

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra botaniky a fyziologie rostlin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Sledování biochemických parametrů u vybraných odrůd
jabloní**

Diplomová práce

**Bc. Tadeáš Sochr
Zahradnictví**

PharmDr. Jan Kubeš, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Sledování biochemických parametrů u vybraných odrůd jablek" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2024

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval PharmDr. Janu Kubešovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky a trpělivost při mém vypracování diplomové práce. Na závěr bych chtěl poděkovat i své rodině za podporu při studiu na České zemědělské univerzitě.

Sledování biochemických parametrů u vybraných odrůd jabloní

Souhrn

V diplomové práci byly sledovány vybrané biochemické parametry v listech jabloní odrůd 'Rubinola' a 'Galaval'. Listy těchto odrůd byly získávány v průběhu dvou let ze stromů pěstovaných v sadu Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích. Termíny odběrů byly vybrány na základě určených fenologických fází jádovin. Z listů byly připraveny extrakty, ve kterých byl stanoven obsah malondialdehydu (MDA), který může vznikat v důsledku peroxidace membránových lipidů působením volných radikálů, a také celkový obsah celkový obsah fenolických látek (TPC), flavonoidů (TFC) a fenolických kyselin (PAC), které se řadí mezi neenzymatické antioxidanty a mohou tak naopak mít protektivní účinek. Množství těchto látek, jako i antioxidační aktivita extraktu byla stanovena pomocí kolorimetrických metod na UV/Vis spektrofotometru.

Z naměřených výsledků vyplývá, že v průběhu obou let docházelo během sledovaného období k postupnému nárůstu stanovovaných parametrů. Z hlediska srovnání obou odrůd nebyly významné rozdíly v rámci jednoho odběru nezávisle na roce pozorovány pouze v případě stanovení celkového obsahu flavonoidů. Celkově vyšší obsah pozorovaných látek pak měla odrůda 'Rubinola'. Zejména v případě fenologické fáze BBCH 73 u ní došlo k většímu nárůstu MDA i TPC oproti odrůdě 'Galaval' v roce 2022 i 2023, kdy se uskutečnily odběry v době větších dešťových srážek. Environmentální podmínky by tak mohly být jedním z faktorů ovlivňující tvorbu sekundárních metabolitů u sledovaných odrůd jabloní.

Klíčová slova: *Malus × domestica*, sekundární metabolity, flavonoidy, podmínky pěstování, abiotický stres

Screening of biochemical markers in leaves of different apple's cultivars

Summary

In the thesis, selected biochemical parameters were monitored in the leaves of apple trees of the 'Rubinola' and 'Galaval' varieties. The leaves of these varieties were obtained over the course of two years from trees grown at the Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy. Sampling dates were chosen based on the determined phenological phases of the kernels. Extracts were prepared from the leaves, in which the content of malondialdehyde (MDA), which can arise as a result of the peroxidation of membrane lipids by the action of free radicals, was determined, as well as the total content of total phenolic substances (TPC), flavonoids (TFC) and phenolic acids (PAC), which are classified as non-enzymatic antioxidants and can, on the contrary, have a protective effect. The amount of these substances, as well as the antioxidant activity of the extract, was determined using colorimetric methods on a UV/Vis spectrophotometer.

The measured results show that in the course of both years there was a gradual increase in the determined parameters during the monitored period. In terms of comparing the two varieties, no significant differences were observed within one sampling, regardless of the year, only in the case of determining the total content of flavonoids. The 'Rubinola' variety had an overall higher content of the observed substances. Especially in the case of the BBCH 73 phenological phase, there was a greater increase in both MDA and TPC compared to the variety 'Galaval' in 2022 and 2023, when the samples were taken during periods of greater rainfall. Environmental conditions could thus be one of the factors influencing the formation of secondary metabolites in the observed varieties of apple trees.

Keywords: *Malus × domestica*, secondary metabolites, flavonoids, growing conditions, abiotic stress

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Jabloň (<i>Malus × domestica</i> Borkh.)	10
3.1.1 Botanická charakteristika	10
3.1.2 Obsahové látky v plodech	10
3.1.3 Produkce jablek	11
3.1.4 Hnojení	11
3.2 Environmentální stres	13
3.2.1 Biotický stres	13
3.2.1.1 Škůdci	14
3.2.1.2 Choroby	16
3.2.2 Abiotický stres	18
3.2.2.1 Teplotní stres	18
3.2.2.2 Vodní stres	18
3.2.2.3 Světelný stres	19
3.3 Měřené látky	20
3.3.1 Malondialdehyd	20
3.3.2 Fenolické látky	20
3.3.3 Fenolické kyseliny	20
3.3.4 Flavonoidy	20
3.3.5 Celková antioxidační kapacita	21
4 Metodika	22
4.1 Rostlinný materiál	22
4.1.1 Podmínky pěstování	23
4.1.2 Počasí	24
4.1.3 Odběry	25
4.2 Příprava extraktů	25
4.3 Stanovení malondialdehydu	26
4.4 Stanovení fenolických látek	26
4.5 Stanovení fenolických kyselin	26
4.6 Stanovení flavonoidů	26
4.7 Stanovení celkové antioxidační kapacity	26
4.8 Statistické zpracování dat	27

5	Výsledky	28
5.1	Obsah malondialdehydu.....	28
5.2	Obsah fenolických látek.....	29
5.3	Obsah fenolických kyselin.....	30
5.4	Obsah flavonoidů	31
5.5	Celková antioxidační kapacita	33
6	Diskuze	35
7	Závěr	37
8	Literatura	38
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	45

1 Úvod

Jabloně se řadí mezi nejpěstovanější ovocný druh v oblastech mírného pásma a v současné době celoroční dostupnost plodů přispívá k jeho postavení nejkonzumovanějšího čerstvého ovoce na světě. Jablka jsou bohatá na vlákninu, vitamín C, cukry, organické kyseliny, minerály a další fytochemické sloučeniny, známé pro své příznivé vlastnosti pro lidské zdraví (Mignard et al. 2022).

Environmentální abiotické stresy mohou narušit metabolické procesy rostlin, a to buď inhibicí, nebo stimulací produkce sekundárních metabolitů. Zatímco význam těchto sloučenin v adaptaci rostlin a obranných mechanismech je široce uznáván, jejich specifické reakce na změnu klimatu zůstávají nedostatečně pochopeny. Proto jsou čím dál častěji zkoumány účinky různých složek změny klimatu, jako jsou vysoké teploty, zvýšené hladiny oxidu uhličitého, sucho a zvýšené UV-B záření, stejně jako jejich kombinované dopady na sekundární metabolity (Qaderi et al. 2023).

Nejvýznamnějšími sekundárními metabolity v jabloních jsou fenolické látky. Během zralosti jablek se jejich množství mění a stoupá jejich koncentrace. Složení fenolických sloučenin v různých rostlinných pletivech je také silně ovlivněno podmínkami prostředí, jako je právě UV světlo, teplota a výživa. Některé hydroxyskořicové kyseliny, flavanoly a dihydrochalkony se pak podílejí na obranných mechanismech v listech jabloní a pro jejich produkci může dojít k odklonu sacharidů z jejich hlavní metabolické cesty. Metabolické změny, ke kterým dochází za stresových podmínek, tedy mohou ovlivnit biologickou dostupnost základních živin (Sirgedaitė-Šežienė et al. 2022).

V rámci této práce je tak sledováno, jak se liší obsah různých látek produkovaných listy jabloní a antioxidační aktivita připraveného extraktu v závislosti na odrůdě, fenologické fázi a případném vlivu environmentálních podmínek.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této práce bylo sledování vybraných biochemických parametrů v listech jabloní odrůd 'Rubinola' a 'Galaval'. Vzorke byly odebírány a hodnoceny v různých vývojových etapách pro srovnání potencionálních rozdílů v obsahu stanovovaných látek mezi zvolenými odrůdami v závislosti na jejich pěstování v sadu.

Nulová hypotéza: U vybraných odrůd nebude žádný rozdíl v rámci měřených charakteristik u sledovaných termínů odběru.

Alternativní hypotéza: Existuje alespoň jeden hodnocený biochemický parametr, ve kterém se vybrané odrůdy budou mezi sebou v rámci určených vývojových fází lišit.

3 Literární rešerše

3.1 Jabloň (*Malus × domestica* Borkh.)

3.1.1 Botanická charakteristika

Spolu s hrušněmi, kdouloněmi a mišpulemi se jabloň řadí do čeledi *Rosaceae*. Počet druhů v rodu *Malus* Mill. není zcela definovaný a odhaduje se na 25–55 druhů. Moderní kultivované jabloně jsou pravděpodobně výsledkem mezidruhové hybridizace a v současné době se v Evropském inventáři jabloní nachází přes 10000 kultivarů. Za hlavního předka dnešních jabloní je považován *Malus sieversii* Lebed., divoký druh pocházející ze střední Asie, která je centrem jejich původu. Vědecký název *Malus × domestica* Borkh. nahradil dříve používaný *Malus pumila* Mill. (Musacchi & Serra 2018).

Malus × domestica je opadavý ovocný strom dorůstající 6–10 m. Na povrchu kmene je šedá až tmavošedá borka, která se šupinovitě odděluje. Letorosty jsou zelenohnědé, hnědé až tmavě fialově hnědé se stříbrnými zbytky pokožky, šedě chlupaté až plstnaté. Pupeny jsou krátce a zploštěle kuželovité, někdy i zaoblené, květní pupeny až vejcovité nebo kuželovité vejcovité, plstnaté, vernace bývá svinutá.

Listy jsou jednoduché, eliptické až úzce okrouhlé, na bázi zaokrouhlené, tupé i mělce srdčité, na vrcholu zašpičatělé, ojediněle tupé, na okraji tupě až vroubkovaně pilovité. Svrchní strana listu je řídkěji chlupatá, na podzim až lysá, tmavě zelená, spodní strana plstnatá až řídkce plstnatá, světle šedo zelená. Řapík je řídkce plstnatý.

Květy vytvářejí chudokvětý chocholík se zkráceným větvením o 4–8 květech, s čárkovitými až široce čárkovitými listeny, které v době květu zasychají. Kalich je 5cípý, vytrvalý, šedě vlnatě plstnatý. Korunní lístky jsou bílé, zevně zarůžovělé, široce eliptické až úzce okrouhlé nebo široce obvejčité. Tyčinek je 15–20, pestík vzniká srůstem pěti plodolistů. Plodem je kulovitá, zploštělá, soudkovitá nebo kuželovitá malvice. Semena jsou vejcovitá, na bázi špičatá, v pergamenovitých pouzdrech většinou po 1–2. Jabloně se dožívají 80–150 let. Produktivní věk štěpovaných kultivarů je kratší (Hejny & Slavík 2003).

Většina jabloní je cizosprašná, a proto potřebuje k opylení pyl z jiných odrůd. K tomuto přenosu pylu je potřeba hmyzích opylovačů. Nejvýznamnějším opylovačem jabloní je včela medonosná. Bez tohoto opylení nedochází k násadě plodů a dochází tak k snížení výnosu (Ramírez & Davenport 2013).

3.1.2 Obsahové látky v plodech

Chemické složení jablek se může lišit v závislosti na kultivaru, oblasti produkce a pěstitelských postupech. Během zrání dochází ke změnám relativních poměrů obsahových látek. Hlavní složkou jablek je voda, která se pohybuje v rozmezí od 80–85 %. Obsah vlákniny se pohybuje okolo 2–3 g/100 g, přičemž největší množství je obsaženo v exokarpu. Bílkoviny a tuky se vyskytují jen v malém zanedbatelném množství. Hlavní organické kyseliny v jablečných plodech jsou kyselina jablečná a kyselina citronová. Průměrný obsah kyseliny jablečné se pohybuje kolem 200 mg/100 g a obsah kyseliny citronové okolo 3 mg/100 g (Feliciano et al. 2010).

Hlavní podíl na energetické hodnotě, která se pohybuje kolem 52 kcal/100 g, mají sacharidy. V jablkách se vyskytuje hlavně fruktóza, glukóza a sacharóza. Jejich celkový obsah je přibližně 12 g/100 g. Z minerálních látek jsou v jablkách zastoupeny draslík, hořčík, vápník, sodík a fosfor a stopové prvky jako zinek, mangan, měď a železo. Nejvýznamnější je draslík, kterého je okolo 100 mg/100 g. Jablka jsou také bohatá na různé vitamíny jako je A, B1, B2, B3, B5, B6, B9, C a E. Tyto vitamíny hrají důležitou roli v metabolismu lidského těla a podpoře imunity. Jejich obsah je mnohem vyšší v jablečné slupce než v dužnině. Nejvíce zastoupený je vitamín C (kyselina askorbová), který působí jako antioxidant a zlepšuje imunitu. Průměrný obsah je 8 mg/100 g (Arnold & Gramza-Michalowska 2023).

3.1.3 Produkce jablek

Celosvětová produkce jablek v roce 2022 činila 95,83 mil. t, což je o 1,9 mil. t více než v roce 2021. Největším světovým producentem jablek je Čína, která za rok 2022 vyprodukovala 47,6 mil. t tohoto ovoce. V Evropě byla produkce 18,8 mil. t za rok 2022, to je o 0,3 mil. t více než v roce 2021. Největším producentem jablek v Evropě je Polsko s produkcí 4,2 mil. t v roce 2022 (FAO 2024).

V České republice se za rok 2022 sklídilo 138 150 t jablek. Oproti roku 2021 je to nárůst o 28 144 t. Z důvodu konkurenčních levných jablek z Polska a nízké výkupní ceně, u nás ubývá počet jabloní a sadů. Za rok 2022 bylo pokáceno 505 513 ks jabloní a ubylo 484 ha sadů. K roku 2023 bylo v ČR evidováno 5229 ha produkčních jabloňových sadů. Navzdory snižujícím se počtům jabloní neustále stoupá průměrná spotřeba jablek na osobu, která v roce 2021 dosahovala 25,2 kg.

Vedle produkce jablek se v ČR produkují školkařské výpěstky a podnože. Za rok 2022 se vyprodukovalo 1,3 mil. kusů školkařských výpěstků jabloně a 1,4 mil. kusů jabloňových podnoží. V posledních letech se tato produkce snižuje, kvůli menšímu zájmu spotřebitelů (Ministerstvo zemědělství České republiky 2023).

