

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium markerů dormance u šalotky

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Maroš Krchňák
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tibor Béres, Ph.D.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Touto cestou by som chcel poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce Mgr. Tiborovi Béresovi, Ph.D. a doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za trpezlivosť, ochotu, inšpiráciu a za cenné rady a pripomienky.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Maroš Krchňák
Název práce	Studium markerů dormance u šalotky
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin; Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; pracoviště Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Tibor Béres, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Cibule šalotka (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.) je přirozeně dormantní rostlina významná pro svou chuť, obsahové látky a zdravotní benefity. Během dormance se mění její chemické složení, zvláště vzájemný poměr malých sacharidů a fruktanů vlivem fruktanexohydrolas. V šalotce je přítomna hlavně fruktan-1-exohydrolasa. V této práci byla zkoumána dynamika malých sacharidů, glukosidů kvercetinu a enzymová aktivita fruktan-1-exohydrolasy. Cílem bylo posoudit využití dynamiky obsahových látek a enzymové aktivity jako markerů ukončení dormance a začátku klíčení. Parametry byly sledovány v deseti kultivarech skladovaných při kontrolované teplotě během pěti měsíců. Obsah fruktosy a sacharosy byl stanoven metodou HPLC spojenou s odpařovacím detektorem rozptylu světla. V průběhu skladování měl obsah obou sacharidů mírně rostoucí trend. Šlo však o velmi proměnlivé parametry, závislé od množství faktorů, proto byl obsah sacharidů vyhodnocený jako nevhodný marker konce dormance. Glukosidy kvercetinu byli kvantifikované metodou HPLC s UV detekcí. Dynamika kvercetin-4'-O-glukosidu a kvercetin-3,4'-O-diglukosidu neměla v kultivarech shodný trend. Protože nesouvisí s metabolickými procesy při klíčení, byl obsah glukosidů kvercetinu vyhodnocený jako nevhodný marker. HPLC metoda stanovení aktivity fruktan-1-exohydrolasy byla v důsledku časté kontaminace a nízké spolehlivosti a reprodukovatelnosti vyhodnocená jako nevhodná.

Klíčová slova	šalotka, dormance, fruktany, flavonoidy, malé sacharidy, fruktan-1-exohydrolasa
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Maroš Krchňák
Title	Study of dormancy markers in shallot
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Olomouc
Supervisor	Mgr. Tibor Béres, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

Shallot (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.) is a naturally dormant plant, valued for its flavour, nutrition values and health benefits. Composition of shallot, especially the ratio between fructans and simple carbohydrates, changes during dormancy. This is due to the presence of fructan exohydrolases, primarily fructan 1-exohydrolase. Dynamic changes of simple carbohydrates and quercetin glucosides content, along with enzyme activity of fructan 1-exohydrolase, were the subject of this study. The aim of this study was to determine the applicability of mentioned parameters as dormancy release markers. These parameters were measured in ten cultivars during the storage period of five months in controlled temperature. The content of sucrose and fructose was determined using HPLC coupled with evaporative light scattering detector. The content of both saccharides increased slightly during storage. It was, however, a very variable parameter dependent on many factors, therefore it was rejected as a suitable dormancy marker. Quercetin glucosides were quantified using HPLC with UV detection. Dynamics of quercetin 3,4'-diglucoside and quercetin 4'-glucoside was observed to be variable amongst cultivars. In addition, content of these glucosides is not closely related to metabolic processes during sprouting. It was thus rejected as a suitable dormancy marker as well. Activity of fructan 1-exohydrolase was determined using HPLC. Because of frequent contamination, low reliability and low reproducibility, it was deemed an inappropriate method.

Keywords	shallot, dormancy, fructans, flavonoids, simple carbohydrates, fructan 1-exohydrolase
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Slovak

Obsah

1 ÚVOD	8
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	10
2.1 Rod cesnakovité	10
2.1.1 Cesnak cibul'ový (<i>Allium cepa</i> L.)	10
2.1.1.1 Šalotka (<i>Allium cepa</i> var. <i>Aggregatum</i> L.)	11
2.1.2 Prekurzory chuti	12
2.2 Sacharidy	13
2.2.1 Malé neštruktúrne sacharidy	13
2.2.1.1 Metódy stanovenia malých sacharidov	14
2.2.2 Fruktooligosacharidy a fruktány	14
2.2.2.1 Syntéza fruktánov	15
2.2.2.2 Degradácia fruktánov	17
2.2.2.3 Metódy stanovenia aktivity fruktánexohydroláz	17
2.3 Dormancia	18
2.3.1 Inhibícia klíčenia	18
2.3.2 Indukcia uvoľnenia z dormancie	19
2.3.3 Zmeny v chemickom zložení počas dormancie	19
2.4 Flavonoidy	21
2.4.1 Chemická štruktúra	21
2.4.2 Účinky na ľudský organizmus	22
2.4.3 Biologická aktivita v rastlinách	23
2.4.4 Biosyntéza	24
2.4.5 Metódy stanovenia flavonoidov	26
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	28
3.1 Materiál	28
3.1.1 Chemikálie	28
3.1.2 Prístroje a pomôcky	28
3.1.3 Rastlinný materiál	29
3.2 Metódy	30
3.2.1 Spracovanie rastlinného materiálu	30
3.2.2 Analýza obsahu malých sacharidov	31
3.2.3 Analýza glukozidov kvercetínu	31
3.2.4 Stanovenie enzýmovej aktivity fruktán-1-exohydrolázy	32
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA	34
4.1 Analýza obsahu malých sacharidov	34
4.2 Analýza glukozidov kvercetínu	38
4.3 Stanovenie enzýmovej aktivity fruktán-1-exohydrolázy	42
5 ZÁVER	45
6 LITERATÚRA	46
7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	52

Ciele práce

1. Vypracovanie literárnej rešerše s kľúčovými slovami: šalotka, dormancia, fruktány, flavonoidy, malé sacharidy, fruktán-1-exohydroláza
2. Sledovanie aktivity fruktán-1-exohydrolázy, dynamiky obsahu malých sacharidov a kvercetínu vo vybraných genotypoch šalotky počas skladovania
3. Interpretácia dát, hodnotenie genotypov, hodnotenie markerov

1 ÚVOD

Rod cesnakovité (*Allium*) sa radí k najvýznamnejším a najdlhšie pestovaným hospodárskym jednoklíčnolistovým rastlinám na svete. Známych je viac než 850 druhov rastlín rodu *Allium*. Cesnak cibuľový (*Allium cepa* L.) a jeho menej rozšírený poddruh šalotka (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.) tvoria charakteristické podzemné zásobné orgány – cibule. Cesnak cibuľový tvorí jednu veľkú cibuľu, pre šalotku je typický rast cibúľ v trse. Cibule sa využívajú predovšetkým v gastronómii pre svoju jedinečnú chuť a arómu. Sú im tiež pripisované významné antimikrobiálne, fungicídne, protizápalové a antioxidačné vlastnosti.

Zásobná funkcia cibule je sprostredkovaná fruktánmi, oligo- až polysacharidmi zloženými zo sacharózy a reťazca fruktózových podjednotiek. Predlžovanie reťazca akumuluje fruktózu proti koncentračnému spádu. Fruktóza je pri výstupe z dormancie uvoľnená z fruktánov pomocou fruktánexohydroláz a spotrebovaná na rast klíčka. Okrem zásoby energie slúžia fruktány na kryoprotekciu a osmoreguláciu. Hlavným enzýmom degradácie fruktánov v šalotke je fruktán-1-exohydroláza. Nárast aktivity tohto enzýmu je spojený s ukončením dormancie a začiatkom klíčenia. Sledovaním aktivity by bolo možné odhadnúť trvanlivosť konkrétneho kultivaru šalotky, čo je významným parametrom pre trh a šľachtenie.

Šalotka obsahuje, popri fruktánoch, aj malé neštruktúrne sacharidy, predovšetkým sacharózu a fruktózu. Ich obsah a vzájomný pomer má veľký vplyv na výslednú chuť, trvanlivosť a následné využitie. V šalotkách je prítomné aj významné množstvo fenolických látok. Kvercetín je najviac zastúpeným flavonolom v cesnaku cibuľovom a je zodpovedný za horkú chuť. V rastlinách plní predovšetkým antioxidačnú funkciu. Pre svoje zdravie prospešné vlastnosti a možné aplikácie v medicíne je v súčasnosti významným predmetom výskumu, spolu so zlúčeninami síry, ktoré sú prekurzormi chuti a arómy cibule. Obsah živín a zdravie prospešných látok je dôležitý pri charakterizácii plodín, šľachtení a uvedení na trh. Selekciou vhodných odrôd s požadovanými vlastnosťami pre konkrétne klimatické podmienky je možné znížiť náklady na pestovanie a skladovanie, zvýšiť výnos a odolnosť rastlín a obmedziť používanie postrekov za účelom zvýšenia trvanlivosti.

Dormancia je obdobie zastaveného rastu meristematického pletiva a typicky nízkej metabolickej aktivity. Cibule sú prirodzene dormantné orgány, čo im umožňuje prežiť nepriaznivé podmienky počas zimy a vyklíčiť na jar. Počas dormancie sa mení zloženie

cibule, predovšetkým obsah vody a vzájomný pomer fruktánov a malých sacharidov. Pre urýchlenie výstupu z dormancie sa používa ošetrovanie chladom. Obsah jednotlivých látok je charakteristický pre daný genotyp, výrazný vplyv na ich konečné zastúpenie majú predovšetkým počasie v danom vegetačnom období, podmienky skladovania a spôsob sušenia po zbere. Väčšina výskumu v tejto oblasti sa však týka cesnaku cibulového (*A. cepa* var. *cepa* L.) a nie šalotky (*A. cepa* var. *aggregatum* L.).

Táto práca sa zameriava na sledovanie dynamiky malých sacharidov a kvercetínu vo viacerých kultivaroch šalotky počas skladovania pri kontrolovanej teplote. Hodnotí, ako na túto dynamiku vplýva ošetrovanie chladom. Ďalším cieľom je posúdenie využitia aktivity fruktánexohydroláz ako markerov výstupu z dormancie. Experimenty boli uskutočnené v spolupráci s Genovou bankou Výzkumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i., ktorá sa zaoberá uchovávaním, charakterizáciou a hodnotením morfológických, biologických a hospodárskych znakov genetických zdrojov rastlín.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Rod cesnakovité

Rod cesnakovité (*Allium*) z čeľade amarylkovitých (*Amaryllidaceae*) z radu asparágotvarých (*Asparagales*) patrí s viac ako 850 druhmi k najvýznamnejším hospodárskym jednoklíčnolistovým plodinám. Sú to jedny z najstarších kultivovaných rastlín a majú široké využitie v gastronómii pre ich chuť a nutričné hodnoty (Benkeblia, 2000; Wheeler *et al.*, 2013; Hrabovský *et al.*, 2016). Predmetom skúmania sú ich antimikrobiálne, protizápalové a detoxikačné účinky (Nicastro *et al.*, 2015).

Medzi najčastejšie pestované druhy rodu *Allium* patria cesnak kuchynský (*A. sativum* L.), cesnak cibuľový (*A. cepa* L.), cesnak pórový (*A. ampeloprasum* L.) či cesnak pažitkový (*A. schoenoprasum* L.). Voľne v prírode sa vyskytuje predovšetkým cesnak medvedí (*A. ursinum* L.) a cesnak planý (*A. oleraceum* L.; Friesen *et al.*, 2006).

Typickým znakom rodu *Allium* je prítomnosť podzemných zásobných orgánov, predovšetkým cibúľ a podzemkov. Tie obsahujú fruktány, ako zásobné sacharidy. Semená sú guľaté a čierne v dôsledku prítomnosti fyto melanínu (Brewster, 2008). Chromozómy sú veľké, málo početné (najbežnejší počet je osem) a obsahujú 15290 megapárov báz, vďaka čomu sú ideálne modelové rastliny pre cytogenetické pozorovania (Arumuganathan a Earle, 1991).

Zeleniny rodu *Allium* pre svoju nízku rýchlosť rastu, pomalé klíčenie a úzke vertikálne listy obtiažne kompetujú s burinami. Plytký a málo rozvetvený koreňový systém sťažuje prístup k vode a živinám v pôde. Prítomnosť buriny spôsobí rast cibule aj na mladých rastlinách, čo zastavuje rast listov. Dochádza tak k menšiemu vzrastu nadzemnej aj podzemnej časti rastliny (Shatbold a Holm, 1956).

2.1.1 Cesnak cibuľový (*Allium cepa* L.)

Cesnak cibuľový (zastaralo cibuľa kuchynská) je pestovaný viac než 4700 rokov a nevyskytuje sa v divokej podobe. Domestikovaný bol prvýkrát na Blízkom východe. Druh *A. cepa* zahŕňa dve hlavné skupiny rastlín: cibule (*A. cepa* var. *cepa* L.) a šalotky (*A. cepa* var. *aggregatum*; Fritsch a Friesen, 2002).

Cesnak cibuľový tvorí veľké, samostatné podzemné orgány – cibule. Tradične sa pestuje zo semien a vyznačuje sa veľkou variabilitou v skladovateľnosti, suchej hmotnosti, chuti, farbe a požiadavkách na svetlo a teplotu. Typický obsah suchej hmoty

(dry weight – DW) cibule sa pohybuje medzi 10 až 12% hmotnosti čerstvej hmoty, pri kultivaroch určených na sušenie je DW až 20%. Cibule s DW<10% sú vhodné na konzumáciu bez tepelnej úpravy (O'Donoghue *et al.*, 2004).

Vďaka dlhotrvajúcemu pestovaniu cesnaku cibul'ového a jeho prispôbeniu najrôznejším klimatickým podmienkam a požiadavkám konzumentov, dnes existuje veľká rôznorodosť kultivarov. Najvyššou genetickou diverzitou sa vyznačuje oblasť Strednej Ázie. V ostatných častiach sveta dochádza ku genetickej erózii v dôsledku masového pestovania moderných odrôd, čo môže spôsobiť stratu vzácných a využiteľných génov z populácie. Vznikla teda potreba zbierania, charakterizácie, ukladania a regenerácie kultivarov v génových bankách (Astley *et al.*, 1983).

2.1.1.1 Šalotka (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.)

Cibule šalotky rastú v trsoch, sú úzke a menšieho vzrastu. Listy sú tenké, vyrastajú z každej cibule zvlášť. Na rozdiel od cibule, ktorá má dobre vyvinutú stonku, má šalotka kríkovitý vzhľad. Typicky sa rozmnožujú vegetatívne. Vzájomná krížiteľnosť kvetov šalotky a cibule podporuje zaradenie šalotiek, v minulosti nazývaných *A. ascalonicum*, do rovnakého druhu (Puizina, 2013).

Šalotky, vďaka vegetatívne mu množeniu, rastú rýchlejšie ako cibule, a preto sú odolnejšie voči škodcom a chorobám. Nižšie nároky na podmienky prostredia umožňujú pestovať šalotky aj v chladnom podnebí, napr. vo Fínsku a severných častiach Ruska, a zároveň aj vo vlhkých tropických oblastiach (Currah a Proctor, 1990).

Genetickou modifikáciou *A. cepa* pomocou bakteriálneho vektora *Agrobacterium tumefaciens* boli vypestované rastliny odolné voči herbicídum obsahujúcim glyfosát a glufosinát. Pestovanie týchto transgénnych rastlín, by umožnilo používanie moderných, ľahšie degradovateľných herbicídov v menšom množstve (Eady *et al.*, 2003). Transgénnou modifikáciou šalotiek bola dosiahnutá ich odolnosť voči larvám sivkavca stavokrvového (*Spodoptera exigua*; Zheng *et al.*, 2005).

Najvýznamnejším škodcom je strapka tabaková (*Thrips tabaci*), krídlatý hmyz z radu *Thysanoptera*. Poškodzuje listy a kvety a je vektorom pre vírusy. Medzi ďalších škodcov patrí kvetárka cibul'ová (*Delia antiqua*) a voška cesnaková (*Myzus ascalonius*). Vírus žltej prúžkovitosti cibule, ktorý prenášajú vošky, poškodzuje listy, skracuje dormanciu a spôsobuje veľké straty úrody (Lorbeer *et al.*, 2002).

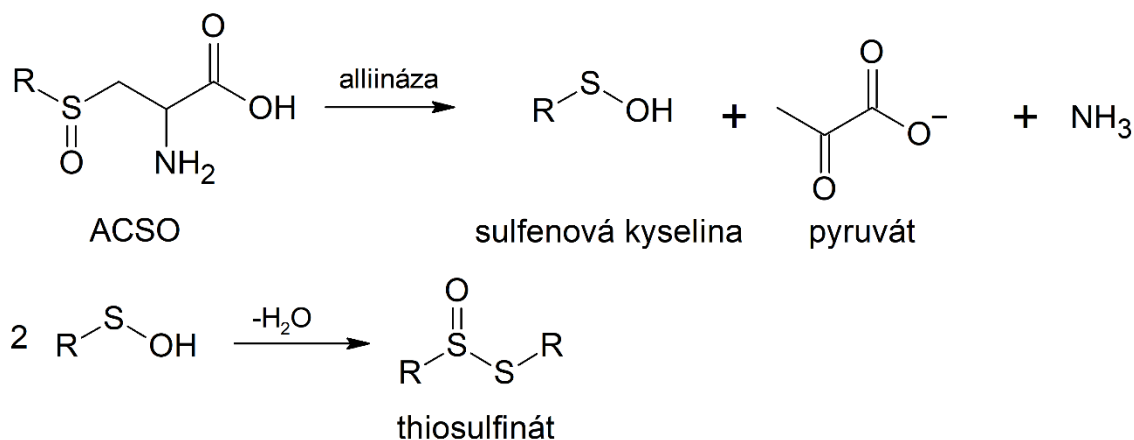
2.1.2 Prekurzory chuti

Cesnak cibul'ový a šalotka sú primárne konzumované pre ich unikátnu chuť a schopnosť zvýrazniť chuť iných potravín. Charakteristickú chuť a arómu tvoria predovšetkým zlúčeniny síry, ktoré sa uvoľňujú z buniek po ich poškodení pri krájaní a varení. V rastlinách plnia fungicídnu a baktericídnu funkciu a odpudzujú byľinožravce, škodcovia ich však využívajú ako signálne molekuly na vyhľadanie hostiteľa (Brewster, 2008).

V rastlinách rodu cesnakovité boli identifikované a izolované štyri hlavné prekurzory chuti, S-alk(en)yl-L-cysteínsulfoxidy (ACSO): *trans*-(+)-S-(1-prop-1-en-1-yl)-1-cysteínsulfoxid (izoalliin), S-allyl-L-cysteínsulfoxid (alliin; nevyskytuje sa v *A. cepa*), (+)-S-propyl-1-cysteínsulfoxid (propiin) a (+)-S-metyl-1-cysteínsulfoxid (methiin). ACSO sú lokalizované v cytoplazme, sú neprchavé, bez chuti a zápachu (Lancaster *et al.*, 2000; Putnik *et al.*, 2019).

