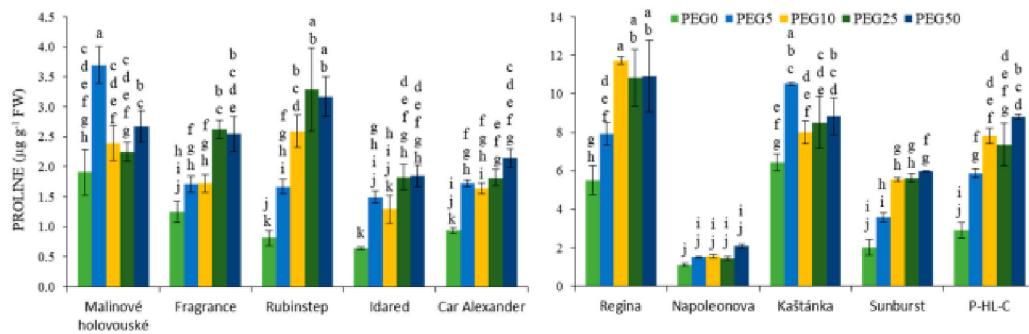
compared to untreated plants was observed at higher concentrations of PEG (PEG25 and PEG50), mainly for “Fragrance” and “Idared” apples and “Kaštánka”, “Sunburst” and “P-HL-C” cherries.



**Figure 2.** Effect of PEG-6000 concentration on the relative water content (%) for in vitro culture of apple (left) and cherry (right) cultivars. Error bars represent standard deviation (SD). Values within column, followed by the same letter(s), are not significantly different according to Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Osmotic Regulating Compounds

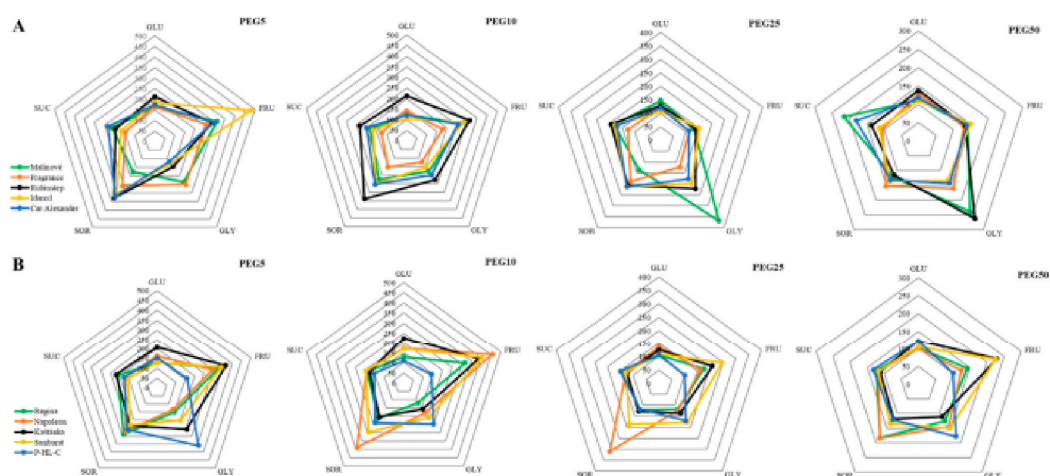
Increasing concentration of PEG in medium stimulated the proline accumulation in all tested apple and cherry cultivars (Figure 3). The maxima for individual cultivars were achieved mostly after application of the two highest concentrations PEG25 and PEG50, except for “Malinové holovouské” apple cultivar and for “Regina” and “Kaštánka” cherry cultivars. Overall, the measured values were significantly higher for cherries (both control and stressed plants), except for the cultivar “Napoleonova”, where the values were comparable to apple cultivars. A significantly higher increment was monitored in apples, specifically in “Rubinstep” with about 4 times in PEG25 and PEG50 variants. An almost threefold increase was also recorded for “Idared” in the same variants. In the case of cherries, the accumulation of proline was the most pronounced in cultivars “Sunburst” and “P-HL-C” (almost 3-fold for PEG50 plants).



**Figure 3.** Effect of PEG-6000 concentration on proline content ( $\mu\text{g g}^{-1}$  FW) for in vitro culture of apple (left) and cherry (right) cultivars. Error bars represent standard deviation (SD). Values within column, followed by the same letter(s), are not significantly different according to Tukey's test ( $p < 0.05$ ).



In case of the tested apple explants, a sharp increment in monitored sugars content after the application of the two lowest doses of PEG was observed in all varieties (Figure 4, detailed data are given in Supplementary Materials Tables S1 and S2). Subsequently, a decrease, sometimes to the control values, was noted. The maximum increase in the content of simple sugars was detected for glucose in cultivars “Rubinstep” and “Kaštánka” (more than 2 times). The maximum fructose contents exhibited apple cultivars “Idared” (almost 5 times), followed by the “Rubinstep” (3 times) and “Napoleonova” (almost 5 times) cherry cultivars. The highest values of sucrose were recorded for “Rubinstep” and “Car Alexander” apples, and “Kaštánka” and “Regina” cherries.

