

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2023**

**Jana Pokorná**

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biologie**

**Dynamika osmoticky aktivních látek v pupenech  
ovocných stromů**

Bakalářská práce

Autor: Jana Pokorná  
Studijní program: B0511A030001 Biologie a ekologie  
Studijní obor: Biologie a ekologie  
Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.

Hradec Králové

květen 2023



## Zadání bakalářské práce

**Autor:** Jana Pokorná

Studium: S20BI017BP

Studijní program: B0511A030001 Biologie a ekologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

**Název bakalářské práce:** **Dynamika osmoticky aktivních látek v pupenech ovocných stromů.**

Název bakalářské práce AJ: Dynamics of osmotically active substances in the buds of fruit trees.

### **Cíl, metody, literatura, předpoklady:**

V posledních letech dochází k častému výskytu mrazů v období, kdy jsou již ovocné dřeviny po ekodormanci v prvních fázích rašení a bývají tímto jevem poškozovány, především generativní orgány. Častější mrazové poškození je díky dřívějšímu vstupu rostlin do vegetace, až o 3 týdny oproti dřívějším dekadám. Tento jev se s velkou pravděpodobností bude opakovat, v horším případě prohlubovat. Právě změny v akumulaci osmoticky aktivních látek, jako například aminokyselin (zejména prolinu) a produktů metabolismu sacharidů, jsou vhodným markérem pro posouzení míry stresu a můžou pomoci při odhadování míri tolerance/senzitivity vybraných odrůd ovocných stromů.

odobrné publikace dostupné ve vědeckých databázích

Zadávací pracoviště: Katedra biologie,  
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

# **PROHLÁŠENÍ**

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

V Hradci Králové dne

Jana Pokorná



## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych velmi poděkovala vedoucí své práce RNDr. Zuzaně Kovalíkové, Ph.D. za skvělé vedení bakalářské práce, za trpělivost, pomoc a za čas, který mi při vypracování práce věnovala.

Poděkování také patří Výzkumnému a šlechtitelskému ústavu ovocnářskému v Holovousech za poskytnutí materiálu k experimentům a Národní agentuře pro zemědělský výzkum za finanční podporu v rámci projektu QK21010200 (Šlechtění ovocných druhů na odolnost k abiotickým vlivům v kombinaci s vysokým obsahem antioxidantů v plodech).

Nakonec bych také chtěla poděkovat svým rodičům, kteří mě podporovali a trpělivě četli každou část mé bakalářské práce.

# ANOTACE

POKORNÁ, J. *Dynamika osmoticky aktivních látek v pupenech ovocných stromů*, Hradec Králové, 2023. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Zuzana Kovalíková. 66 s.

Cílem bakalářské práce bylo sledovat dynamiku osmoticky aktivních látek (cukry, cukerné alkoholy a prolin) v pupenech vybraných tolerantních a senzitivních genotypů dvou ovocných stromů v různých fenofázích vývoje pupene s cílem zhodnotit, jak spolu souvisí obsah stanovených látek a citlivost daného genotypu.

Ve vztahu k citlivosti nebo odolnosti jednotlivých genotypů byl trend u obou druhů odlišný. Genotypy meruněk považované za tolerantnější vykazovaly buď hodnoty měřených cukrů nižší, popřípadě změny s přechodem mezi fenofázemi nebyly tak markantní. U třešní tomu bylo přesně naopak, kdy vyšší hodnoty cukrů byly zaznamenány u tolerantnějších genotypů. Jasný vztah mezi obsahem prolinu a citlivosti genotypů nebyl prokázán.

## Klíčová slova

Osmoticky aktivní látky, cukry, prolin, meruňky, třešně, pupeny

# ANNOTATION

POKORNÁ, J., *Dynamics of osmotically active substances in the buds of fruit trees*. Hradec Králové, 2023. Bachelor thesis at Faculty of Science, University of Hradec Králové. Thesis supervisor Zuzana Kovalíková. 66 p.

The aim of the bachelor's thesis was to monitor the dynamics of osmotically active substances (sugars, sugar alcohols and proline) in the buds of selected tolerant and sensitive genotypes of two fruit trees in different phenophases of bud development with the aim of evaluating how the content of the determined substances and the sensitivity of the given genotype are related.

In relation to the sensitivity or resistance of individual genotypes, the trend was different for both species. Apricot genotypes considered to be more tolerant either showed lower values of measured sugars, or the changes with the transition between phenophases were not so striking. It was exactly the opposite in case of cherries, where higher sugar values were recorded for more tolerant genotypes. A clear relationship between the proline content and the sensitivity of the genotypes was not demonstrated.

## Keywords

Osmotically active compounds, sugars, proline, apricot, cherry, buds

# Obsah

Úvod.....	8
1. Teoretická část.....	9
1.1. Pupen .....	9
1.1.1. Typy pupenů.....	9
1.1.2. Ochrana pupenu .....	12
1.1.3. Fyziologie pupenů .....	12
1.2. Rostlinný stres.....	17
1.2.1. Reakce rostlin na vodní deficit .....	18
1.2.2. Reakce rostlin na nízké teploty .....	19
1.2.3. Osmotický stres a osmotické vyrovnání .....	21
1.2.4. Osmoticky aktivní látky .....	21
2. Praktická část.....	34
1.3. Materiál a metody .....	34
1.3.1. Rostlinný materiál .....	34
1.3.2. Charakteristika vybraných genotypů.....	36
1.3.3. Stanovení cukrů a cukerných alkoholů .....	39
1.3.4. Stanovení prolinu.....	39
1.3.5. Statistické zpracování dat.....	39
1.4. Výsledky .....	40
1.4.1. Obsah prolinu .....	40
1.4.2. Obsah cukrů a cukerných alkoholů .....	41
3. Diskuze .....	45
Závěr .....	51
Seznam použité literatury .....	52
Přílohy.....	59

## Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
ATP	adenosintrifosfát
BBCH51	fenofáze nalévání pupene
BBCH53	fenofáze počátku rašení pupene
BBCH59	fenofáze balonu
COI	chladem indukované proteiny (Cold Induced Proteins)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid
FW	čerstvá hmotnost (fresh weight)
GA	kyselina giberelinová
HSP	proteiny teplotního šoku (Heat Shock Proteins)
IAA	auxin
Ick1	cyklin-dependentní-kináza
LEA	Late Embryogenesis Abundant proteiny
mRNA	messengerová RNA
NAD <sup>+</sup>	oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotid
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADP <sup>+</sup>	oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfát
P5C	pyrrolin-5-karboxylát
P5CDH	pyrrolin-5-karboxylát dehydrogenáza
P5CS	pyrrolin-5-karboxylát syntáza
P5CR	pyrrolin-5-karboxylát reduktáza
ProDH	prolin hydrogenáza
RFO	rafinozová rodina oligosacharidů
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	radioaktivní formy kyslíku
VŠÚO	Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský s.r.o., Holovousy