Po lýze buniek sú ACSO hydrolyzované alliináza (EC 4.4.1.4), ktorá sa nachádza vo vakuole. Produktmi hydrolyzy sú prchavé a nestabilné sulfenové kyseliny, amoniak a pyruvát (Obr. 1; Block, 1992; Jones *et al.*, 2004).

Vzájomnou kondenzáciou sulfenových kyselín sa tvoria thiosulfináty, zodpovedné za špecifickú chuť a arómu. Nestabilné thiosulfináty vstupujú do kaskády prevažne neenzymatických reakcií, pričom sa tvorí množstvo rôznych organických zlúčenín síry, prevažne thiosulfonátov a mono-, di- a trisulfidov, ktoré ďalej významne vplývajú na výslednú chuť. Činnosť alliinázy, ako aj následné reakcie thiosulfinátov, sú do veľkej miery ovplyvnené podmienkami pri varení či extrakcii (Randle a Lancaster, 2002; Fredotović a Puizina, 2019).



Obr. 1 Premena prekurzorov chuti (upravené a prevzaté z Tocmo *et al.*, 2015)

2.2 Sacharidy

Sacharidy sa delia do troch základných skupín: monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Oligosacharidy sú zložené z dvoch až desiatich sacharidových zvyškov. V prírode sú z oligosacharidov bežné disacharidy (laktóza, sacharóza, maltóza) a trisacharidy (rafinóza). Polysacharidy sú lineárne alebo vetvené polyméry a môžu obsahovať desiatky až tisícky monosacharidových jednotiek, typicky D-glukózu, ale aj D-galaktózu, L-galaktózu, D-manózu a D-xylózu. Monosacharidy sa podľa prítomnosti aldehydovej alebo ketónovej skupiny delia na aldózy a ketózy, Podľa počtu uhlíkov sú rozdeľované na triózy, tetrózy, pentózy, hexózy a heptózy. Aldózy s aspoň tromi atómami uhlíka a ketózy aspoň so štyrmi, obsahujú chirálne centrá. Poloha hydroxylovej skupiny na chirálnom uhlíku, najvzdialenejšom od karbonylovej skupiny, určuje D- alebo L- konfiguráciu sacharidu. V prírode dominujú D-formy sacharidov. Sacharidy tvoria po intramolekulárnych reakciách cyklické hemiacetály, resp. hemiketaly. Podľa polohy hydroxylovej skupiny na asymetrickom, pôvodne karbonylovom, uhlíku sa rozlišujú α - a β -anoméry (Garrett a Grisham, 2012).

2.2.1 Malé neštruktúrne sacharidy

Neštruktúrne sacharidy tvoria viac než 60% suchej hmotnosti cibule. Zahŕňajú predovšetkým glukózu, fruktózu, sacharózu a fruktány (Rutherford a Whittle, 1982). Sacharidy sú počas rastu akumulované v cibuli proti koncentračnému gradientu, vďaka polymerizácii na oligo- a polysacharidy (Darbyshire a Henry, 1981). Obsah sacharidov a ich vzájomný pomer je závislý na genotype. Sacharidy majú v rastlinách rozmanité funkcie. Okrem zdroja a zásoby energie a uhlíku, sa uplatňujú ako signálne molekuly či regulátory metabolických procesov, napr. fotosyntézy, klíčenia a kvitnutia. Zabezpečujú udržiavanie turgoru a ochranu pred suchom a chladom (Sami *et al.*, 2016).

Monosacharidy v rastlinách sú syntetizované v sekundárnej fáze fotosyntézy fixáciou CO₂ v Calvin-Bensonovom, resp. Hatch-Slackovom cykle. Glykolýzou sú glukóza a fruktóza degradované na pyruvát, ATP a NADH (Garrett a Grisham, 2012). Sacharóza vzniká v cytozole kondenzáciou UDP-glukózy a fruktóza-6-fosfátu za katalýzy sacharózafosfátsyntázou (EC 2.4.1.14) a následným odštiepením fosfátu sacharózafosfátosfatázou (EC 3.1.3.24). Sacharóza je najčastejšie degradovaná na fruktózu a glukózu invertázou (EC 3.2.1.26; Winter a Huber, 2000).

Štruktúrne sacharidy sa nachádzajú v bunkovej stene. Sú to najmä celulóza, hemicelulóza a pektíny. Z jednoduchých cukrov je v bunkovej stene prítomná galaktóza (Redgwell a Selvendran, 1986). Škrob sa vyskytuje v obmedzenom množstve v koreňovej špičke a okolo cievnych zväzkov (Ernst a Bufler, 1994).

2.2.1.1 Metódy stanovenia malých sacharidov

Sacharidy sú extrahované z čerstvej alebo lyofilizovanej homogenizovanej rastlinnej hmoty, použitím horúcej vody alebo vodných roztokov etanolu, metanolu či iných organických rozpúšťadiel. Extrakcia môže byť podporená použitím refluxu alebo ultrazvuku. Sacharidy sú najčastejšie analyzované použitím HPLC alebo vysokoúčinnnej aniónovej chromatografie (high performance anion exchange chromatography – HPAEC) v spojení s refraktometrickým detektorom, pulzným amperometrickým detektorom, hmotnostným spektrometrom alebo odparovacím detektorom rozptylu svetla (evaporative light scattering detector – ELSD). Použitie plynovej chromatografie vyžaduje derivatizáciu sacharidov na prchavé zlúčeniny. Medzi ďalšie používané metódy patrí kapilárna elektroforéza s MS či kolorimetrické metódy (Lamari *et al.*, 2003; Downes a Terry, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Revanna *et al.*, 2013; Dvořáčková *et al.*, 2014).

ELSD pracuje na princípe nebulizácie eluentu z chromatografickej kolóny pomocou prúdu vzduchu alebo dusíku. Aerosól ďalej prechádza vyhriatou trubicou, kde je odparená mobilná fáza. Vysušené častice pokračujú v prúde plynu k svetelnému lúču. Rozptyl svetla, závislý na koncentrácii a veľkosti častíc analytu, je detegovaný fotonásobičom alebo fotodiódou (Mourey a Oppenheimer, 1984; Dvořáčková *et al.*, 2014).

2.2.2 Fruktooligosacharidy a fruktány

Fruktány sú vo vode rozpustné lineárne alebo rozvetvené polyméry fruktózy. Vyskytujú sa v približne 15% kvitnúcich rastlín. Rastliny rodu *Allium* väčšinou obsahujú fruktány s jednou sacharózovou jednotkou. Počet fruktózových jednotiek v molekule fruktánu udáva jeho stupeň polymerizácie (degree of polymerization – DP). V cesnaku cibul'ovom sú prítomné fruktány do DP 20, väčšinu celkových fruktánov tvoria fruktooligosacharidy s nižším DP, predovšetkým zo série inulínu a neoínulínu. Ako fruktooligosacharidy sa obvykle označujú fruktány s DP < 12. Šalotky najčastejšie obsahujú fruktány s DP 8-14 (Ernst *et al.*, 1998; Benkeblia, 2013). Cibule určené na konzumáciu bez tepelnej úpravy

obsahujú <4% DW (w/w) fruktánov, zatiaľ čo šalotky a odrody určené na sušenie obsahujú >65% DW (w/w) fruktánov, typicky s vyšším DP (Yaguchi *et al.*, 2008).

Fruktány sa okrem DP líšia aj polohou fruktózových jednotiek, vetvením a typom väzby. Delia sa na základných päť skupín: inulín, leván, neoinulín, neoleván a vetvený graminan. Inulín pozostáva z lineárneho reťazca β -D-(2,1)-fruktozylových jednotiek. Vyskytuje sa predovšetkým v rastlinách radu astrotvarých, napríklad v čakanke obyčajnej (*Cichorium intybus* L.). Leván je tvorený lineárnym reťazcom β -D-(2,6)-fruktozylovými jednotkami a nachádza sa v trávach. Rastliny z čeľade cesnakovité a radu asparágotvaré obsahujú neoinulín s β -D-(2,1)-fruktozylovými lineárnymi reťazcami na C1 a C6 uhlíku glukózy. Neoleván sa vyskytuje u lipnicotvarých, napríklad u ovsu siateho (*Avena sativa* L.; Vijn a Smeekens, 1999; Cimini *et al.*, 2015).

Fruktány plnia funkciu zásobných sacharidov a majú významný vplyv na osmoreguláciu a kryoprotekciu. Syntéza a mobilizácia fruktánov je menej náchylná na nízke teploty než škrob. Akumulácia fruktánov v zásobných orgánoch a ich vyššia rozpustnosť vo vode oproti škrobu umožňuje zvýšenú odolnosť voči suchu a chladu. Po hydrolyze na fruktózu a sacharózu v dužinatých listoch cibule, sú transportované do podcibulia, kde sú spotrebúvané na rast klíčka (Brewster, 2008; Muir *et al.*, 2007).

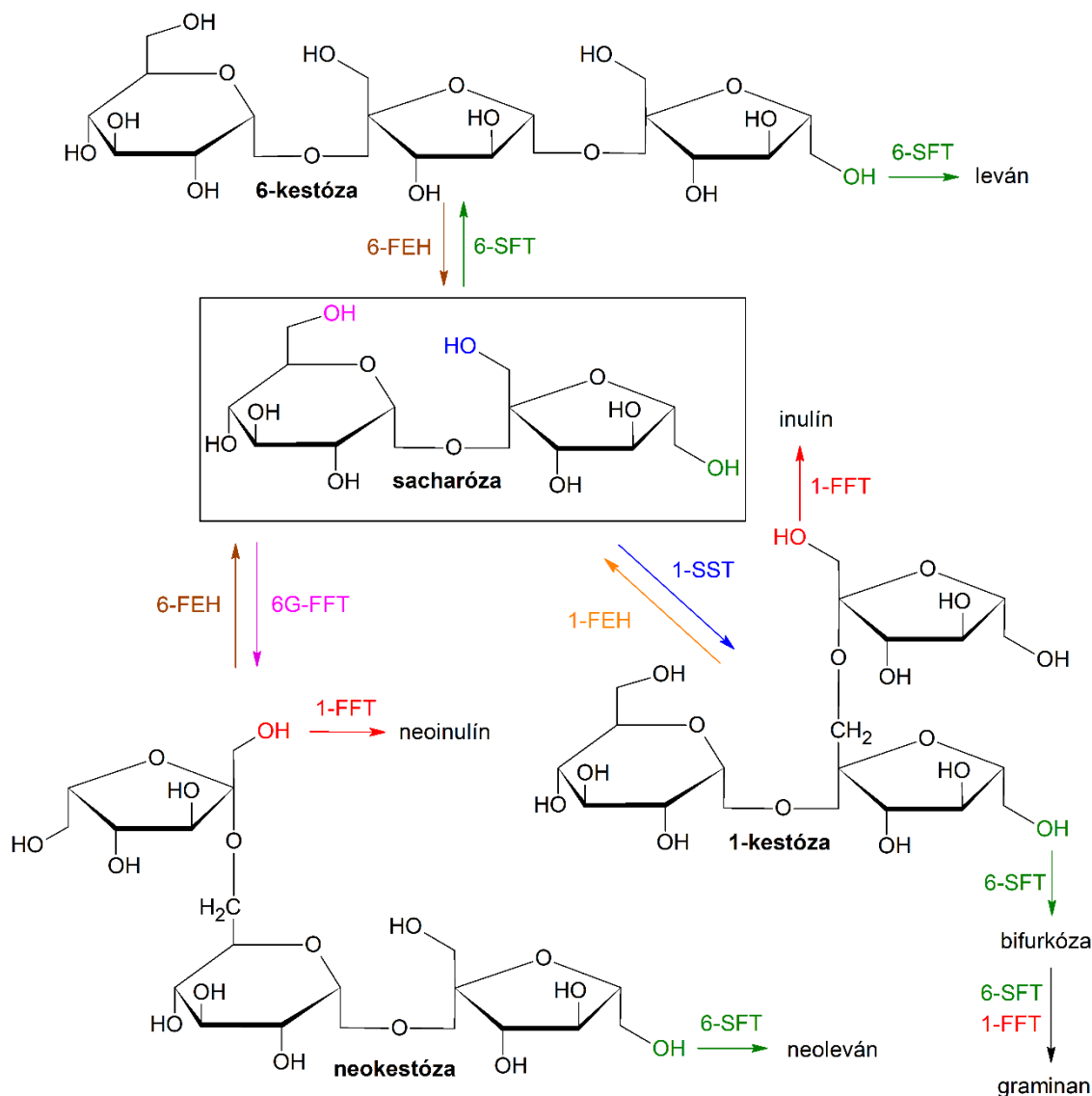
Sladká chuť fruktánov sa s rastúcim DP znižuje. Schopnosť viazať vodu a tvoriť gély sa zvyšuje s rastúcim DP. Fruktány sú odolné voči hydrolytickým enzýmom v ľudskom tráviacom trakte, čo spôsobuje ich nízku energetickú hodnotu a umožňuje bezpečnú konzumáciu u diabetikov. Znižujú hladinu sérového cholesterolu a priaznivo vplyvajú na bifidobaktérie, pre ktoré sú bohatým zdrojom uhlíku. Krátke mastné kyseliny, ktoré vznikajú po fermentácii fruktánov v hrubom čreve, podporujú metabolizmus lipidov. Fruktány s vysokým DP sa používajú ako náhrada tukov (Yun, 1996; Vijn a Smeekens, 1999; Eady, 2002).

2.2.2.1 Syntéza fruktánov

Syntéza fruktánov prebieha vo vakuole a začína tvorbou troch základných trisacharidov: 1-kestózy, 6-kestózy a neokestózy (Obr. 2). Na jednu z troch primárnych hydroxylových skupín sacharózy je pripojená pomocou príslušného enzýmu fruktózová podjednotka, získaná z druhej molekuly sacharózy. Enzým sacharóza:sacharóza-1-fruktozyltransferáza (1-SST, EC 2.4.1.99), katalyzuje tvorbu 1-kestózy (Obr. 2). Predĺžovanie reťazca β -(2,1)-fruktozylovými podjednotkami a vznik lineárneho inulínu, umožňuje

fruktán:fruktán-1-fruktozyltransferáza (1-FFT, EC 2.4.1.100) (Obr. 2; Shiomi, 1989; Van den Ende *et al.*, 1996; Van Laere a Van den Ende, 2002).

Pôsobením sacharóza:fruktán-6-fruktozyltransferázy (6-SFT, EC 2.4.1.10) na 1-kestózu vzniká vetvená bifurkóza, ktorá je ďalej predlžovaná pomocou 1-FFT a 6-SFT za vzniku graminanu. 6-SFT navyše katalyzuje aj vznik 6-kestózy zo sacharózy a následne predlžovaním reťazca aj tvorbu lineárneho fruktánu levánu (Obr. 2). Neosérie fruktánov sú syntetizované z neokestózy, ktorá vzniká v dvojkrokovej syntéze. 1-kestóza syntetizovaná pomocou 1-SST vstupuje do reakcie ako donor fruktózy pre sacharózu. Účinkom fruktán:fruktán-6G-fruktozyltransferázy (6G-FFT, EC 2.4.1.243) vzniká neokestóza (Obr. 2). Jej elongáciou vplyvom 1-FFT alebo 6-SFT sa tvorí neoinulín resp. neoleván (Van den Ende *et al.*, 2004; Cimini *et al.*, 2015).



Obr. 2 Biosyntéza a degradácia fruktánov (prevzaté a upravené z Ende *et al.*, 2004)

2.2.2.2 Degradácia fruktánov

Fruktán endohydrolázy štiepia reťazec fruktózových jednotiek fruktánov na náhodnom mieste, zatiaľ čo fruktán exohydrolázy degradujú fruktány hydrolýzou koncovej fruktózy. V rastlinách doposiaľ neboli objavené endohydrolázy. Baktérie a bunky húb obsahujú obe skupiny enzýmov (Van Damme a Derycke, 1983).

Do skupiny fruktánexohydroláz sa zaraďujú štyri enzýmy, líšiac sa typom väzby, ktorú hydrolyzujú. Fruktán-1-exohydroláza (1-FEH, EC 3.2.1.153) hydrolyzuje terminálne β -(2,1)-fruktozylové väzby fruktánov typu inulinu a graminanu (Obr. 2; Ueno *et al.*, 2015). 1-FEH bola identifikovaná v troch izoformách: 1-FEH I, 1-FEH IIa a 1-FEH IIb (Van den Ende *et al.*, 2000, 2001, 2003).

Terminálne β -2,6 fruktozylové väzby v levánových a graminanových fruktánoch hydrolyzuje fruktán-6-exohydroláza (6-FEH, EC 3.2.1.154) (Obr. 2; Van Riet *et al.*, 2006). V pšenici siatej (*Triticum aestivum* L.) bol detegovaný enzým 6&1-FEH, hydrolyzujúci oba typy väzieb vo fruktánoch s nízkym DP, preferenčne však hydrolyzuje β -2,6 fruktozylové väzby (Kawakami *et al.*, 2005). 6-kestóza-exohydroláza (6-KEH) v pšenici metabolizuje 6-kestózu (Van den Ende *et al.*, 2005).

2.2.2.3 Metódy stanovenia aktivity fruktánexohydroláz

Proteínové extrakty v acetátovom alebo citrát-fosfátovom pufre sa získavajú z čerstvého alebo zmrazeného homogenizovaného materiálu. Po extrakcii obvykle nasleduje filtrácia, oddelenie pevného podielu centrifugovaním a prípadné ďalšie purifikačné kroky, ako dialýza alebo ultrafiltrácia. Po inkubácii v nadbytku substrátu sa stanovuje množstvo uvoľnenej fruktózy alebo glukózy. Medzi najpoužívanejšie metódy patrí HPAEC-PAD alebo iné HPLC metódy. Zo spektrofotometrických metód sa využíva neokuproinová metóda a metóda 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny. Enzymatická metóda stanovenia fruktózy je založená na fosforylácii fruktózy, premene fruktóza-6-fosfátu na glukóza-6-fosfát a jeho oxidácii na glukonát-6-fosfát za účasti NADP⁺. NADPH, ktorý v reakcii vznikol, sa stanovuje meraním zmeny absorbancie roztoku pri 340 nm (Benkeblia *et al.*, 2005; Krivorotova a Sereikaite, 2014; Gasperl *et al.*, 2015; Jammer *et al.*, 2015).

2.3 Dormancia

Cibule rastlín rodu *Allium* sú prirodzene dormantné orgány, umožňujúce rastline prežiť obdobia nepriaznivé pre rast, predovšetkým zimné mrazy (Brewster, 2008). Dormancia je definovaná ako dočasné zastavenie viditeľného rastu meristemického pletiva (Benkeblia, 2003). Cibule v dormancii sa vyznačujú nízkou úrovňou respirácie v porovnaní s ostatnými zeleninami. Počas klíčenia alebo po poranení cibule, sa úroveň respirácie prudko zvyšuje (Robinson *et al.*, 1975).