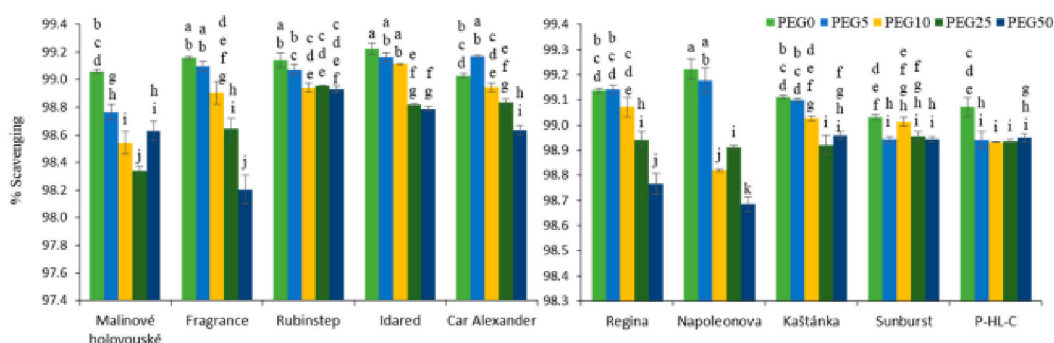


**Figure 4.** Effect of PEG-6000 concentration on sugars content ( $\text{mg g}^{-1}$  FW) in vitro culture of apple (A) and cherry (B) cultivars. All values were recalculated relative to the compound content in untreated samples taken as 100%. GLU, glucose; FRU, fructose; GLY, glycerol; SOR, sorbitol; SUC, sucrose. The statistical data are shown in Supplementary Material Tables S1 and S2.

We followed the changes in the concentration of two sugar alcohols. Glycerol maximum was recorded for apple cultivars only at higher PEG concentrations, specifically in PEG25 for “Malinové holovouské” (3.7 times) and in PEG50 for “Rubinstep” (more than 2.5 times). The maxima in cherries at a PEG5 concentration ranged to “P-HL-C” (3.5-fold) and “Kaštánka” with more than 2.5-fold increase. A more than 3-fold increase in second sugar alcohol sorbitol was observed in the varieties “Rubinstep”, “Idared”, and “Napoleonova”. The maxima differed between both individual sugars and varieties. Thus, we could not determine unambiguously in which variety the synthesis of sugars was most stimulated. However, the above results show that the most often mentioned apple cultivar included “Rubinstep”, and cherry cultivars “Napoleonova” or “Kaštánka”.

### 3.3. Antioxidant Capacity and Antioxidant Enzymes Activity

Our results show that the plants synthesized a sufficient amount of antioxidants and their total antioxidant capacity, measured as scavenging of DPPH radical, decreased only slightly with the increasing PEG concentration. The most significant differences were noticed in apple cultivars “Fragrance” and “Malinové holovouské” and in cherry cultivars “Regina” and “Napoleonova” (Figure 5).



**Figure 5.** Effect of PEG-6000 concentration on scavenging activity of DPPH radical (%) for in vitro culture of apple (left) and cherry (right) cultivars. Error bars represent standard deviation (SD). Values within column, followed by the same letter(s), are not significantly different according to Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

A simultaneous increase in activities of monitored enzymes with increasing PEG concentration was noticed in tested apple and cherry cultivars (Figure 6). The highest values of CAT activity in both PEG0 and PEG treated plants were observed in the cultivar "Car Alexander". Higher values of enzymatic activity in PEG0 plants were also found in the case of cultivars "Fragrance" and "Rubinstep". However, at the same time, the smallest increase due to increasing PEG concentration in the medium was observed for them. Overall, CAT activity was mostly stimulated in "Malinové holovouské", more than 3-fold at PEG50. Catalase activity in cherries was generally lower compared to apples. The highest increase was recorded in the cultivars "Sunburst" (3.7 times) and "Kaštánka" (more than two times), while the lowest increment exhibited "P-HL-C". Overall, low values of enzymatic activity of untreated and treated plants were recorded in the cultivar "Regina".