## Úvod

Česká republika je jednou ze zemí, která má vhodné půdní a klimatické podmínky pro pěstování velké většiny ovoce, které je nedílnou součástí jídelníčku. Ovšem v posledních letech dochází k častému výskytu jarních mrazů v období, kdy jsou již ovocné dřeviny po ekodormanci, tedy v prvních fázích rašení pupenů. Jarní mráz má tedy na svědomí převážně poškození generativních orgánů. Důsledky klimatických změn jsou v zemědělství patrné především v dřívějším nástupu vegetačních fází rostlin (dřívější rašení, kvetení i zrání), v celkovém prodlužování délky vegetační sezóny (umožnění pěstovat plodiny s delší dobou vegetace), dále zvýšená extremita srážek i jejich rozložení během roku (výskyt zemědělského sucha i přívalové srážky). Navíc zůstávají zachovány cykly vpádů arktického vzduchu do jižních oblastí, což má za následek výskyt pozdních jarních mrazů. Se změnou abiotických faktorů (hlavně nárůst průměrné teploty) dochází k rozšiřování areálu výskytu škodlivých organismů z jihu do severních oblastí. Tyto nepříznivé jevy se s velkou pravděpodobností budou opakovat, v horším případě prohlubovat. Z těchto důvodů je velmi důležité pochopit jaké jsou možnosti tolerance rostlin k mrazu a suchu.

Tolerance k nízkým a mrazovým teplotám závisí na mnoha biochemických procesech, přičemž součet těchto procesů určuje míru tolerance. Některé z těchto procesů jsou fytohormonálně závislé a jsou vyvolány krátkými dny, jiné jsou závislé na aktivitě různých enzymových systémů a na teplotě (Nilsson a Eriksson, 1986). Krátkodobě působící teploty blízké nule indukují procesy chladové aklimatizace, což vede ke zvýšené toleranci k mrazu (Chinnusamy et al., 2006). V případě působení nízké teploty na rostliny dochází ke změnám struktury buněk, ale také jednotlivých orgánů, kdy se buněčný obsah zahušťuje - dochází ke zvýšené syntéze osmoticky aktivních látek, jakou jsou např. cukry, cukerné alkoholy nebo aminokyseliny, zejména prolin.

Právě proto změny v akumulaci prolinu a produktů metabolismu sacharidů (zejména glukózy, sacharózy a cukerných alkoholů) jsou vhodnými markéry pro posouzení míry stresu a mohou pomoci při odhadování míry tolerance/senzitivity vybraných odrůd ovocných stromů (Jiménez et al., 2013; Kautz et al., 2015; Rickes et al., 2019).

Bakalářská práce je zaměřena na sledování dynamiky osmoticky aktivních látek (cukrů, cukerných alkoholů a prolinu) v pupenech vybraných tolerantních a senzitivních genotypů dvou ovocných stromů (meruňka a třešeň) v různých fenofázích vývoje pupene, s cílem zhodnotit, jak spolu souvisí obsah stanovených látek a citlivost daného genotypu třešňi a meruňky.

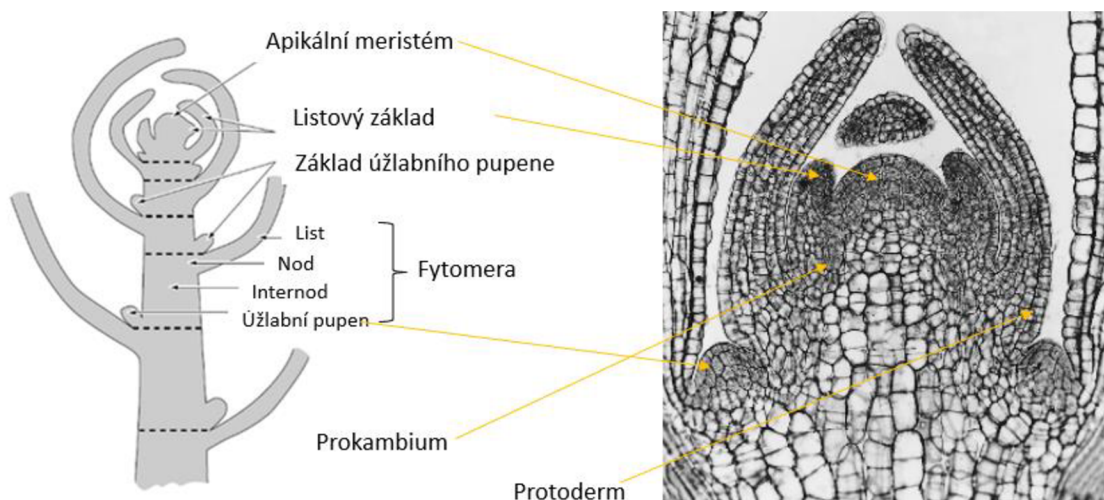
# 1. Teoretická část

## 1.1. Pupen

### 1.1.1. Typy pupenů

Pupen je nejmladší vývojové stádium výhonku, který nese základy všech orgánů, jež se na starším výhonku brzy objeví. Dle typu orgánů, které se z pupenů vyvinou, je můžeme rozdělit do třech typů: listové, květní a smíšené. Listové pupeny obsahují pouze základy listů a jedná se spíše o menší a špičaté pupeny. Květní pupeny nesou základ květu nebo celého květenství a jedná se o větší a kulatější pupeny. Smíšené pupeny obsahují základy listů i květů (Bobák et al., 1992; Votrubová, 1997).

Dle postavení na stonku můžeme pupeny dále rozlišit na terminální (vrcholové) a úžlabní (axilární). Apikální vrchol stonku je tvořen vrcholovým pupenem, který ukončuje vrchol stonku a uzavírá apikální meristém. Apikální meristém se svojí dělivou funkcí podílí na lineárním růstu mateřského stonku. Nad jejich listovými primordiemi se vytvářejí základy úžlabních pupenů. Zvýšenou dělivou funkcí meristematických buněk se z listových primordií vyvinou podpůrné listy, a ze základu pupenu v jejich úžlabí se vyvinou úžlabní pupeny (Obr. 1). Vrcholový pupen si stále udržuje svoji apikální pozici, proto listové základy a úžlabní pupeny, které jsou vrcholu blíže, jsou mladší a méně diferencované než části vzdálenější od apikálního vrcholu (Beck, 2010; Bobák et al., 1992).