3.1.4 Hnojení

Správná minerální výživa je jedním z nejdůležitějších agrotechnických postupů; určuje zdravotní stav, odolnost, výnos, kvalitu plodů a jejich skladovatelnost. Dusík je jedním z klíčových minerálů nezbytných pro správný růst, vývoj a výnos rostlin. Je důležitým prvkem důležitých rostlinných sloučenin v buňce, jako je chlorofyl, cytokininy a řada vitamínů. Správný přísun dusíku rostlinám je tedy rozhodující pro správné buněčné dělení, syntézu buněčných stěn a cytoskeletu a ve výsledku i pro růst mladých pletiv. Má zásadní vliv na procesy asimilace a distribuce všech makro- a mikroprvků nezbytných pro růst a výnos rostlin. Také je důležitou složkou sekundárních metabolitů (Kowalczyk et al. 2022)

Vysoký obsah dusíku v listech má pozitivní vliv na fotosyntézu, což souvisí s vysokým podílem tohoto prvku v enzymech účastnících se fotosyntézy, fotosyntetických pigmentů a jeho přímým vlivem na velikost, počet a složení chloroplastů. Nedostatek dusíku způsobuje inhibici syntézy proteinů a chlorofylu, to vede k tvorbě málo účinných chloroplastů, což má za následek chronickou podvýživu rostlin. S tím také souvisí výrazné zvýšení náchylnosti k různým patogenům. Z těchto důvodů je prvkem, který rostliny vyžadují v největším množství.

Dostupnost dusíku je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňující růst a vývoj rostlin (Fernandes & Rossiello 1995).

Kowalczyk et al. (2022) zjistili, že ideální roční dávka dusíku pro pěstování jabloní je 50 kg/ha. Tato dávka N by měla plně zajistit nutriční potřeby jabloní, zaručit jejich vysoký výnos a neměla by zbytečně zatěžovat životní prostředí. Zaznamenali také, že hnojení dusíkem ovlivňuje makroprvkové složení listů a plodů.

Potřeba fosforu při růstu jabloní je ve srovnání s jinými živinami relativně malá. Fosfor zůstává klíčovým faktorem ve sloučeninách, které zajišťují přenos energie; je rovněž složkou nukleových kyselin, a proto je většinou vyžadován v rostlinách během fázi meristematické aktivity. Týká se to zejména začátku růstu způsobeného sezónními změnami nebo výsadbou sazenic. Vývoj nového kořenového systému, tvorba květů, opylování a nasazování plodů jsou obdobími, kdy P hraje v rostlinách klíčovou roli. Proto je důležité aplikovat fosfor už brzy na začátku sezóny. Nedostatek fosforu narušuje širokou škálu metabolických procesů, a tak zpomaluje růst rostlin, způsobuje špatné vyvíjení kořenů a snižuje velikost plodů (Hawkesford et al. 2023).

Draslík má pro produkci jablek také velký význam. Pro správný růst a vývoj plodů ho jabloně potřebují v podobném množství jako dusík. V listech, kde je nejvyšší intenzita metabolických procesů, je draslík druhým nejhojnějším kationtem. Tento prvek je spoluzodpovědný za fotosyntézu, syntézu bílkovin, aktivaci enzymů, osmoregulaci, pohyb průduchů a prodloužování buněk. Syntéza sekundárních metabolitů je také velmi závislá na hladině draslíku v cytoplazmě (Neilsen & Neilsen 2003).

Standardní dávka těchto makroprvků je podle Tagliavini & Marangoni (2002) do 60 kg/ha N a 50–100 kg/ha K za rok. Tyto dávky zajišťují vysoký výnos ovoce a zbytečně nekontaminují půdu. U fosforu se pohybuje roční dávka kolem 20 kg/ha (Neilsen et al. 2008).

Jako víceletá plodina vyžaduje jabloň vyváženou výživu pro růst, optimální výnos a kvalitu ovoce. Optimální přísun živin z půdy do rostlinného systému rovněž napomáhá odolnosti vůči patogenním organismům a dlouhověkosti vegetace a zvyšuje stabilitu a kvalitu stromu. Mezi klíčové mikroživiny pro udržitelný růst druhů jabloní patří bór, chlór, měď, železo, mangan, molybden, sodík, selen a zinek. K zjištění obsahu těchto živin se používá analýza listů, ze které se dá zjistit nutriční stav plodů. Výsledná data mohou být použita ke zvýšení efektivity používání hnojiv (Ljavić et al. 2023).

Naměřená data se porovnávají s hodnotami z Tabulky 1, z kterých se určí, jestli je živin dostatek, nebo je potřeba přihnojení.

Tabulka 1: Obsah živin v sušině listů jabloně

Jednotka	Živina	Obsah živin			
		nedostatkový	nízký	optimální	vysoký
% v sušině	Dusík	pod 1,8	1,8–2,09	2,1–2,4	nad 2,4
	Fosfor		pod 0,15	0,15–0,32	nad 0,32
	Draslík	pod 0,7	0,7–0,99	1,0–1,5	nad 1,5
	Hořčík	pod 0,18	0,18–0,21	0,22–0,32	nad 0,32
mg/1 kg sušiny	Železo	pod 50	50–100	100–300	nad 300
	Bor	pod 18	18–24	25–45	nad 45
	Zinek	pod 12	12–24	25–50	nad 50
	Měď	pod 2	2–7	8–20	nad 20
	Mangan	pod 20	21–40	41–100	nad 100
	Molybden	pod 0,05	0,05–0,3	0,4–1,2	nad 1,2

Zdroj: Blažek (2001)

Hnojit lze přímo do půdy nebo na list. Amiri et al. (2008) zjistili, že aplikace na list je účinnější než do půdy. V produkci jablek tak doporučují obě aplikace, aby se docílilo vysokých výnosů a kvalitu ovoce.

3.2 Environmentální stres

Stresem je jakýkoli nepříznivý stav nebo látka, která ovlivňuje nebo blokuje metabolismus, růst nebo vývoj rostliny. Faktory, které indukují stres, mohou být rozděleny do dvou hlavních kategorií: „biotické“ - vyvolané živými organismy, jako jsou houby a hmyz, a „abiotické“ - vyplývající z neživých faktorů, jako je sucho, extrémní teploty, slanost a znečišťující látky, například těžké kovy. Rovnováha mezi tolerancí a citlivostí může určit, zda má stresový faktor pozitivní nebo negativní účinek. Dále je třeba rozlišovat mezi krátkodobými a dlouhodobými stresey. Reakce rostliny na stres se liší v závislosti na době trvání a závažnosti stresového podnětu (Kranner et al. 2010).

Abiotické a biotické stresey mohou ovlivnit rostlinnou fyziologii a biochemické procesy, což vede k nepříznivým změnám v růstu a vývoji rostlin. Aby těmto stresům mohly rostliny odolávat, vyvinuly si různé strategie, které zahrnují fyziologické, biochemické a molekulární reakce, jako je produkce stresových hormonů, osmotické přizpůsobení a aktivace genů souvisejících se stresem. Například produkují enzymy a proteiny, které na stres reagují (Nawaz et al. 2023).

3.2.1 Biotický stres

Rostliny se vyrovnávají s mnoha biotickými stresey prostřednictvím různých morfologických, biochemických a molekulárních mechanismů. Biotické stresey zahrnují útoky škůdců, parazitů a patogenů, jako jsou houby, bakterie, hmyz a viry. Tyto organismy mohou způsobit různá onemocnění rostlin a napadat různé části rostlinných pletiv. Aby se rostliny mohly vypořádat s biotickými stresey, vyvinul se u nich pokročilý imunitní systém. Tento systém zahrnuje pasivní obrannou linii, která využívá fyzické bariéry, jako jsou vosky a kutikuly, a aktivní mechanismy, jako je produkce chemických sloučenin. Dále má rostlinný imunitní systém dvě úrovně rozpoznání patogenů: molekulární strukturou patogenních organismů spuštěnou imunitu a efektozem spouštěnou imunitu. Tyto úrovně spouští reakce vedoucí

k aktivaci iontových kanálů, zvýšení hladiny vápníku a produkci reaktivních forem kyslíku (ROS). Hormony jako kyselina salicylová, kyselina jasmonová a ethylen hrají klíčovou roli v regulaci těchto imunitních odpovědí. Navíc existuje síť vzájemných interakcí mezi těmito hormony, které pomáhají rostlinám vybrat nejlepší obrannou strategii. Reakce rostlin na útoky hmyzu zahrnují produkci těkavých sloučenin a obranných proteinů (Gimenez et al. 2018).

3.2.1.1 Škůdci

Na jabloních se vyskytuje mnoho škůdců, kteří škodí na plodech, listech, větvích i kořenech. V rámci rešerše byli vybráni ti nejvýznamnější:

Květopas jabloňový (*Anthonomus pomorum* Linnaeus)

Je to brouk z čeledi Curculionidae, který je běžným škůdcem jabloní v mnoha oblastech Evropy. Zakrslé jabloně v moderních sadech poskytují málo úkrytů, proto většina dospělců přezimuje v přilehlých lesích nebo živých plotech. Brzy na jaře se květopas stěhuje do sadů a kolonizuje jabloně. Po období žíru kladou samičky jednotlivá vajíčka do uzavřených květních pupenů. Vylíhlé larvy se živí uvnitř pupenů, což nakonec vede k zavíčkování květů a v mnoha případech ke značné ztrátě výnosu.

V posledních desetiletích se populace *A. pomorum* v mnoha oblastech Evropy zvýšily na škodlivou úroveň. Tento opětovný nárůst se připisuje selektivní kontrole obaleči jablečnému a mšicím v sadech v rámci ekologického a integrovaného obhospodařování. Postřiky insekticidy jsou účinným prostředkem boje proti obaleči jablečnému. Aby se zabránilo poškození květů, musí být aplikace prováděny v období mezi kolonizací stromu a kladením vajíček (Hausmann et al. 2004).

Obaleč jablečný (*Cydia pomonella* Linnaeus)

Tento motýl z čeledi Tortricidae je významným škůdcem v produkci jádrového ovoce, především u jabloní. Je velmi přizpůsobivý různým klimatickým podmínkám a je známo, že si vytvořil rezistenci vůči několika skupinám chemických insekticidů. Přezimuje jako dospělá housenka, nejčastěji pod odumřelou kůrou, v půdě nebo ve větvích kolem báze stromu. Kuklí se brzy na jaře. První dospělci se líhnou od května do června. Samice kladou jednotlivá vajíčka na plody nebo přilehlé listy. Po vylíhnutí vajíček mladé housenky vyhledávají plody a zavrtávají se do nich, kde se živí jejich vnitřkem. Když dokončí svůj vývoj, tak ovoce opouští a hledají místo pro kuklení. Napadené plody mají tendenci předčasně dozrát a opadat. Bez použití chemické ochrany může obaleč způsobit 30–50 % ztrát produkce, v některých letech dokonce až 80 % (Pajač et al. 2011).

Pilatka jablečná (*Hoplocampa testudinea* Klug)

Jedná se o blanokřídrou vosičku z čeledi Tenthredinidae, která napadá pouze jabloně. Plně vyvinuté housenice přezimují v kokonu v půdě. Kuklí se v březnu až dubnu 3–4 týdny před vylíhnutím. Někteří jedinci zůstávají v diapauze v půdě klidně další dva roky a mají tak lepší šanci na přežití při nízké násadě plodů nebo při usmrcení housenic insekticidy. Po spáření klade samička vajíčka do květu. Housenice po vylíhnutí způsobují žír pod slupkou plodu, pak povrchový žír, který má za následek vznik spirálovité jizvy. Poté přelézají na další plody, kde

vyžirají jádřinec. Pokud se housenice prokouše až k semeníku, dochází k zastavení vývoje plodu a jeho opadnutí. Přírodním parazitoidem pilatky v Evropě je *Aptesis nigrocincta* Gravenhorst. V ochraně proti pilatce byly použity neinsekticidní metody, jako jsou zejména háďátka, entomopatogenní houby a metody fyzické kontroly, jako jsou celulózové bariéry a ochranné sítě. Přesto se jako neúčinnější metoda jeví chemická ochrana (Vincent et al. 2019).

Mšice jabloňová (*Aphis pomi* De Geer)

Je jedním z nejvýznamnějších škůdců z čeledi Aphididae v evropských zemích. Škodí zejména na jabloních, ale jako oligofág se může vyskytovat i na hrušních, mišpulích a na některých dalších ovocných stromech. Sáním na listech a letorostech způsobují jejich deformaci a odumírání a celkově oslabují růst stromu. Takto poškozují zejména rostlinné školky a mladé sady (Laznik et al. 2011).

Dospělé stromy jsou většinou zaneseny medovicí, kterou mšice vylučují. Ta se usazuje na listech a plodech, což podporuje rozvoj černí. Listy pak ztrácejí klíčové funkce a plody nedozrávají. Navíc medovice přitahuje mravence, kteří mšice chrání před predátory. Účinnou ochranou proti mšicím je aplikace insekticidů, jako jsou systémové neonikotinoidy, které významně snižují ztráty v produkci jablek. Další možností je pak použití programů integrované ochrany proti škůdcům, které kombinují používání insekticidů s biologickou kontrolou, správu sadů a vývoj odolných kultivarů (Stoeckli et al. 2008).

Mšice jitrocelová (*Dysaphis plantaginea* Passerini)

Tato mšice z čeledi Aphididae, je klíčovým škůdcem jabloní v Evropě a Severní Americe. Jejím primárním hostitelem je jablň *Malus × domestica* a jejími sekundárními hostiteli jsou jitrocelové byliny *Plantago* spp. Na konci jara okřídlená samice opouští svého primárního hostitele a migruje na svého sekundárního hostitele. Na podzim se vrací na jabloně, kde probíhá pohlavní rozmnožování a klade prezimující vajíčka. Na jaře se vajíčka líhnou a vznikají partenogenetické generace. V tomto období způsobují nevratné poškození jabloní. Poranění postihuje listy, větve a plody. Po silném napadení dochází k deformacím listů a ovoce, které je malé a ztrácí ekonomickou hodnotu (Miñarro & Dapena 2007). Účinnými ochrannými prostředky proti této mšici jsou rostlinné extrakty, jako je azadirachtin a pyrethrum. Další účinnou ochranou je úplná defoliace stromů na podzim (Andreev et al. 2012).

Vlnatka krvavá (*Eriosoma lanigerum* Hausmann)

Je hlavním celosvětovým škůdcem, který se živí druhy *Malus* spp. Je to jeden z nejvýznamnějších invazních škůdců jablek na světě, který se rozšířil z východní části Severní Ameriky do téměř všech oblastí na planetě, kde se pěstují jablka. Nymfy prezimují v kořenovém systému. Při oteplení se přesouvají do nadzemních částí, kde vytváří pevně srostlé kolonie potažené bílými, voskovitými, vláknitými sekrety. Mšice mají obvykle dvě roční maxima hojnosti, a to v červnu a v září. V jednom roce mohou mít až 13 generací. Škodí na nových výhonech, větvích, řezných ránách, listech a kořenech. Postižené stromy ztrácejí vitalitu a je poškozen jejich vývoj i plodnost. Kořeny mladých stromů se zhoršují natolik, že mohou být snadno vyvráceny i při středně silném větru. Plody z takovýchto stromů mají nízkou kvalitu, jsou malé, deformované a chuťově nevýrazné (Adhikari 2022). V mnoha částech světa snižují počet kolonií vlnatky v nadzemních částech stromů parazit *Aphelinus mali* Haldeman

a predátoři, jako je škvor evropský a slunéčko sedmítečné. Na kořenech se však žádní predátoři nevyskytují, a proto je nutné vysazovat odolné podnože, aby se zabránilo výskytu tohoto škůdce (Sandanayaka et al. 2003).