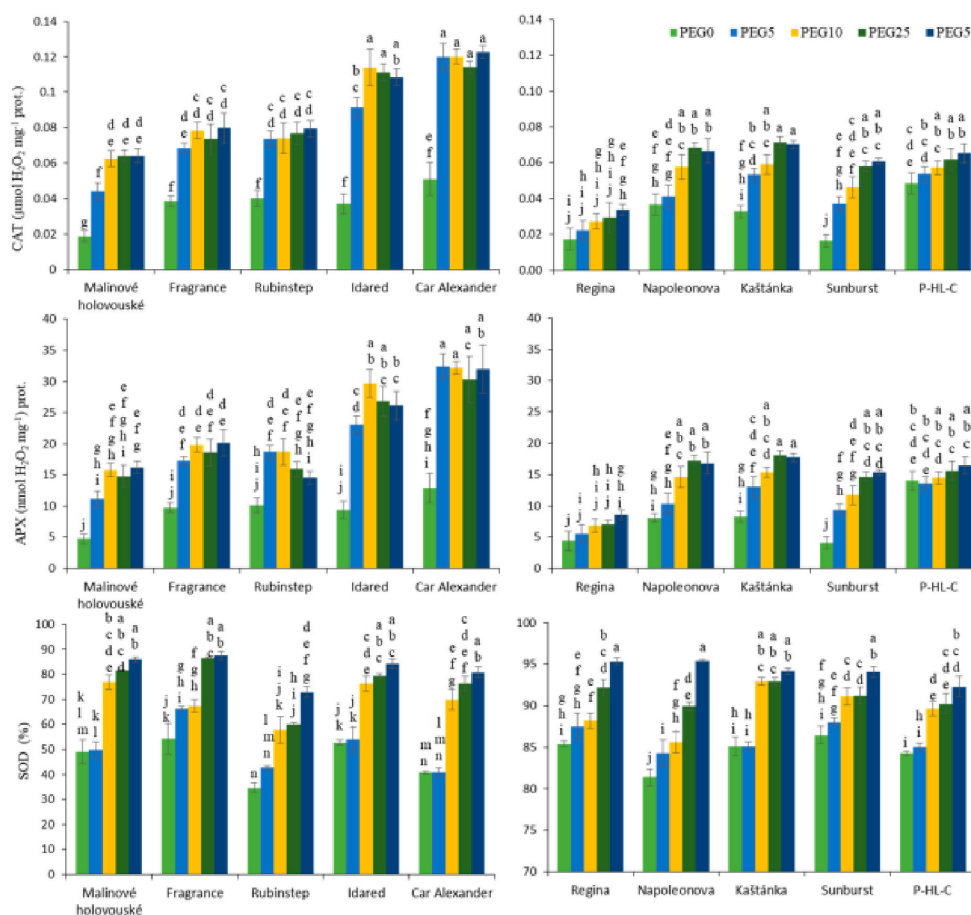
There was a sharp increase in APX activity in apples after application of the lowest PEG dose that further enhanced with increasing PEG concentration. The lowest values were observed again in the cultivar "Malinové holovouské" where the rose was also the highest (up to 3.5 times). APX activity was significantly stimulated in "Idared" as well (up to 3-fold) and "Car Alexander" (2.5-fold). APX activity values within cherry cultivars displayed a similar accumulation trend as in activity of CAT. Overall, the values were lower compared to apples and the increase in activity was gradual. The lowest values of PEG0 and PEG-treated plants were observed in the cultivar "Regina". The most stimulated enzymatic activity was recorded in "Sunburst" (more than 3.5-fold).

The most significant increment in SOD activity in apple explants was recorded in cultivars "Rubinstep" and "Car Alexander" (approximately 2-fold). At the same time, these varieties had the lowest enzymatic activity seen for PEG0 plants. On the contrary, the highest values in PEG0 plants were typical of cultivars "Fragrance" and "Idared" and the lowest increment in activity was recorded due to an increase in concentration of PEG in the medium. The increment in SOD activity was less pronounced in cherries. The highest values were recorded for the "Napoleonova", but only a 1.2-fold increase. At the same time, the lowest activity of PEG0 plants was observed in this case. Overall, it can be noted that SOD activity, both with and without the addition of PEG, was significantly lower in cherries.

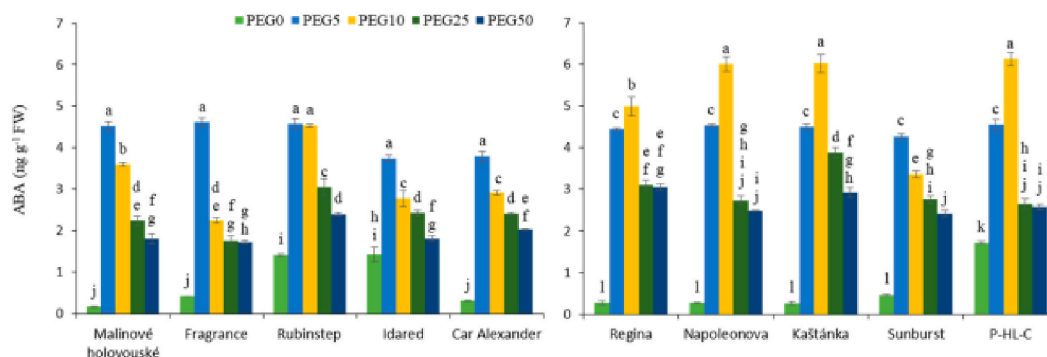
#### 3.4. Abscisic Acid Content

The addition of PEG in the medium was associated with a significant increase in ABA content, compared to control (PEG0). The increase of PEG concentration over 5% for apple and over 10% for cherry explants caused a significant reduction of ABA content. The highest increase, up to 27 times, was observed for apple cultivar "Malinové holovouské". For cherry cultivars "Napoleonova" and "Kaštánka" more than 20-fold rose was monitored.