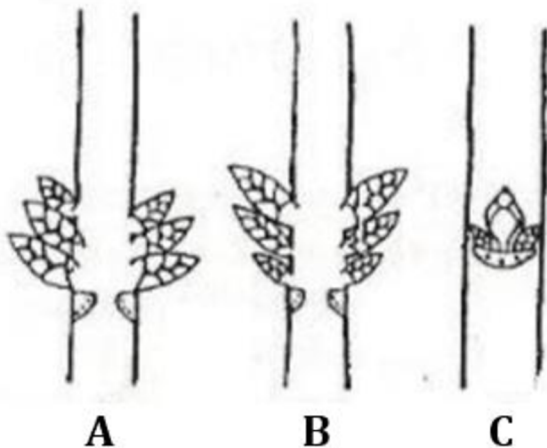


Obr. 1: Schématický (vlevo) a mikroskopický řez (vpravo) růstovým vrcholem lnu setého (*Linum usitatissimum*) (upraveno dle Evert, 2006).

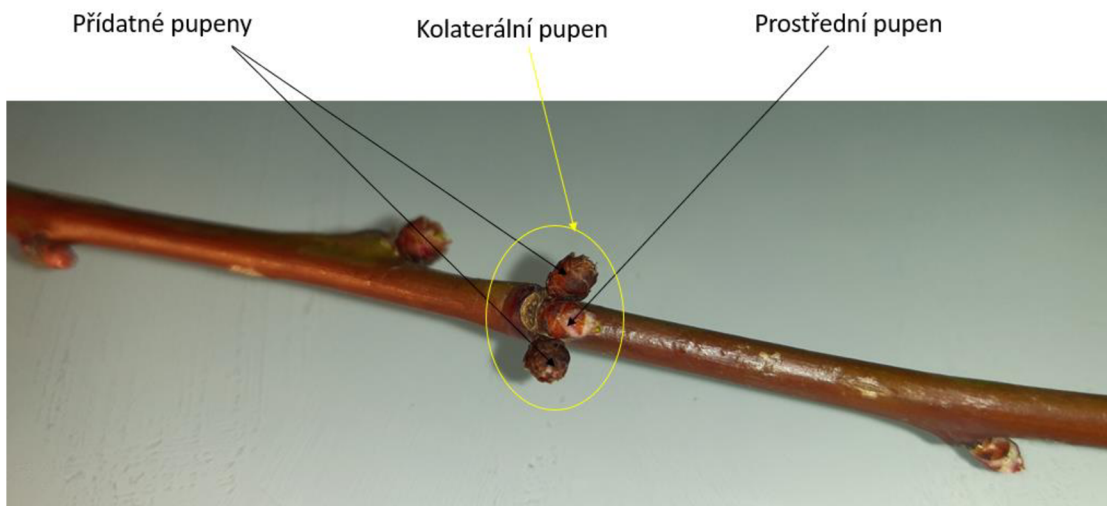
Axilární pupen představuje pomyslnou samostatnou jednotku. To znamená, že produkuje vlastní reprodukce-schopné části, ze kterých vyrůstají základy

postranních prýtu s dalšími úžlabními pupeny. Jejich množství a vývoj závisí na vnějších podmínkách (např. na množství dostupných živin, dostatku vody nebo světla) a vnitřních podmínkách (rostlinný druh, hladina fytohormonů). Růst pupenů je ve velké míře ovlivňován fytohormony – mezi ty nejdůležitější patří auxiny a cytokininy. Auxiny obecně v růstu pupenů brání a cytokininy naopak růst pupenů podporují (Bobák et al., 1992; Evert, 2006). Laterální pupeny jsou pod vlivem apikálních pupenů, které potlačují jejich buněčné dělení a zvětšování buněk. To je zajištěno pohybem auxinu z vrcholového výhonku k bázi rostliny, kde působí inhibičně na okolí laterálních pupenů. Pokud dojde k poškození nebo oddělení vrcholového výhonku, množství auxinu okolo laterálních pupenů se sníží, což má za následek jejich růst (Kochhar a Gujral, 2020).

V úžlabí podpůrného listu se vyvíjí buď jeden úžlabní pupen, a to uprostřed, nebo se jich vyvíjí více. Pokud je pupenů více, rozlišujeme je dle postavení na kolaterální a seriální pupeny (Obr. 2). Kolaterální pupeny se vyskytují hlavně u jednoděložných rostlin, které mají většinou širokou listovou bázi. Pupy jsou uloženy vedle sebe, přičemž jako první se zakládá prostřední pupen. Další pupeny se zakládají později a označují se jako přídatné neboli akcesorické. Kolaterální pupeny se mohou vyskytovat i u dvouděložných – např. u třešně nebo meruňky (Obr. 3). Seriální pupeny se vyskytují většinou u dvouděložných rostlin a jsou umístěny nad sebou. Postupnost vzniku i rozvoje je dvojaká. Nejčastěji se rozvíjí shora-dolů, směrem do pazuchy listu – seriální pupeny sestupné (Obr. 2B). Méně často se zakládají opačně, tedy zdola-nahoru, od pazuchy listu – seriální pupeny vzestupné (Obr. 2A) (Bobák et al., 1992; Evert, 2006; Slavíková, 2002).



Obr. 2 Typy úžlabních pupenů: A- seriální pupeny vzestupné; B – seriální pupeny sestupné; C – kolaterální pupeny (upraveno dle Slavíková, 2002).



Obr. 3 Kolaterální pupeny na větévce meruňky (foto: Z. Kovalíková).

Charakteristickým znakem krytosemenných rostlin je úzký vztah mezi podpůrným listem a úžlabním pupenem. Jednotlivé části se vyvíjejí pod přímým vlivem druhé části. Podpůrný list se také podílí na ochraně před mechanickým poškozením a před nadměrným výparem z úžlabního pupenu. Postavení axilárních pupenů je jedním z poznávacích znaků určitých taxonů. U nahosemenných rostlin se úžlabní pupeny zakládají jen v úžlabí některých listů, a to převážně těch, které jsou v blízkosti vrcholu výhonku. Kdežto u krytosemenných rostlin se úžlabní pupeny zakládají v úžlabí všech listů a listenů, vyjma listenů květních obalů (Bobák et al., 1992; Slavíková, 2002).

Jednotlivé pupeny se od sebe liší jak v rámci druhů, tak i v rámci jedné rostliny. Odlišují se časem založení, rychlostí růstu, velikostí, počtem založených listových základů a charakterem výhonku, který se z nich vyvinul. Květní výhonek se vyvíjí buď ze středního pupene u kolaterálních pupenů nebo ze spodního pupene u seriálních pupenů. Zbylé pupeny vytvářejí listové výhonky. U téměř všech stromů se pupeny zvětšují od báze směrem k vrcholu stonku (akrotonické větvení). Vrcholové (periferní, okrajové) pupeny se vyvíjejí v dlouhé větve. Ty umožňují listům přijmout nejkvalitnější světlo. Květní pupeny jsou zakládány níže než listové a spící pupeny jsou zakládány nejnižší (Bobák et al., 1992; Slavíková, 2002).