Strata vody je dôležitým faktorom vplyvujúcim na skladovateľnosť a kvalitu cibule. Väčšina vody sa vyparuje cez suchú povrchovú vrstvu cibule, preto je dôležité zamedziť jej poškodeniu. Vyrovnanie tlaku vodnej pary vo vnútri cibule a v okolitom vzduchu výrazne obmedzuje stratu vody. Optimálna relatívna vlhkosť pri skladovaní je 65-75% (Petropulos *et al.*, 2016).

Výrazný vplyv na trvanlivosť cibule má proces sušenia priamo po zbere, ktorý spôsobuje spevnenie vonkajšej suchej vrstvy a zabraňuje vzniku prasklín. Najčastejšie sa využíva sušenie priamo na poli alebo umelo, prúdom vzduchu. Spolu s metódou sušenia majú vplyv na výslednú kvalitu cibule aj podmienky pestovania, zaobchádzanie s rastlinami pri zbere či teplota a relatívna vlhkosť pri sušení (Nabi *et al.*, 2013).

2.3.1 Inhibícia klíčenia

Koniec dormancie a klíčenie cibúľ je hlavnou príčinou zhoršenia kvality a skrátenia doby trvanlivosti. Na zastavenie klíčenia sa používa niekoľko postupov. Postrek listov hydrazidom kyseliny maleínovej znižuje obsah cytokinínov v cibuli, inhibuje metabolizmus nukleových kyselín a bunkové delenie. Dochádza tiež k výraznému obmedzeniu respirácie na konci dormancie, v porovnaní s rastlinami bez postreku (Ward a Tucker, 1976; Rutherford a Whittle, 1982). Ožiarenie čerstvých cibúľ γ žiarením výrazne obmedzuje respiráciu počas dormancie, dochádza k jej kontinuálnemu poklesu počas celej doby skladovania. Táto metóda významne predlžuje dobu skladovateľnosti bez nutnosti použitia chemických inhibítorov (Benkeblia *et al.*, 2000).

Teplota pri skladovaní je určujúci faktor trvanlivosti cibule. Optimálna teplota pre klíčenie je v rozmedzí od 10°C do 20°C, v závislosti od odrody. Skladovanie pri 5°C a pri 30°C spomaľuje proces klíčenia a obmedzuje respiráciu (Miedema, 1994a; Yoo *et al.*, 1997). V praxi sa využíva skladovanie pri teplote 0°C a relatívnej vlhkosti 75-85%. V subtropických a tropických krajinách sa cibule skladujú pri teplotách

okolo 30°C a nižšej relatívnej vlhkosti. Na oddialenie klíčenia sa používa aj skladovanie v atmosfére s nízkou koncentráciou kyslíka (1% v/v) alebo za prítomnosti etylénu (0,01% v/v; Brewster, 2008).

2.3.2 Indukcia uvoľnenia z dormancie

Vonkajšia, suchá vrstva cibule zabraňuje difúzii plynov. Nedostatok kyslíka inhibuje klíčenie (Masarovičová a Repčák, 2002). Po odstránení suchej vrstvy dochádza k zrýchleniu respirácie a k stratám vody. Cibule bez tejto vrstvy klíčia rýchlejšie, než cibule so zachovanou a nepoškodenou suchou vrstvou (Tanaka *et al.*, 1985).

Klíčenie môže byť stimulované aplikáciou cytokinínov pri teplote 25-30°C, kedy je ich endogénny obsah nižší v porovnaní s cibulami skladovanými pri nižších teplotách (Miedema, 1994b).

Cytokiníny produkované v koreňoch urýchľujú klíčenie. Tvorba koreňov je závislá na teplote a vlhkosti. Skladovaním pri 10°C na vlhkom substráte je možné docieľiť 50% rast koreňov v priebehu 8 až 63 dní, v závislosti na odrode. Pri 30°C dochádza k spomaleniu tvorby koreňov. Odstránenie koreňa inhibuje klíčenie (Miedema, 1994b, c).

Ošetrovanie chladom je metóda simulujúca prirodzené podmienky, ktoré sú nevyhnutné pre ukončenie dormancie. Využíva sa perióda (7-14 dní) pôsobenia chladu (0-10°C), po ktorej vzrastá schopnosť vyklíčiť (Masarovičová a Repčák, 2002). Premiestnenie cibúl, skladovaných pri 0-5°C, do 25°C urýchľuje uvoľnenie z dormancie (Tanaka *et al.*, 1985).

Uvoľnenie z dormancie je sprevádzané výrazným vzrastom obsahu glukózy, fruktózy a sacharózy v cibuliach, ako aj zrýchlením respirácie a vyšším obsahom fenolických látok. Po ošetrovaní chladom počas 1 týždňa došlo k výraznému urýchleniu klíčenia (Benkeblia, 2003).

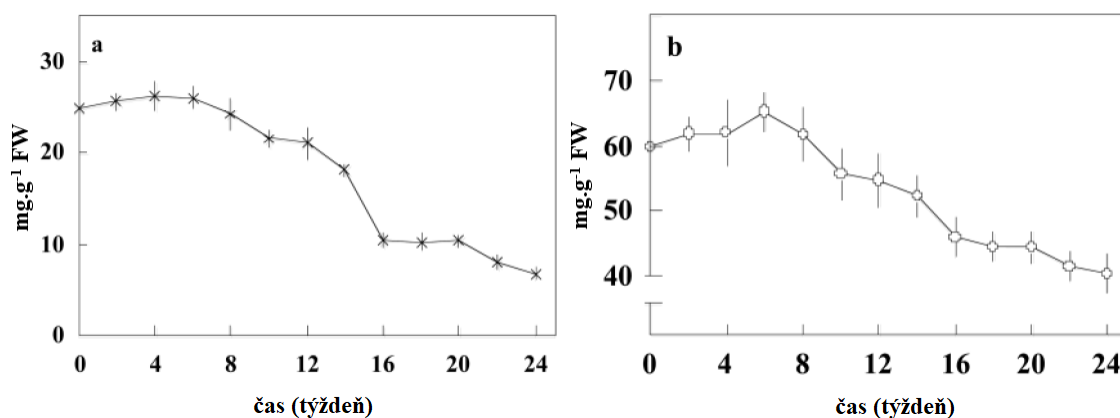
2.3.3 Zmeny v chemickom zložení počas dormancie

Sharma a Lee (2016) sledovali v uskladnenom cesnaku cibulovom stratu hmotnosti, zmeny peroxidázovej aktivity a suchej hmotnosti, dynamiku malých sacharidov, kyseliny pyrohroznovej a kvercetínu a jeho glukozidov. Počas obdobia 9 mesiacov pozorovali fluktuáciu obsahu kvercetínu a jeho glukozidov bez výrazného rastúceho či klesajúceho trendu. Suchú hmotnosť vyhodnotili ako relatívne stálu, strata celkovej hmotnosti bola výrazná už po 4 mesiacoch skladovania. Koncentrácia malých sacharidov mala rastúci trend počas obdobia dormancie, po začatí klíčenia a zvýšení respirácie ich koncentrácia

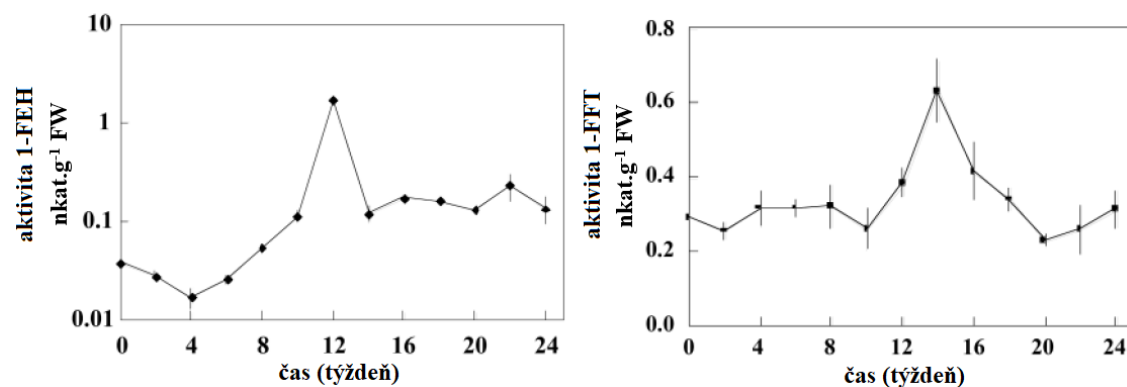
klesala. Obsah kyseliny pyrohroznovej, spojenej s ostrosťou cibule, narastal po dobu 7 mesiacov. Peroxidázová aktivita rástla počas 5 mesiacov, následne sa ustálila a pozorované boli len mierne fluktuácie.

Benkeblia *et al.* (2005) monitorovali viaceré parametre v cesnaku cibuľovom, uskladnenom pri 15°C a 45% relatívnej vlhkosti. Od 8. týždňa od uskladnenia pozorovali nárast a následné ustálenie koncentrácie fruktózy. Zároveň zaznamenali od tohto obdobia výrazný pokles obsahu sacharózy a 1-kestózy. Od 6. týždňa mal obsah celkových sacharidov a fruktooligosacharidov klesajúci trend (Obr. 3). Aktivita 1-FEH prudko vzrástla v 12. týždni od uskladnenia. Aktivita 1-FFT vzrástla po 14 týždňoch skladovania (Obr. 4).

Chope *et al.* (2006) pozorovali exponenciálny pokles obsahu kyseliny abscisovej (ABA) na začiatku dormancie, vplyvom enzymatického rozkladu. Pri začiatku klíčenia obsah ABA vzrástol v dôsledku *de novo* biosyntézy v klíčku. Obsah ABA v čerstvej cibuli po zbere môže vplývať na skladovateľnosť a trvanlivosť.



Obr. 3 Zmena obsahu fruktooligosacharidov (a) a celkových sacharidov (b) počas skladovania (prevzaté a upravené z Benkeblia *et al.*, 2005)



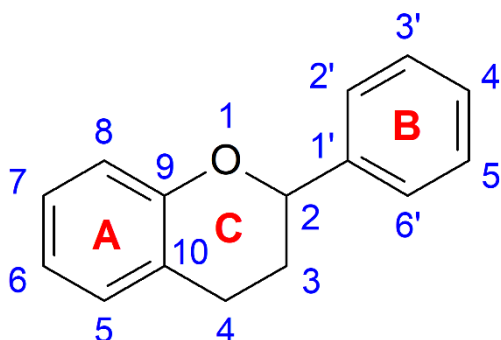
Obr. 4 Zmena aktivity 1-FEH a 1-FFT počas skladovania (prevzaté a upravené z Benkeblia *et al.*, 2005)

2.4 Flavonoidy

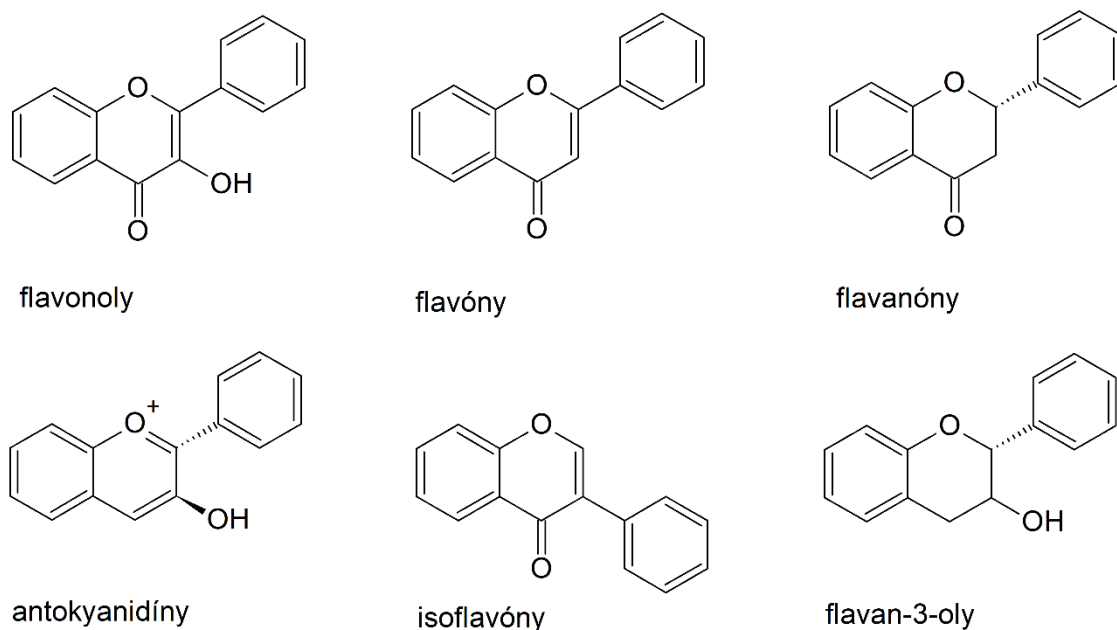
Flavonoidy sú fenolické látky, ktorých základný skelet je zložený z dvoch aromatických jadier (značené A a B), prepojených trojuhlíkovým heterocyklickým pyránovým kruhom (značený C; Obr. 5). Sú najpočetnejšou skupinou fenolov, vyskytujú sa vo všetkých častiach rastlín, predovšetkým však v bunkách s fotosyntetickou aktivitou. V rastlinách bolo identifikovaných viac než 6000 rôznych flavonoidov. Vysokým obsahom flavonoidov a iných fenolov sa vyznačuje ovocie, zelenina, čaj, káva, kakao, pivo a víno, kde sa vo veľkej miere podieľajú na tvorbe chuti (Crozier *et al.*, 2009).

2.4.1 Chemická štruktúra

Flavonoidy sa na základe štruktúry delia do viacerých podskupín, líšiacich sa substitúciou C kruhu a jeho stupňom oxidácie. Tieto podskupiny sú: flavóny, flavanoly, flavonoly, flavanóny, antokyanidíny, izoflavóny, dihydroflavonoly a i. (Obr. 6). Flavonoidy, ktorých B kruh je naviazaný na uhlíku 3 kruhu C, sa nazývajú izoflavonoidy. Pri väzbe na uhlík 4 ide o neoflavonoidy. Najčastejšia substitúcia na uhlíkovom skelete býva hydroxylácia na uhlíkoch 3, 5, 7, 3', 4' a 5'. Zriedkavejšie sa vyskytuje metylová a metoxylová skupina, aromatické či alifatické kyseliny, sulfát, prenyl alebo izoprenyl. Väčšina flavonoidov tvorí O-glykozidy na uhlíkoch 3 alebo 7, predovšetkým s glukózou, galaktózou, arabinózou, rhamnózou a xylózou. Málokedy sa vyskytujú vo forme aglykónu (bez sacharidového zvyšku). Sacharidové a hydroxylové substituenty zvyšujú rozpustnosť flavonoidov vo vode, zatiaľ čo ostatné, menej rozšírené skupiny, napr. metylové a izopentylové, zvyšujú lipofilitu (Iwashina, 2000; Kumar a Pandey, 2013; Panche *et al.*, 2016).



Obr. 5 Základná štruktúra flavonoidov



Obr. 6 Základné štruktúry najvýznamnejších tried flavonoidov (Kumar a Pandey, 2013)

2.4.2 Účinky na ľudský organizmus

Väčšina flavonoidov sa vstrebáva v tenkom čreve vo forme aglykónu. O- β -D-glykozidy flavonoidov sú rozkladané na aglykóny a sacharidy na povrchu mikrovlnok tenkého čreva enzýmom laktáza-florizinhydroláza (LPH, EC 3.2.1.108 a EC 3.2.1.62). LPH, napriek širokej substrátovej špecifite, nerozkladá napr. rutín a naringinín, ich aglykóny sa uvoľňujú až činnosťou mikroorganizmov v hrubom čreve (Day *et al.*, 2000).

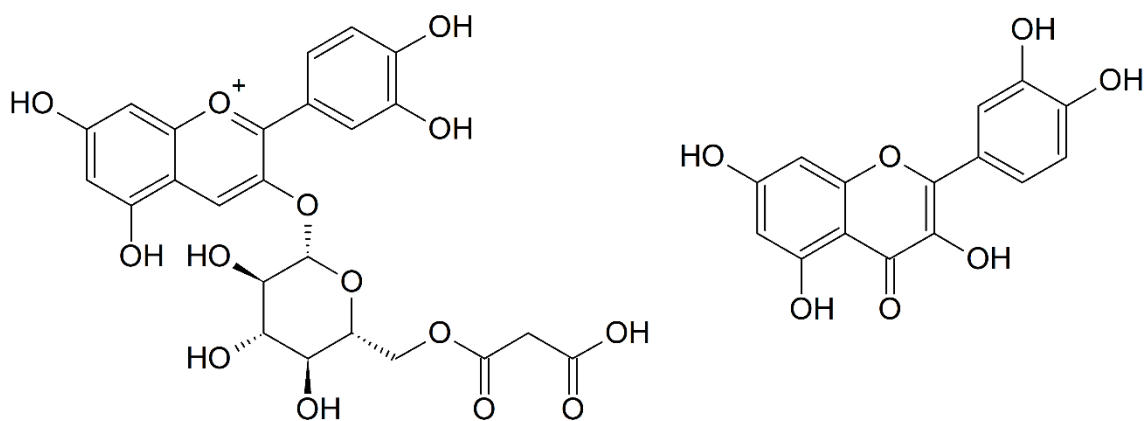
Zďaleka najvýznamnejšími sú antioxidantné vlastnosti flavonoidov. Inhibujú enzýmy tvorby reaktívnych foriem kyslíka (reactive oxygen species – ROS) a odstraňujú ROS, za vzniku relatívne stabilného radikálu príslušného flavonoidu, predovšetkým vďaka prítomnosti hydroxylových skupín (Cao *et al.*, 1996). Schopnosť chelatovať ióny železa, medi a iných kovov prispieva k zníženiu tvorby ROS (Brown *et al.*, 1998). Celkovú antioxidantnú aktivitu ovplyvňuje typ, počet a rozmiestnenie substituentov. Aglykóny vykazujú vyššiu antioxidantnú aktivitu ako glykozidy flavonoidov (Ratty a Das, 1988). Flavonoidy ďalej vykazujú významnú antivírusovú a antibakteriálnu aktivitu, čo úzko súvisí s ich funkciou v rastlinách, kde sa mnohé syntetizujú ako odpoveď na infekciu (Cushnie a Lamb, 2005). Konzumácia cibule, ako excelentného zdroja kvercetínu, je spojená s nižším výskytom rakoviny pľúc, prostaty, žalúdka, hrubého čreva a prs (Block *et al.*, 1992).