Overall, higher levels in PEG0 plants were in the “Rubinstep”, “Idared”, and “P-HL-C”, while simultaneously the lowest increase in ABA content of only 2.5–3.5-fold after the PEG application was observed (Figure 7).



**Figure 6.** Effect of PEG-6000 concentration on catalase activity CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ ), ascorbate peroxidase activity APX ( $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ ), and superoxide dismutase activity SOD (%) for in vitro culture of apple (left) and cherry (right) cultivars. Error bars represent standard deviation (SD). Values within column, followed by the same letter(s), are not significantly different according to Tukey's test ( $p < 0.05$ ).



**Figure 7.** Effect of PEG-6000 concentration on abscisic acid content ABA (ng g<sup>-1</sup> FW) for in vitro culture of apple (left) and cherry (right) cultivars. Error bars represent standard deviation (SD). Values within column, followed by the same letter(s), are not significantly different according to Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Apples and cherries are among the most cultivated fruit trees both in the Czech Republic and Europe. The total yield of these trees is affected by water availability. The growing number of dry days during the vegetative season and worldwide increasing shortages of water led to the search for drought-resistant cultivars. The response of plants to limited water supply are monitored at multiple levels [30]. In the present study, we studied biochemical responses of apple and cherry in vitro cultures to induced drought-like stress conditions.

Leaf water potential and RWC are usually used as important and reliable indices of plant water deficit or water status. In agreement with our finding, various studies reported a significant decline in RWC in several fruit species including apple rootstock [31], pistachio trees [32], almond [33,34], and *Prunus* rootstock [35], as well as in cherry rootstock, and fig in vitro cultures [36,37]. Moreover, the authors suggested that water potential in resistant genotypes under water deficit condition is maintained longer than susceptible genotypes. For example, Turkan et al. [38] pointed out that the RWC level in the leaves of resistant cultivars were not affected by drought stress, while in sensitive cultivars, the RWC was reduced up to 10% in 14 days. The drought sensibility out of our tested cultivars was declared for "Malinové holovouské" and "Car Alexander" [17,39] that, however, was not manifested in a significant decrease in RWC. In contrast, the decline in RWC was relatively small in the tolerant cherry cultivar "Napoleonova" [22].

The influence of abiotic and biotic stress stimuli, including water deficit, leads to an imbalance between ROS production and degradation. Their elevated accumulation affects plant metabolism in different ways and leads to cellular damage. The antioxidant machinery in plants is a result of both sequential and simultaneous actions of various antioxidant molecules together with antioxidant enzymes including SOD, CAT, and APX [6,10]. Our experiments confirmed that activities of these enzymes were elevated in drought-stressed apple and cherry leaves compared with the controls. The peak activities were monitored at the two highest PEG concentrations. Similar results were also found for five kiwifruit species [40], apple trees [31], and sweet cherry in vitro explants [36], where the more pronounced answer was in drought tolerant genotypes. Here, on the other hand, the activities of APX and other enzymes involved in ascorbate-glutathione cycle reacted markedly differently. The drop under mild and severe stress conditions could result from the elevated ROS production and its interaction with the above-mentioned enzymes that lead to its inactivation via quick oxidation. These enzyme activations and the magnitude of it appears decisive in the development of stress sensitivity and tolerance. For example, the activa-



tion of CAT and APX is stronger in tolerant species, while in contrast, sensitive species increasingly activate GPX [38,41].

In our results, it is not possible to state quite clearly which varieties are more tolerant due to changes in the accumulation of the above enzymes. Due to the sharp increase in the activities of CAT, APX, and SOD, “Malinové holovouské” and “Car Alexander” appeared as more tolerant apple cultivars. However, these findings contradict the declared low or very low drought resistance, respectively [17,39]. The cultivars “Fragrance” and “Rubinstep” with declared frost resistance, which may also be related to increased drought resistance, showed an overall low increase in CAT and APX activities due to increasing PEG concentration in medium. However, overall, the values in both PEG0 and PEG treated plants were high compared to other cultivars, and thus the ROS quenching potential was high, which could be reflected in a low increase in enzymatic activities. On the contrary, in cherry, tolerant cultivar “Napoleonova” [22] corresponded to the above proposed concept of increased enzymatic activity due to water stress conditions. At the same time, the very frost-resistant “Sunburst” [20] showed a similar accumulation trend.