U bylin se vyvíjejí axilární pupeny ve větve ve stejném roce, kdy byly založeny. U dřevin se pupeny zakládají na nejmladších částech stonků, dobře viditelné po opadnutí listů. Tyto pupeny přes zimu odpočívají a v dalším vegetačním období se vyvíjí v boční výhonky. U některých pupenů byl růst a následný vývoj zastaven. Tyto tzv. spící pupeny mohou v neaktivním stádiu zůstat i desetiletí. Jejich další vývoj je podmíněn vnějšími podmínkami. Nejčastějším impulzem k aktivaci bývá nějaký vnější zásah (např. mráz nebo poranění), který poškodí vzrostný vrchol nebo



postranní větve vyrůstající nad spícím pupenem. Většinou se jedná o pupeny listové nebo smíšené, u tropických dřevin to mohou být i květní. Tento jev, při němž se na starších částech kmene rostliny objevují květy nebo květenství, označujeme jako kauliflorie (např. u kakaovníku nebo zmarliky Jidášovy) (Bobák et al., 1992; Slavíková, 2002).

Adventivní (náhradní) pupeny vznikají na různých částech rostliny (mimo pazuchy listů) dle potřeby, mohou se tedy objevit na kořenech či listech. Vznikají bez přímé návaznosti na apikální meristém. Adventivní pupeny často vznikají v oblasti kalusu, kde byla rostlina dříve poškozena, z kambia nebo v pericyklu. Mohou být také produkovány pokožkou. Podle toho z jak hluboko uloženého pletiva vznikají, je dělíme na exogenní (z relativně povrchového pletiva) a endogenní (z hluboko uložených pletiv). Pokud adventivní pupeny vznikají z již diferencovaných pletiv, jejich vytvoření je možné díky dediferenciaci a navození totipotenti buněk (Beck, 2010; Pallardy, 2008). Adventivní pupeny slouží často k vegetativnímu rozmnožování rostlin, kdy se z adventivního pupenu vyvíjí nový prýt, např. podzemní šlahouny u trav tvořeny endogenně z pericyklu (Slavíková, 2002).

### **1.1.2. Ochrana pupenu**

Apikální meristém je chráněn mladými listy, které tvoří pupen. Pokud nedochází k dalšímu vývoji, ani růstu listů, a pupen je ve fázi dormance, tak se některé listy modifikují a vytvoří šupiny. Povrch šupin může být pokryt trichomy nebo speciálním typem emergencí – koletery, které produkují slizy a pryskyřice. Jejich úloha je ochrana před mechanickým poškozením, vyschnutím a před jarními mrazy. Konkrétně dřeviny jsou většinou chráněny kožovitými šupinami – pupenové šupiny, které okolo pupenu tvoří obal. Samotný pupen je před zimou chráněn ještě tím, že obsahuje málo vody (jen 50 %) v porovnání se začátkem jeho vývoje, kdy obsah vody činí až 80 %. Na této ochraně se podílí modifikace vnitřních částí buněk dělivých pletiv, avšak mechanismus není ještě zcela objasněn. Dále může být pupen ukrytý v bázi řapíku, která ho chrání, protože ještě nemá vyvinutou pokožku (např. platan). Byliny a některé stromy pupeny chráněné nemají, tvoří tzv. nahé pupeny. Přechodným typem je chránění pupenu pouze na bázi, tzv. polonahé pupeny (Bobák et al., 1992; Evert, 2006; Slavíková, 2002).

### **1.1.3. Fyziologie pupenů**

Vývoj rostliny lze obecně rozdělit do několika etap, a to embryonální, juvenilní, zralosti a stárnutí. Pro rostlinu v daný okamžik bývá charakteristická pouze jedna fáze. To, že rostlina spadá pouze pod jednu fázi neznámá, že nemůže na sobě mít, jak pupeny s budoucími vegetativními orgány, tak pupeny s budoucími květy. Jedná

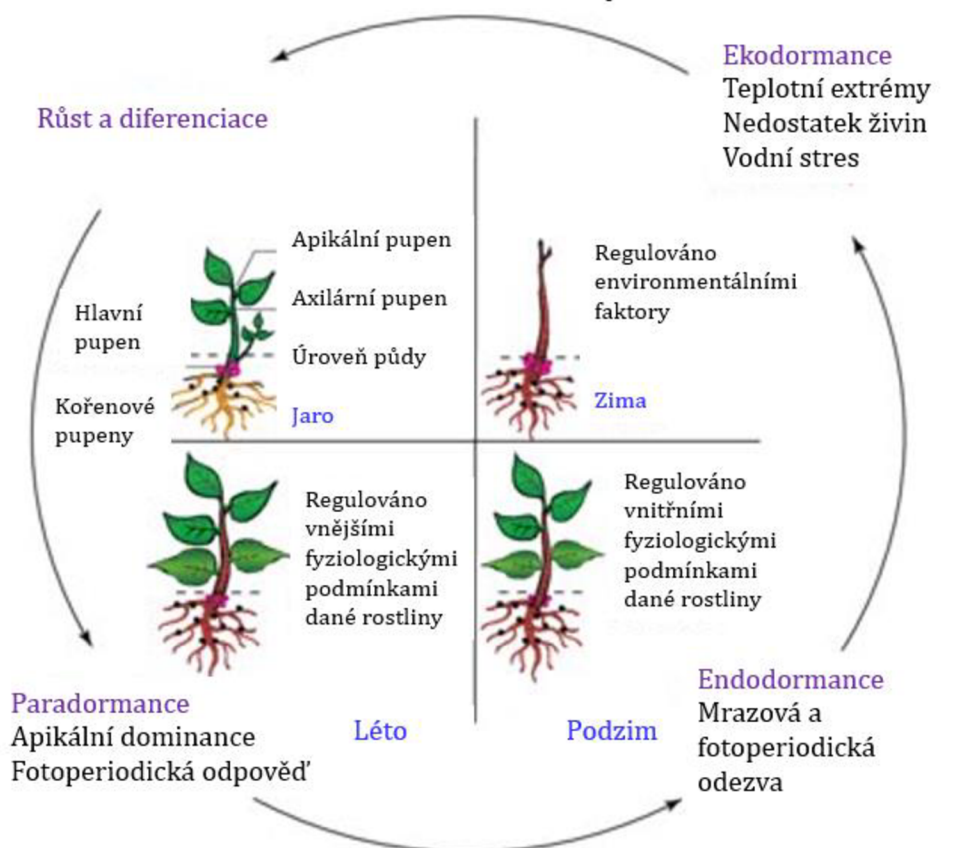
se o tzv. vývojový gradient, kdy pupeny s vegetativními orgány jsou na bázi stonku a pupeny květní, jsou blízko vrcholu. Z hlediska pupenů je nejdůležitější fáze zralosti, kdy dochází k přechodu z vegetativní do generativní fáze. Přejít mezi jednotlivými etapami je zajištěn různými vnějšími a vnitřními faktory. Mezi vnější faktory patří teplota, světlo a dostatek vláhy. Mezi vnitřní faktory lze řadit koncentraci růstových hormonů a zásobních látek. Při nevhodných podmínkách dochází k zpomalení růstu až dormanci (Procházka et al., 1998).