3.2.1.2 Choroby

Jabloně jsou také náchylné k různým chorobám, které mohou způsobit ztrátu úrody či snížit kvalitu plodů. Tyto choroby mohou být způsobeny bakteriemi, houbami, viry nebo dalšími patogeny. Mezi nejběžnější choroby jabloní patří:

Virus mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus*, ApMV)

ApMV má široké hostitelské spektrum. Vyskytuje se převážně u jabloní a hrušní, ale také u peckovin (*Prunus* spp.) jako jsou např. broskvoně, švestky, mandloně a meruňky, dále pak na rybízu (*Ribes* sp.), ostružiníku (*Rubus* sp.), lísce (*Corylus* sp.), chmelu (*Humulus* sp.), růžích (*Rosa* sp.) a na mnoha dalších druzích. Na jabloních infikovaných tímto virem se mohou vyvinout na mladých listech bledě žluté až jasně krémově zbarvené nepravidelné skvrny nebo pruhy podél hlavních žilek. Tyto léze na postižených listech se mohou po vystavení letnímu slunci a horku změnit a listy předčasně opadávají. Distribuce symptomatických listů může být nepravidelná v jednotlivých stromech nebo omezená jen na jednu větev. Virus se přenáší roubováním, očkováním nebo mechanicky. Je prokázáno, že ApMV snižuje růst stromů a výnos ovoce, kdy na infikovaných stromech dokáže zbrzdit jejich růst až o 40 % a průměrný výnos o 7 %. Nejdůležitější ochranou proti ApMV jsou preventivní opatření jako je zdravý školkařský materiál a rezistentní odrůdy (Grimová et al. 2016).

Fytoplazmová proliferace jabloně (*Candidatus Phytoplasma mali*)

Tuto chorobu, jinak známou pod anglickým názvem Apple Proliferation Phytoplasma (APP), vyvolává bakterie '*Candidatus Phytoplasma mali*'. Na jabloních způsobuje řadu příznaků, jako je zastavení růstu, proliferace axilárních pupenů (metlovitost), žloutnutí nebo červenání listů, malé plody bez chuti, celkový úpadek a někdy i úhyn napadené rostliny (Baric et al. 2011). Hlavními přenašeči APP jsou mery *Cacopsylla picta* Foerster a *Cacopsylla melanoneura* Foerster. Patogen je distribuován v rostlině prostřednictvím mízy floému. V zimě, během vegetačního klidu, se APP nevyskytuje v nadzemních částech stromu, ale sídlí v kořenech. Na začátku vegetačního období, kdy se vytváří nový floém, se bakterie začnou pohybovat v míze směrem do nadzemních částí stromu, jako jsou větve, kmen a listy. U takto napadených stromů neexistuje žádná léčba. Nejúčinnějším možným opatřením proti šíření APP je likvidace infikovaných stromů (Barthel et al. 2021).

Bakteriální spála růžovitých (*Erwinia amylovora* Burrill)

Spála postihuje celou škálu rostlin patřících do čeledi *Rosaceae*, hlavně jabloně a hrušně. Je to velmi nebezpečná choroba, která za příznivých podmínek pro šíření způsobuje významná poškození až hynutí stromů. Tuto chorobu způsobuje bakterie *Erwinia amylovora* Burrill, která je zařazena v seznamu Evropské a středozemní organizace pro ochranu rostlin jako karanténní škodlivý organismus. Hlavními místy infekce jsou květy. Po proniknutí *E. amylovora* Burrill

do rostliny, se šíří do dřevních částí stromů, kde vytváří kapičky bakteriálního exudátu, který představuje sekundární zdroj inokula. Exudát přitahuje hmyz, který se může stát potenciálním přenašečem a dále šířit toto onemocnění (Pedroncelli & Puopolo 2023).

Nejčastějšími příznaky infekce spálou jsou vodnatění a vadnutí pletiv, ohýbání a následné usychání letorostů, usychání květů a výskyt bakteriálního slizu. Většina opatření proti spále je založena na preventivních opatřeních, jako je prořezávání a odstraňování nemocných částí rostlin, použití chemických a biologických prostředků. Další možností je použití rezistentních a odolných odrůd (Khan et al. 2012).

Strupovitost jabloně (*Venturia inaequalis* (Cooke) Winter)

Je způsobena parazitickou houbou *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter. Šíří se za deštivého počasí z opadaných listů pomocí askospor. Nejviditelnější a nejzávažnější příznaky strupovitosti jabloní se vyskytují na listech a plodech. Na listech se objevují hnědozelené, šedočerné, sazovité skvrny a může docházet i k jejich deformaci. Plody se postupně pokrývají černými skvrnami, které se přetváří v nekrotické. Strupovitost snižuje činnost fotosyntézy, asimilaci CO₂, tvorbu listů a nasazování pupenů (Belete & Boyraz 2017).

Závažná infekce může způsobit defoliaci a může oslabit stromy, které se stanou náchylnější k dalším abiotickým stresům, jako jsou poranění z nachlazení a mrazu. Produkční ztráty ve vysoce infikovaných sadech mohou dosáhnout až 70 %. Pro kontrolu strupovitosti jablek se nejvíce používají fungicidní postřiky. Z preventivních opatření se zdá být nejúčinnější používání odolných odrůd (Khajuria et al. 2018).

Padlí jabloně (*Podosphaera leucotricha* (Ellis & Everh.) Salmon)

Vlivem oteplování stoupá význam této choroby způsobené houbou *Podosphaera leucotricha* (Ellis & Everh.) Salmon. Přezimuje jako mycelium v pupenech infikovaných během předchozího vegetačního období. Na jaře se šíří přes výhony a listy. Na povrchu mycelia se tvoří konidie, které se dále rozšiřují větrem. Vedle bílého povlaku na letorostech a listech dochází k jejich svinování a následně i zasychání (Strickland et al. 2021). V závažnějších případech může choroba způsobit značnou defoliaci a na plodech vyvinout rzivost. Kromě dopadu na výnos a kvalitu ovoce může častá přítomnost houby ovlivnit životnost sadu. Nejběžnějším způsobem kontroly padlí je aplikace fungicidů. Jejich opakované používání však může vést k rozvoji rezistence patogenu. Proto je důležité zvážit i preventivní opatření jako je použití odolných odrůd (Guzmán-Pantoja & Bowater 2019).

Vedle chorob vyskytujících se v sadu, způsobují značné škody i posklizňové skládkové choroby. Jsou důsledkem infekce plodů, ke které dochází během vegetačního období. Choroba se projeví až při zrání plodů, nebo při infekci poraněními, ke kterým dochází před sklizní, během sklizně nebo při uvádění ovoce na trh. Hlavními faktory určujícími výskyt chorob jsou přítomnost zdroje infekce v sadu, náchylnost odrůd jabloní a povětrnostní podmínky příznivé pro jejich rozvoj. Hlavními skládkovými chorobami jsou plísň. Mezi nejčastější patří modrá hniloba (*Penicillium expansum* Link), plíseň šedá (*Botrytis cinerea* Persoon), kruhová hnědá hniloba (*Neofabraea alba* (Guthrie) Verkley) a hnědá moniliniová hniloba (*Monilinia fructigena* Honey). K ochraně proti skládkovým chorobám jsou důležité preventivní metody,

jako je odstranění napadených plodů nebo zamezení mechanického poškození plodů (Głos et al. 2022).

3.2.2 Abiotický stres

Rostliny jsou neustále vystavovány mnoha nepříznivým podmínkám prostředí. Mezi ně patří abiotické stresy, jako je sucho, teplo, chlad, UV záření a nedostatek živin. Ty mají škodlivé účinky na růst rostlin a produktivitu a jsou stále důležitější s ohledem na přímé nebo nepřímé účinky změny klimatu. Rostliny reagují na abiotické stresy mnoha způsoby, od genové exprese po fyziologii, od architektury rostlin po primární a sekundární metabolismus. Tyto komplexní změny umožňují rostlinám tolerovat nepříznivé podmínky anebo se jim přizpůsobovat. Složitost reakce rostliny může být dále ovlivněna délkou a intenzitou stresu, genotypem rostliny, kombinací různých stresů, typem exponovaného pletiva, buněk a vývojovou fází, ve které rostliny stres vnímají (Mareri et al. 2022).

3.2.2.1 Teplotní stres

Teplota hraje zásadní roli při utváření růstu a vývoje rostlin, přičemž změny v těchto faktorech vedou k aklimatizačním reakcím nebo poškození buněk a potenciálně k smrti rostlin. Rostliny si vyvinuly ochranné mechanismy spojené s fotosyntetickým elektronovým transportním řetězcem, xantofylovým cyklem a fotorespirační cestou, aby přežily za nepříznivých světelných a teplotních podmínek. Zvýšené hladiny ROS jsou produkovány za stresových podmínek, které mají jak škodlivé účinky, tak ale slouží i k signálním funkcím. Rostliny syntetizují nízkomolekulární antioxidanty a antioxidační enzymy v reakci na zvýšenou tvorbu reaktivních forem kyslíku, s variacemi v závislosti na intenzitě a trvání stresu. Krátkodobý stres má tendenci snižovat hladiny antioxidantů, zatímco dlouhodobá expozice vede k jejich postupnému nárůstu v důsledku aklimatizace. Antioxidační reakce primárně působí v chloroplastech a vykazuje vysokou vzájemnou závislost, lišící se mezi rostlinnými druhy na základě tolerance stresu (Szymańska et al. 2017).

Fenolické sloučeniny, jako jsou flavonoly, antokyany a proantokyany, jsou důležitými složkami sekundárního metabolismu rostlin, které dokáží zvýšit odolnost vůči abiotickým stresům. Například antokyany fungují jako antioxidanty, které snižují ROS vyvolané abiotickým stresem, a pomáhají tak udržovat buněčnou osmotickou homeostázu. Obecně ovoce s červenou slupkou je odolnější vůči změnám teploty než ovoce se zelenou slupkou. Další skupinou sekundárních metabolitů jsou isopreny, které jsou syntetizovány v mevalonátové dráze. Isopreny jako limonen, myrcen nebo menthol působí jako antioxidanty a mohou inhibovat syntézu reaktivních forem kyslíku. Tím chrání listy před fotooxidačním poškozením a zvyšují tepelnou toleranci rostlin. Vysoká produkce isoprenu během stresu má za následek menší negativní dopad na fotosyntézu (Li et al. 2023).

3.2.2.2 Vodní stres

Vodní stres také vede k nadprodukci ROS, inhibuje růst a fotosyntézu, indukuje peroxidaci lipidů a spouští programovanou buněčnou smrt. Rostliny si však vyvinuly mechanismy, jak se přizpůsobit vodnímu stresu, včetně osmotického přizpůsobení

a antioxidačních obranných systémů. Akumulace rozpustných cukrů a prolinu pomáhá stabilizovat membránové proteiny a zvyšuje odolnost rostlin. Enzymatické antioxidanty, jako je superoxid dismutáza, peroxidáza, kataláza, glutathionreduktáza a askorbátperoxidáza, jsou aktivovány, aby zachytily nadměrné reaktivní formy kyslíku, čímž napomáhají toleranci rostlin vůči vodnímu stresu. Změny v aktivitách těchto enzymů hrají zásadní roli v adaptaci rostlin na vodní stres (Sun et al. 2020).

Aby rostliny vydržely podmínky sucha, používají různé mechanismy zvládnání stresu, jako je syntéza ROS, produkce stresových hormonů, jako je ethylen a kyselina abscisová. Tyto mechanismy vyvolávají v rostlinách krátkodobé i dlouhodobé reakce. Krátkodobé reakce se obvykle projeví, když je stres krátký. Příklady krátkodobých reakcí zahrnují sníženou asimilaci uhlíku, uzavření průduchů, osmotickou úpravu, inhibici růstu, přenos signálu a signalizaci buněčného sucha. Obecně platí, že tyto reakce nezpůsobí významné poškození rostlin za předpokladu, že se rychle obnoví normální podmínky. Dlouhá období sucha však způsobují závažnější a trvalejší zranění, která mohou vést k úhynu rostlin. Dlouhodobé odezvy zahrnují inhibovaný růst výhonků, metabolické adaptace, sníženou transpirační plochu a stárnutí (Ahluwalia et al. 2021).

Vodní stres způsobený přemokřením vede k udušení kořenů tím, že brání volné výměně kyslíku mezi půdou a atmosférou. K zamokření půdy obvykle dochází v důsledku záplav, silných srážek nebo tání ledu a sněhu během zimního období a po něm. To vede k nedostatku nebo omezené dostupnosti volného kyslíku v důsledku snížené výměny plynů. V podmínkách hypoxie se rostliny uchylují k alternativní spotřebě sacharidů a anaerobnímu metabolismu, stejně jako využívají alternativní orgány, jako jsou listy nebo vzdušné kořeny pro výměnu kyslíku a plynů. Hypoxie označuje částečnou anebo úplnou absenci volného kyslíku v půdě a významně ovlivňuje růst, vývoj a výnosy plodin. Podobně jako stres ze sucha spouští hypoxie uzavírání průduchů a vadnutí, jako obrannou reakci rostliny ke zmírnění nepříznivých účinků nedostatku kyslíku. Také snižuje rychlost fotosyntézy, metabolismu a transpirace (Mosa et al. 2017).

3.2.2.3 Světelný stres

Snížení ozónové vrstvy v důsledku lidské činnosti vedlo ke globálnímu nárůstu slunečního UV-B záření, což ovlivňuje suchozemské ekosystémy, včetně rostlin. Na různých úrovních rostlinného organismu ovlivňuje expozice UV-B fyziologické procesy, růst, výnos, fotosyntézu, morfologii, poškození DNA a denaturaci proteinů v rostlinách. Rostliny vyvinuly enzymatické i neenzymatické antioxidační obranné systémy jako reakci na oxidační stres způsobený UV-B zářením a nadměrnou tvorbou ROS. Některé flavonoidy a fenolové sloučeniny chrání rostliny a fotosyntetická pletiva před poškozením způsobeným UV-B zářením (Sharma et al. 2017).