2.4.3 Biologická aktivita v rastlinách

Flavonoidy majú v rastlinách schopnosť do istej miery pohlcovať škodlivé UV-B žiarenie o vlnových dĺžkach 280-315 nm, ktoré je spojené so zvýšenou tvorbou ROS. Pôsobenie tohto žiarenia indukuje zvýšenú syntézu flavonoidov a ich akumuláciu v mezofyle (Schmitz-Hoerner a Weissenbock, 2003). Flavonoidy zohrali významnú úlohu pri prechode rastlín z morí na súš (Bonafante a Genre, 2008). Väčšina flavonoidov má absorpčné maximum okolo hodnoty 350 nm, čo odpovedá UV-A žiareniu. Akumulácia flavonoidov s antioxidantnou aktivitou prebieha nezávisle na prítomnosti UV-B žiarenia. Predpokladá sa, že ochrana pred UV-B žiarením je založená najmä na vysokej antioxidantnej aktivite flavonoidov a na eliminácii ROS, ktoré vznikli po pôsobení UV-B žiarenia na bunky, než na samotnej prevencii vzniku ROS (Agati a Tattini, 2010; Giovanni *et al.*, 2013).

Flavonoidy v peli sú zodpovedné za žltú farbu a zohrávajú dôležitú úlohu pri klíčení peľových zŕn a rozmnožovaní rastlín. Ich obsah sa typicky pohybuje medzi 2-4% DW (Zerback *et al.*, 1989). Ďalej flavonoidy inhibujú polárny transport auxínov (Kuhn *et al.*, 2011) a podieľajú sa na odpudzovaní byľinožravcov a škodcov, lákaní opel'ovačov, ochrane pred infekciami či tvorbe hľuziek u bôbových rastlín (Havsteen, 2002). Antokyány pelargonidín, kyanidín a delfinidín sú významné pigmenty vyšších rastlín. Ich modifikácie, vzájomný pomer, tvorba komplexov s kovovými iónmi, prítomnosť ďalších pigmentov a pH vo vakuole, sú určujúcimi faktormi výslednej farby kvetov a plodov (Bridle *et al.*, 1984; Yu a McGonigle, 2005; Falcone Ferrerya *et al.*, 2012).

Najviac zastúpeným flavonolom v cesnaku cibuľovom je kvercetín (Obr. 7; Q), resp. jeho glykozidy. Najčastejšie sa ako sacharidový substituent na kvercetíne vyskytuje glukóza. Cesnak cibuľový, predovšetkým žlté a červené odrody, sa vyznačuje niekoľkonásobne vyšším obsahom kvercetínu, v porovnaní s ostatnými zeleninami (Hertog *et al.*, 1992). Obsah kvercetínu ostáva vysoký aj po tepelnej úprave. V čerstvých cibuliach sa takmer všetok kvercetín vyskytuje vo forme kvercetín-4-glukozidu (QMG) a kvercetín-3,4-diglukozidu (QDG). Obsah kvercetínu rastie od stredu cibule k povrchovým vrstvám. Vonkajšie vrstvy, predovšetkým suchá povrchová, obsahujú aj významné množstvo voľného kvercetínu. Žlté odrody majú o cca 50% nižší obsah celkového kvercetínu oproti odrodám červeným. Biele odrody sa vyznačujú nízkymi hladinami kvercetínu (Patil a Pike, 1995; Hirota *et al.*, 1998).

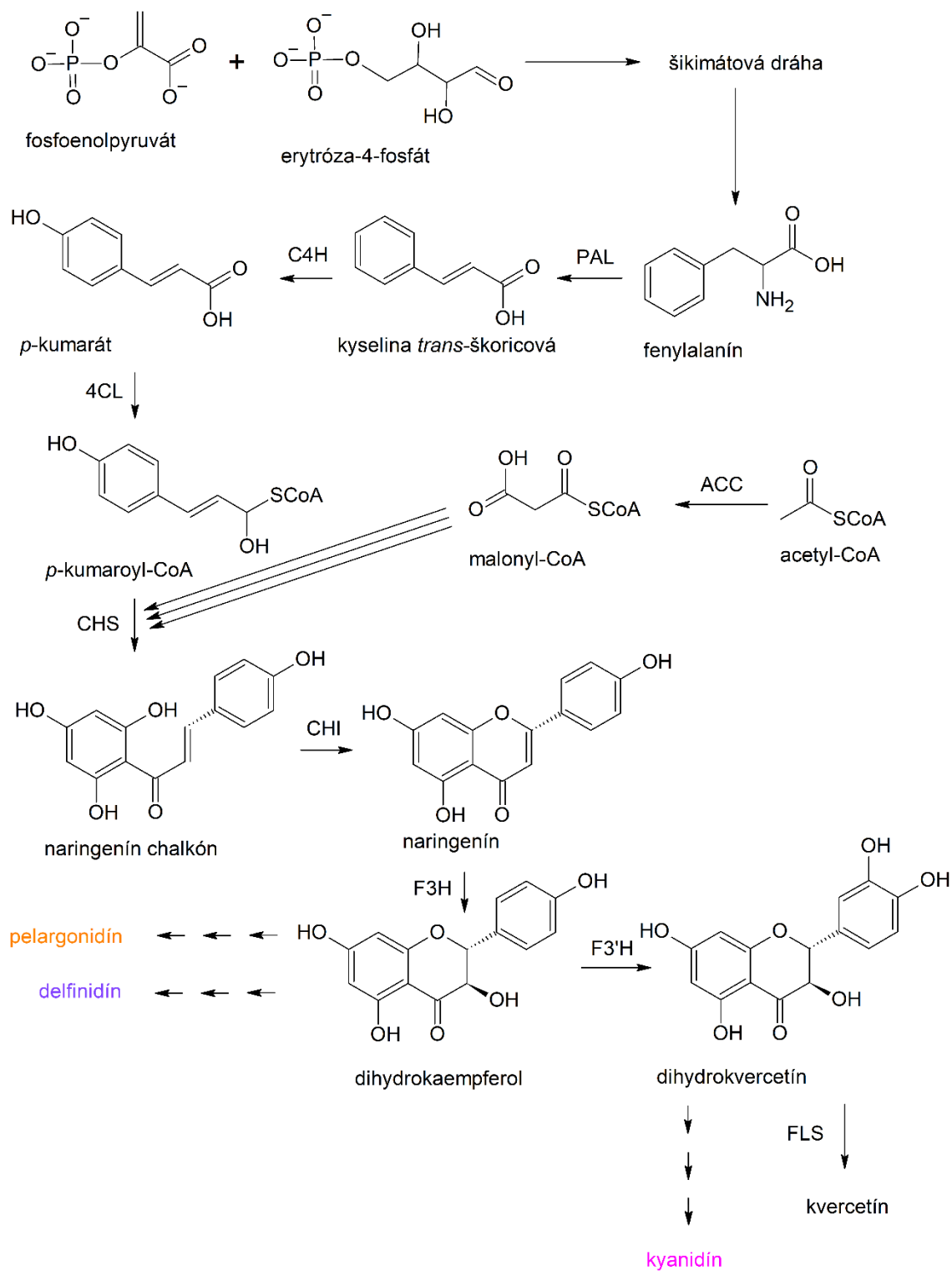


Obr. 7 Štruktúra kyanidín-3-(6'-malonylglukozidu) (vľavo) a aglykónu kvercetínu (vpravo)

Z antokyánov v šalotke a červených odrodách cibule dominuje kyanidín-3-(6'-malonylglukozid) (Obr. 7), kyanidín-3-glukozid a kyanidín-3-(3'-glukozyglukozid) (Ferrerres *et al.*, 1996; Fossen *et al.*, 1996).

2.4.4 Biosyntéza

Biosyntéza flavonoidov je napojená na niekoľko metabolických dráh, predovšetkým na glykolýzu, pentózafosfátový cyklus, šikimátovú dráhu, fenylypropanoidovú dráhu a citrátový cyklus. Šikimátová dráha, ako hlavný zdroj fenylyalanínu, začína kondenzáciou fosfoenolpyruvátu s erytrózou-4-fosfátom za vzniku 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátu (DAHP) a anorganického fosfátu za katalýzy DAHP-syntázou (EC 4.1.2.15). Uzavretie kruhu, dehydratácia a redukcia cez medziprodukty 3-dehydrochinát a 3-dehydrošikimát za prítomnosti enzýmov 3-dehydrochinátsyntázy (EC 4.2.3.4), 3-dehydrochinátdehydratázy (EC 4.2.1.10) a šikimát-5-dehydrogenázy (EC 1.1.1.25) vedú k tvorbe kyseliny šikimovej. Tá je následne fosforylovaná na šikimát-3-fosfát šikimátkinázou (EC 2.7.1.71). Fosforylovaná forma je substrátom pre 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát (EPSP) syntázu (EC 2.5.1.19), cieľový enzým herbicídu glyfosátu. Z EPSP, pôsobením chorizmátsyntázy (EC 4.2.3.5), vzniká kyselina chorizmová. Biosyntéza fenylyalanínu, ako prekurzoru flavonoidov, pokračuje premenou kyseliny chorizmovej na preferenát, pôsobením chorizmátmutázy (EC 5.4.99.5). Preferenátaminotransferáza (EC 2.6.1.79) katalyzuje transaminačnú reakciu, ktorej produktom je arogenát. Jeho dehydratáciou, za prítomnosti arogenátdehydratázy (EC 4.2.1.91), vzniká fenylyalanín (Obr. 8; Herrmann a Weaver, 1999; Tzin a Galili, 2010).



Obr. 8 Biosyntéza flavonoidov

Fenylalanín zo šikimátovej dráhy vstupuje do dráhy fenylypropanoidovej. Deamináciu fenylalanínu na kyselinu *trans*-škoricovú katalyzuje fenylalanínamoniaklyáza (PAL; EC 4.3.1.24). Cytochróm P450 dependentná monooxygenáza cinnamát-4-hydroxyláza (C4H; EC 1.14.13.11) katalyzuje vznik *p*-kumarátu. Pre ďalšie reakcie musí byť

p-kumarát aktivovaný konverziou na CoA thioester *p*-kumaroyl-CoA-ligázou (4CL; EC 6.2.1.12) za spotreby ATP (Obr. 8; Vogt, 2010; Fraser a Chapple, 2011).

Ireverzibilnou karboxyláciou acetyl-CoA biotinylovaným enzýmom acetyl-CoA-karboxylázou (ACC; EC 6.4.1.2) sa tvorí malonyl-CoA. Biosyntéza flavonoidov pokračuje kondenzáciou troch molekúl malonyl-CoA s jednou molekulou *p*-kumaroyl-CoA, za katalýzy chalkónsyntázou (CHS; EC 2.3.1.74). Uvoľňuje sa CO₂ a po spontánnej cyklizácii sa tvorí naringenín chalkón. Stereošpecifická cyklizácia naringenín chalkónu na (2S)-naringenín je katalyzovaná chalkónizomerázou (CHI; EC 5.5.1.6). Naringenín tvorí základ pre syntézu flavonoidov. Flavanón-3-dioxygenáza (F3H; EC 1.14.11.9) katalyzuje oxygenáciu naringenínu na dihydrokaempferol. Následnou hydroxyláciou na uhlíku 3' enzýmom flavonoid-3'-monoxygenáza (F3'H; EC 1.14.14.82) vzniká dihydrokvercetín, z ktorého následne v prítomnosti flavonolsyntázy (FLS; EC 1.14.11.9) vzniká kvercetín. Z dihydrokaempferolu sa ďalšími reakciami tvorí delphinidín a pelargonidín, dihydrokvercetín je prekursorom kyanidínu. V poslednom kroku sú tieto významné antokyány glykozylované enzýmom antokyanidín-3-O-glukozyltransferázou (UFGT; EC 2.4.1.115) na farebnú a stabilnú formu (Obr. 8; Falcone Ferreyra *et al.*, 2012; Petrusa *et al.*, 2013; Saito *et al.*, 2013).

2.4.5 Metódy stanovenia flavonoidov

Flavonoidy sa typicky extrahujú z čerstvého alebo sušeného homogenizovaného rastlinného materiálu pomocou metanolu, etanolu, acetónu, chloroformu alebo vody, prípadne ich kombináciou. Vyššia výťažnosť sa dosahuje použitím zahrievania pod refluxom, Soxhletovej extrakcie, ultrasonicky asistovanej extrakcie, mikrovlnne asistovanej extrakcie alebo extrakcie na pevnej fáze. Na extrakciu a jej výťažok má vplyv množstvo faktorov, predovšetkým výber rozpúšťadla, doba extrakcie, teplota, pomer rozpúšťadla a vzorky či počet opakovaní. Pre dosiahnutie hydrolýzy glykozidov flavonoidov a následné stanovenie celkových flavonoidov, sa extrakty okysľujú kyselinou chlorovodíkovou za súčasného zavádzania dusíka a následne inkubujú pri 80-90°C, bežne po dobu 2 hodín. Používaná je tiež enzymatická hydrolýza (Matilla *et al.*, 2001; Khoddami *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017).

Detekcia a kvantifikácia flavonoidov v extrakte je možná množstvom metód. Medzi najjednoduchšie patria metódy kolorimetrické. Využíva sa najčastejšie tvorba komplexu flavonoidov s AlCl₃ a meranie jeho absorbancie pri 430 nm (da Silva *et al.*, 2015). Kolorimetrické metódy sú väčšinou nešpecifické pre konkrétny flavonoid a nedosahujú

vysokú presnosť. Ich výhoda spočíva v nízkych nákladoch, jednoduchosti a rýchlosti merania (Ignat *et al.*, 2011). Moderná prístrojová kvantifikácia je založená na separácii GC alebo HPLC a následnej detekcii. Použitie GC vyžaduje zaradenie rôznych modifikačných krokov, typicky odstránenie lipidov, hydrolýza glykozidových a esterových väzieb či transformáciu na prchavejšie deriváty. Medzi najpoužívanejšie spôsoby detekcie pri GC patrí plameňový ionizačný detektor (flame ionisation detector – FID) a MS (Naczka a Shahidi, 2004; Khoddami *et al.*, 2013). Najpoužívanejšie detektory pri separácii pomocou HPLC sú detektor diódového poľa (diode array detector – DAD) v UV/VIS oblasti a hmotnostný spektrometer. DAD sníma absorbanciu vzorky v reálnom čase v celom UV/VIS spektre. Biele svetlo zo zdroja prechádza prietokovou celou, za ktorou sa rozkladá na optickej mriežke. Na každú z fotodiód diódového poľa dopadá žiarenie o určitej vlnovej dĺžke, zoslabené absorpciou v cele. DAD umožňuje tvorbu knižníc spektier, rýchle stanovenie absorpčného maxima či jednoduchú identifikáciu látok. Medzi ďalšie používané metódy patrí elektrochemická či fluorescenčná detekcia (Jones, 1985; Stalikas, 2007; Swartz, 2010).

Menej využívané metódy pri analýze flavonoidov sú napríklad chromatografia na tenkej vrstve alebo kapilárna elektroforéza s MS, fluorescenčnou alebo UV/VIS detekciou. Výhody kapilárnej elektroforézy sú predovšetkým vysoké rozlíšenie, krátke analýzy a nízke potrebné objemy vzoriek a reagensí (Stalikas, 2007; Singh *et al.*, 2017).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Acetonitril (Biosolve, Francúzsko)

D-fruktóza (Lach-Ner, Česká republika)

D-glukóza monohydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Disodná soľ kyseliny etyléndiaminotetraoctovej, dihydrát (EDTA; Lach-Ner, Česká republika)

Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF; Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogénfosforečnan sodný, dodekahydrát (VWR International, Belgicko)

Inulín (Megazyme, Írsko)

Izopropylalkohol (Penta, Česká republika)

Kvercetín dihydrát (Extrasynthese, Francúzsko)

Kvercetín-3,4'-O-diglukozid (Extrasynthese, Francúzsko)

Kvercetín-4'-O-glukozid (Extrasynthese, Francúzsko)

Kyselina citrónová (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina mravčia (Merck KGaA, Nemecko)

Metanol (Honeywell, Nemecko)

Mili-Q voda (laboratórium Centra regionu Haná)

Octan sodný trihydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Sacharóza (Lach-Ner, Česká republika)

Sephadex G-25 (Pharmacia AB, Švédsko)

3.1.2 Prístroje a pomôcky

96-jamkové doštičky s tesniacou fóliou WebSeal (Thermo Fischer Scientific, USA)

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Poľsko)

Centrifuga 5804 R (Eppendorf, Nemecko)

Centrifugačné filtre Centriprep 10 kDa cut-off, 15 ml (Merck Milipore, USA)

Centrifugačné skúmavky 15 ml a 50 ml (Corning, Mexiko)

Centrifugačný koncentrátor CentriVap (Labconco, USA)

ELSD detektor 3300 (Alltech, USA)

Chromatografická kolóna Kinetex EVO C18 s predkolónou (150 x 2,1 mm, 2,6 µm; Phenomenex, USA)

Chromatografická kolóna Rezex RCM monosaccharide Ca²⁺ (8 %) s predkolónou (300 x 7,8 mm, 8 µm; Phenomenex, USA)

Injekčné striekačky 2 ml (B. Braun, Nemecko)

Kvapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 s detektorom diódového poľa (Thermo Fischer Scientific, USA)

Kvapalinový chromatograf Smartline (Knauer, Nemecko)

Lyofilizátor BETA 1-8 LD plus (Christ, Nemecko)

Oscilačný mlyn MM 400 (Retsch, Nemecko)

pH-meter CX505 (Elmetron, Poľsko)

Pipety (Labnet, USA)

Predvážky (Kern, Nemecko)

Sklenené skúmavky (12 x 75 mm; Fisherbrand, USA)

Softvér Clarity, verzia 6.1 (DataApex, Česká republika)

Softvér Thermo Xcalibur, verzia 3.1.66.10 (Thermo Fischer Scientific, USA)

Striekačkové filtre CHS Filterpure 0,22µm (Chromservis, Česká republika)

Suchý kúpeľ (Hangzhou Miu Instruments, Čína)

Suchý kúpeľ TCDB-01 (Clever Scientific, Veľká Británia)

Termostat HPLC CROCO-CIL (Ercatech AG, Švajčiarsko)

Tyčový mixér DG3 Spiraglio (Moulinex, Francúzsko)

Ultrazvukový kúpeľ AU-32 (Argolab, Taliansko)

Varič (Sencor, Česká republika)

Vortex (VELP Scientifica, Taliansko)

Vortex V-1 plus (Biosan, Litva)

3.1.3 Rastlinný materiál

V experimentálnej časti bolo použitých desať kultivarov šalotky (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.) z genetických zdrojov Výzkumného ústavu rostlinné výroby v.v.i. v Olomouci (Tab. 1). Šalotky boli skladované pri kontrolovanej teplote 15°C bez prístupu svetla. Časť šalotiek z troch kultivarov, vybraných na základe výrazných rozdielov vo fenotype (Obr. 9), bola na základe článku Benkeblia (2003) v období 12.11.2018 až 19.11.2018 ošetrená chladom uskladnením pri teplote 1°C a následne premiestnená k zvyšnému materiálu.