It is well known that plants accumulate wide scale of osmoregulators such as inorganic ions, soluble sugars, proline or glycine betaine in the vacuole and cytosol that contribute to membrane stability thus reducing the negative effect of water stress [3]. We followed the accumulation changes of two main representatives, proline and sugars. In our present study, proline content significantly increased with increasing PEG concentration in the medium. Other authors also reported elevated proline accumulation in various plants under in vitro conditions [33,34,36] and field experiments [35]. However, it is important to note here that Kautz et al. [42] pointed out that proline values could vary significantly with respect to the method of cultivation and the induction of drought-like conditions. Proline concentration in the hydroponically grown seedlings did not match the values those for plants cultivated in soil and was more than two times higher.

In addition to its osmoprotective role, proline also acted as a ROS scavenger and molecular chaperone contributing to stabilization of protein structure and protection of the cells from damage caused by adverse environments [43]. Therefore, it was suggested that genotypes with higher proline content may be more resistant to stressful conditions, as was reported in different pistachio [32] and grass pea [44] genotypes. If we leaned towards this statement, cultivars “Malinové holovouské”, “Fragrance”, “Regina” and “Kaštánka” would appear to be more tolerant. However, the rate of biosynthesis and the activity of individual genes could also play a role in the rapid accumulation of proline and thus increased resistance. For example, gene P5SC, codifying crucial enzyme in biosynthesis, was also up-regulated and its higher expression was correlated with higher proline levels in drought-tolerant *Prunus* and safflower cultivars in comparison with a drought-sensitive one [35,45]. Thus, genetic manipulations of proline synthesis and degradation leading to its increased levels in plants might be a promising tool for enhanced drought resistance in plants [46].

Carbohydrates, besides their important function as energy rich molecules and building block for plant growth, play a crucial role in processes maintaining cell turgor under osmotic stress, e.g., under drought and salinity. Changes in the concentrations of water-soluble carbohydrates, mostly sugars such as glucose, fructose, sucrose, sorbitol, and mannitol, can be a result of the regulation of sugar metabolism and export [47,48]. Levels of these sugars were affected by different types of drought-induced stress. A concentration-dependent experiment with pistachio demonstrated a simultaneous increase in total soluble sugars and sucrose with increasing PEG concentration in the medium where tolerant cultivars reacted more markedly [32]. Only the content of sorbitol in apples, but not of other soluble carbohydrates, responded to drought in the same way as in our study, i.e., a significant increase at moderate stress. However, its concentration varied under severe drought and was less or similar to that in controls [49]. Time dependent water studies significantly stimulated the synthesis of sorbitol, glucose, fructose, and galactose in apple trees [47] and *Prunus* rootstock [35]. On the contrary, sucrose concentration was

significantly lower in the drought-stressed variants. Given the high concentration of leaf sorbitol, authors suggested that sorbitol rather than sucrose is preferentially accumulated at the low photosynthetic rate of drought-stressed plants and acts as a storage of carbon. The accumulation behaviour of sucrose makes it more available sugar than sorbitol. These results were also supported by both the expression and activity of key enzymes aldose-6-phosphate reductase (A6PR) [47] and sorbitol-6-phosphate dehydrogenase (S6PDH) [35] in sorbitol synthesis. Moreover, sucrose acts as a signal molecule participating in the crosstalk between hormonal, oxidative, and defence signalling [50].

Owing to the putative role of proline and sorbitol as antioxidants, they could be ameliorating deleterious effects of drought-induced oxidative stress by protecting membranes and enzymes. These osmoprotectants, together with higher activity of antioxidant enzymes, show these genotypes as drought resistant [51,52].

Abscisic acid is regarded as a stress hormone as a result of its rapid accumulation under unfavourable environmental conditions. Therefore, overall higher ABA concentrations in plants can be associated with improved stress tolerance that helps the plant to survive [53]. In the present study, the endogenous ABA content in the leaves of apple and cherry explants rose with drought treatment and reached maximum when the two lowest PEG concentrations were used. Similar results were found for poplar trees where three different watering regimes significantly increased ABA content [41]. Time dependent studies showed that prolonged drought conditions resulted in gradual increase in ABA content [54,55]. In addition, the expression of genes related to the ABA biosynthesis pathway correlated with physiological results of drought response, i.e., with a decrease in photosynthesis activity as consequence of ABA-induced stomatal closure. The expression was higher after 15 days under drought conditions [56]. Other processes on a metabolic level, catabolism, or de/conjugation, also controlled the level of stress induced ABA accumulation as proven by elevated levels of phaseic acid, dihydrophaseic acid, and ABA-glucose ester [55,57].