Nízká intenzita světla neposkytuje dostatečnou energii pro vývoj rostlin, zatímco nadměrná intenzita světla může způsobit poškození světlem a kolísající úrovně světla mohou zhoršit účinnost fotosyntézy. Vystavení světelnému stresu, zejména vysokému světelnému stresu, spouští fotoinhibici, což vede k nerovnováze v distribuci energie mezi fotosystémem I a fotosystémem II, což má za následek rychlý pokles účinnosti fotosyntézy. V reakci na lehký stres si rostliny vyvinuly různé sebeobrané mechanismy, včetně produkce a vychytávání

chloroplastických ROS, pohybu chloroplastů, otevírání nebo uzavírání stomatálních průduchů, produkce anthokyanů a koordinace systémové signalizace. Fotosyntetický aparát, zahrnující molekulární aparát odpovědný za fotosyntézu, je náchylný k poškození vlivem světelného stresu. V důsledku toho si rostliny vyvinuly strategie pro rychlou adaptaci na světelný stres, jako je modulace komplexních struktur a stavů proteinů vázaných na tylakoidní membránu (Shi et al. 2022).

3.3 Měřené látky

3.3.1 Malondialdehyd

Malondialdehyd (MDA) je malá a reaktivní organická molekula, která se vyskytuje ve všech eukaryotických buňkách. Molekula MDA má tři uhlíkové atomy s dvěma aldehydovými skupinami na pozicích uhlíku 1 a 3. V kyselém prostředí se MDA stává elektrofilním, což znamená, že může reagovat s nukleofily. Tato reaktivita je důsledkem peroxidace mastných kyselin, zejména kyseliny linolové, která je hlavním zdrojem MDA v rostlinách. Může být vytvářen neenzymatickými procesy pomocí reaktivních forem kyslíku nebo enzymatickou aktivitou lipoxygenázy. V rostlinách je zvýšená hladina MDA často považována za indikátor oxidativního stresu a poškození buněk (Morales & Munné-Bosch 2019).

3.3.2 Fenolické látky

Jsou to sloučeniny obsahující jedno nebo více aromatických jader a jednu nebo více hydroxylových skupin. Představují nejrozšířenější sekundární metabolity v rostlinách. Hrají klíčovou roli v obraně rostlin proti ultrafialovému záření, patogenům a predátorům. Jejich přítomnost ve všech rostlinných orgánech z nich činí životně důležitou složku lidské potravy. Fenolické látky se vyskytují převážně v ovoci, luštěninách, zelenině, čaji, víně a kávě, což přispívá k sensorickým atributům rostlinných potravin. Kromě toho přispívají k hořkosti ovoce prostřednictvím interakce se slinnými glykoproteiny a mohou dodávat barvu různému ovoci a zelenině. Mezi běžné fenolické sloučeniny v rostlinách patří lignany, třísloviny, fenolické kyseliny, stilbeny a flavonoidy (Alara et al. 2021).

Kapp et al. (2023)

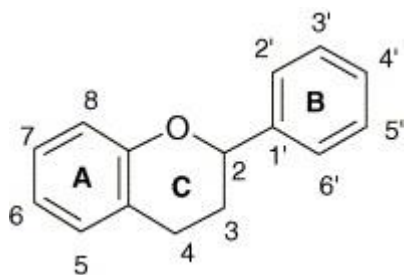
3.3.3 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny se dělí do dvou hlavních skupin: kyselin hydroxybenzoových a kyselin hydroxyskořicových. Kyseliny hydroxybenzoové, mezi něž patří kyselina gallová, p-hydroxybenzoová, protokatechová, vanilová a syringová, mají obecnou strukturu C6-C1. Naopak kyseliny hydroxyskořicové jsou aromatické sloučeniny s postranním řetězcem o délce C6-C3, zahrnující kyseliny kávovou, ferulovou, p-kumarovou a sinapovou (Balasundram et al. 2006).

3.3.4 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nízkomolekulární sloučeniny, skládající se z patnácti atomů uhlíku, uspořádaných v konfiguraci C6-C3-C6. Struktura se skládá ze dvou aromatických kruhů A a B,

spojených 3uhlíkovým můstkem, obvykle ve formě heterocyklického, pyranového, kruhu C (Obrázek 1). Aromatický kruh A je odvozen z acetát/malonátové dráhy, zatímco kruh B je odvozen z fenylalaninu. Flavonoidy samy o sobě dělíme do šesti podskupin: flavony, flavonoly, flavanoly, flavanony, isoflavony a antokyany podle oxidačního stavu centrálního C kruhu. Jejich strukturální variace v každé podskupině je částečně způsobena stupněm a typem hydroxylace, methoxylace, prenylace nebo glykosylace. Nejběžnějšími flavonoidy jsou kvercetin, katechin, naringenin, kyanidin-glykosid a daidzein (Dai & Mumper 2010).



Obrázek 1: Obecná struktura molekuly flavonoidů

Autor: Balasundram et al. (2006)

3.3.5 Celková antioxidační kapacita

Celková antioxidační kapacita (TAC) je důležitým parametrem používaným k hodnocení stresových reakcí rostlin. K měření TAC jsou používány metody adaptované z lékařské biochemie na biologii rostlin, které jsou založeny na reaktivitě vzorků na syntetické chromogenní radikály. Obsahy TAC jsou kalibrovány a měřeny v jednotkách specifických antioxidantů, jako je například kyselina askorbová nebo ve vodě rozpustný analog vitamínu E (Majer et al. 2010).

4 Metodika

4.1 Rostlinný materiál

Odrůda 'Rubinola'

'Rubinola' je křížencem odrůd 'Prima' a 'Rubín'. Byla vyšlechtěna na stanici Ústavu experimentální botaniky ve Střížovicích. Její plody jsou středně velké až větší a mají tvar zploštěle kulovitý až kulovitý. Barva je žlutá se zářivým červeným žíháním a mramorováním. Hladká slupka je středně silná a slabě masná. Má středně tuhou, šťavnatou a sladkou dužinu. Plody zrají koncem září přibližně 10 dní před odrůdou 'Golden Delicious'. Konzumně dozrávají v listopadu a v chladu vydrží až do března (Blažek 2001).

Stromy mají bujný růst, který postupně zeslabuje. Koruny jsou široce kulovité se sklonem k vyholování větví. Růst a plodnost je velmi podobná odrůdě 'Rubín'. Odrůda je rezistentní proti strupovitosti jabloní a je odolná proti padlí a rakovině. Plodnost je vysoká a pravidelná. Je vhodná pro přerobování méně vhodných odrůd. Díky kvalitě plodů patří mezi nejlepší odrůdy. Nejlépe se pěstuje na středních nebo vyšších chráněných polohách. V teplejších oblastech se dají plody skladovat jen krátce (Blažek 2001). Odrůda je zobrazena na Obrázku 2 a 3.



Obrázek 2: Odrůda 'Rubinola'

Autor: doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.



Obrázek 3: Odrůda 'Rubinola'

Odrůda 'Galaval'

Tato odrůda byla vyšlechtěna ve Francii jako mutace odrůdy 'Galaxy'. Její plody jsou malé až střední a jejich tvar je kulovitý až plochý. Barva je tmavě fialovo červená. Slupka je slabá a slabě masná a pod ní se nachází jemná, šťavnatá, středně aromatická a mírně sladká dužina. Plody se sklízí poslední týden v srpnu, podobně jako odrůda 'Galaxy' (Richard 2009).

'Galaval' má velmi dobré skladovací vlastnosti. Ve skladech s řízenou atmosférou vydrží až do konce dubna. I po vyjmutí z těchto skladů si zachovává vysokou pevnost (Jankowski&syn 2018). Odrůda je zobrazena na Obrázku 4 a 5.



Obrázek 4: Odrůda 'Galaval'

Autor: doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.



Obrázek 5: Odrůda 'Galaval'

4.1.1 Podmínky pěstování

Do pokusu byly zařazeny stromy ze sadů Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy (360 m n.m.). Dlouhodobá průměrná roční teplota pro danou lokalitu je 8,3 °C s průměrným ročním úhrnem srážek 665 mm. Pěstitelské podmínky zde odpovídají řepařskému výrobnímu typu. Lokalita spadá dle agroklimatické rajonizace do makrooblasti mírně teplé a podoblasti mírně vlhké. Sad je lokalizován v mírném svahu. Půda patří do skupiny půdních typů hnědozem, je hluboká a bezskeletovitá.

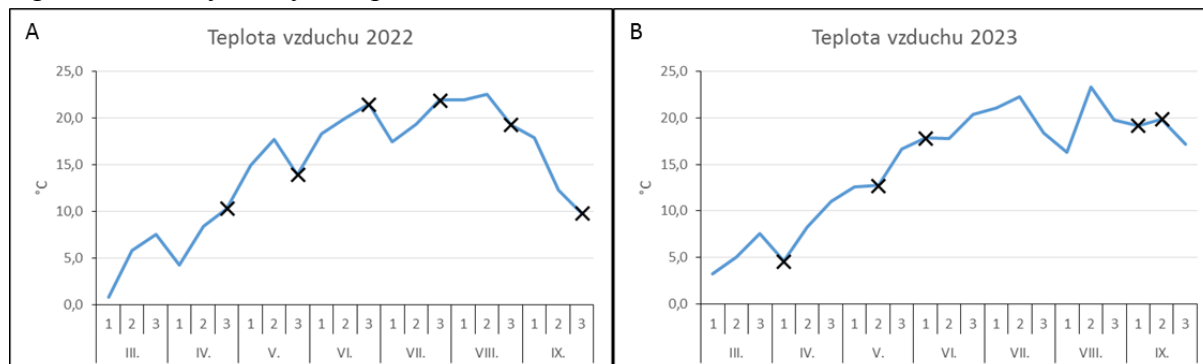
Výsadby jabloní byly založeny bez krycího systému a bez doplňkové závlahy v roce 2008. Odrůdy jabloní byly naočkované na podnoži M 9. Pěstebním tvarem bylo volné větveno. Jabloně byly vysázeny ve sponu 4 × 1,0 m.

Stromy byly ošetřované agrotechnologickými postupy v rámci konvenční produkce a pravidel SISPO. V meziřadí byl trvalý trávnatý porost, který byl pravidelně sekán nebo mulčován. Příkmený pás byl udržovaný herbicidy. Základní hnojení se provádělo jednou ročně hnojivem LAV 27 (ledek amonný s vápencem) v dávce 110 kg/ha. Doplňkové hnojení bylo provedeno postřikem na list hnojivem DAM 390 2× v dávce 3 l/ha, 3× v dávce 4,7 l/ha a v období dozrávání plodů se aplikuje 2× STOPIT s dávkou 10 l/ha.

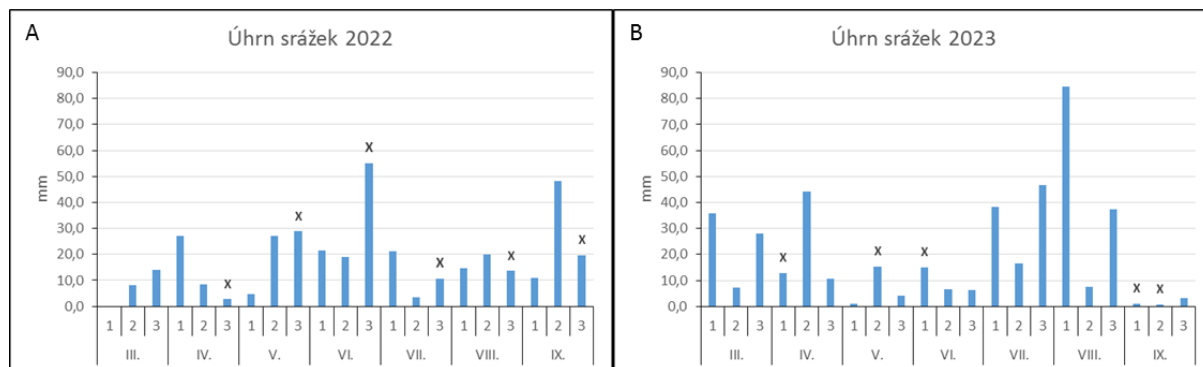
Řez jabloní proběhl během dormance v měsících leden–březen. Biomasa z řezu byla mulčována v meziřadí.

4.1.2 Počasí

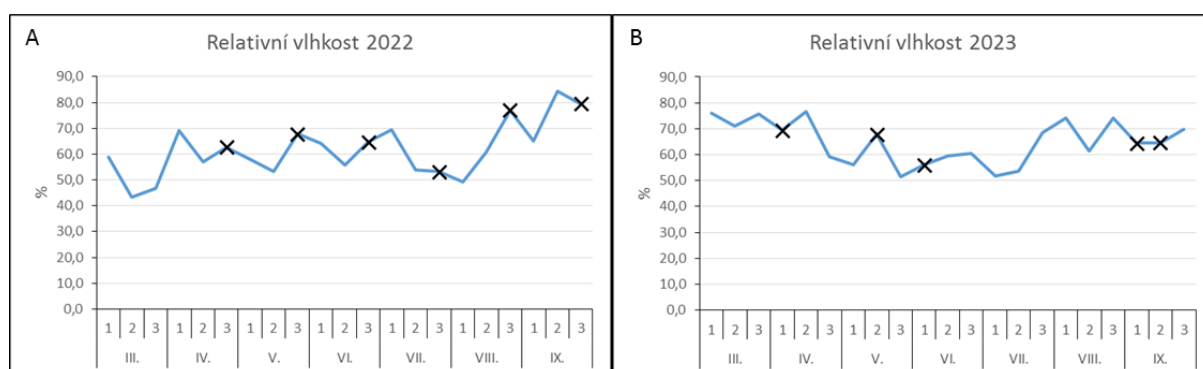
Data pro počasí z ČHMÚ (2024) byla upravena v programu MS Excel do grafické podoby. Data byla získávána z meteorologické stanice Holovousy. Tyto grafy sloužily k porovnání s výsledky této práce.



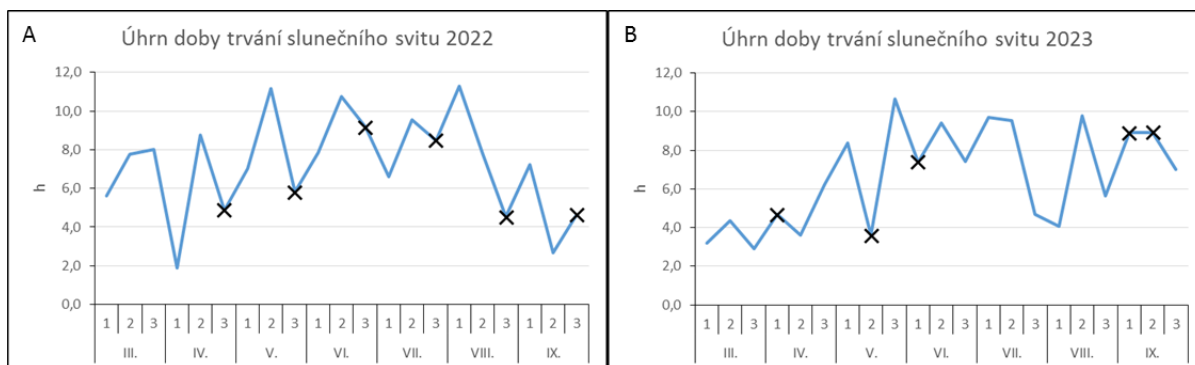
Graf 1: Vývoj průměrných teplot vzduchu v dekadách za období březen–září v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B). Symbolem × jsou označeny odběry vzorků.