Tab. 1 Použité kultivary šalotky

Poľné číslo	Odroda	Evidenčné číslo	Pôvod
3000*	Gazda	09H0200017	Maďarsko
3030	landrace (Volbu)	09H0200279	Oppland, Nórsko
3090	landrace (Thuringer)	09H0200998	Nemecko
3109*	landrace (Thuringer)	09H0200973	Nemecko
3110	landrace (Thuringer)	09H0200974	Nemecko
3111	landrace (Thuringer)	09H0200975	Nemecko
3130	landrace (Cvek)	09H0200994	Rybníček, Česko
3131	landrace (Stencel)	09H0200995	Otice, Česko
3132	landrace (Dostalek)	09H0200996	Komárno, Slovensko
3133*	landrace (POLKIE99 20 44)	09H0200997	Poľsko

* Kultivary podrobené ošetreniu chladom



Obr. 9 Porovnanie fenotypov kultivarov 3000 (vľavo) a 3109 (vpravo)

3.2 Metódy

3.2.1 Spracovanie rastlinného materiálu

Pre analýzu obsahu malých sacharidov a glukozidov kvercetínu bola počas piatich mesiacov odoberaná reprezentatívna vzorka 4 cibúľ jednotlivých kultivarov šalotky. Cibule boli zbavené vonkajšej suchej vrstvy, nakrájané a lyofilizované. Suchý materiál bol homogenizovaný oscilačným guľovým mlynom po dobu 2,5 min. pri 25 Hz. Pre stanovenie aktivity fruktán-1-exohydrolázy boli použité čerstvé cibule zbavené vonkajšej suchej vrstvy.

3.2.2 Analýza obsahu malých sacharidov

Metóda analýzy bola prevzatá z O'Donoghue *et al.* (2004) a optimalizovaná Dosedělovou (2018). Pre extrakciu malých sacharidov bol k navážke 10 mg suchej hmoty pridaný 1 ml 70% metanolu. Zmes bola vortexovaná, 15 minút sonifikovaná v ultrazvukovom kúpeli a centrifugovaná (15 min., 20000 g, 20°C). Bolo odobraných 750 µl extraktu do sklenených skúmaviek. Extrakt bol následne odparený na centrifugačnom koncentrátore pri 40°C. Odparok bol rozpustený v 750 µl Mili-Q vody, vortexovaný a 5 minút sonifikovaný. Roztok bol prefiltrovaný do 96-jamkových doštičiek pomocou injekčných striekačiek a striekačkových filtrov. Obsah sacharidov všetkých kultivarov v jednotlivých mesiacoch bol analyzovaný v troch opakovaniach. Od decembra bol monitorovaný aj obsah sacharidov v šalotkách ošetrených chladom.

Sacharidy v roztoku boli separované pomocou kvapalinového chromatografu Smartline na kolóne Rezex RCM monosaccharide Ca²⁺ (300 x 7,8 mm, 8 µm) pri teplote 80°C. Mobilnú fázu tvorila Mili-Q voda o prietoku 0,6 ml·min⁻¹. Na jednu analýzu bolo dávkovaných 10 µl vzorky. Doba analýzy bola 20 min. Separované zložky boli detegované pomocou ELSD detektora pri teplote 80°C a prietoku dusíku 2 l·min⁻¹. Zhotovený a trikrát zmeraný bol koncentračný rad štandardov sacharózy, D-glukózy a D-fruktózy o koncentráciách 0,025; 0,050; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 1,7 mg·ml⁻¹.

Získané chromatogramy boli vyhodnotené v programe Clarity a dáta spracované v Microsoft Excel 365 (ver. 1808). Jednotlivé sacharidy boli identifikované na základe retenčných časov zložiek zmesi štandardov. Z meraní koncentračného radu štandardov bola zhotovená kalibračná rovnica. Obsah fruktózy a sacharózy bol kvantifikovaný z logaritmov plôch pík v príslušných chromatogramoch pomocou rovníc lineárnej regresie. Koncentrácie sacharidov v roztoku boli prepočítané na obsah daného sacharidu v 1 g suchej hmoty.

3.2.3 Analýza glukozidov kvercetínu

Glukozidy kvercetínu boli analyzované metódou popísanou v Caridi *et al.* (2007) a optimalizovanou Dosedělovou (2018). Glukozidy kvercetínu boli extrahované z 10 mg suchej hmoty v 1 ml 70% metanolu. Po vortexovaní bola zmes 15 minút sonifikovaná a centrifugovaná (15 min., 20000 g, 20°C). Metanolový extrakt bol päťkrát zriedený 70% metanolom do sklenených vialiek. Bol zhotovený koncentračný rad štandardov kvercetín-3,4'-O-diglukozidu (QDG), kvercetín-4'-O-glukozidu (QMG) a aglykónu

kvercetínu (Q) v 70% metanole o koncentráciách 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10; 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Kalibračný rad bol zmeraný trikrát. Analyzované boli všetky kultivary v troch opakovaníach počas piatich mesiacov, od decembra bol obsah glukozidov kvercetínu monitorovaný aj v šalotkách ošetrovaných chladom.

Glukozidy kvercetínu, prítomné v roztoku, boli separované na kvapalinovom chromatografe Dionex UltiMate 3000, na kolóne Kinetex EVO C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 μm) s predkolónou C18. Analýza trvala 15 minút, dávkovaných bolo 10 μl vzorky. Použité boli dve mobilné fázy, A (0,1% vodný roztok kyseliny mravčej) a B (0,1% roztok kyseliny mravčej v acetonitrile). Prietok mobilnej fázy bol 0,3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ s gradientovou elúciou. V čase 0-2 min. bola mobilná fáza zložená z 5% B, od 2 do 8 min. sa postupne zvyšoval obsah B až na 61,5%. Medzi 8 a 8,1 min. vzrástol obsah B na 100%, medzi 10,1 min. a 10,2 min. klesol obsah B na 5%. Zložky zmesi boli detegované DAD pri vlnovej dĺžke 255 nm.

Chromatogramy boli vyhodnotené v programe Thermo Xcalibur. Podľa retenčných časov štandardov boli identifikované glukozidy kvercetínu v chromatogramoch jednotlivých vzoriek. Ich obsah bol kvantifikovaný na základe kalibračnej rovnice získanej z meraní kalibračného radu. Koncentrácia roztoku bola prepočítaná na jednotky $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ suchej hmoty na základe naváženého množstva. Získané dáta boli spracované v programe Microsoft Excel 365 (ver. 1808).

3.2.4 Stanovenie enzýmovej aktivity fruktán-1-exohydrolázy

Metóda stanovenia enzýmovej aktivity 1-FEH bola prevzatá z Benkeblia *et al.* (2005) a z Krivorotova a Sereikaite (2014). Enzýmový extrakt bol pripravený z reprezentatívnej vzorky čerstvej šalotky, zbavenej suchých častí. 40 g nakrájanej čerstvej šalotky bolo za chladenia ľadom homogenizovaných tyčovým mixérom vo vychladenom citrát-fosfátovom pufre (pH 6,5; kyselina citrónová, hydrogénfosforečnan sodný) s prídavkom 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF a 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA. Zmes bola prefiltrovaná cez tri vrstvy gázy a filtrát bol centrifugovaný (15 min., 20000 g, 4°C).

K 200 μl supernatantu bolo pridaných 800 μl 3% (w/v) roztoku inulínu v citrát-fosfátovom pufre. Ako slepá vzorka bola použitá zmes 200 μl supernatantu a 800 μl pufru. Následne boli roztoky inkubované pri 30°C po dobu troch hodín a denaturované pri 95°C po dobu 10 minút. Z každého kultivaru boli zhotovené tri vzorky. Pre posúdenie hydrolýzy prirodzených fruktánov v extrakte bol analyzovaný aj neinkubovaný roztok blanku.

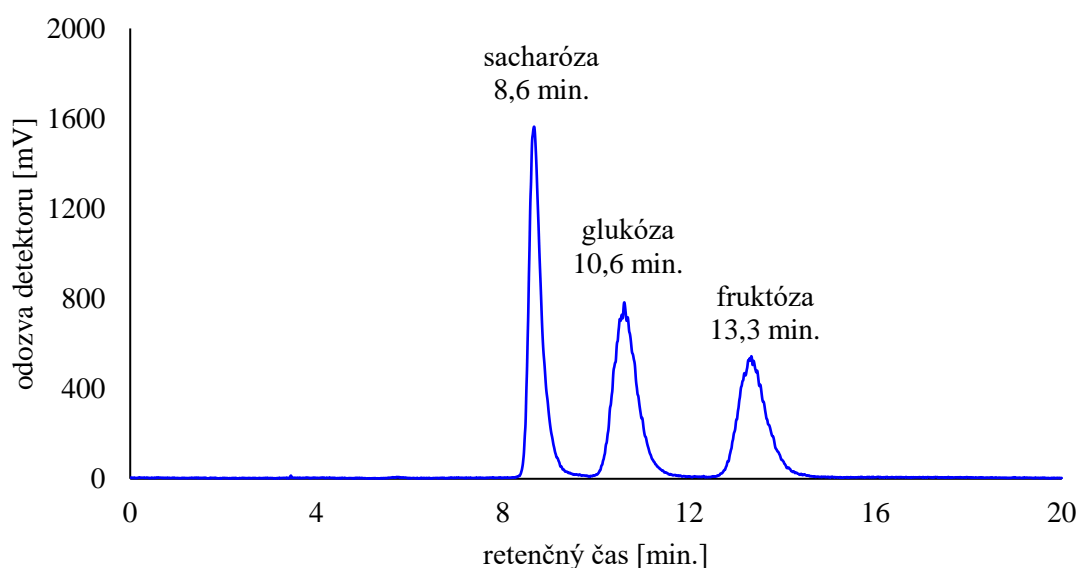
Po centrifugácii (10 min., 20000 g, 20°C) bol supernatant desaťkrát zriedený a prefiltrovaný pomocou injekčných striekačiek a striekačkových filtrov do sklenených vialiek. Množstvo uvoľnenej glukózy a fruktózy bolo stanovené metódou HPLC-ELSD podľa kapitoly 3.2.2.

V rámci experimentu boli testované aj metódy zahustenia enzýmového extraktu. V prvom spôsobe bolo pridaných 40 mg Sephadex G-25 k 2 ml extraktu. Zmes bola vortexovaná a po 15 minútach státia centrifugovaná (10 min., 20000 g, 4°C). Druhý spôsob zahustenia využíval centrifugačné filtre Centriprep. 10 ml extraktu bolo na základe manuálu výrobcu ultrafiltrovaných centrifugáciou (3 x 30 min., 3000 g, 4°C).

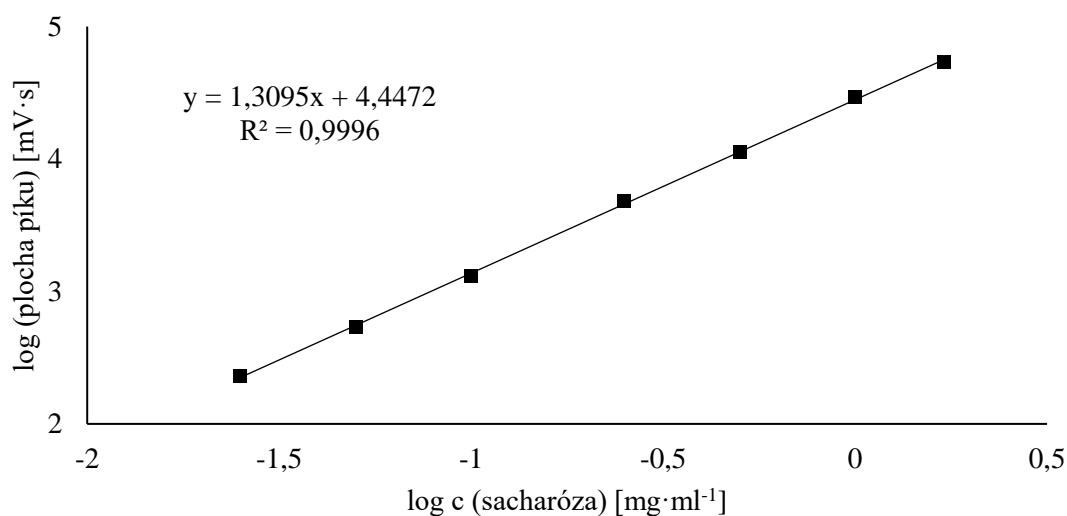
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Analýza obsahu malých sacharidov

V chromatogramoch zmesi štandardov boli na základe retenčného času identifikované píky sacharózy (8,6 min.), glukózy (10,6 min.) a fruktózy (13,3 min.; Obr. 10). Z troch meraní kalibračného radu boli pre sacharózu a fruktózu zhotovené kalibračné priamky a rovnice lineárnej regresie po logaritmickej transformácii. Pre sacharózu mala rovnica lineárnej regresie tvar $y = 1,3095x + 4,4472$, $R^2 = 0,9996$ (Obr. 11); pre fruktózu tvar $y = 1,2338x + 4,2988$, $R^2 = 0,9975$. Lineárny dynamický rozsah pre sacharózu a fruktózu bol $0,025 - 1,7 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.



Obr. 10 Chromatogram zmesi štandardov sacharidov ($c = 1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)



Obr. 11 Kalibračná priamka sacharózy ($0,025 - 1,7 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Výsledný obsah sacharidov v jednotlivých mesiacoch so smerodajnými odchýlkami z troch meraní je uvedený v Tab. 2 a Tab. 3. Obsah glukózy vo väčšine vzoriek bol podľa predpokladov pod limitom kvantifikácie, kvantifikované boli sacharóza a fruktóza.

Najmenej fruktózy zo skúmaných šalotiek obsahoval kultivar 3110 so žltou dužinou. Počas skladovania však u tohto kultivaru došlo k najvýraznejšiemu vzrastu obsahu fruktózy na viac než dvojnásobok a sacharózy na 1,4-násobok. Vysoký obsah fruktózy bol zaznamenaný v červených kultivároch 3000, 3130 a 3131, pochádzajúcich z Maďarska a Česka, t. j. teplejších oblastí oproti Nemecku či Poľsku. Najvyšší obsah sacharózy, a zároveň nízky obsah fruktózy, bol nameraný v kultivare 3133 z Poľska. Jedná sa o kultivar s výrazne bielou dužinou, ktoré sú typicky sladšie a vhodné pre okamžitú konzumáciu. V šalotkách tohto kultivaru, ošetrovaných chladom, dochádzalo k výrazným zmenám obsahu oboch sledovaných sacharidov. V decembri prudko vzrástol obsah fruktózy a mierne aj obsah sacharózy, čo môže byť dôsledok vyššej metabolickej aktivity oproti neošetreným šalotkám, kde bol pozorovaný kontinuálny rast hladiny sacharidov. V marci bola pozorovaná aj rozsiahlejšia prítomnosť deliacich sa buniek vo vnútorných častiach ošetrovaných šalotiek kultivaru 3133 v porovnaní s neošetrenými. Ošetrované aj neošetrené šalotky kultivaru 3109 mali približne rovnaký obsah sacharózy aj fruktózy počas skladovania. Neošetrené šalotky kultivaru 3000 mali vyšší obsah fruktózy než ošetrované, obsah sacharózy bol takmer zhodný. V kultivároch 3109 a 3000 neboli výrazné rozdiely v zastúpení delivého pletiva ošetrovaných a neošetrených šalotiek.

Tab. 2 Obsah sacharózy počas uskladnenia (aritmetický priemer (n = 3) ± smerodajná odchýlka)

poľné číslo	sacharóza [mg·g ⁻¹ DW]				
	november	december	január	február	marec
3000	81,1 ± 0,4	92,7 ± 1,9	114,1 ± 5,9	117,6 ± 6,9	136,3 ± 3,7
3030	91,5 ± 2,8	113,2 ± 3,0	97,4 ± 5,4	109,6 ± 5,0	109,0 ± 4,3
3090	85,5 ± 2,3	84,9 ± 6,3	95,9 ± 0,9	103,2 ± 8,7	99,0 ± 7,4
3109	81,3 ± 0,6	98,5 ± 1,0	96,6 ± 7,6	104,2 ± 6,4	123,5 ± 10,0
3110	89,2 ± 0,5	84,6 ± 1,9	107,8 ± 5,4	122,7 ± 5,1	126,7 ± 6,9
3111	69,6 ± 1,7	101,8 ± 1,7	96,4 ± 9,9	100,7 ± 4,4	92,6 ± 10,8
3130	75,1 ± 0,4	94,0 ± 2,8	106,7 ± 2,7	108,7 ± 9,2	99,9 ± 4,6
3131	91,5 ± 6,9	108,2 ± 3,2	117,2 ± 3,1	112,7 ± 2,9	117,5 ± 2,8
3132	86,5 ± 2,6	104,3 ± 7,4	116,6 ± 3,4	125,9 ± 1,7	115,3 ± 1,5
3133	109,6 ± 3,6	103,7 ± 0,7	120,2 ± 2,5	121,0 ± 2,4	135,9 ± 3,0
3000*		96,4 ± 1,7	105,1 ± 3,7	111,7 ± 3,7	135,9 ± 1,8
3109*		97,4 ± 6,6	101,4 ± 4,4	108,0 ± 2,9	116,1 ± 4,0
3133*		124,9 ± 2,9	95,4 ± 3,1	120,2 ± 4,4	90,4 ± 5,5