## **Dormance**

Dormanci lze definovat jako dočasné pozastavení viditelného růstu jakékoliv struktury, která v sobě obsahuje meristémy. Představuje mechanismus přežití zajišťující sezonní a environmentální synchronizaci růstu. Morfogenetická funkce dormance je kontrola růstových forem a změn v habitatu rostliny. Proto se dormance týká jen určitých částí, zatímco další pokračují v růstu, což rostlině umožňuje nahradit poškozený primární výhonek. Pro dormanci je typické potlačení buněčného dělení a regulace buněčného cyklu (Olsen, 2003; Pallardy, 2008). Dormance pupenů je regulována vnitřními a vnějšími faktory a také je kontrolována na molekulární úrovni. Regulace dormance pupenů se účastní různé epigenetické mechanismy zahrnující modifikaci histonů, metylaci DNA a syntézu malých nekódujících RNA. Klíčovou roli hrají také fytohormony, které navozují, udržují a uvolňují rostliny z dormance. Dalšími regulátory jsou fytochromy a chemické signály, např. cukry (Ríos et al., 2014).

Lang et al. (1987) zavedli dělení dormance na tři jasně odlišitelné fáze, a to ekodormance, paradormance a endodormance (Obr. 4). Tyto fáze lze rozlišit i podle relativního množství vody a podle množství sacharidů, které odpovídají fyziologii v dané fázi (Kaufman a Blanke, 2017). Ekodormance je způsobena vnějšími faktory prostředí a pomine, pokud jsou podmínky prostředí opět vhodné pro růst rostliny (Cattani et al., 2018; Dai, 2019). Rostlina do ekodormantního stavu přechází, pokud je vystavena vysokým teplotám, nedostatku živin nebo vodnímu stresu (sezonní dormance v oblastech se suchými obdobími). Zde je klidový režim způsoben akumulací ABA, která brání buněčnému dělení v meristému (Dai, 2019). Paradormance je nejlépe prozkoumaná ze tří typů dormancí a někdy se označuje jako apikální dominance nebo korelativní inhibice. Je vynucená signály, které pupen přijímá odjinud z rostliny. Např. axilární pupeny se stávají paradormantními v důsledku apikální dominance terminálního pupene. Pokud ale nastane jeho odstranění, paradormance pomine (Dai, 2019; Horvath et al., 2003). Obecně terminální pupeny dosahují hlubší dormance než axilární, ale její uvolnění je zde snadnější (Olsen, 2003). Endodormance je výsledkem fyziologických změn uvnitř pupenu, které zabraňují předčasnému růstu v období, kdy podmínky prostředí často kolísají mezi těmi, které umožňují nebo inhibují růst. Endodormance poskytuje důležitý mechanismus pro ochranu vegetativních pupenů tím, že zajišťuje, že

meristémy neobnoví svůj růst, dokud se neobnoví stabilní podmínky. Vstupu do endodormance na podzim předchází krátká fotoperioda, nebo nízká teplota (Dai, 2019). Endodormance u mnohých druhů souvisí s chladovou aklimatizací. Ta může u rostlin přetrvat i po přechodu pupenu z endodormance do ekodormance. Tímto mechanismem rostlina zamezuje, aby došlo k obnovení růstu pupenů během krátkodobého nástupu vhodných teplot, např. krátkodobé oteplení v zimě (Dai, 2019; Olsen, 2003).



Obr. 4: Typy dormance a jejich příčiny (upraveno dle Horvath et al. 2003).

Víceleté dřeviny mírného klimatu nerostou ve všech ročních obdobích stejně a sezónnosti se přizpůsobily právě dormancí pupenů. Před nástupem zimního období dochází k zastavení primárního růstu výhonku a k vytvoření pupenů, který v sobě uzavírá meristém výhonku, čímž ho chrání před nepříznivými podmínkami (Dai, 2019). Nově vytvořené pupeny prvně vstupují do reverzibilní fáze nečinnosti neboli paradormance, kdy mají ještě možnost růstu, ale vhodných růstových podmínek je méně, což růst omezuje. Dále dochází k postupnému přechodu do endodormance, kde už nemůže dojít k růstu, i kdyby se vhodné podmínky obnovily. Ukončení dormance je podmíněno dlouhodobým vystavením nízkým teplotám. Předpokládá se, že jednotlivé pupeny nějakým způsobem zaznamenávají dobu, po

kteřou jsou vystaveny chladným teplotám, aby mohly vystoupit z endodormantního stavu. Tato doba je dána geneticky a může se lišit i v rámci jednotlivých kultivarů, což je velmi cenné pro šlechtění rostlin (Cattani et al., 2018; Pallardy, 2008).

Uvolnění pupenů z dormance je obsáhlý proces, který lze rozdělit do několika fází. Pro každou fázi je charakteristická součinnost hormonů a dalších metabolitů, avšak jejich vzájemné interakce, stejně jako jejich jasný účel během uvolňování z dormance, zatím nejsou zcela objasněny. Během 1. fáze dochází k odstranění primárních příčin dormance (zejména enzymů aktivních během chladného období) a přechodu z endodormance do ekodormance. Pro 2. neboli katabolickou fázi, je typická vysoká metabolická aktivita a zvýšení aktivity giberelinů (GA), což podporuje syntézu a aktivaci hydrolytických enzymů a mobilizaci rezervních sacharidů potřebných pro růst. Nalévání pupenu typicky naznačuje přechod z endodormance do ekodormance. Během 3. fáze se zvyšuje množství GA a cytokininů. Dochází k další mobilizaci rezervních sacharidů, stejně tak i ke zvýšení aktivity auxinů, zvýšení mitotické aktivity a úplnému uvolnění z dormance. V této fázi pupen začíná kvést a výhonek se začne vyvíjet (Pallardy, 2008).