Potentially drought-sensitive cultivars of apple [58] and pepper [59] reacted more readily. The rootstock itself can also have an influence on the overall formation of drought tolerance. Tworowski et al. [57] and Zhang et al. [60] pointed out that different cultivars drafts on a more tolerant rootstock accumulated more ABA. This type of cultivation, together with the production of plants with enhanced expression of ABA genes, can lead to the development of more drought resistant varieties. According to this statement, "Malinové holovouské", "Fragrance", "Rubinstep" in apples, and "Napoleonova", "Kaštánka" and "P-HL-C" in cherries accumulated the highest amounts of ABA. Besides the first mentioned, all cultivars are drought or frost tolerant.

## 5. Conclusions

Our work focused on the relative water content, antioxidant activity, accumulations of osmotica, and the content of abscisic acid in apple and cherry cultivated in vitro on media containing increasing levels of polyethylene glycol and causing different levels of osmotic stress in tested plants. Our results confirmed that studied genotypes responded differently to osmotic stress manifested as reduction in the leaf relative water content and increment in the activities of antioxidant enzymes, as well as contents of proline, sugars, and abscisic acid. Generally, cherry cultivars exhibited a lower decrease in RWC and enzymatic activities but a higher proline content than the apple plants. Based on our findings, we concluded that apple cultivar "Rubinstep" and cherry cultivars "Napoleonova" and "Kaštánka" could be evaluated as drought tolerant since they exhibited the major features including higher antioxidant capacity and accumulation of osmoprotectants that are crucial for plant stress-tolerance. To our best knowledge, such a comprehensive analysis of mentioned responses to osmotic stress in apple and cherry in vitro culture, as we produced, has never been published. It provides fundamental information for breeders. Our study also suggests a fast method for prediction of the plant tolerance under controlled laboratory conditions that can be used for the initial screening of fruit cultivars.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22157922/s1>, Table S1. Effect of different concentration of PEG 6000 on sugars of in vitro culture of five apple cultivars. Data are means  $\pm$  SDs. 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 sugars of in vitro culture of five cherry cultivars. Data are means  $\pm$  SDs. Values within column, followed by the same letter(s), are not significantly different according to Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

**Author Contributions:** Conceptualization, Z.K. and P.J.; methodology, Z.K. and P.J.; investigation, Z.K., P.J., J.T., D.D. and R.A.; resources, P.J.; data curation, Z.K. and P.J.; writing—original draft preparation, Z.K., P.J.; 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:** Supported by the ministry of Agriculture of the Czech Republic Project No. RO1521.

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

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in the current study are available in the article and supplementary materials.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Jiřina Rachotová for excellent technical assistance.

**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

- Santander, C.; Aroca, R.; Ruiz-Lozano, J.M.; Olave, J.; Cartes, P.; Borie, F.; Cornejo, P. Arbuscular Mycorrhiza Effects on Plant Performance under Osmotic Stress. *Mycorrhiza* **2017**, *27*, 639–657. [[CrossRef](#)]
- Swapna, S.; Shylaraj, K.S. Screening for Osmotic Stress Responses in Rice Varieties under Drought Condition. *Rice Sci.* **2017**, *24*, 253–263. [[CrossRef](#)]
- Liang, W.; Ma, X.; Wan, P.; Liu, L. Plant Salt-Tolerance Mechanism: A Review. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *496*, 286–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Amini, S.; Ghobadi, C.; Yamchi, A. Proline Accumulation and Osmotic Stress: An Overview of P5CS Gene in Plants. *J. Plant Mol. Breed.* **2015**, *3*, 44–55.
- Saddhe, A.A.; Manuka, R.; Penna, S. Plant Sugars: Homeostasis and Transport under Abiotic Stress in Plants. *Physiol. Plant.* **2020**, *171*, 739–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Waškiewicz, A.; Beszterda, M.; Goliński, P. Nonenzymatic Antioxidants in Plants. In *Oxidative Damage to Plants*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 201–234, ISBN 978-0-12-799963-0.
- Zhang, C.; Shi, S. Physiological and Proteomic Responses of Contrasting Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) Varieties to PEG-Induced Osmotic Stress. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 242. [[CrossRef](#)]
- Gill, S.S.; Anjum, N.A.; Gill, R.; Yadav, S.; Hasanuzzaman, M.; Fujita, M.; Mishra, P.; Sabat, S.C.; Tuteja, N. Superoxide Dismutase—Mentor of Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 10375–10394. [[CrossRef](#)]
- Leung, D.W.M. Studies of Catalase in Plants under Abiotic Stress. In *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*; Gupta, D.K., Palma, J.M., Corpas, F.J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 27–39, ISBN 978-3-319-75087-3.
- Pandey, S.; Fartyal, D.; Agarwal, A.; Shukla, T.; James, D.; Kaul, T.; Negi, Y.K.; Arora, S.; Reddy, M.K. Abiotic Stress Tolerance in Plants: Myriad Roles of Ascorbate Peroxidase. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 581. [[CrossRef](#)]
- Asghar, M.A.; Li, Y.; Jiang, H.; Sun, X.; Ahmad, B.; Imran, S.; Yu, L.; Liu, C.; Yang, W.; Du, J. Crosstalk between Abscisic Acid and Auxin under Osmotic Stress. *Agron. J.* **2019**, *111*, 2157–2162. [[CrossRef](#)]
- Pál, M.; Tajti, J.; Szalai, G.; Peeva, V.; Végh, B.; Janda, T. Interaction of Polyamines, Abscisic Acid and Proline under Osmotic Stress in the Leaves of Wheat Plants. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 12839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 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.
- Zhang, Z.; Igathinathane, C.; Li, J.; Cen, H.; Lu, Y.; Flores, P. Technology Progress in Mechanical Harvest of Fresh Market Apples. *Comput. Electron. Agric.* **2020**, *175*, 105606. [[CrossRef](#)]
- Acero, N.; Gradillas, A.; Beltran, M.; García, A.; Muñoz mingarro, D. Comparison of Phenolic Compounds Profile and Antioxidant Properties of Different Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Varieties. *Food Chem.* **2019**, *279*, 260–271. [[CrossRef](#)]
- Blažek, J. Odrůda jableň Rubinstep. *Vědecké Práce Ovocnářské* **2001**, *17*, 163–165.