* Kultivary podrobené ošetrovaniu chladom

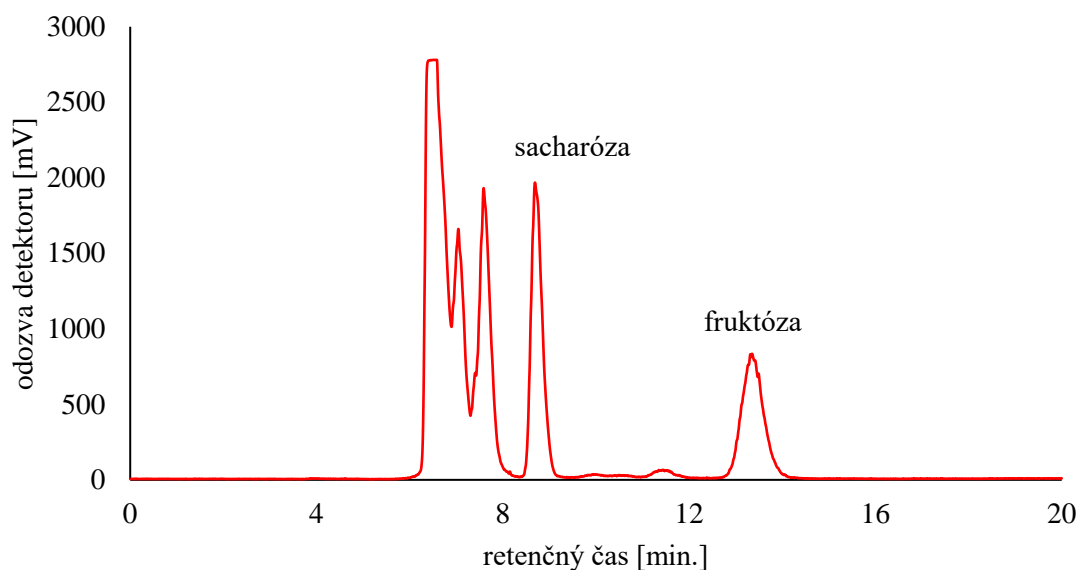
Tab. 3 Obsah fruktózy počas uskladnenia (aritmetický priemer (n = 3) ± smerodajná odchýlka)

poľné číslo	fruktóza [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ DW]				
	november	december	január	február	marec
3000	70,8 ± 1,6	113,1 ± 3,2	128,6 ± 5,9	137,9 ± 8,5	145,9 ± 4,1
3030	57,9 ± 3,8	85,6 ± 2,1	94,0 ± 5,6	117,7 ± 7,7	135,3 ± 3,1
3090	72,9 ± 2,1	86,5 ± 4,5	109,4 ± 3,0	85,4 ± 10,5	121,6 ± 10,9
3109	76,9 ± 0,9	110,4 ± 0,9	109,3 ± 10,0	82,2 ± 6,7	143,4 ± 11,5
3110	45,1 ± 1,7	59,4 ± 2,1	88,7 ± 4,6	86,8 ± 3,0	108,6 ± 6,4
3111	64,7 ± 0,5	111,9 ± 0,9	114,7 ± 15,6	104,3 ± 5,1	99,3 ± 4,4
3130	82,0 ± 1,7	118,0 ± 2,3	126,0 ± 2,1	131,5 ± 13,0	150,0 ± 8,7
3131	91,5 ± 6,2	153,3 ± 14,9	169,0 ± 5,6	169,8 ± 6,1	146,1 ± 2,7
3132	61,6 ± 2,9	113,3 ± 7,2	129,9 ± 2,3	119,8 ± 4,2	131,1 ± 4,1
3133	66,4 ± 1,2	93,1 ± 1,6	107,7 ± 2,7	89,3 ± 1,6	82,2 ± 2,3
3000*		100,6 ± 1,5	81,4 ± 3,3	103,0 ± 2,5	91,8 ± 2,2
3109*		115,9 ± 10,1	95,3 ± 4,0	98,4 ± 5,1	135,3 ± 3,5
3133*		140,3 ± 4,9	105,9 ± 4,5	130,7 ± 3,2	112,1 ± 5,4

* Kultivary podrobené ošetreniu chladom

Veľmi nízky obsah glukózy a naopak významné zastúpenie sacharózy a fruktózy v šalotke sú v súlade s prácou Ariyanti *et al.* (2018), ktorí stanovili obsah sacharidov v šalotkách z Vietnamu a Indonézie v dvoch vegetačných obdobiach. Obsah sacharidov je premenlivý a do veľkej miery závislý na počasí v danom vegetačnom období, ako aj na genotype, manipulácii po zbere a teplote a vzdušnej vlhkosti pri skladovaní. V porovnaní s cibuľou má šalotka vyšší obsah sacharózy a fruktánov, je odolnejšia voči vplyvom prostredia a škodcom a má kratšie vegetačné obdobie. Pestuje sa však len v obmedzenom množstve, s čím súvisí aj jej vyššia cena. Selekciami vhodných odrôd pre pestovanie alebo šľachtenie by bolo možné znížiť náklady na pestovanie a skladovanie, obmedziť používanie postrekov a zvýšiť trvanlivosť.

Vo vzorkách bolo pozorované vysoké zastúpenie neznámych analytov s retenčným časom medzi 6 a 8 min (Obr. 12). Vzhľadom na retenčné časy, intenzitu signálu a typ použitej kolóny pri HPLC sa dá predpokladať, že neznáme analyty sú predovšetkým fruktány. Obsah sacharidov v jednotlivých kultivároch koreluje rádo s diplomovou prácou Dosedělové (2018), ktorá stanovila obsah sacharózy, fruktózy a glukózy v 87 kultivároch šalotky za účelom charakterizácie genetických zdrojov, čo je dôležité pre ďalšie uplatnenie v šľachtení a selekcii vhodných odrôd pre pestovanie. Keďže však nešlo o čerstvo zozbierané šalotky, ale o šalotky v dormancii, bolo dôležité objasniť aj zmeny v ich zložení počas skladovania pri kontrolovanej teplote, nakoľko to môže mať dopad na konečnú aplikovateľnosť dát.



Obr. 12 Chromatogram vzorky kultivaru 3000 z januára

Celkovo mal obsah sacharózy aj fruktózy počas skladovania mierne stúpajúci trend u väčšiny kultivarov. Dynamika fruktózy je v súlade s článkom Benkeblia *et al.* (2005), dynamika sacharózy mala opačný trend ako v tejto publikácii. Rovnako Yaguchi *et al.* (2008) uvádzajú pokles obsahu sacharózy počas dlhodobého skladovania. Sharma *et al.* (2015) pozorovali pomerne stabilnú hladinu fruktózy a rastúcu hladinu sacharózy počas 6 mesiacov skladovania. Tieto práce sú ale zamerané na cesnak cibul'ový, t. j. cibuľu kuchynskú, nie na šalotku, takže nie je možné výsledky úplne porovnávať v dôsledku rozdielného zloženia.

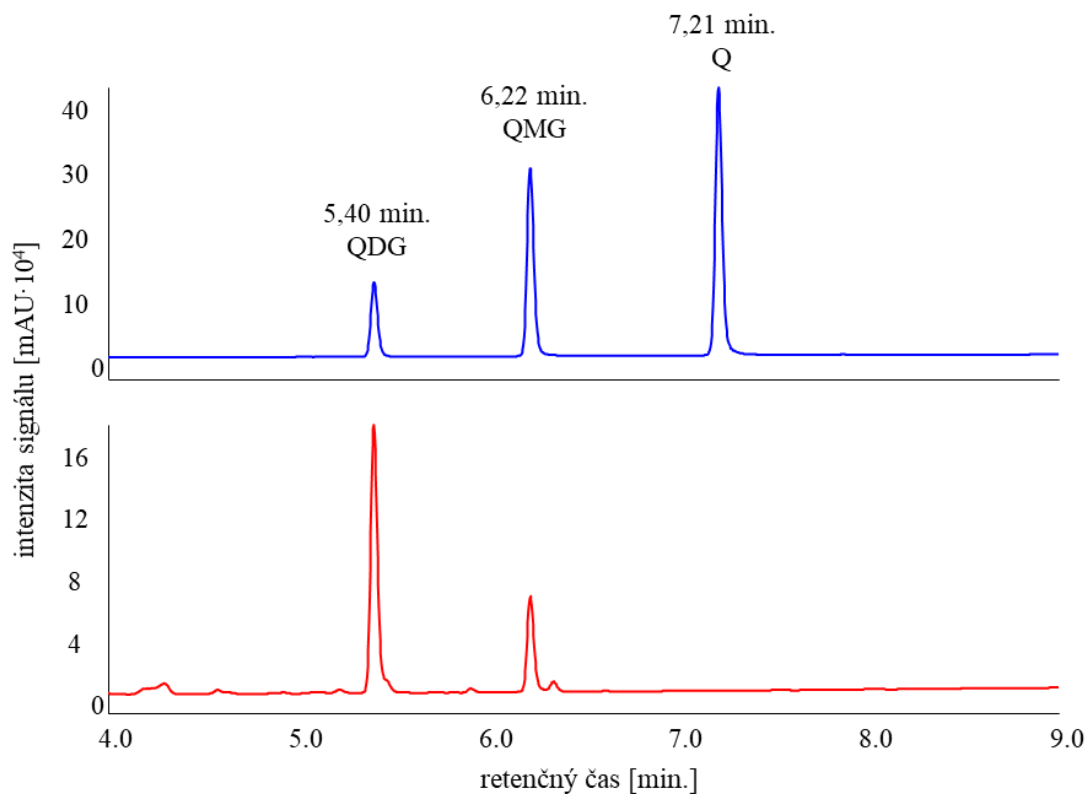
Sledovanie dynamiky sacharidov konkrétnej odrody vo viacerých vegetačných obdobiach umožňuje určiť, či je daná odroda vhodná pre okamžitú konzumáciu, sušenie, alebo dlhodobé uskladnenie. Keďže obsah sacharidov medzi vegetačnými obdobiami je premenlivý (Ariyanti *et al.*, 2018) a závisí od množstva faktorov, nie je vhodným markerom pre určenie konca dormancie. Iným potenciálnym markerom konca dormancie šalotiek by mohla byť redistribúcia fruktánov z dužiny cibule do podcibulia pred začiatkom klíčenia (Ohanenye *et al.*, 2019).

4.2 Analýza glukozidov kvercetínu

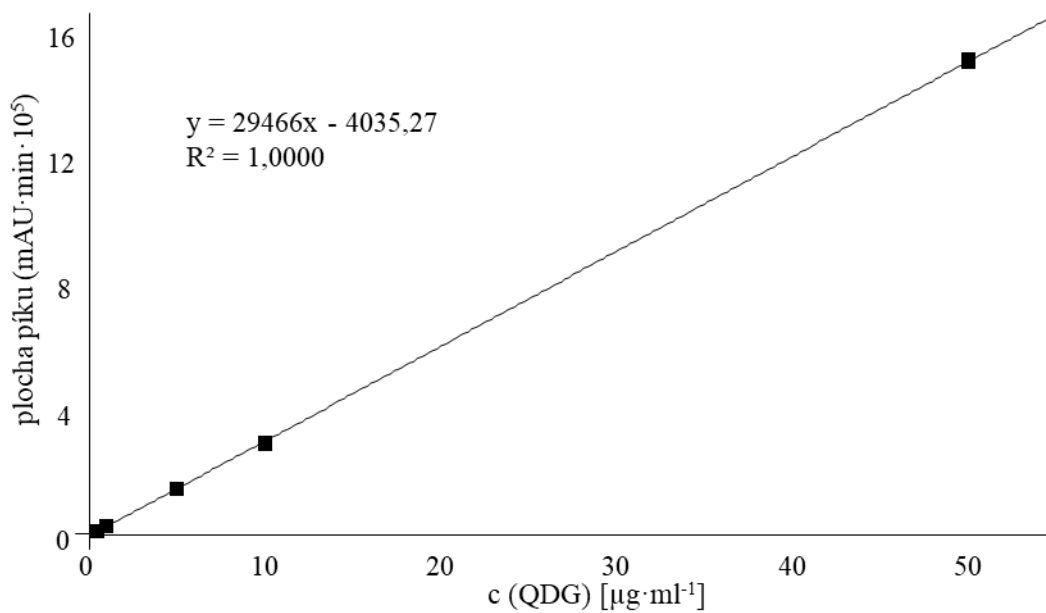
Na základe retenčných časov bol v chromatografickom zázname (Obr. 13) identifikovaný pík QDG (5,4 min.), QMG (6,22 min.) a Q (7,21 min.). Z meraní kalibračného radu v troch opakovaníach bola zhotovená kalibračná priamka s rovnicou lineárnej regresie pre QDG ($y = 29466x - 4035,27$; $R^2 = 1,0000$; Obr. 14), QMG ($y = 74112,4x - 11264,8$; $R^2 = 1,0000$) a Q ($y = 111495x - 21597,5$; $R^2 = 0,9999$). Lineárny dynamický rozsah pre QDG a Q bol $0,5-50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pre QMG $0,1-50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Obsah QDG a QMG vo vzorkách bol kvantifikovaný z plôch píkov, použitím rovníc lineárnej regresie. Priemerný obsah QDG a QMG z troch meraní a smerodajné odchýlky sú uvedené v Tab. 4 a Tab. 5.

Najväčší obsah QDG aj QMG bol pozorovaný v kultivare 3030, pochádzajúcom z Nórska. Naopak najnižší obsah oboch glukozidov mal kultivar 3133 z Poľska. Výnimočne nízky obsah QMG bol pozorovaný aj v žltom kultivare 3110. Dynamika obsahu QDG bola medzi kultivarmi premenlivá. V kultivaroch 3000, 3130 a 3133 a bol obsah QDG relatívne stály. Kultivary 3030, 3109 a 3110 sa vyznačovali zvýšenou hladinou QDG v januári a februári, nasledovanou poklesom na pôvodné či nižšie hodnoty v marci. V zvyšných kultivaroch bola pozorovaná fluktuácia obsahu QDG bez viditeľných trendov. U kultivarov 3109, 3111, 3133 a 3131 bol zistený pokles obsahu QMG počas skladovania. Zvyšné kultivary mali hladinu QMG pomerne stálu.

Chladom ošetrované šalotky kultivarov 3000 a 3133 mali od decembra výrazne vyššiu hladinu QDG a QMG ako neošetrené. V žltom kultivare 3109 bol vyšší obsah QDG a QMG v ošetrovaných šalotkách pozorovaný až od februára. Zmeny QDG a QMG v ošetrovaných a neošetrovaných šalotkách daného kultivaru mali približne rovnaké trendy. Z týchto výsledkov je možné tvrdiť, že ošetrovanie chladom, aj keď nemalo veľký vplyv na uvoľnenie z dormancie, zvýšilo obsah glukozidov kvercetínu v šalotkách. Tento nárast je spôsobený pravdepodobne stresom z chladu, ktorý indukuje tvorbu ROS. Chladné podnebie Nórska môže byť dôvod, prečo má práve kultivar 3030 najvyšší obsah QDG a QMG. Tieto závery sú v súlade so Sharma a Lee (2016), ktorí zistili, že cesnak cibulový, skladovaný pri 4°C , obsahuje väčšie množstvo glukozidov kvercetínu než cesnak cibulový skladovaný pri 10°C a 25°C .



Obr. 13 Porovnanie úsekov chromatogramov zmesi štandardov (hore) a vzorky kultivaru 3000 z januára (dole)



Obr. 14 Kalibračná priamka kvercetín-3,4'-O-diglukozidu (QDG)

Tab. 4 Obsah kvercetín-3,4'-O-diglukozydu počas uskladnenia (aritmetický priemer (n = 3) ± smerodajná odchýlka)

poľné číslo	kvercetín-3,4'-O-diglukozyd [mg·g ⁻¹ DW]				
	november	december	január	február	marec
3000	6,72 ± 0,24	6,54 ± 0,38	6,80 ± 0,46	7,05 ± 0,28	7,56 ± 0,53
3030	8,81 ± 0,51	8,42 ± 0,12	10,65 ± 0,58	10,55 ± 0,43	8,39 ± 0,17
3090	5,73 ± 0,19	5,83 ± 0,13	7,25 ± 0,37	5,04 ± 0,63	6,45 ± 0,30
3109	6,86 ± 0,08	8,45 ± 0,35	6,91 ± 1,21	7,55 ± 0,02	4,72 ± 0,41
3110	4,11 ± 0,06	3,90 ± 0,14	5,01 ± 0,23	4,65 ± 0,12	3,47 ± 0,11
3111	8,73 ± 0,54	5,48 ± 0,10	6,17 ± 0,76	6,64 ± 0,14	7,00 ± 0,14
3130	7,36 ± 0,17	6,61 ± 0,91	7,84 ± 1,40	7,31 ± 0,19	7,12 ± 0,39
3131	7,38 ± 0,14	5,79 ± 0,39	5,68 ± 0,05	7,20 ± 1,04	4,70 ± 0,12
3132	6,77 ± 0,27	8,07 ± 0,25	6,80 ± 0,25	7,50 ± 0,18	6,48 ± 0,12
3133	3,19 ± 0,10	2,31 ± 0,04	2,76 ± 0,06	2,52 ± 0,03	1,85 ± 0,15
3000*		8,21 ± 0,29	10,05 ± 0,27	6,96 ± 0,47	8,97 ± 0,35
3109*		6,47 ± 0,48	7,36 ± 0,22	10,29 ± 0,52	7,04 ± 0,24
3133*		3,87 ± 0,06	3,30 ± 0,19	4,25 ± 0,29	4,72 ± 0,32

* Kultivary podrobené ošetreniu chladom

Tab. 5 Obsah kvercetín-4'-O-glukozydu počas uskladnenia (aritmetický priemer (n = 3) ± smerodajná odchýlka)

poľné číslo	kvercetín-4'-O-glukozyd [mg·g ⁻¹ DW]				
	november	december	január	február	marec
3000	1,27 ± 0,05	1,17 ± 0,07	1,06 ± 0,07	1,06 ± 0,05	1,32 ± 0,09
3030	1,72 ± 0,10	1,67 ± 0,02	1,98 ± 0,11	1,87 ± 0,08	1,64 ± 0,04
3090	0,98 ± 0,03	1,07 ± 0,02	1,19 ± 0,06	0,76 ± 0,09	1,06 ± 0,04
3109	1,16 ± 0,01	1,29 ± 0,05	1,06 ± 0,18	1,00 ± 0,01	0,74 ± 0,06
3110	0,52 ± 0,00	0,49 ± 0,01	0,64 ± 0,03	0,47 ± 0,02	0,49 ± 0,01
3111	1,54 ± 0,13	0,74 ± 0,01	0,95 ± 0,10	0,98 ± 0,02	1,06 ± 0,02
3130	1,17 ± 0,04	1,14 ± 0,14	1,15 ± 0,19	1,19 ± 0,02	1,33 ± 0,12
3131	1,40 ± 0,03	1,00 ± 0,06	0,90 ± 0,01	1,15 ± 0,16	0,69 ± 0,02
3132	1,20 ± 0,13	1,53 ± 0,05	1,14 ± 0,05	1,18 ± 0,03	1,24 ± 0,02
3133	0,81 ± 0,03	0,44 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,37 ± 0,03
3000*		1,56 ± 0,05	2,08 ± 0,07	1,08 ± 0,08	1,50 ± 0,09
3109*		0,98 ± 0,07	0,93 ± 0,03	1,30 ± 0,06	1,14 ± 0,03
3133*		0,91 ± 0,02	0,65 ± 0,04	0,79 ± 0,08	1,03 ± 0,08

* Kultivary podrobené ošetreniu chladom

Vo vzorkách nebola detegovaná aglykonická forma kvercetínu (Obr. 13), pretože použitá suchá hmota neobsahovala povrchové suché vrstvy šalotky, v ktorých sa nachádza popri glukozidoch aj aglykón kvercetínu, čo je v súlade s Beesk *et al.* (2010), ktorí sledovali distribúciu QDG, QMG a Q v povrchových, stredných a vnútorných (klíčiach) častiach cibule metódou HPLC-DAD.