Graf 2: Vývoj úhrnu srážek po dekadách za období březen–září v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B). Symbolem × jsou označeny odběry vzorků.



Graf 3: Vývoj průměrné relativní vlhkosti v dekadách za období duben–září v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B). Symbolem × jsou označeny odběry vzorků.



Graf 4: Vývoj průměrného úhrnu doby trvání slunečního svitu v dekadách za období duben–září v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B). Symbolem × jsou označeny odběry vzorků.

4.1.3 Odběry

Vzorky listů byly odebrány ze šesti stromů jabloní odrůdy 'Galaval' a šesti stromů odrůdy 'Rubinola'. Z každého stromu byly odebrány tři listy z různé části stromu a byly vytvořeny směsné vzorky. Během vegetačního období jabloní bylo celkově provedeno 6 odběrů. Tyto odběry byly určeny podle fenologických fází dle stupnice BBCH pro jabloně. Odběry byly provedeny v letech 2022 a 2023. Z logistických důvodů nebyla provedena analýza vzorku z odběru ve fenologické fázi BBCH 76 v roce 2023. Termíny odběrů jsou uvedeny v Tabulce 2. Vzorky byly do dalšího zpracování uchovávány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 2: Termíny odběrů listů dle fenofází

Fenofáze	Odběr 2022	Odběr 2023	Popis fenofází dle Meier et al. 1994
BBCH 65	29.4.	10.4.	Plné kvetení, minimálně 50 % květů otevřených, první korunní plátky opadávají
BBCH 71	27.5.	12.5.	Velikost plodů do 10 mm, opad plůdků po kvetení
BBCH 73	24.6.	10.6.	Druhý opad plůdků
BBCH 76	21.7.	-	Plody dosahují asi 60 % konečné velikosti
BBCH 81	22.8.	10.9.	Začátek dozrávání plodů
BBCH 87	23.9.	20.9.	Sklizňová zralost plodů

Zdroj: Autor (2024)

4.2 Příprava extraktů

Z každého odebraného listu se připravil extrakt. Pomocí tekutého dusíku bylo v třecí misce rozmělněno 0,5 g listu na jemný prášek, ke kterému bylo přidáno 10,5 ml 80% ethanolu. Tato směs se nechala zhruba minutu macerovat za laboratorní teploty a poté byla přefiltrována přes filtrační papír do zkumavek. Takto vzniklé extrakty byly skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 Stanovení malondialdehydu

MDA bylo stanoveno v den přípravy extraktu analýzou dle Du & Bramlage (1992). Pro vlastní analýzu bylo pipetováno 0,7 ml vzorku, přidáno 0,7 ml 2-thiobarbiturové kyseliny v kyselině trichloroctové, směs byla promíchána a následně zahřívána ve vodní lázni při 95 °C po dobu 25 minut. Vychladlý roztok byl odstředěn po dobu 1 minuty při 11000 rpm. Absorbance byla změřena při vlnových délkách 440 nm, 532 nm a 600 nm pomocí UV/VIS spektrofotometru (Evolution 201; Thermo Scientific) a celkový obsah malondialdehydu byl stanoven v nmol/g čerstvé váhy (FW – fresh weight).

4.4 Stanovení fenolických látek

TPC bylo analyzováno podle Singleton & Rossi (1965). Do zkumavky bylo přidáno 10 µl extraktu, 940 µl vody a 750 µl Folin–Ciocalteu činidla. Roztok se nechal 6 minut inkubovat a následně se do něj přidalo 800 µl 7% Na₂CO₃. Vzniklá reakční směs byla uložena na 90 minut do tmy při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 765 nm. Celkový obsah fenolů byl určen jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE) v mg/g FW, která byla použita jako standard pro kalibrační křivku.

4.5 Stanovení fenolických kyselin

PAC byl stanoven podle Českého lékopisu 2017. K 25 µl extraktu bylo postupně přidáno 975 µl vody, 200 µl 0.5 mol/L HCl, 200 µl NaNO₂, 200 µl Na₂MoO₄ a 400 µl 1 mol/L NaOH. Následně byly vzorky promíchány a měřeny při 490 nm na spektrofotometru. Celkový obsah fenolických kyselin byl stanoven v mg/g FW jako ekvivalent kávové kyseliny (CAE).

4.6 Stanovení flavonoidů

TFC bylo měřeno metodou popsanou Tsanova-Savova et al. (2018). Do zkumavky bylo napipetováno 20 µl extraktu, 940 µl vody a 120 µl 5% NaNO₂. Po 5 minutách se do směsi přidalo 120 µl 10% AlCl₃. Následně se směs nechala reagovat 6 minut a poté se přidalo 800 µl 1 mol/L NaOH. Vzorky byly měřeny při vlnové délce 415 nm na spektrofotometru. Celkový obsah flavonoidů byl vypočítán jako ekvivalent kvercetinu (QE) v mg/g FW.

4.7 Stanovení celkové antioxidační kapacity

TAC bylo přizpůsobeno dle Prieto et al. (1999). K 10 µl extraktu bylo přidáno 90 µl ultračisté vody a 1 ml reakčního činidla (0.6 mol/L H₂SO₄, 28 mmol/L Na₃PO₄ and 4 mmol/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄). Směs byla inkubována ve vodní lázni při 95 °C po dobu 90 minut. Po zchlazení vzorků na laboratorní teplotu byly měřeny spektrofotometrem při vlnové délce 695 nm. Celková antioxidační aktivita byla vyhodnocena jako ekvivalent kyseliny askorbové (AAE) v mg/g FW.

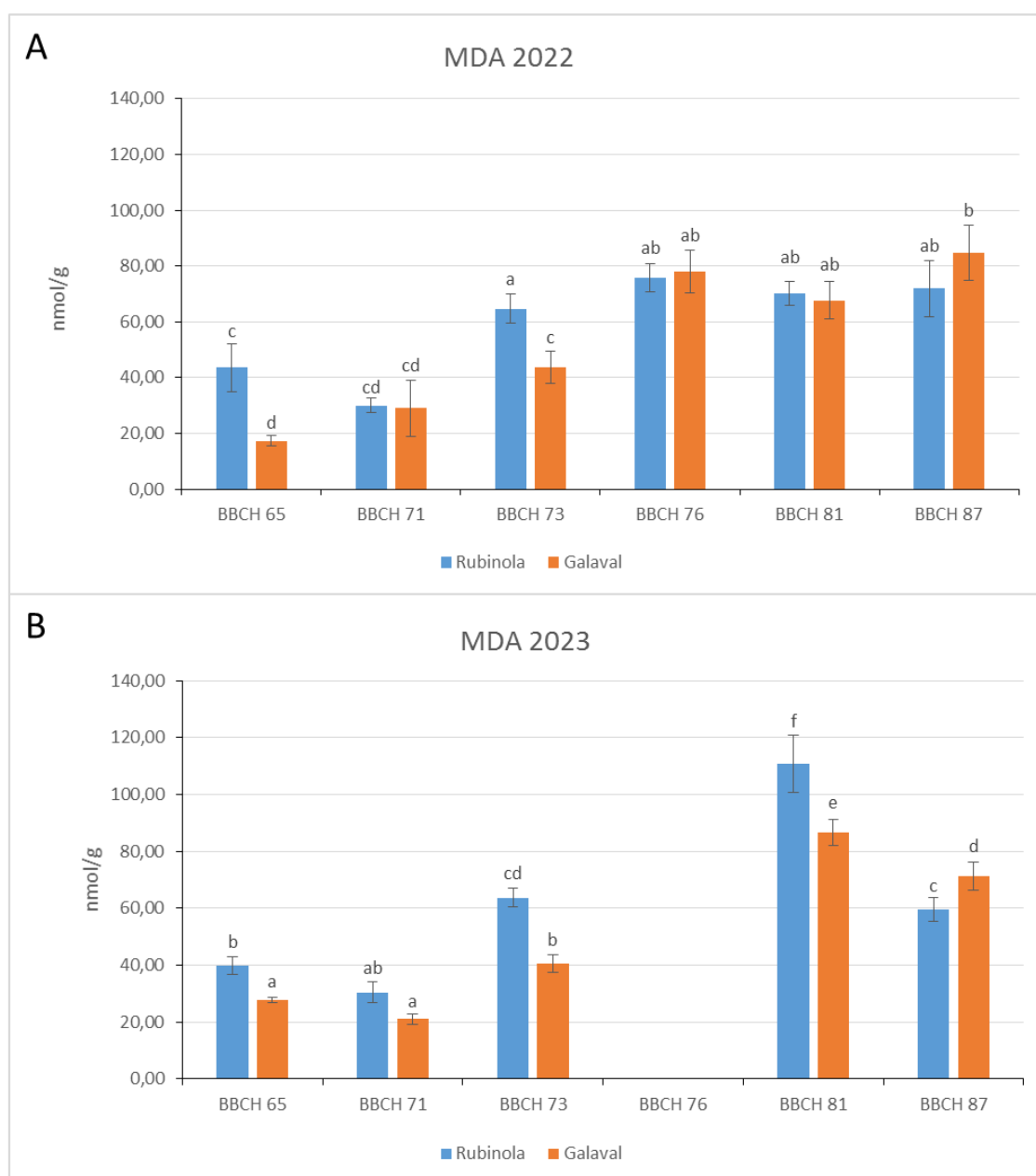
4.8 Statistické zpracování dat

Data byla zpracována využitím programu STATISTICA 12. Pro každou odrůdu a odběr byla použita čtyři měření. Pro analýzu byla vybrána ANOVA a Tukeyho post-hoc test při hladině významnosti $p < 0,05$. Grafy byly vytvořeny v programu MS Excel.

5 Výsledky

5.1 Obsah malondialdehydu

Jak znázorňuje Graf 5A, tak se množství MDA v listech jabloní postupně zvyšovalo v průběhu roku 2022 u obou odrůd, zejména v prvních třech sledovaných odběrech. Patrné to bylo u odrůdy 'Galaval', méně u genotypu 'Rubinola', kde byl na začátku měření v rámci BBCH 65 pozorován výrazně vyšší obsah tohoto produktu poškození membrán. Přestože se obě odrůdy mezi sebou v koncentraci MDA do určité míry lišily, zvláště u posledního odběru, nebyl zde prokázán statisticky signifikantní rozdíl.



Graf 5: Obsah malondialdehydu (nmol/g FW) v listech vybraných genotypů jabloní v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B). Hodnoty sloupců označených stejnými písmeny nejsou od sebe statisticky významně odlišné (Tukeyův test, hladina významnosti $p < 0,05$).

V rámci roku 2023 (Graf 5B) měla u prvních třech sledovaných fenologických fází podobný vývoj odrůda 'Rubinola'. Průměrná koncentrace MDA u 'Galaval' byla ve srovnání s předchozím rokem, s výjimkou BBCH 65, i druhé odrůdě nižší, nicméně významný rozdíl zde opět pozorován nebyl. V rámci fenologických fází BBCH 81 a BBCH 87 v tomto roce však mezi odrůdami byly pozorovány signifikantní rozdíly, kdy u genotypu 'Rubinola' byl naměřen vůbec nejvyšší obsah MDA, ale v posledním odběru se jeho koncentrace zvýšila opět u 'Galaval'.

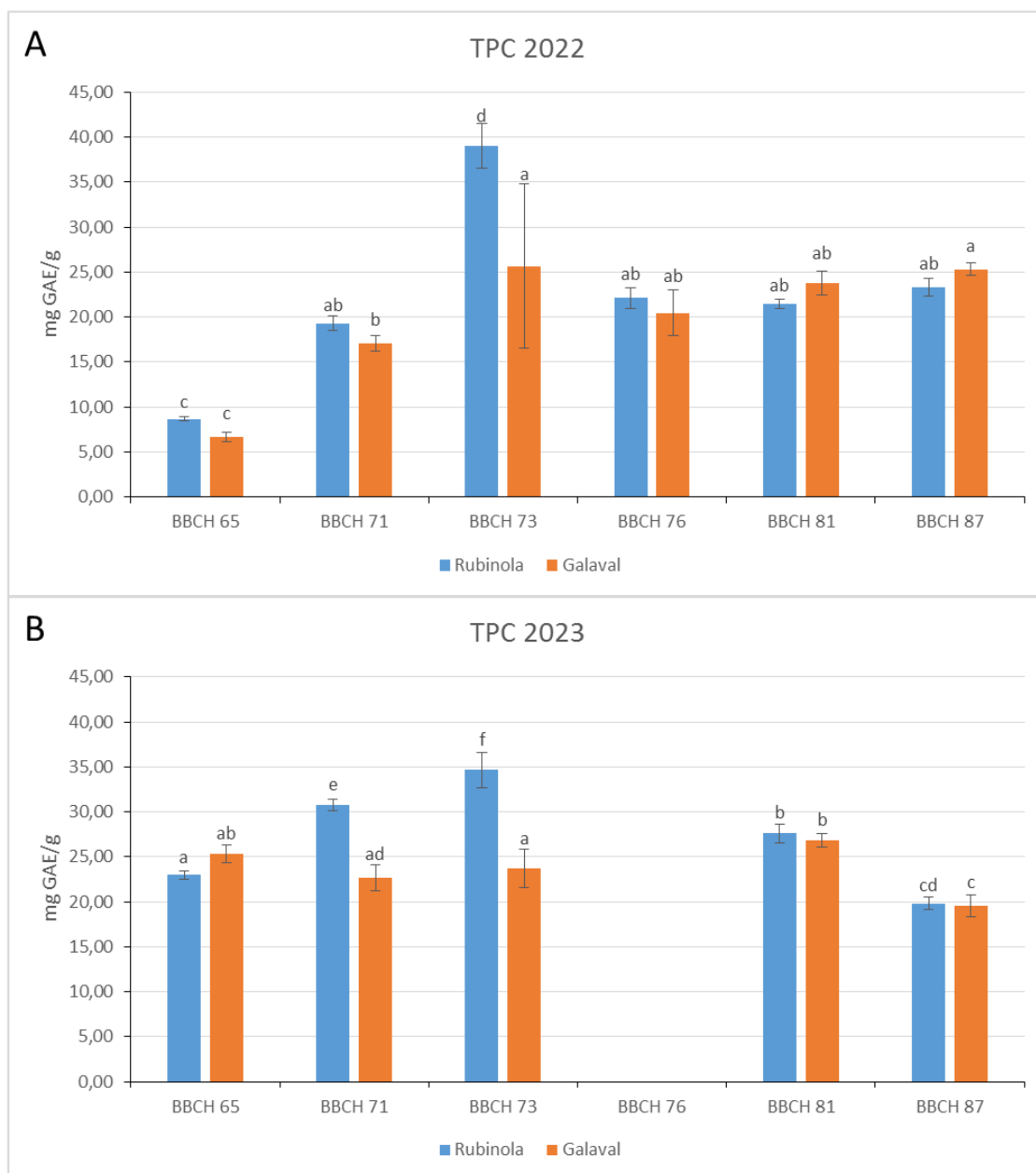
S výjimkou fáze BBCH 87 (sklizňová zralost) lze tak konstatovat, že v průběhu měření docházelo k větší tvorbě malondialdehydu u odrůdy 'Rubinola', což se signifikantně projevilo v obou letech zejména u prvního a třetího měření (BBCH 65 a 73) a v roce 2023 ještě navíc u fáze BBCH 81.