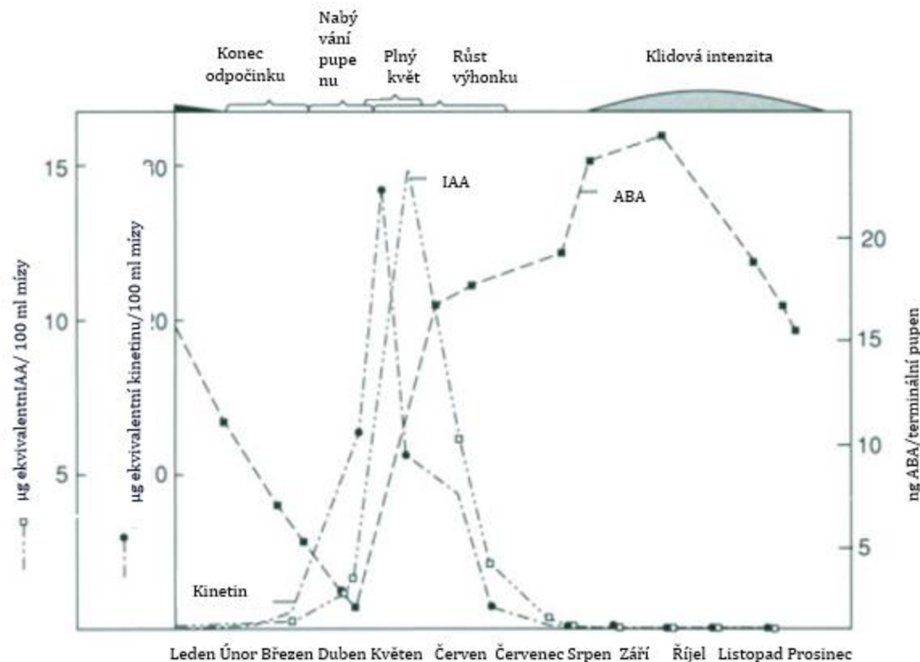
## **Fytohormony**

Indukce, udržování a uvolňování pupenů z dormance jsou složité procesy a liší se podle typu dormance a pupenů. Dlouho se předpokládalo, že rostlinné hormony hrají klíčovou roli v dormanci, což podporovalo i velké množství korelačních důkazů, avšak někdy s protichůdnými zprávami. Rostlinné hormony nejspíše uplatňují své účinky tím, že se podílejí na řízení základních růstových procesů, buněčného dělení a prodlužování buněk (Olsen, 2003).

Po dlouhou dobu se věřilo, že endodormance pupenů je řízena rovnováhou mezi hormony inhibujícími růst (ABA) a podporujícími růst (GA a cytokininy) (Obr. 5). V listnatých stromech se po vystavení krátkým dnům zvyšuje koncentrace ABA i aktivita genů zapojených do její biosyntézy, což značí její zapojení do indukce zastavení růstu a rozvoje dormance pupenů. Problémem je, že u některých stromů (např. jabloně nebo javora klenu) ABA klesala i když byla rostlina vystavena nízké teplotě. To vedlo k závěru, že ABA nemá přímý vliv na kontrolu dormance. Při regulaci dormance pupenů je důležitá spíše citlivost na ABA než samotné změny její hladiny. Její účinek je pravděpodobně závislý i na fyziologickém stavu rostliny (Olsen, 2003; Pallardy, 2008).

GA se podílí na uvolňování z dormance, protože se jejich koncentrace v expandujících pupenech často zvyšuje. Obecně se jejich obsah mnohonásobně zvyšuje před nebo současně s otevíráním pupene, a naopak klesá s přechodem do dormance. Avšak určení konkrétní role GA při uvolňování dormance je

komplikované, protože většina GA v rostlinách je neaktivní a celkové množství GA v pupenech během změn může být tedy zavádějící (Pallardy, 2008).



Obr. 5: Změny růstových hormonů u jabloní během ročního růstového cyklu (upraveno dle Kozłowski a Pallardy, 1997). ABA – kyselina abscisová, IAA - auxin

Existují však náznaky, že ABA působí prostřednictvím indukce inhibitoru cyklin-dependentní-kinázy (Ick1), aby zabránila buněčnému dělení a zachovala dormanci. Antagonistický vztah mezi GA a ABA v procesech souvisejících s dormancí lze alespoň částečně vysvětlit jejich interakcí s Ick1, přičemž GA inhibuje její syntézu a ABA ji stimuluje. Bylo prokázáno, že auxin stimuluje buněčný růst a dělení interakcí s degradací cyklinů a dalších klíčových sloučenin kontroly buněčného dělení. To může být důležité pro účinky auxinu v dormanci pupenů (Olsen, 2003).

Úloha cytokininů při uvolňování dormance byla předpokládána kvůli zvyšujícím se hladinám během růstu pupenů a stimulaci růstu pupenů exogenními cytokininy. Avšak jejich role není úplně jasná, pravděpodobně stimuluje růst pupenů po uvolnění z dormance, ale přímo ho neovládají (Pallardy, 2008).

Auxin je jedním z nejdůležitějších fytohormonů a má vliv na apikální dominanci. Pokud dojde k odstranění apikálního vrcholu či přestane být auxin transportován do vrcholu, dojde k aktivaci úžlabních pupenů. Zjednodušeně lze říci, že auxiny jsou antagonisté cytokininů (Procházka et al., 1998).

## Dýchání pupenů

Rychlost dýchání jednotlivých pupenů, v rámci jednoho stromu, se liší podle velikosti pupenů a podle množství jejich metabolicky aktivního pletiva. Mnoho pupenů se ani neotevře nebo odumře. Velikost pupenů v rámci stromu je téměř zanedbatelná, ovšem během vegetačního období jsou pupeny velmi fyziologicky aktivní. Během dormance je aktivita dýchání stabilní a velmi nízká. S naléváním pupenů na jaře se rychlost dýchání mnohonásobně zvětšuje. Bylo také dokázáno, že šupiny pupenu, které slouží k ochraně, brání vstupu kyslíku do pupenu a tím zpomalují dýchání (Pallardy, 2008).

## Dynamika sacharidů v pupenech

Vegetativní i květní pupeny akumulují sacharidy během posledních fází svého vývoje. Jednotlivé typy sacharidů uložených v pupenech se u jednotlivých druhů liší. Neaktivní pupeny borovice Monterey měly vysoké koncentrace rozpustných sacharidů, ale málo škrobu, zatímco hlavní sacharidy dormantních pupenů hrušně byly sacharóza a sorbitol. Pupeny rododendronu akumulovaly glukózu, fruktózu, škrob a v menším množství i maltózu a rafinózu. Hluboká dormance pupenů *Populus trichocarpa* x *P. deltoides* cv. *Raspalje* byla spojena s nízkou hladinou sacharidů, která nadále mírně klesala. Následná, krátká přechodná fáze byla charakterizována poklesem škrobu a zvýšením rozpustných cukrů. Většina variací v sacharidech se objevila po přerušení dormance pupenů. Spolu se sacharózou byla rafinóza hlavním přítomným cukrem. Rafinóza během postdormance rychle kolísala a rychle mizela před otevřením pupenů (Kozlowski a Pallardy, 1997).