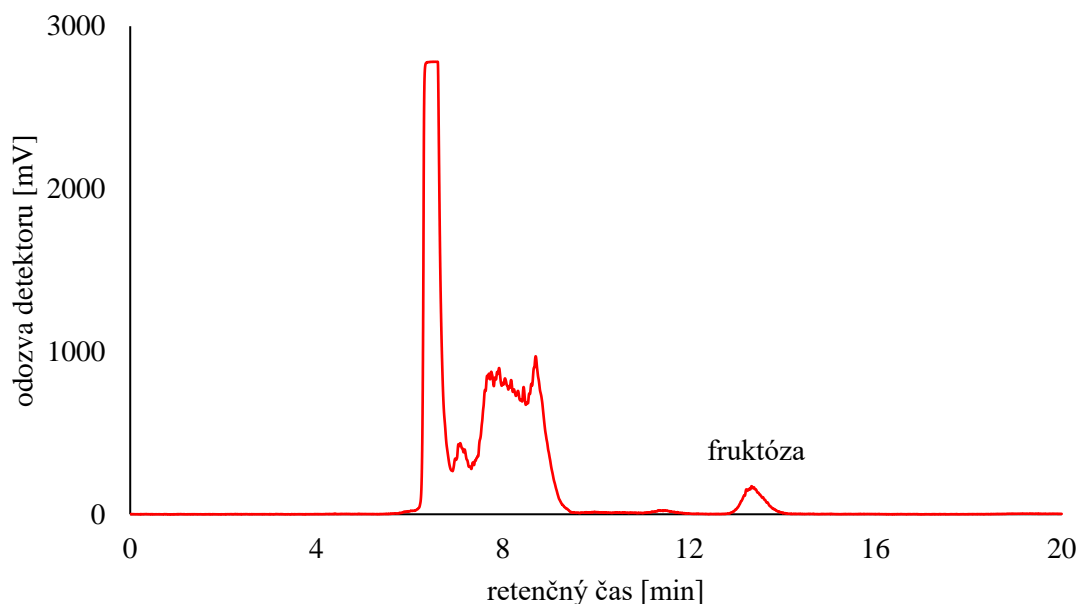
Výsledné koncentrácie glukozidov kvercetínu rádozo zodpovedajú hodnotám v práci Dosedělovej (2018). Vyšší obsah QDG ako QMG koreluje s Price *et al.* (1997). Sharma *et al.* (2015) analyzovali obsahové látky v rôznych častiach cibule počas 7 mesiacov uskladnenia v kontrolovaných podmienkach pri 21-23°C. Pozorovali, rovnako ako v tejto práci, vyššiu koncentráciu QDG ako QMG, mierny nárast QDG a takmer konštantný obsah QMG. Major *et al.* (2018) sledovali, okrem iného, aj zastúpenie QDG a QMG v šalotkách z Chorvátska, v ktorých určili, že obsahujú rovnaké alebo vyššie množstvo QMG ako QDG, čo je v rozpore s výsledkami tejto práce. Šlo však o genotypy subtropické, ktoré neboli v tejto práci skúmané. Väčšina výskumu glukozidov kvercetínu v *A. cepa* je zameraná na cibuľu a nie na šalotku. Šalotka obsahuje väčšie množstvo QDG ako cibuľa a porovnateľné množstvo QMG (Dosedělová, 2018).

Rovnako ako obsah sacharidov, aj obsah kvercetínu a jeho glukozidov je výrazne ovplyvnený poveternostnými podmienkami vo vegetačnom období, stresom, manipuláciou po zbere a podmienkami pri skladovaní. V červených odrodách je typický vyšší obsah glukozidov kvercetínu. Ukončenie dormancie nie je priamo spájané so zmenou obsahu kvercetínu a jeho glukozidov, neovplyvňujú ho výrazne ani vzájomné premeny a metabolizmus sacharidov. Počas dormancie sa však mení hladina QDG a QMG v šalotkách, čo má, rovnako ako pri malých sacharidoch, vplyv na charakterizáciu genetických zdrojov a ich ďalšie využitie. Obsah glukozidov kvercetínu bol vyhodnotený ako nevhodný marker dormancie, z dôvodu relatívne malých a nepravidelných zmien počas skladovania, ktoré priamo nesúvisia s hlavnými metabolickými procesmi pri klíčení.

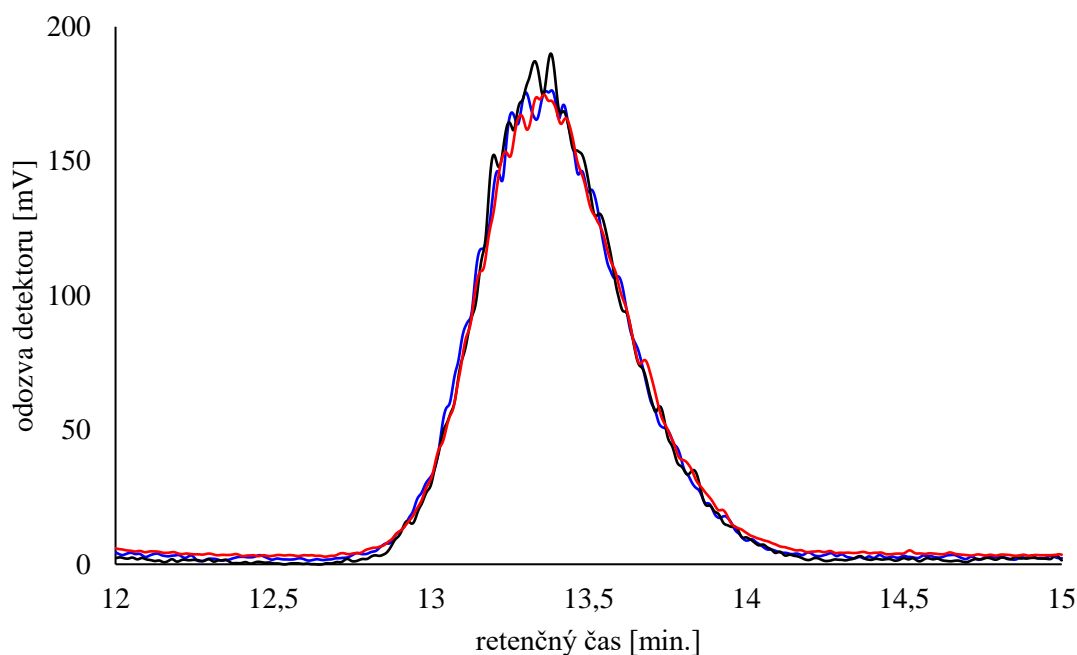
4.3 Stanovenie enzýmovej aktivity fruktán-1-exohydrolázy

V chromatogramoch boli identifikované píky sacharózy a fruktózy na základe ich retenčných časov. Pík sacharózy splýval s píkmi prirodzených fruktánov a pridaného inulínu, preto nebolo možné obsah sacharózy kvantifikovať (Obr. 15). Obsah fruktózy v inkubovanej slepej vzorke, neinkubovanej slepej vzorke a v reálnych vzorkách bol stanovený podľa rovnice lineárnej regresie po logaritmickej transformácii ($y = 1,2546x + 4,5374$; $R^2 = 0,9972$). Oproti slepým vzorkám nebola pozorovaná významná zmena obsahu fruktózy (Tab. 6). Na Obr. 16 sú porovnané veľkosti píkov oboch slepých vzoriek a priemeru meraní reálnych vzoriek jednotlivých kultivarov. Nebola teda detegovaná žiadna enzýmová aktivita počas dormancie ani pred jej koncom, čo naznačuje chybu v metóde.

Zahustenie roztoku prídavkom Sephadex G-25 bolo účinné, ale týmto spôsobom nebolo možné oddeliť nečistoty, ktoré boli prítomné v roztoku aj po centrifugovaní a spôsobovali nepresnosti pri pipetovaní. Nečistoty, v kombinácii s nutným chladením na 4°C, výrazne znižovali účinnosť centrifugačných filtrov, ktoré nie sú vhodné pre husté roztoky. Nečistoty sa nachádzali, napriek filtrácii cez striekačkové filtre, aj vo vzorkách pre HPLC-ELSD, kde spôsobovali upchávanie predkolóny, nárast tlaku a, v niektorých prípadoch, znehodnotenie vzorky.



Obr. 15 Chromatogram vzorky kultivaru 3131 z februára po inkubácii



Obr. 16 Porovnanie píkov fruktózy z chromatogramov inkubovanej slepej vzorky (modrá), neinkubovanej slepej vzorky (čierna) a aritmetického priemeru troch meraní reálnych vzoriek (červená) kultivaru 3131 z februára

Tab. 6 Porovnanie koncentrácií fruktózy v neinkubovanej slepej vzorke (A), inkubovanej slepej vzorke (B) a vzorkách kultivarov (aritmetický priemer ($n = 3$) \pm smerodajná odchýlka)

poľné číslo	fruktóza [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]					
	december			február		
	slepá vzorka A	slepá vzorka B	vzorka kultivaru	slepá vzorka A	slepá vzorka B	vzorka kultivaru
3000	0,140	0,144	$0,139 \pm 0,004$	0,169	0,172	$0,201 \pm 0,008$
3030	0,088	0,110	$0,108 \pm 0,023$	0,206	0,187	$0,183 \pm 0,011$
3090	0,118	0,106	$0,109 \pm 0,016$	0,229	0,234	$0,196 \pm 0,007$
3109	0,119	0,103	$0,132 \pm 0,004$	0,175	0,182	$0,185 \pm 0,003$
3110	0,083	0,077	$0,080 \pm 0,008$	0,126	0,139	$0,138 \pm 0,001$
3111	0,137	0,153	$0,150 \pm 0,004$	0,156	0,106	$0,133 \pm 0,004$
3130	†	†	†	0,242	0,215	$0,202 \pm 0,003$
3131	0,175	0,188	$0,197 \pm 0,033$	0,235	0,238	$0,228 \pm 0,007$
3132	0,094	0,113	$0,138 \pm 0,014$	0,202	0,153	$0,194 \pm 0,003$
3133	0,100	0,103	$0,104 \pm 0,001$	0,137	0,131	$0,132 \pm 0,025$
3000*	0,094	0,109	$0,117 \pm 0,004$	0,168	0,137	$0,178 \pm 0,012$
3109*	0,159	0,168	$0,165 \pm 0,002$	0,243	0,235	$0,225 \pm 0,014$
3133*	0,112	0,112	$0,129 \pm 0,016$	0,123	0,114	$0,119 \pm 0,003$

* Kultivary podrobené ošetreniu chladom

† Znehodnotená vzorka

Analýza aktivity 1-FEH nebola úspešná, zmeny obsahu fruktózy oproti slepým vzorkám boli príliš malé a nepravidelné. Aktivita nemohla byť spoľahlivo určená aj z dôvodu častej kontaminácie vzoriek nečistotami, nízkej rozpustnosti inulínu v pufre, inhibície 1-FEH fruktózou prítomnou v extrakte, vysokej ceny analýz, časovo náročného postupu a s tým súvisiacim rizikom proteolýzy. Boli otestované aj možnosti filtrácie a zahustenia extraktu, ale nepodarilo sa úplne odstrániť nečistoty, preto neboli tieto zahustené extrakty ďalej používané. Vzniklo aj riziko poškodenia vybavenia, predovšetkým HPLC kolóny. Znečistenie extraktov mohlo byť spôsobené fruktánmi, ktorých je v šalotke vyššie množstvo než v cibuli, a ktoré boli detegované aj pomocou HPLC-ELSD. Nakoľko nebola pozorovaná žiadna endogénna aktivita v začiatkoch experimentálnej činnosti, nebolo výhodné pokračovať v pravidelných analýzach, keďže bola spochybnená funkčnosť a spoľahlivosť metódy. Napriek tomu boli vyhotovené analýzy aktivity 1-FEH počas dormancie a pred jej koncom pre všetky kultivary.

S ohľadom na výsledky dynamiky malých sacharidov, ktorých obsah priamo závisí od aktivity fruktánexohydroláz a fruktozyltransferáz, je možné predpokladať, že aktivita 1-FEH nevzrástla počas skladovania prudko, ako uvádza Benkeblia *et al.* (2005). Počas skladovania nebolo ani pozorované klíčenie, ktoré podľa Benkeblia (2003) nastalo u cibule ošetrenej chladom už po ôsmich týždňoch od uskladnenia. Hypotéza, že ošetrenie chladom výrazne urýchlí klíčenie šalotiek, sa teda nepotvrdila. Dôvodom môže byť krátke trvanie ošetrenia, či nevhodne zvolená teplota. Teplota pri skladovaní nemusela byť optimálna pre klíčenie šalotky, nakoľko sa väčšina publikácií, napr. Benkeblia (2003), Yoo *et al.* (1997), nezameriava na šalotku, ale na cibuľu. Tie síce patria do rovnakého druhu, no optimálne trvanie a teplota ošetrenia chladom, skladovacie podmienky a dĺžka dormancie sa môžu výrazne líšiť. Budúce smerovanie výskumu by mohlo viesť k optimalizácii týchto podmienok a stanoveniu ideálnej teploty a vzdušnej vlhkosti pri skladovaní za účelom predĺženia trvanlivosti, alebo naopak, urýchlenu klíčenia.

Metóda v Benkeblia *et al.* (2005) využívala ako rastlinný materiál letný kultivar *A. cepa* var. *cepa* cv. Tenshin, ktorý obsahoval fruktány s nízkym DP, teda nemuselo dôjsť k tak rozsiahlemu ovplyvňovaniu experimentu prítomnými fruktánmi, ako v tejto práci. Využívala navyše, oproti metóde z Krivorotova a Sereikaite (2014), aj centrifugačné filtre, ktoré sa ukázali byť neefektívne pre enzýmové extrakty šalotky.

Pre ďalšiu analýzu 1-FEH by bolo potrebné optimalizovať extrakčnú metódu na použitie so šalotkami a zvoliť iné metódy zahustenia a filtrácie, napríklad gélovú chromatografiu, vysolovanie alebo dialýzu.

5 ZÁVER

Bakalárska práca bola zameraná na sledovanie dynamiky malých neštruktúrnych sacharidov metódou HPLC-ELSD a dynamiky glukozidov kvercetínu metódou HPLC-DAD počas piatich mesiacov v desiatich kultivaroch šalotky (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.) z genetických zdrojov. Ďalším cieľom bolo sledovanie enzýmovej aktivity fruktán-1-exohydrolázy v šalotke metódou HPLC-ELSD. Čiastkovým cieľom bolo porovnanie šalotiek ošetrovaných chladom s neošetrovanými šalotkami. Získané dáta boli využité na zhodnotenie jednotlivých kultivarov a posúdenie aplikovateľnosti sledovaných parametrov, predovšetkým ako markerov výstupu z dormancie u šalotky.

Obsah sacharózy a fruktózy počas skladovania mal vo väčšine sledovaných genotypov mierne stúpajúci trend. Obsah glukózy bol stabilne pod limitom kvantifikácie. Sledovanie dynamiky sacharózy a fruktózy umožňuje určiť trvanlivosť a aplikáciu daného kultivaru. Nakoľko sa jedná o veľmi premenlivý parameter, závislý od genotypu a podmienok pestovania a skladovania, bol vyhodnotený ako nevhodný marker konca dormancie. Ošetrovanie chladom nemalo výrazný vplyv na dynamiku sacharidov.

Počas skladovania bol v šalotkách pozorovaný mierny nárast kvercetín-3,4'-O-diglukozidu a takmer konštantný obsah kvercetín-4'-O-glukozidu, tento trend však nebol prítomný vo všetkých genotypoch. Obsah glukozidov navyše nesúvisí priamo s metabolickými procesmi výstupu z dormancie. Preto ho nemožno považovať za vhodný marker konca dormancie. Ošetrovanie chladom spôsobilo nárast obsahu oboch glukozidov.

Metóda stanovenia enzýmovej aktivity fruktán-1-exohydrolázy sa ukázala byť ako nevhodná, predovšetkým z dôvodu kontaminácie extraktu, neefektívnej filtrácie, nízkej spoľahlivosti či nedostatočnej optimalizácii metódy pre štúdium šalotky.

Nakoľko väčšina výskumu v tejto oblasti je zameraná na štúdium cibule, nie šalotky, budúce smerovanie výskumu by mohlo viesť k optimalizácii podmienok (predovšetkým teploty, vzdušnej vlhkosti a svetelného režimu) pri ošetrovaní chladom a skladovaní za účelom oddialenia, alebo naopak, urýchlenia klíčenia.

Pre ďalšie štúdium enzýmovej aktivity fruktán-1-exohydrolázy je nutné optimalizovať postup extrakcie a zaviesť iné filtračné a purifikačné kroky, napríklad gélovú chromatografiu, vysolovanie alebo dialýzu. Vhodný marker konca dormancie pre ďalší výskum je redistribúcia fruktánov do podcibulia pred začiatkom klíčenia.

6 LITERATÚRA

- Agati G., Tattini M. (2010): Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist* **186**, 786-793.
- Ariyanti N.A., Torikai K., Kirana R.P., Hirata S., Sulistyaningsih E., Ito S., Yamauchi N., Kobayashi N., Shigyo M. (2018): Comparative Study on Phytochemical Variations in Japanese F-1 Varieties of Bulb Onions and South-East Asian Shallot Landraces. *Horticulture Journal* **87**, 63-72.
- Arumuganathan K., Earle E.D. (1991): Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**, 208-218.
- Astley D., Innes N.L., van der Meer Q.P. (1983): *Genetic Resources of Allium species – a global report*. IBPGR Secretariat, Rome. Italy, 38 strán.
- Beesk N., Perner H., Schwarz D., George E., Kroh L.W., Rohn S. (2010): Distribution of quercetin-3,4'-O-diglucoside, quercetin-4'-O-monoglucoside, and quercetin in different parts of the onion bulb (*Allium cepa* L.) influenced by genotype. *Food Chemistry* **122**, 566-571.
- Benkeblia N. (2003): Low Temperature and Breaking of Dormancy Effects on Respiration Rate, Sugars, Phenolics and Peroxidase Activity Changes in Inner Buds of Onion *Allium cepa* L. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* **53**, 16-20.
- Benkeblia N. (2013): Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. *Journal of Chromatography A* **1313**, 54-61.
- Benkeblia N., Onodera S., Shiomi N. (2005): Variation in 1-fructo-exohydrolase (1-FEH) and 1-kestose-hydrolysing (1-KH) activities and fructo-oligosaccharide (FOS) status in onion bulbs. Influence of temperature and storage time. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**, 227-234.
- Benkeblia N., Varoquaux P., Gouble B., Selselet-Attou G. (2000): Respiratory parameters of onion buds (*Allium cepa* L.) during storage. Effects of ionizing radiation and temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1772-1778.
- Block E. (1992): The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – implications for the organic chemistry of sulfur. *Angewandte Chemie International Edition in English* **31**, 1135-1178.
- Block G., Patterson B., Subar A. (1992): Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* **18**, 1-29.
- Bonafante P., Genre A. (2008): Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science* **13**, 492-498.
- Brewster J.L. (2008): *Onions and Other Vegetable Alliums*. 2nd ed., CABI North American Office, Cambridge, MA, USA., 448 strán.
- Bridle P., Loeffler R.S.T., Timberlake C.F., Self R. (1984): Cyanidin 3-malonylglucoside in *Cichorium intybus*. *Phytochemistry* **23**, 2968-2969.
- Brown J.E., Khodr H., Hider R.C., Rice-Evans C.A. (1998): Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal* **330**, 1173-1178.
- Cao G., Sofic E., Prior R.L. (1996): Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* **22**, 749-760.
- Caridi D., Trenerry V.C., Rochfort S., Duong S., Laughler D., Jones R. (2007): Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry* **105**, 691-699.
- Chope G.A., Terry L.A., White P.J. (2006): Effect of controlled atmosphere storage on abscisic acid concentration and other biochemical attributes of onion bulbs. *Postharvest Biology and Technology* **39**, 233-242.
- Cimini S., Locato V., Vergauwen R., Paradiso A., Cecchini C., Vandenpoel L., Verspreet J., Courtin C.M., D'Egidio M.G., Van den Ende W., De Gara L. (2015): Fructan biosynthesis and degradation as part of plant metabolism controlling sugar fluxes during durum wheat kernel maturation. *Frontiers in Plant Science* **6**, 89 <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00089>.
- Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. (2009): Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* **26**, 965-1096.