5.2 Obsah fenolických látek

V rámci roku 2022 (Graf 6A) se obsah TPC postupně zvyšoval u obou odrůd ve fázích BBCH 65, BBCH 71 a BBCH 73. Mezi těmito fázemi byly také pozorovány signifikantní rozdíly. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán ve fázi BBCH 73, po které nastal pokles. Mezi odrůdami i odběry nebyla do konce pozorování zaznamenána další významná změna v obsahu fenolických látek, i když se jejich množství u posledních dvou odběrů opět mírně zvyšovalo. Ve fázi BBCH 73 tak byl pozorován jediný signifikantní rozdíl mezi oběma odrůdami.

Z Grafu 6B je patrné, že v roce 2023 docházelo ke kolísavějšímu trendu než v předchozím roce. U odrůdy 'Rubinola' byl pozorován postupný nárůst obsahu TPC do fáze BBCH 73, podobný roku 2022, a poté následoval postupný pokles. U odrůdy 'Galaval' byl v prvních třech měřeních TPC relativně vyrovnaný, a zatímco v BBCH 81 se množství sledovaných látek výrazně zvýšilo, v posledním odběru byl stejně jako u druhé odrůdy signifikantní pokles. Mezi odrůdami tak byly zaznamenány statisticky významné rozdíly ve fenologické fázi BBCH 71 a BBCH 73.

Celkově lze konstatovat, že vyšší obsah TPC byl pozorován u odrůdy 'Rubinola', což se projevilo v obou letech ve většině odběrů, zejména u fenologických fází BBCH 71 a BBCH 73.

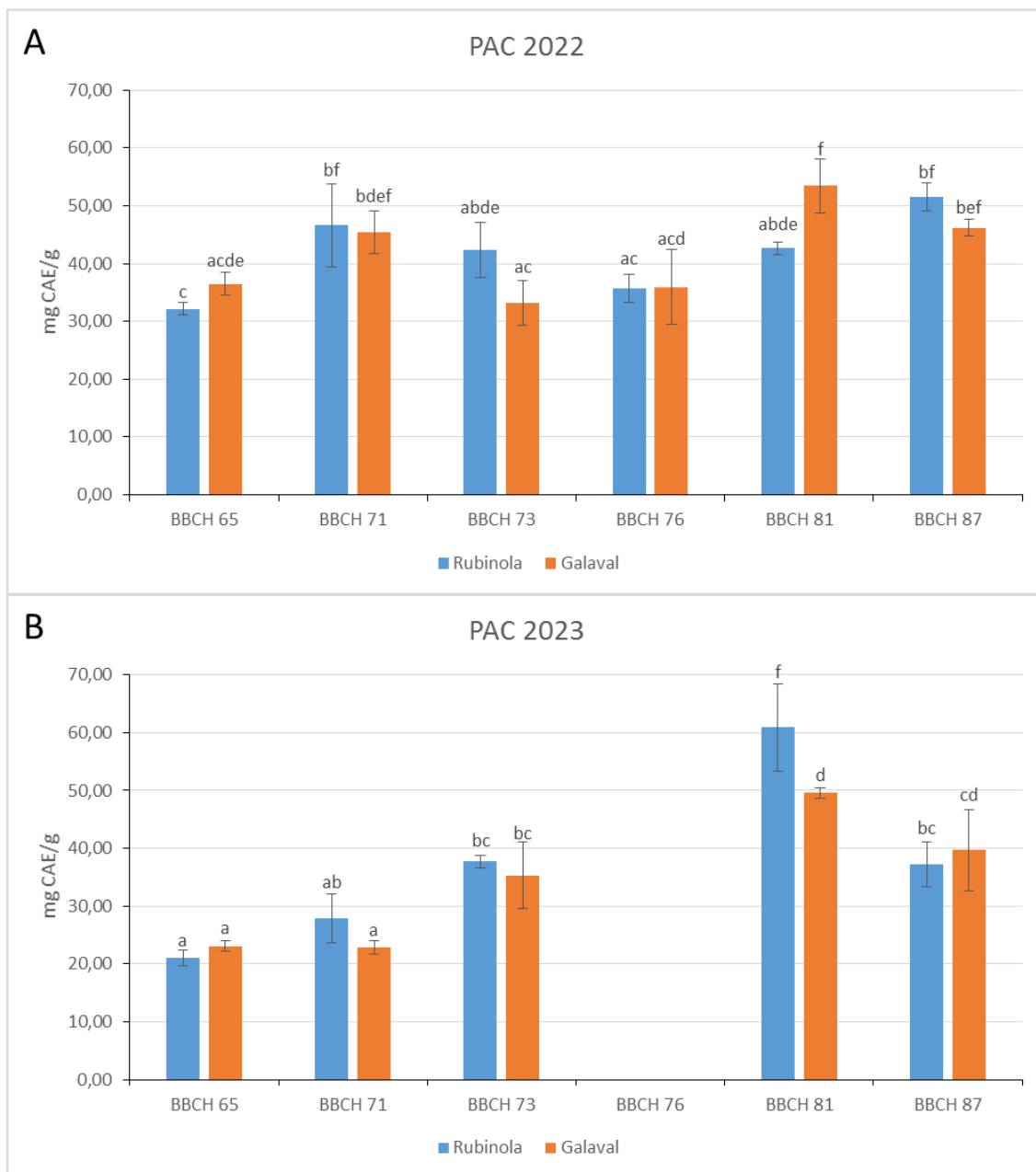


Graf 6: Obsah fenolických látek (mg GAE/g FW) v listech vybraných genotypů jabloní v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B). Hodnoty sloupců označených stejnými písmeny nejsou od sebe statisticky významně odlišné (Tukeyův test, hladina významnosti $p < 0,05$).

5.3 Obsah fenolických kyselin

Jak je zobrazeno na Grafu 7A, tak v roce 2022 byly zaznamenány dva nárůsty obsahu PAC ve fázích BBCH 71 a BBCH 81, po kterých následoval pokles, což bylo podobné jako u TFC (Graf 8A). Nejvyšší obsah fenolických kyselin byl pozorován u odrůdy 'Galaval' v pátém odběru (BBCH 81). V tomto odběru byl také zaznamenán signifikantní rozdíl v obsahu PAC při srovnání s odrůdou 'Rubinola'. I když docházelo k dalším určitým rozdílům mezi odrůdami, tak nebyly statisticky významné.

V roce 2023 (Graf 7B) byl pozorován pravidelný nárůst obsahu PAC, až na poslední odběr, kde došlo k jeho poklesu podobně jako u jiných skupin metabolitů (Graf 6B, 8B a 9B). Nejvyšší obsah fenolických kyselin byl opět jako v předchozím roce ve fázi BBCH 81. Zde byl také zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi odrůdami, ale oproti předešlému roku byl vyšší obsah u odrůdy 'Rubinola'. Žádné další rozdíly mezi odrůdami nebyly pozorovány.

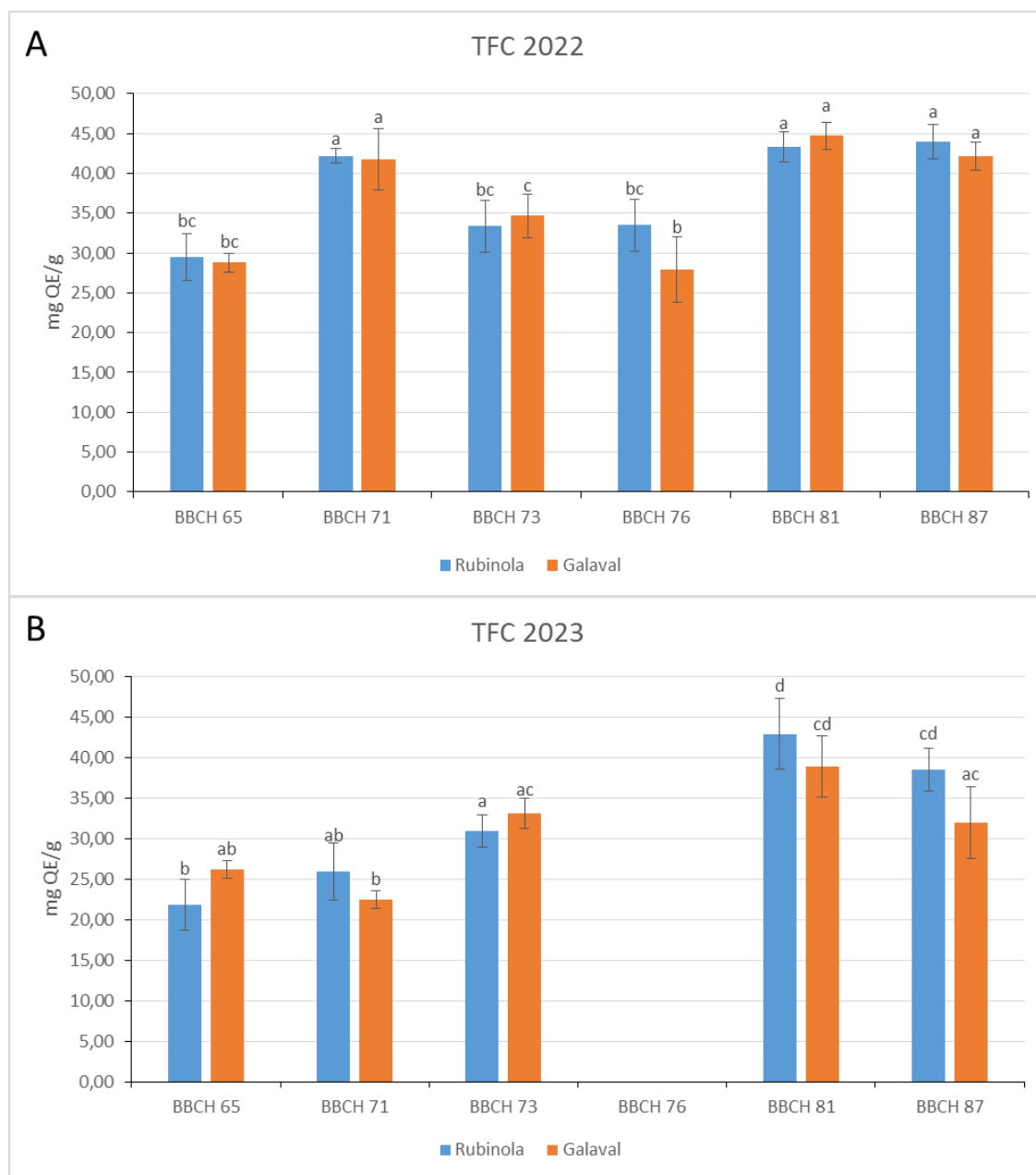


Graf 7: Obsah fenolických kyselin (mg CAE/g FW) v listech vybraných genotypů jablek v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B). Hodnoty sloupců označených stejnými písmeny nejsou od sebe statisticky významně odlišné (Tukeyův test, hladina významnosti $p < 0,05$).

5.4 Obsah flavonoidů

Obsah TFC byl v průběhu odběrů podle Grafu 8A v roce 2022 proměnlivý podobně jako obsah TAC (Graf 9A). I když mezi odrůdami nebyl pozorován žádný signifikantní statistický rozdíl v obsahu TFC v jednotlivých fenologických fázích, tak byly zaznamenány rozdíly

v obsahu TFC u obou odrůd mezi různými odběry. A to konkrétně mezi skupinou odběrů 1, 3 a 4 (BBCH 65, 73 a 76) se skupinou odběrů 2, 5 a 6 (BBCH 71, 81 a 87).



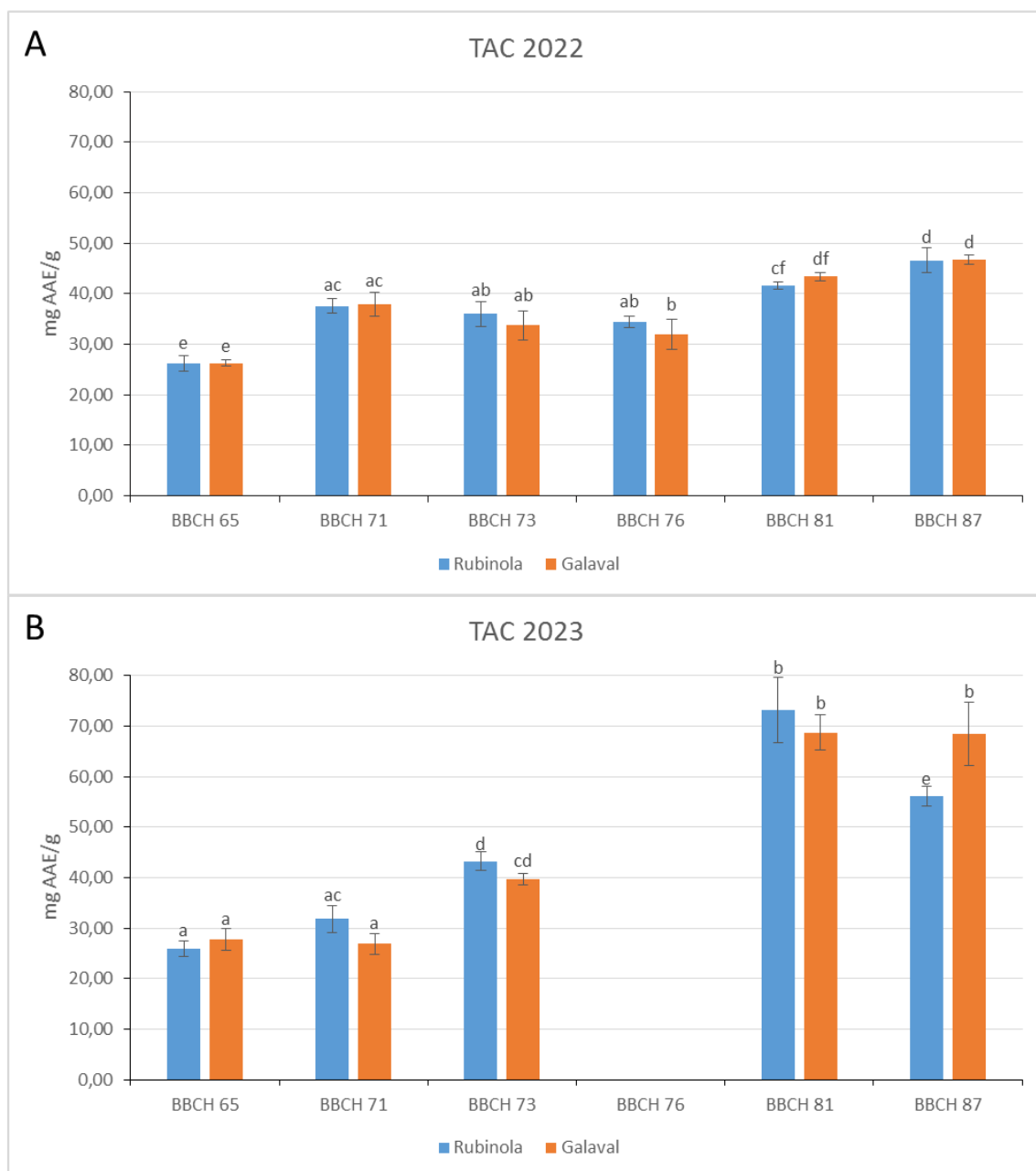
Graf 8: Obsah flavonoidů (mg QE/g FW) v listech vybraných genotypů jablek v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B). Hodnoty sloupců označených stejnými písmeny nejsou od sebe statisticky významně odlišné (Tukeyův test, hladina významnosti $p < 0,05$).