## 1.2. Rostlinný stres

Rostlinný stres lze definovat mnoha způsoby, ale vždy platí, že se jedná o nepříznivě působící vnější vlivy, tj. stresory, které ovlivňují fyziologii rostliny a způsobí posun životního optima mimo homeostázu. Míru stresu lze měřit pomocí míry přežití rostliny, její produktivity, na základě primárních asimilačních procesů a také na celkovém stavu a růstu rostliny. Stres lze dělit na biotický, který je důsledkem negativního působení dalších organismů, se kterými je daná rostlina v kontaktu nebo s nimi sdílí životní prostor a abiotický, který je způsoben vnějšími podmínkami prostředí. Mezi základní podmínky prostředí, jež rostlinu ovlivňují patří: světlo, voda, teplota, obsah a dostupnost živin v půdě, zasolení a těžké kovy, a další (Buchanan et al., 2000; Hirayama a Shinozaki, 2010; Kochhar a Gujjar, 2020).

Rostliny díky svému přisedlému způsobu života nejsou schopny uniknout před neustálým působením vnějších podmínek. Proto si během evoluce vyvinuly mnohé

adaptační a aklimatizační mechanismy, díky kterým mohou déle přežít a reprodukovat se i v nehostinných podmínkách, ale za cenu vydání velkého množství energie, zpomalení tvorby biomasy a zpomalení životních funkcí. Adaptační mechanismy jsou dány geneticky, kdežto aklimatizační mechanismy představují krátkodobé zvýšení odolnosti během působení stresoru (Kochhar a Gujlar, 2020).

Celková odpověď rostliny je podmíněna typem, intenzitou a délkou trvání stresu, fyziologickým stavem rostliny, druhem rostliny a ontogenetickým stádiem. Pokud daný stresor pronikne až k plazmatické membráně, dochází ke spuštění tzv. stresové reakce. Rozpoznání stresu aktivuje přenos signálu, který zajišťují signální molekuly (ABA, kyselina jasmonová, etylen, vápník). Spuštěním signální kaskády dochází k ovlivnění metabolismu a změnám v genové expresi (např. zvýšená aktivita obranných genů, zvýšení translace, hromadění stresových proteinů). Dále může docházet k zvýšené syntéze primárních a sekundárních metabolitů na úkor snížení produkce nových zdrojů, a zvýšené spotřeby energie (např. syntéza osmoticky aktivních látek) (Procházka et al., 1998; Slováková a Mistrík, 2007).

Mírné stresové působení může mít na rostliny nicméně i pozitivní účinky. Např. v ročních růstových cyklech opadavých ovocných dřevin teplé teploty na jaře přerušují dormanci pupenů a zahájí novou sezónu růstu a vývoje rostlin za podmínek zvyšující se fotoperiody a teplých teplot od léta do začátku podzimu. Listnaté stromy v reakci na zkracující se fotoperiodu a klesající teploty na podzim přecházejí do dormance a zůstávají v klidovém stavu v průběhu zimy a brzy na jaře, během nichž vystavení mrazu udržuje dormanci. Na pupeny ovocných dřevin nejvíce působí dva typy stresů, a to nedostatek vody a působení nízkých teplot (Dai, 2019).

### **1.2.1. Reakce rostlin na vodní deficit**

Vodní stres může být způsoben jak suchem – nedostatkem vody, tak záplavami – nadbytkem vody. Voda je v rostlině využívána velmi rychle, ve velkém množství, a rostlina si může vytvořit jen omezené zásoby, které vystačí na krátkou dobu. Z toho důvodu je stres způsobený nedostatkem vody velmi častý a poměrně rychle se projevuje (Procházka et al., 1998).

Nejvíce náchylný na vodní stres je růst buněk. Jakmile dojde ke snížení turgorového tlaku, okamžitě se zpomaluje růst a dělení buněk, což vede ke zmenšování listové plochy, tedy i snížení velikosti fotosyntetického aparátu. Dále dochází k uzavření listových průduchů, stáčení listů a vadnutí rostliny, čím se výrazněji zmenšuje užitečná plocha potřebná pro transpiraci a zachycování slunečního záření. Prohlubující se vodní deficit může dále poškodit membrány chloroplastů a inaktivovat klíčové enzymy fotosyntézy. To vše se projeví mírným až výrazným

snížením efektivity fotosyntézy. Dále dochází ke zmenšení objemu protoplastu, změně lipidové dvojvrstvy a přemístění membránových proteinů, změnám aktivity enzymů (Anjum et al., 2011; Farooq et al., 2009; Kochhar a Gujlar, 2020; Procházka et al., 1998).

Vodní stres indukuje syntézu stresových hormonů ABA a etylénu a stresových proteinů, LEA proteinů a dehydrinů. V podmínkách vodního deficitu je ABA syntetizována v kořenech a transportována do listů, kde indukuje uzavírání průduchů. Jejich uzavřením dojde k snížení ztrát vody zamezením výparu, tedy transpirace. Při dlouhodobém deficitu dojde k indukci syntézy etylénu, který způsobí opad listů (Anjum et al., 2011; Farooq et al., 2009; Pallardy, 2008). LEA proteiny a dehydriny se skládají převážně z hydrofilních aminokyselin a podílejí na ochraně cytoplazmy a membrán před dehydratací, vychytávají reaktivní formy kyslíku (ROS), které poškozují různé buněčné struktury (např. DNA, proteiny, lipidy) (Hong-Bo et al., 2005).

### **1.2.2. Reakce rostlin na nízké teploty**

Každý rostlinný druh má své teplotní optimum, tedy teplotu, ve které bude nejlépe prosperovat. Rostliny jsou schopny přežít i mimo své teplotní optimum, v extrémních podmínkách, ale jen po omezenou dobu. Rostliny se často působením extrémního chladu vyhýbají přesunem celého životního cyklu do vhodných podmínek – v mírném pásmu přesunem životního cyklu do léta, kdy je vhodná teplota a dostatek srážek. Primárním účinkem nízké teploty je disfunkce rostlinného metabolismu projevující se velmi rychle, ale pokud dojde k obnovení vhodných podmínek včas, rostlina se vrací do původního stavu. Sekundárními účinky nízké teploty jsou disfunkce, které se vyvinuly následkem primárních změn a patří mezi ně ztráta vitality a redukce růstu (Slováková a Mistrík, 2007).