- Currah L., Proctor F.J. (1990): *Onions in Tropical Regions*. Natural Resources Institute Bulletin No. 35, Natural Resources Institute, Chatham Maritime, Kent, UK, 232 strán.
- Cushnie T.P.T., Lamb A.J. (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**, 343-356.
- da Silva L.A., Pezzini B.R., Soares L (2015): Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (*Lamiaceae*) leaves. *Pharmacognosy magazine* **11**, 96-101.
- Darbyshire B., Henry R.J. (1981): Differences in fructan content and synthesis in some *Allium* species. *New Phytologist* **87**, 249-256.
- Day A.J., Cañada F.J., Díaz J.C., Kroon P.A., McLauchlan R., Faulds C.B., Plumb G.W., Morgan M.R., Williamson G. (2000): Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters* **468**, 166-170.
- Dosedělová V. (2018): *Chemická charakterizace šalotky*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Downes K., Terry L.A. (2010): A new acetonitrile-free mobile phase method for LC–ELSD quantification of fructooligosaccharides in onion (*Allium cepa* L.). *Talanta* **82**, 118-124.
- Dvořáčková E., Šnóblková M., Hrdlička P. (2014): Carbohydrate analysis: from sample preparation to HPLC on different stationary phases coupled with evaporative light-scattering detection. *Journal of Separation Science* **37**, 323-337.
- Eady C.C. (2002): Genetic Transformation of Onions. In: *Allium Crop Science: Recent Advances*. (Rabinowitch H.D., Currah L., eds), CAB International, Wallingford, UK, 119-144.
- Eady C.C., Davis S., Farrant J., Reader J., Kenel F. (2003): *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of herbicide resistant onion (*Allium cepa*) plants. *Annals of Applied Biology* **142**, 213-217.
- Ernst M., Bufler G. (1994): Stems of *Allium cepa* L. contain starch. *New Phytologist* **128**, 403-406.
- Ernst M.K., Chatterton N.J., Harrison P.A., Matitschka G. (1998): Characterization of fructan oligomers from species of the genus *Allium* L. *Journal of Plant Physiology* **153**, 53-60.
- Falcone Ferreyra M.L., Rius S.P., Casati P. (2012): Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science* **3**, 222 <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>.
- Ferreres F., Gil M., Tomás-Baberán F. (1996): Anthocyanins and flavonoids from shredded red onion and change during storage in perforated films. *Food Research International* **29**, 389-395.
- Fossen T., Andersen Ø.M., Øvstedal D.O., Pedersen A.T., Raknes Å. (1996): Characteristic anthocyanin pattern from onions and other *Allium* spp. *Journal of Food Science* **61**, 703-706.
- Fraser C.M., Chapple C. (2011): The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* **9**, e0152 <https://doi.org/10.1199/tab.0152>.
- Fredotović Z., Puizina J. (2019): Edible *Allium* species: Chemical composition, biological activity and health effects. *Italian Journal of Food Science* **31**, 19-39.
- Friesen N., Fritsch R., Blattner F.R. (2006): Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* L. (*Alliaceae*) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso* **22**, 372-395.
- Fritsch R.M., Friesen N. (2002): Evolution, Domestication and Taxonomy. In: *Allium Crop Science: Recent Advances*. (Rabinowitch H.D., Currah L., eds), CAB International, Wallingford, UK, 5-30.
- Garrett R.H., Grisham C.M. (2015): *Biochemistry*. 5th ed., Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, CA, 1169 strán.
- Gasperl A., Morvan-Bertrand A., Prud'homme M., van der Graaff E., Roitsch T. (2015): A Simple and Fast Kinetic Assay for the Determination of Fructan Exohydrolase Activity in Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Frontiers in Plant Science* **6**, 1154 <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01154>.
- Giovanni A., Brunetti C., Di Ferdinando M., Ferrini F., Pollastri S., Tattini M. (2013): Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry* **72**, 35-45.

- Havsteen B.H. (2002): The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **96**, 67-202.
- Herrmann K.M., Weaver L.M. (1999): The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 473-503.
- Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Katan M.B. (1992): Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 2379-2383.
- Hirota S., Shimoda T., Takahama U. (1998): Tissue and spatial distribution of flavonol and peroxidase in onion bulbs and stability of flavonol glucosides during boiling of the scales. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 3497-3502.
- Hrabovský M., Zahradníková E., Mičieta K. (2016): Proposal of Slovak names for angiosperm phylogeny group classification of flowering plants: APG IV. *Acta Botanica UC* **51**, 9-21.
- Ignat I., Volf I., Popa V.I. (2011): A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**, 1821-1835.
- Iwashina T. (2000): The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research* **133**, 287-299.
- Jammer A., Gasperl A., Luschin-Ebengreuth N., Heyneke E., Chu H., Cantero-Navarro E., Großkinsky D.K., Albacete A.A., Stabentheiner E., Franzaring J., Fangmeier A., Van der Graaff E., Roitsch T. (2015): Simple and robust determination of the activity signature of key carbohydrate metabolism enzymes for physiological phenotyping in model and crop plants. *Journal of Experimental Botany* **66**, 5531-5542.
- Jones D.G. (1985): Photodiode array detectors in UV-VIS spectroscopy: part I. *Analytical Chemistry* **57**, 1057-1073.
- Jones M.G., Hughes J., Tregova A., Milne J., Tomsett A.B., Collin A. (2004): Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1903-1918.
- Kawakami A., Yoshida M., Van den Ende W. (2005): Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* **358**, 93-101.
- Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. (2013): Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**, 2328-2375.
- Krivorotova T., Sereikaite (2014): Determination of fructan exohydrolase activity in the crude extracts of plants. *Electronic Journal of Biotechnology* **17**, 329-333 <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.09.005>.
- Kuhn B.M., Geisler M., Bigler L., Ringli C. (2011): Flavonols Accumulate Asymmetrically and Affect Auxin Transport in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **156**, 585-595.
- Kumar S., Pandey A.K. (2013): Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal* **2013**, 162750 <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/>.
- Lamari F.N., Kuhn R., Karamanos N.K. (2003): Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *Journal of Chromatography B* **793**, 15-36.
- Lancaster J.E., Shaw M.L., Walton E.F. (2000): S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, alliinase and aroma in *Leucocoryne*. *Phytochemistry* **55**, 127-130.
- Lorbeer J.W., Kuhar T.P., Hoffmann M.P. (2002): Monitoring and Forecasting for Disease and Insect Attack in Onions and *Allium* Crops within IPM Strategies. In: *Allium Crop Science: Recent Advances*. (Rabinowitch H.D., Currah L., eds), CAB International, Wallingford, UK, 293-309.
- Major N., Goreta Ban S., Urlić B., Ban D., Dumičić G., Perković J. (2018): Morphological and Biochemical Diversity of Shallot Landraces Preserved Along the Croatian Coast. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1749 <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01749>.
- Masarovičová E., Repčák M. (2002): *Fyziológia rastlín*. 1. vyd., Univerzita Komenského, Bratislava, 303 strán.
- Matilla P., Astola J., Kumpulainen J. (2001): Determination of Flavonoids in Plant Material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array Detections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 5834-5841.

- Miedema P. (1994a): Bulb dormancy in onion. I. The effects of temperature and cultivar on sprouting and rooting. *Journal of Horticultural Science* **69**, 29-39.
- Miedema P. (1994b): Bulb dormancy in onion. II. The role of cytokinins in high temperature imposed sprout inhibition. *Journal of Horticultural Science* **69**, 41-45.
- Miedema P. (1994c): Bulb dormancy in onion. III. The influence of the root system, cytokinin, and wounding on sprout emergence. *Journal of Horticultural Science* **69**, 47-52.
- Mourey T.H., Oppenheimer L.E. (1984): Principles of Operation of an Evaporative Light-Scattering Detector for Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **56**, 2427-2434.
- Muir J.G., Shepherd S.J., Rosella O., Rose R., Barrett J.S., Gibson P.R. (2007): Fructan and free fructose content of common Australian vegetables and fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 6619-6627.
- Nabi G., Rab A., Sajid M., Farhatullah D., Sayed J.A., Ali I. (2013): Influence of curing methods and storage conditions on the post-harvest quality of onion bulbs. *Pakistan Journal of Botany* **45**, 455-460.
- Naczki M., Shahidi F. (2004): Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* **1054**, 95-111.
- Nicastro H.L., Ross S.A., Milner J.A. (2015): Garlic and Onions: Their Cancer Prevention Properties. *Cancer Prevention Research* **8**, 181-189.
- O'Donoghue E.M., Somerfield S.D., Shaw M., Bendall M., Hedderly D., Eason J., Sims I. (2004): Evaluation of Carbohydrates in Pukekohe Longkeeper and Grano Cultivars of *Allium cepa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 5383-5390.
- Ohanenye I.C., Alamar M.C., Thompson A.J., Terry L.A. (2019): Fructans redistribution prior to sprouting in stored onion bulbs is a potential marker for dormancy break. *Postharvest Biology and Technology* **149**, 221-234.
- Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. (2016): Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* **5**: e47 <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
- Patil B.S., Pike L.M. (1995): Distribution of quercetin content in different rings of various coloured onion (*Allium cepa* L.) cultivars. *Journal of Horticultural Science* **70**, 643-650.
- Petropulos S.A., Ntatsi G., Ferreira I.C.F.R. (2016): Long-term storage of onion and the factors that affect its quality: A critical review. *Food Reviews International* **33**, 62-83.
- Petrussa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A. (2013): Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 14950-14973.
- Price K.R., Bacon J.R., Rhodes M.J.C. (1997): Effect of Storage and Domestic Processing on the Content and Composition of Flavonol Glucosides in Onion (*Allium cepa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 938-942.
- Puizina J. (2013): Shallots in Croatia – genetics, morphology and nomenclature. *Acta Botanica Croatica* **72**, 387-398.
- Putnik P., Gabrić D., Roohinejad S., Barba F.J., Granato D., Mallikarjunan K., Lorenzo J.M., Bursać Kovačević D. (2019): An Overview of Organosulfur Compounds from *Allium* spp.: From Processing and Preservation to Evaluation of Their Bioavailability, Antimicrobial, and Anti-inflammatory Properties. *Food Chemistry* **276**, 680-691.
- Randle W.M., Lancaster J.E. (2002): Sulphur Compounds in Alliums in Relation to Flavour Quality. In: *Allium Crop Science: Recent Advances*. (Rabinowitch, H.D., Currah, L., eds), CAB International, Wallingford, UK, 329-356.
- Ratty A.K., Das N.P. (1988): Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* **39**, 69-79.
- Redgwell R.J., Selvendran R.R. (1986): Structural features of cell-wall polysaccharides of onion *Allium cepa*. *Carbohydrate Research* **157**, 183-199.
- Revanna R., Turnbull M.H., Shaw M.L., Wright K.M., Butler R.C., Jameson P.E., McCallum J.A. (2013): Measurement of the distribution of non-structural carbohydrate composition in onion populations by a high-throughput microplate enzymatic assay. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**, 2470-2477.
- Robinson J.E., Browne K.M., Burton W.G. (1975) Storage characteristics of some vegetables and soft fruits. *Annals of Applied Biology* **81**, 399-408.

- Rutherford P.P., Whittle R.E. (1982): The carbohydrate composition of onions during long term cold storage. *Journal of Horticultural Science* **57**, 349-356.
- Saito K., Yonekura-Sakakibara K., Nakabayashi R., Higashi Y., Yamazaki M., Tohge T., Fernie A.R. (2013): The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry* **72**, 21-34.
- Sami F., Yusuf M., Faizan M., Faraz A., Hayat S. (2016): Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **109**, 54-61.
- Schmitz-Hoerner R., Weissenböck G. (2003): Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry* **64**, 243-255.
- Shadbolt C.A., Holm L.G. (1956): Some Quantitative Aspects of Weed Competition in Vegetable Crops. *Weeds* **4**, 111-123.
- Sharma K., Assefa A.D., Ko E.Y., Lee E.T., Park S.W. (2015): Quantitative analysis of flavonoids, sugars, phenylalanine and tryptophan in onion scales during storage under ambient conditions. *Journal of Food Science and Technology* **52**, 2157-2165.
- Sharma K., Lee Y.R. (2016): Effect of different storage temperature on chemical composition of onion (*Allium cepa* L.) and its enzymes. *Journal of Food Science and Technology* **53**, 1620-1632.
- Shiomi N. (1989): Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in Liliaceous plants. *Journal of Plant Physiology* **134**, 151-155.
- Singh B., Kumar A., Malik A.K. (2017): Flavonoids biosynthesis in plants and its further analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **38**, 820-832.
- Stalikas C.D. (2007): Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* **30**, 3268-3295.
- Swartz M. (2010): HPLC Detectors: A Brief Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **33**, 1130-1150.
- Tanaka M., Chee K., Komochi S. (1985): Studies on the storage of autumn harvested onion bulbs. I. Influence of storage temperature and humidity on the sprouting during storage. *Research Bulletins of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station* **141**, 1-16.
- Tocmo R., Liang D., Lin Y., Huang D. (2015): Chemical and biochemical mechanisms underlying the cardioprotective roles of dietary organopolysulfides. *Frontiers in Nutrition* **2**, 1 <https://doi.org/10.3389/fnut.2015.00001>.
- Tzin V., Galili G. (2010). The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book* **8**: e0132 <https://doi.org/10.1199/tab.0132>.
- Ueno K., Yokoshima S., Sasajima Y., Ishiguro Y., Yoshida M., Shiomi N., Onodera S. (2015): Two fructan 1-exohydrolase isoforms hydrolyze fructans in edible burdock (*Arctium lappa* L.) during storage at a low temperature. *Journal of Applied Glycoscience* **62**, 65-72.
- Van Damme E.J., Derycke D.G. (1983): Microbial inulinases. Fermentation process, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology* **29**, 139-176.
- Van den Ende W., Clerens S., Vergauwen R., Van Riet L., Van Laere A., Yoshida M., Kawakami A. (2003): Fructan 1-exohydrolases: beta-(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat (*Triticum aestivum* L.)? Purification, characterization, mass mapping and cloning of two 1-FEH isoforms. *Plant Physiology* **131**, 621-631.
- Van den Ende W., De Coninck B., Van Laere A. (2004): Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Trends in Plant Science* **9**, 523-528.
- Van den Ende W., Michiels A., De Roover J., Verhaert P., Van Laere A. (2000): Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. *The Plant Journal* **24**, 447-456.
- Van den Ende W., Michiels A., Van Wouterghem D., Clerens S.P., De Roover J., Van Laere A.J. (2001): Defoliation induces 1-FEH II (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEH IIa and 1-FEH IIb). Mass fingerprint of the 1-FEH II enzymes. *Plant Physiology* **126**, 1186-1195.

- Van den Ende W., Mintiens A., Speleers H., Onuoha A.A., Van Laere A. (1996): The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* L. during growth, storage and forcing. *New Phytologist* **132**, 555-563.
- Van den Ende W., Yoshida M., Clerens S., Vergauwen R., Kawakami A. (2005): Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist* **166**, 917-932.
- Van Laere A., Van den Ende W. (2002): Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell & Environment* **25**, 803-815.
- Van Riet L., Nagaraj V., Van den Ende W., Clerens S., Wiemken A., Van Laere A. (2006): Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* **57**, 213-223.
- Vijn I., Smeekens S. (1999): Fructan: More Than a Reserve Carbohydrate? *Plant Physiology* **120**, 351-359.
- Vogt T. (2010): Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant* **3**, 2-20.
- Ward C.M., Tucker W.G. (1976): Respiration of maleic hydrazide treated and untreated onion bulbs during storage. *Annals of Applied Biology* **82**, 135-141.
- Wheeler E.J., Mashayekhi S., McNeal D., Columbus J.T., Pires J.C. (2013): Molecular systematics of *Allium* subgenus *Amerallium* (*Amaryllidaceae*) in North America. *American Journal of Botany* **100**, 701-711.
- Winter H., Huber S.C. (2000): Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 253-289.
- Yaguchi S., McCallum J., Shaw M., Pither-Joyce M., Onodera S., Shiomi N., Yamauchi N., Shigyo M. (2008): Biochemical and Genetic Analysis of Carbohydrate Accumulation in *Allium cepa* L. *Plant & Cell Physiology* **49**, 730-739.
- Yoo K.S., Andersen C.R., Pike L.M. (1997): Internal CO₂ concentrations in onion bulbs at different storage temperatures and in response to sealing of the neck and base. *Postharvest Biology and Technology* **12**, 157-163.
- Yu O., McGonigle B. (2005): Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis. *Advances in Agronomy* **86**, 147-190.
- Yun J.W. (1996): Fructo-oligosaccharides – occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology* **19**, 107-117.
- Zerback R., Dressler K., Hess D. (1989): Flavonoid compounds from pollen and stigma of *Petunia hybrida*: Inducers of the *vir* region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Plant Science* **62**, 83-91.
- Zhang A., Sun H., Wang P., Han Y., Wang X. (2012): Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst* **137**, 293-300.
- Zheng S.J., Henken B., de Maagd R.A., Purwito A., Frens F.A., Kik C. (2005): Two different *Bacillus thuringiensis* toxin genes confer resistance to beet army worm (*Spodoptera exigua* Hubner) in transgenic Bt-shallots (*Allium cepa* L.). *Transgenic Research* **14**, 261-272.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

1-FEH	fruktán-1-exohydroláza
1-FFT	fruktán:fruktán-1-fruktozyltransferáza
1-SST	sacharóza:sacharóza-1-fruktozyltransferáza
6-SFT	sacharóza:fruktán-6-fruktozyltransferáza
ABA	kyselina abscisová
ACSO	S-alk(en)yl-L-cysteínsulfoxidy
DAD	detektor diódového poľa
DAHP	3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfát
DP	stupeň polymerizácie
DW	suchá hmota
ELSD	odparovací detektor rozptylu svetla
EPSP	5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát
HPAEC	vysokoúčinná aniónová chromatografia
LPH	laktáza-florizinhydroláza
ROS	reaktívne formy kyslíku
UFGT	antokyanidín-3-O-glukozyltransferáza
QDG	kvercetín-3,4'-O-diglukozid
QMG	kvercetín-4'-O-glukozid
Q	aglykón kvercetínu