V roce 2023 (Graf 8B) byl průběh obsahu flavonoidů odlišný od předchozího roku. Až do fáze BBCH 81 obsah TFC pravidelně narůstal a poté následoval mírný pokles, podobně jako u TAC (Graf 9B). Mezi odrůdami v jednotlivých odběrech nebyly prokázány žádné signifikantní rozdíly v obsahu TFC. Lišily se však obsahy flavonoidů u obou odrůd mezi některými odběry. Nejvíce se lišily hodnoty prvního (BBCH 65) a druhého odběru (BBCH 71) s předposledním odběrem (BBCH81).

Vyšší obsah TFC byl v obou letech zaznamenán u odrůdy 'Rubinola'.

5.5 Celková antioxidační kapacita

Jak lze pozorovat na Grafu 9A, tak se TAC mírně navyšoval v průběhu celého roku 2022, s výjimkou odběrů BBCH 73 a 76. V těchto fázích nastal určitý pokles, který ale nebyl mezi jednotlivými intervaly měření průkazný. Následující nárůst antioxidační kapacity u BBCH 81 však již statisticky významný byl. Mezi vlastními odrůdami nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly. Nejnížší hodnoty celkové antioxidační kapacity byly naměřeny v prvním odběru (BBCH 65) u obou odrůd, nejvyšší hodnoty byly u obou odrůd v posledním odběru (BBCH 87).



Graf 9: Celková antioxidační kapacita (mg AAE/g FW) v listech vybraných genotypů jabloní v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B). Hodnoty sloupců označených stejnými písmeny nejsou od sebe statisticky významně odlišné (Tukeyův test, hladina významnosti $p < 0,05$).

Na rozdíl od předchozího roku TAC výrazně stoupala po celý rok 2023 (Graf 9B). Nejvíce to bylo patrné u odrůdy 'Galaval', kdy nedošlo u hodnocených vzorků k žádnému poklesu. Naproti tomu u 'Rubinola' byl zaznamenán významný pokles u posledního odběru (BBCH 87), a to i ve srovnání s druhou odrůdou. Nejvyšší antioxidační kapacita byla pozorována ve fenologické fázi BBCH 81 u 'Rubinola', nicméně z hlediska statistiky zde v porovnání s odrůdou 'Galaval' nebyl výrazný rozdíl.

V porovnání obou let byl mnohem vyšší obsah TAC naměřen u posledních dvou fenologických fází v roce 2023, ale jinak se celková antioxidační kapacita mezi lety příliš nelišila.

6 Diskuze

Přestože jsou jabloně pěstovány především kvůli svým plodům, pozornost si také získávají jejich listy. V různých studiích bylo pozorováno, že nezávisle na odrůdě mohou listy obsahovat více fenolických látek ve srovnání s jinými částmi rostliny (Kapp et al. 2023), a že antioxidační aktivita připravených extraktů je rovněž větší (Wojdyło & Oszmiański 2020). V případě stanovení TAC pak záleží také na použité metodě. Wojdyło & Oszmiański (2020) stanovovali u listů odrůdy 'Ozark Gold' antioxidační aktivitu listů odebraných ve čtyřech odběrech po plném květu (60, 80, 130 a 145 dní), kdy se jimi získaný TPC v jednotlivých termínech dle statistiky významně neměnil. Podobné výsledky byly vidět i v roce 2022 u odrůdy 'Galaval' (Graf 1A), kdy rozdíl mezi BBCH 65 a BBCH 73 byl také okolo 60 dnů a do konce sledování byl obsah fenolických látek vyrovnaný. V roce 2023 (Graf 1B) byla situace u této odrůdy podobná, přestože TPC nemohl být v BBCH 76 změřen. U odrůdy 'Rubinola' byl ve třetím odběru 2022 naměřen TPC větší, ale poté klesl a nelišil se od 'Galaval'. Celková antioxidační aktivita (Graf 9) v obou letech během sledovaných odběrů stoupala, zatímco Wojdyło & Oszmiański (2020) pozorovali při použití DPPH metody pozvolný pokles, v případě ABTS byly hodnoty více proměnlivé.

Kromě celkového kvantitativního hlediska byla v práci Wojdyło & Oszmiański (2020) zaznamenána rovněž změna v zastoupení jednotlivých metabolitů, kdy se zaměřili na různé glykosidy a další deriváty fenolických aglykonů jako kyselina kávová, floretin nebo quercetin. V rámci těchto metabolitů byl u nich pozorován jak statisticky významný nárůst a pokles, tak i ne příliš změněné koncentrace. Kromě listů 'Ozark Gold', pozorovali Wojdyło & Oszmiański (2020) obsah a typ fenolických látek i v plodech této a dalších dvou odrůd – 'Starkinson' a 'Kosztela'. U každé ze tří z těchto odrůd bylo v jablkách odlišné zastoupení jednotlivých fenolických kyselin a flavonoidů, které se pak mohou podílet na jejich celkovém obsahu.

Jak popsali Kapp et al. (2023), tak se obsah těchto látek v listech mezi některými z jimi analyzovaných odrůd také lišil, u některých však byl poměrně podobný. Výstupy těchto dvou prací by tak mohly vysvětlovat tedy nejen výsledky PAC (Graf 7) a TFC (Graf 8) naměřených v rámci sledovaných odběrů, ale i jejich obsah u odrůd 'Rubinola' a 'Galaval' jako takových. Nárůst některých z těchto sekundárních metabolitů v průběhu roku pak u odrůdy 'Ligol' popsali i Liaudanskas et al. (2018).

Zvýšený obsah MDA v případě odrůdy 'Rubinola' v roce 2023 (Graf 5B), může naznačovat zvýšenou oxidaci lipidů v důsledku přítomnosti oxidačního stresu v rostlinách. Tento stres by mohl být způsobený vysokou teplotou a délkou působení. To potvrdila i studie Ma et al. (2008), kteří při pokusu s jabloněmi odrůdy 'Gala' pozorovali změny obsahu MDA v listech při zvýšené teplotě a zjistili, že se zvyšující se teplotou a dobou jejího působení stoupal i obsah MDA v listech. Podobné výsledky byly pozorovány i v této práci, kdy teplota vzduchu (Graf 1B) a délka působení slunečního svitu (Graf 4B) se vyvíjela podobně jako obsah MDA. Při srovnání všech tří grafů lze pozorovat, že se zvyšující se teplotou a dobou slunečního svitu stoupal i obsah této látky. Rozdíly pozorované mezi odrůdami 'Galaval' a 'Rubinola' v obsahu MDA, kdy vyšší obsah této látky značí poškození byl zaznamenán u odrůdy 'Rubinola', by tak mohli naznačovat, že je 'Galaval' odolnější vůči daným stresům.

Některé práce se zabývaly obsahem MDA u hrušní a jabloní vystaveným suchu (Wang et al. 2012; Mihaljević et al. 2021; Maleki Asayesh et al. 2023). U všech těchto prací zaznamenali

postupný nárůst obsahu MDA se zvyšující se dobou sucha. Tento jev se ale nepotvrdil v této práci a nebyl nalezen žádný vztah mezi suchem a obsahem MDA. Mohlo by to být způsobeno tím, že v tomto pokuse měli rostliny dostatek srážek (Graf 2) a netrpěli tak stresem ze sucha. To může znamenat, že se MDA syntetizuje i při působení jiných stresových podmínek, jako je dříve zmíněný stres z teploty a délky působení slunečního záření.

Celkově vyšší tvorba TPC u odrůdy 'Rubinola' by mohla být dána genetickou odolností vůči strupovitosti jabloně. To je také zaznamenáno v pokusu Petkovsek et al. (2009), kde byl sledován obsah TPC mezi odolnými a náchylnými odrůdami proti strupovitosti jabloní. Bylo zjištěno, že větší obsah TPC byl naměřen v listech odolných odrůd. Je však nutné přihlédnout i k tomu, že čistě jenom obsah fenolických látek nnesvědčí o odolnosti odrůd.

Zvýšený obsah TPC může také například vyvolat stresový faktor prostředí. Tím se zabývali Mihaljević et al. (2021), kteří sledovali vliv stresu ze sucha na různé parametry a obsahové látky u tří vybraných genotypů jabloní. Vyšší obsah fenolických látek, po 12 dnech vystavení suchu, zaznamenaly u dvou genotypů. V této práci se ale spíše vyvíjel obsah TPC u obou odrůd podle úhrnu srážek (Graf 2), více patrné to bylo v roce 2022 (Graf 6A). Při vyšších srážkách byl pozorován vyšší obsah těchto fenolických látek.

V prvních třech odběrech se zdá, že byl obsah TPC ovlivněn i vzrůstající teplotou, to bylo pozorováno hlavně u odrůdy 'Rubinola' v obou letech odběrů. S rostoucí teplotou rostl i obsah TPC. Tento jev zaznamenali i Viljevac Vuletić et al. (2022), kdy vystavili dva genotypy slivoní krátkodobému teplotnímu stresu. Nicméně by tento nárůst TPC mohl být také způsoben přirozeným vývojem rostliny.

V jako jediném měřeném parametru se obsah TFC mezi odrůdami 'Rubinola' a 'Galaval' nelišil ani v jednom roce. Mezi odběry došlo pouze k nárůstu v posledních dvou fenologických fázích. To by mohlo znamenat, že se obsah TFC v listech zvyšuje s dozráváním plodů. Lebedev et al. (2022) toto potvrdili v listech maliníků, ale jen u některých genotypů. Zvýšení flavonoidů by také mohlo být způsobeno zvýšením MDA. Což se také projevilo v pokusu s hrušněmi u Maleki Asayesh et al. (2023), kdy obsah MDA stoupal podobně jako obsah TFC.

U parametrů TFC a PAC byl zaznamenán podobný trend v jednotlivých letech. S růstem jednoho parametru se zvyšoval i druhý, podobná situace poté byla i u případného poklesu. Mohlo by to znamenat, že tyto parametry tedy reagují společně na stres, což dokládá i Michalek et al. (2005). Tito autoři pozorovali stimulační vliv abiotických elicitorů na fenylalaninlyázu, jednoho z klíčových enzymů syntézy fenolických látek, a produkci flavanolů a chlorogenové kyseliny v listech jabloně. Podobný vývoj měla TAC, a právě obsah látek typu polyfenolů je odpovědný za antioxidační aktivitu, díky které by mohly najít listy jabloní najít uplatnění například v doplňcích stravy. Zde pak může právě hrát roli nejen použitá odrůda, termín odběru, ale i další faktory jako způsob extrakce a použité rozpouštědlo (Cendrowskiet al. 2024).

Existuje velké množství článků na sledování biochemických látek v plodech a slupkách jablek (Le Bourvellec et al. 2015; Acquavia et al. 2021). Avšak mnohem méně je studií zabývajících se obsahem těchto látek v listech jabloní. Tyto studie by bylo vhodné více prozkoumat. Přestože se jim nevěnuje tolik pozornosti, tak mají hodnotné výsledky. Například ve studii Sirgedaitė-Šežienė et al. (2022) zjistili, že obsah v listech jabloní je přibližně 15krát vyšší než v plodech. Tyto zjištění by mohla mít přínos pro farmaceutický nebo potravinářský průmysl, kdy tyto látky mají vysokou antioxidační hodnotu a mají mnoho pozitivních vlastností na lidské zdraví.

7 Závěr

- Odrůdy 'Galaval' a 'Rubinola' se mezi sebou v rámci určených vývojových fází lišily v několika sledovaných parametrech, zejména z hlediska MDA a TPC, čímž byla potvrzena alternativní hypotéza a zamítnuta nulová. Nejvíce se tyto rozdíly projevíly v obsahu MDA a TPC.
- Celkově měla vyšší obsah sledovaných parametrů odrůda 'Rubinola'.
- Dále byly zaznamenány změny v obsahu jednotlivých metabolitů mezi různými odběry, což mohlo být zapříčiněno stresovými faktory prostředí, jako je teplota, délka sluneční svitu nebo vliv srážek. Některé pozorované změny mohly také nastat v důsledku jejich přirozené tvorby během růstu.

8 Literatura

- Acquavia M, Pascale R, Foti L, Carlucci G, Scrano L, Martelli G, Brienza M, Coviello D, Bianco G, Lelario F. 2021. Analytical Methods for Extraction and Identification of Primary and Secondary Metabolites of Apple (*Malus domestica*) Fruits: A Review. *Separations* **8**.
- Adhikari U. 2022. Distribution, Biology, Nature Of Damage And Management Of Woolly Apple Aphid, *Eriosoma lanigerum* (Hausmann), (Hemiptera: Aphididae) In Apple Orchard. *Reviews In Food and Agriculture* **3**:92-99.
- Ahluwalia O, Singh PC, Bhatia R. 2021. A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability* **5**.
- Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. 2021. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science* **4**:200-214.
- Amiri ME, Fallahi E, Golchin A. 2008. Influence of Foliar and Ground Fertilization on Yield, Fruit Quality, and Soil, Leaf, and Fruit Mineral Nutrients in Apple. *Journal of Plant Nutrition* **31**:515-525.
- Andreev R, Rasheva D, Kutinkova H. 2012. Non-chemical control of *Aphis spiraecola* patch and *Dysaphis plantaginea* pass. on apple. *Journal of Biopesticides* **5**:239 - 242.
- Arnold M, Gramza-Michalowska A. 2023. Recent Development on the Chemical Composition and Phenolic Extraction Methods of Apple (*Malus domestica*)-A Review. *Food and Bioprocess Technology* DOI: 10.1007/s11947-023-03208-9.
- Baric S, Berger J, Cainelli C, Kerschbamer C, Letschka T, Dalla Via J. 2011. Seasonal colonisation of apple trees by 'Candidatus *Phytoplasma mali*' revealed by a new quantitative TaqMan real-time PCR approach. *European Journal of Plant Pathology* **129**:455-467.
- Barthel D, Dordevic N, Fischnaller S, Kerschbamer C, Messner M, Eisenstecken D, Robatscher P, Janik K. 2021. Detection of apple proliferation disease in *Malus × domestica* by near infrared reflectance analysis of leaves. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **263**.
- Belete T, Boyraz N. 2017. Critical review on apple scab (*Venturia inaequalis*) biology, epidemiology, economic importance, management and defense mechanisms to the causal agent. *J. Plant Physiol. Pathol* **5**.
- Blažek J. 2001. *Pěstujeme jabloně*. Brázda, Praha.
- Cendrowski A, Jakubowska Z, Przybył JL. 2024. Apple Tree Leaves (*Malus domestica* Borkh) as a Valuable Source of Polyphenolic Compounds with a High Antioxidant Capacity. *Applied Sciences* **14**.
- Dai J, Mumper RJ. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15**:7313-7352.