17. Boček, S. *Ovocné Dřeviny v Krajině: Pilotní vzdělávací Program, Hostětín 2007/8: Sborník Přednášek a Seminářních Prací*; ZO ČSOP Veronica: Brno, Czech Republic, 2008; ISBN 978-80-904109-2-3.
18. *Nové Odrůdy Ovoce = New Cultivars of Fruit*; Vyzkumny a slechtitelsky ustav ovocnarsky Holovousy: Holovousy, Czech Republic, 2007; ISBN 978-80-87030-04-2.
19. Kutina, J.; Holeček, S. *Pomologický Atlas 2*; Brázda: Praha, Czech Republic, 1992; ISBN 978-80-209-0192-7.
20. Lane, W.D.; Schmid, H. Lapins and Sunburst sweet cherry. *Can. J. Plant Sci.* **1984**, *64*, 211–214. [[CrossRef](#)]
21. Blažková, J. *Pěstování Třešní na Slabě Rostoucích Podnožích*; Výzkumný a slechtitelský Ústav Ovocnářský Holovousy: Holovousy, Czech Republic, 2005; ISBN 978-80-902636-8-0.
22. Kutina, J. *Pomologický Atlas 1*; Brázda: Praha, Czech Republic, 1991; ISBN 80-209-0089-6.
23. Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 473–497. [[CrossRef](#)]
24. Barrs, H.D.; Weatherley, P.E. A Re-Examination of the Relative Turgidity Techniques for Estimating Water Deficits in Leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* **1962**, *15*, 413–428. [[CrossRef](#)]
25. Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies. *Plant Soil* **1973**, *39*, 205–207. [[CrossRef](#)]
26. Mathew, S.; Abraham, T.E.; Zakaria, Z.A. Reactivity of Phenolic Compounds towards Free Radicals under In Vitro Conditions. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 5790–5798. [[CrossRef](#)]
27. Kováčik, J.; Babula, P.; Hedbavny, J. Comparison of Vascular and Non-Vascular Aquatic Plant as Indicators of Cadmium Toxicity. *Chemosphere* **2017**, *180*, 86–92. [[CrossRef](#)]
28. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
29. Dobrev, P.I.; Vankova, R. Quantification of Abscisic Acid, Cytokinin, and Auxin Content in Salt-Stressed Plant Tissues. In *Plant Salt Tolerance*; Shabala, S., Cuin, T.A., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2012; pp. 251–261, ISBN 978-1-61779-985-3.
30. Alizadeh, V.; Shokri, V.; Soltani, A.; Yousefi, M.A. Effects of Climate Change and Drought-Stress on Plant Physiology. *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* **2015**, *3*, 38–42.
31. Wang, W.; Liang, D.; Li, C.; Hao, Y.; Ma, E.; 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. Biochem.* **2012**, *51*, 81–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Karimi, S.; Yadollahi, A.; Nazari-Moghadam, R.; Imani, A.; Arzani, K. Changes in some physiological and osmotic parameters of several pistachio genotypes under drought stress. *J. Biol. Environ. Sci.* **2012**, *6*, 263–270.
33. Khoeyrdi, F.F.; Shamshiri, M.H.; Estaji, A. In vitro Screening of Almond (*Prunus dulcis* (Mill.)) Genotypes for Drought Tolerance. *Sci. Hortic.* **2016**, *198*, 44–51. [[CrossRef](#)]
34. Akbarpour, E.; Imani, A.; Yeganeh, S.F. Physiological and Morphological Responses of Almond Cultivars under In Vitro Drought Stress. *J. Nuts* **2017**, *8*, 61–72.
35. 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](#)]
36. 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](#)]
37. 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](#)]
38. Turkan, I.; Bor, M.; Ozdemir, F.; Koca, H. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought—Tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Sci.* **2005**, *168*, 223–231. [[CrossRef](#)]
39. Řiha, J. *České Ovoce—díl III. Jablka*; České nakladatelství: Praha, Czech Republic, 1919.
40. 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](#)]
41. Lei, Y.; Yin, C.; Li, C. Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiol. Plant.* **2006**, *127*, 182–191. [[CrossRef](#)]
42. 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](#)]
43. Szabados, L.; Savouré, A. Proline: A multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* **2010**, *15*, 89–97. [[CrossRef](#)]
44. 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](#)]
45. Thippeswamy, M.; Chandraobulreddy, P.; Sinilal, B.; Kumar, M.S.; Sudhakar, C. Proline accumulation and the expression of  $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase in two safflower cultivars. *Biol. Plant.* **2010**, *54*, 386–390. [[CrossRef](#)]
46. Molinari, H.B.C.; Marur, C.J.; Daros, E.; Campos, M.K.F.; Carvalho, J.F.P.R.; Bessalho Filho, J.C.; Pereira, L.F.P.; Vieira, L.G.E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): Osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiol. Plant.* **2007**, *130*, 218–229. [[CrossRef](#)]



47. Yang, J.; Zhang, J.; Li, C.; Zhang, Z.; Ma, F.; Li, M. Response of sugar metabolism in apple leaves subjected to short-term drought stress. *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *141*, 164–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Valliyodan, B.; Nguyen, H.T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, *9*, 189–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. 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](#)]
50. Ruan, Y.L. Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2014**, *65*, 33–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. De Campos, M.K.F.; de Carvalho, K.; de Souza, F.S.; Marur, C.J.; Pereira, L.F.P.; Filho, J.C.B.; Vieira, L.G.E. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic ‘Swingle’ citrumele plants over-accumulating proline. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *72*, 242–250. [[CrossRef](#)]
52. Ashraf, M.; Akram, N.A.; Al-Qurainy, F.; Foolad, M.R. Drought tolerance: Roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. *Adv. Agron.* **2011**, *111*, 249–296.
53. Dar, N.A.; Amin, I.; Wani, V.; Wani, S.A.; Shikari, A.B.; Wani, S.H.; Masoodi, K.Z. Abscisic acid: A key regulator of abiotic stress tolerance in plants. *Plant Gene* **2017**, *11*, 106–111. [[CrossRef](#)]
54. Kowitcharoen, L.; Wongs-Aree, C.; Setha, S.; Komkhuntod, R.; Srilaong, V.; Kondo, S. Changes in abscisic acid and antioxidant activity in sugar apples underdrought conditions. *Sci. Hortic.* **2015**, *193*, 1–6. [[CrossRef](#)]
55. Perin, E.C.; da Silva Messias, R.; Borowski, J.M.; Crizel, R.L.; Schott, I.B.; Carvalho, I.R.; Rombaldi, C.V.; Galli, V. ABA-dependent salt and drought stress improve strawberry fruit quality. *Food Chem.* **2019**, *271*, 516–526. [[CrossRef](#)]
56. Bielsa, B.; Leida, C.; Rubio-Cabetas, M.J. Physiological characterization of drought stress response and expression of two transcription factors and two LEA genes in three *Prunus* genotypes. *Sci. Hortic.* **2016**, *213*, 260–269. [[CrossRef](#)]
57. Tworowski, T.; Fazio, G.; Glenn, D.M. Apple rootstock resistance to drought. *Sci. Hortic.* **2016**, *204*, 70–78. [[CrossRef](#)]
58. Bhusal, N.; Han, S.-G.; Yoon, T.-M. 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.). *Sci. Hortic.* **2019**, *246*, 535–543. [[CrossRef](#)]
59. Ismail, M.R.; Davies, W.J.; Awad, M.H. Leaf growth and stomatal sensitivity to ABA in droughted pepper plants. *Sci. Hortic.* **2002**, *96*, 313–327. [[CrossRef](#)]
60. Zhang, Z.; Cao, B.; Li, N.; Chen, Z.; Xu, K. Comparative transcriptome analysis of the regulation of ABA signaling genes in different rootstock grafted tomato seedlings under drought stress. *Environ. Exp. Bot.* **2019**, *166*, 103814. [[CrossRef](#)]