- Du Z, Bramlage WJ. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**:1566-1570.
- Feliciano RP, Antunes C, Ramos A, Serra AT, Figueira ME, Duarte CMM, Carvalho A de, Bronze MR. 2010. Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *Journal of Functional Foods* **2**:35-45.
- Fernandes MS, Rossiello ROP. 1995. Mineral Nitrogen in Plant Physiology and Plant Nutrition. *Critical Reviews in Plant Sciences* **14**:111-148.
- Gimenez E, Salinas M, Manzano-Agugliaro F. 2018. Worldwide Research on Plant Defense against Biotic Stresses as Improvement for Sustainable Agriculture. *Sustainability* **10**.
- Głos H, Bryk H, Michalecka M, Puławska J. 2022. The Recent Occurrence of Biotic Postharvest Diseases of Apples in Poland. *Agronomy* **12**.
- Grimová L, Winkowska L, Konrady M, Ryšánek P. 2016. Apple mosaic virus. *Phytopathologia Mediterranea* **55**:1-19.
- Guzmán-Pantoja LE, Bowater RJ. 2019. A network meta-analysis of the susceptibility of apple genotypes to powdery mildew under organic management. *Scientia Horticulturae* **243**:506-513.
- Hausmann C, Samietz J, Dorn S. 2004. Significance of shelter traps for spring monitoring of *Anthonomus pomorum* in apple orchards. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **112**:29-36.
- Hawkesford MJ, Cakmak I, Coskun D, De Kok LJ, Lambers H, Schjoerring JK, White PJ. 2023. Functions of macronutrients. *Marschner's Mineral Nutrition of Plants*:201-281. Academic press.
- Hejny S, Slavík B. 2003. *Květena České republiky* 3. Academia, Praha.
- Kapp K, Kalder K, Kikas A, Univer T, Püssa T, Raal A. 2023. Polyphenolic compounds in apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars grown in Estonia. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* **72**.
- Khajuria YP, Kaul S, Wani AA, Dhar MK. 2018. Genetics of resistance in apple against *Venturia inaequalis* (Wint.) Cke. *Tree Genetics & Genomes* **14**.
- Khan MA, Zhao Y, Korban SS. 2012. Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Resistance to the Bacterial Pathogen *Erwinia amylovora*, Causal Agent of Fire Blight Disease in Rosaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* **30**:247-260.
- Kowalczyk W, Wrona D, Przybyłko S. 2022. Effect of Nitrogen Fertilization of Apple Orchard on Soil Mineral Nitrogen Content, Yielding of the Apple Trees and Nutritional Status of Leaves and Fruits. *Agriculture* **12**.
- Kranner I, Minibayeva FV, Beckett RP, Seal CE. 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist* **188**:655-673.

- Laznik Ž, Cunja V, Kač M, Trdan S. 2011. Efficacy of three natural substances against apple aphid (*Aphis pomi* De Geer, Aphididae, Homoptera) under laboratory conditions. *Acta agriculturae Slovenica* **97**:19-23.
- Lebedev VG, Lebedeva TN, Vidyagina EO, Sorokopudov VN, Popova AA, Shestibratov KA. 2022. Relationship between Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Berries and Leaves of Raspberry Genotypes and Their Genotyping by SSR Markers. *Antioxidants* **11**.
- Le Bourvellec C, Bureau S, Renard CMGC, Plenet D, Gautier H, Touloumet L, Girard T, Simon S, DaMatta FM. 2015. Cultivar and Year Rather than Agricultural Practices Affect Primary and Secondary Metabolites in Apple Fruit. *PLOS ONE* **10**.
- Liaudanskas M, Zymone K, Viskelis J, Kviklys D, Viskelis P, Janulis V. 2018. Seasonal Variation of the Qualitative and Quantitative Composition of Phenolic Compounds in *Malus domestica* Leaves. *Chemistry of Natural Compounds* **54**:348-349.
- Li S, Chen H, Yu H, Li Y, Wang L. 2023. Responses and adaptations of fruit trees to high temperatures. *Fruit Research* **3**.
- Ljavić D et al. 2023. Influence of cultivar and fertilization treatment on the yield and leaf nutrients content of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Heliyon* **9**.
- Majer P, Stoyanova S, Hideg É. 2010. Do leaf total antioxidant capacities (TAC) reflect specific antioxidant potentials? – A comparison of TAC and reactive oxygen scavenging in tobacco leaf extracts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **100**:38-43.
- Maleki Asayesh Z, Arzani K, Mokhtassi-Bidgoli A, Abdollahi H. 2023. Enzymatic and non-enzymatic response of grafted and ungrafted young European pear (*Pyrus communis* L.) trees to drought stress. *Scientia Horticulturae* **310**.
- Mareri L, Parrotta L, Cai G. 2022. Environmental Stress and Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **23**.
- Ma Y-H, Ma F-W, Zhang J-K, Li M-J, Wang Y-H, Liang D. 2008. Effects of high temperature on activities and gene expression of enzymes involved in ascorbate–glutathione cycle in apple leaves. *Plant Science* **175**:761-766.
- Meier U, et al. 1994. Phänologische Entwicklungsstadien des Kernobstes (*Malus domestica* Borkh. und *Pyrus communis* L.), des Steinobstes (*Prunus*-Arten), der Johannisbeere (*Ribes*-Arten) und der Erdbeere (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **46**:141-153
- Mignard P, Beguería S, Giménez R, Font i Forcada C, Reig G, Moreno MÁ. 2022. Effect of Genetics and Climate on Apple Sugars and Organic Acids Profiles. *Agronomy* **12**.
- Mihaljević I, Viljevac Vuletić M, Šimić D, Tomaš V, Horvat D, Josipović M, Zdunić Z, Dugalić K, Vuković D. 2021. Comparative Study of Drought Stress Effects on Traditional and Modern Apple Cultivars. *Plants* **10**.
- Michalek S, Klebel C, Treutter D. 2005. Stimulation of phenylpropanoid biosynthesis in apple (*Malus domestica* Borkh.) by abiotic elicitors. *Eur. J. Hortic. Sci.* **70**:116-20

- Miñarro M, Dapena E. 2007. Resistance of Apple Cultivars to *Dysaphis plantaginea* (Hemiptera: Aphididae). *Environmental Entomology* **36**:1206-1211.
- Ministerstvo zemědělství České republiky. 2023. Praha. Situační a výhledová zpráva: Ovoce.
- Ministerstvo zdravotnictví České republiky. 2017. Praha. Český lékopis 2017.
- Morales M, Munné-Bosch S. 2019. Malondialdehyde: Facts and Artifacts. *Plant Physiology* **180**:1246-1250.
- Mosa KA, Ismail A, Helmy M. 2017. *Plant Stress Tolerance*. Springer, Cham.
- Musacchi S, Serra S. 2018. Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Scientia Horticulturae* **234**:409-430.
- Nawaz M, Sun J, Shabbir S, Khattak WA, Ren G, Nie X, Bo Y, Javed Q, Du D, Sonne C. 2023. A review of plants strategies to resist biotic and abiotic environmental stressors. *Science of The Total Environment* **900**.
- Neilsen GH, Neilsen D. 2003. Nutritional requirements of apple. *Apples: botany, production and uses*:267-302. CABI, Wallingford.
- Neilsen GH, Neilsen D, Toivonen P, Herbert L. 2008. Annual Bloom-time Phosphorus Fertilization Affects Soil Phosphorus, Apple Tree Phosphorus Nutrition, Yield, and Fruit Quality. *HortScience* **43**:885-890.
- Pajač I, Pejić I, Barić B. 2011. Codling Moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) – Major Pest in Apple Production: an Overview of its Biology, Resistance, Genetic Structure and Control Strategies. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **76**:87-92.
- Pedroncelli A, Puopolo G. 2023. This tree is on fire: a review on the ecology of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight disease. *Journal of Plant Pathology* DOI: 10.1007/s42161-023-01397-y.
- Petkovsek MM, Stampar F, Veberic R. 2009. Seasonal changes in phenolic compounds in the leaves of scab-resistant and susceptible apple cultivars. *Canadian Journal of Plant Science* **89**:745-753.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* **269**:337-341.
- Qaderi MM, Martel AB, Strugnell CA. 2023. Environmental Factors Regulate Plant Secondary Metabolites. *Plants* **12**.
- Ramírez F, Davenport TL. 2013. Apple pollination: A review. *Scientia Horticulturae* **162**:188-203.
- Richard A. 2009. Apple tree named 'Galaval'. The United States Patent and Trademark Office, USA. US PP19909 P3.
- Sandanayaka WRM, Bus VGM, Connolly P, Newcomb R. 2003. Characteristics associated with Woolly Apple Aphid *Eriosoma lanigerum*, resistance of three apple rootstocks. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **109**:63-72.

- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**:144-158.
- Sirgedaitė-Šėžienė V, Laužikė K, Uselis N, Samuolienė G. 2022. Metabolic Response of *Malus domestica* Borkh cv. Rubin Apple to Canopy Training Treatments in Intensive Orchards. *Horticulturae* **8**.
- Sharma S, Chatterjee S, Kataria S, Joshi J, Datta S, Vairale MG, Veer V. 2017. A review on responses of plants to UV-B radiation related stress. *UV-B Radiation: From Environmental Stressor to Regulator of Plant Growth*:75-97. Wiley.
- Shi Y, Ke X, Yang X, Liu Y, Hou X. 2022. Plants response to light stress. *Journal of Genetics and Genomics* **49**:735-747.
- Stoeckli S, Mody K, Dorn S. 2008. *Aphis pomi* (Hemiptera: Aphididae) Population Development, Shoot Characteristics, and Antibiosis Resistance in Different Apple Genotypes. *Journal of Economic Entomology* **101**:1341-1348.
- Strickland DA, Hodge KT, Cox KD. 2021. An Examination of Apple Powdery Mildew and the Biology of *Podosphaera leucotricha* from Past to Present. *Plant Health Progress* **22**:421-432.
- Sun Y, Wang C, Chen HYH, Ruan H. 2020. Response of Plants to Water Stress: A Meta-Analysis. *Frontiers in Plant Science* **11**.
- Szymańska R, Ślesak I, Orzechowska A, Kruk J. 2017. Physiological and biochemical responses to high light and temperature stress in plants. *Environmental and Experimental Botany* **139**:165-177.
- Tagliavini M, Marangoni B. 2002. Major Nutritional Issues in Deciduous Fruit Orchards of Northern Italy. *HortTechnology* **12**:26-31
- Tsanova-Savova S, Ribarova F, Petkov V. 2018. Quercetin content and ratios to total flavonols and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Bulgarian Chemical Communications* **50**:69-73.
- Viljevac Vuletić M, Mihaljević I, Tomaš V, Horvat D, Zdunić Z, Vuković D. 2022. Physiological Response to Short-Term Heat Stress in the Leaves of Traditional and Modern Plum (*Prunus domestica* L.) Cultivars. *Horticulturae* **8**.
- Vincent C, Babendreier D, Świergiel W, Helsen H, Blommers LHM. 2019. A review of the apple sawfly, *hoplocampa testudinea* (Hymenoptera tenthredinidae). *Bulletin of Insectology* **72**:35-54.
- 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.
- Wojdyło A, Oszmiański J. 2020. Antioxidant Activity Modulated by Polyphenol Contents in Apple and Leaves during Fruit Development and Ripening. *Antioxidants* **9**.

WEB

- Jankowski&syn. 2018. Galaval. Jankowski&syn, Gąbin. Available from <http://www.szkolki.com/en/galaval/> (accessed March 2024)
- Jiří Vysloužil. 2015. Rubinola. Jiří Vysloužil. Available from http://jirivyslouzil.cz/databaze_ovoce/rubinola-2/ (accessed March 2024)
- FAO. 2024. FAOSTAT: Production – Apples. FAO, Rome. Available from <http://www.fao.org/faostat> (accessed March 2024)
- ČHMÚ. 2024. Historická data. ČHMÚ. Available from <https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/zakladni-informace> (accessed March 2024)

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Obsah živin v sušině listů jabloně.....	13
Tabulka 2: Termíny odběrů listů dle fenofázi.....	25

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Obecná struktura molekuly flavonoidů.....	21
Obrázek 2: Odrůda 'Rubinola'.....	22
Obrázek 3: Odrůda 'Rubinola'.....	22
Obrázek 4: Odrůda 'Galaval'.....	23
Obrázek 5: Odrůda 'Galaval'.....	23

Seznam grafů:

Graf 1: Vývoj průměrných teplot vzduchu v dekadách za období března-září v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B).....	24
Graf 2: Vývoj úhrnu srážek po dekadách za období března-září v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B).....	24
Graf 3: Vývoj průměrné relativní vlhkosti v dekadách za období dubna-září v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B).....	24
Graf 4: Vývoj průměrného úhrnu doby trvání slunečního svitu v dekadách za období dubna-září v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B).....	25
Graf 5: Obsah malondialdehydu (nmol/g FW) v listech vybraných genotypů jabloní v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B).....	28
Graf 6: Obsah fenolických látek (mg GAE/g FW) v listech vybraných genotypů jabloní v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B).....	30
Graf 7: Obsah fenolických kyselin (mg CAE/g FW) v listech vybraných genotypů jabloní v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B).....	31
Graf 8: Obsah flavonoidů (mg QE/g FW) v listech vybraných genotypů jabloní v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B).....	32
Graf 9: Celková antioxidační kapacita (mg AAE/g FW) v listech vybraných genotypů jabloní v roce 2022 (A) a v roce 2023 (B).....	33

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

MDA – malondyaldehyd

PAC – obsah fenolických kyselin

ROS – reaktivní formy kyslíku

TAC – celková antioxidační kapacita

TFC – celkový obsah flavonoidů

TPC – celkový obsah fenolických látek