Jako chlad lze obecně označit teploty mezi 0–15 °C. Chlad pro původní rostliny mírného pásu nepředstavuje výrazný problém, avšak záleží na tom, jak dlouho je mu rostlina vystavena, a na jakou část rostlinného orgánu chlad působí. Nejvíce náchylné k chladu/mrazu jsou květy v raném vývoji a mladé rostliny. Zbytek rostliny je proti chladu poměrně odolný. V závislosti na délce působení stresoru, jsou změny do určité doby působení vratné. Poté však již dochází ke smrti rostliny (Kochhar a Gujral, 2020; Slováková a Mistrík, 2007).

Jako mráz lze označit jakoukoliv teplotu nižší než 0 °C, kdy v rostlině vznikají krystaly ledu. Když je klesání teploty pomalé (pokles o 1 °C až 2 °C za hodinu), rostliny mírného pásu si dokáží s působením mrazu poradit, pokud jsou na mrazové období připraveny. Ve všeobecnosti zamrznání v buňkách dělíme na dva typy: vitifikace a krystalizace. Při vitifikaci dochází k velmi rychlému poklesu teploty (až



10 °C za minutu), během kterého krystalizace nestihne proběhnout. S tímto jevem se v přírodě střetáváme velmi ojediněle (Procházka et al., 1998). Naopak při krystalizaci voda v rostlině tvoří pravidelné krystaly ledu. V závislosti na rychlosti poklesu teploty se krystaly tvoří buď uvnitř buňky (intercelulárně) nebo mimo buňku (extracelulárně). Při intercelulárním zamrzáání vznikající krystaly často letálně poškozují buňky. Extracelulární krystalizace má za následek zatížení buněčné stěny a osmotickou nerovnováhu mezi vnějším a vnitřním prostředím, kdy se molekuly vody transportují z buňky do mezibuněčného prostoru a výsledkem je dehydratace, která může vést až ke smrti buňky (Slováková a Mistrík, 2007; Wassan et al., 2021).

První příznaky působení chladu/mrazu se projevují na úrovni cytoplazmatické membrány. Kvůli tuhnutí lipidů přechází z polotekuté do tuhé konzistence a tím dojde k porušení celistvosti membrány. To má za následek oslabení vazby mezi lipidy a membránovými proteiny a volnou propustnost pro ionty z a do buňky. Velmi citlivé na chlad jsou i chloroplasty, mitochondrie a peroxizomy (Ambroise et al., 2020; Kochhar a Gujral, 2020; Procházka et al., 1998). Dále dochází k zpomalení nebo přerušení proudění cytoplazmy, snížení aktivity fotosyntézy a respirace. V mnohých rostlinách může nastat hromadění červených antokyanů, které pravděpodobně hrají obrannou roli proti oxidačnímu poškození, které je způsobené světlem. Dále se mění aktivity enzymů, akumulují se stresové proteiny, fytohormony, různé sekundární metabolity a osmoticky aktivní látky (Arias et al., 2015; Procházka et al., 1998).

Mrazuvzdornost neboli mrazové otužování si rostlina začne vytvářet jako reakci na zkracující se dny a postupně klesající teplotu. Jeden z možných chladových aklimatizačních mechanismů představuje změny v složení a množství proteinů a lipidů v membráně, čím si zachovává tekutou strukturu po delší dobu. Dalším znakem je zvýšení tvorba osmoticky aktivní látek, které snižují bod tuhnutí (o 1 – 2 °C) a udržují vodu v podchlazeném stavu bez přítomnosti krystalizačních jader. Nejčastěji je rostliny vyžívají k přečkání jarních mrazů, což jsou teploty maximálně okolo – 3 °C až – 4 °C (Ambroise et al., 2020; Dai, 2019; Slováková a Mistrík, 2007). Jednoduché cukry (rafinózy, hexózy, sorbitol) a volné aminokyseliny (prolin) se akumulují v cytoplazmě, kde kompenzují negativní vliv osmotického tlaku, který je vyvolaný přítomností ledu v extracelulární matrix. Dehydriny, proteiny teplotního šoku (HSP proteiny = Heat Shock Proteins) a polyaminy stabilizují membrány a inhibují denaturaci proteinů a mRNA (Ambroise et al., 2020). Významnou roli sehrávají i „antifreeze“ proteiny, které zabraňují tvorbě ledových krystalů v apoplastu buňky (Heidarvand a Amiri, 2010).

### 1.2.3. Osmotický stres a osmotické vyrovnání

Pro fungování základních metabolických drah v rostlině je nezbytné zachovat vodní bilanci, tedy poměr mezi příjmem a výdejem vody. V důsledku nerovnoměrných osmotických koncentrací vně a uvnitř buňky dochází k odčerpávání vody z buněk do okolního prostředí. Toto odčerpávání vody lze označit jako osmotický stres. Faktory, které nejčastěji vyvolávají sekundární osmotický stres jsou sucho, mráz a zasolení (Kochhar a Gujlar, 2020; Pallardy, 2008). Rostlina se snaží stres zmírnit tím, že upravuje koncentraci vody a hodnotu osmotického potenciálu uvnitř a vně buněk, čím zamezuje dehydrataci či tvorbě krystalů. Tyhle úpravy označujeme termínem osmotické vyrovnání neboli osmotická adjustace. Těchto úprav rostlina dosahuje díky akumulaci tzv. osmoticky aktivních látek nebo akumulací anorganických iontů. Díky nim dojde ke snížení osmotického potenciálu a vyrovnání osmotického tlaku, což má za následek pohyb vody dovnitř buněk a zvýšení turgoru (Dai, 2019; Zivcak et al., 2016). Přizpůsobení osmotického tlaku rostlinám umožňuje překonat krátká období sucha. Díky přechodnému zvýšení množství osmoticky aktivních látek v buňce rostlina dokáže snížit svůj vodní potenciál, což umožní rostlině nasát zbytkovou vodu z půdy, ke které by jinak neměla přístup (Kochhar a Gujlar, 2020; Pallardy, 2008).

### 1.2.4. Osmoticky aktivní látky

Osmoticky aktivní látky (neboli osmolyty, osmoprotektiva či kompatibilní soluty) představují organické, elektricky nenabitě, vysoce rozpustné molekuly s nízkou molekulární hmotností, které chrání buněčný aparát před denaturujícími podmínkami. Výhodou osmoprotektiv je, že jsou netoxické vůči ostatním buněčným složkám i při vysokých koncentracích, nevstupují do ostatních metabolických drah probíhajících v buňce a při fyziologickém pH mají neutrální náboj, buď neiontový nebo zwitteriontový (Bhattacharya a Kundu, 2020; Hayat et al., 2012; Zivcak et al., 2016).

V rostlině umožňují vyrovnat změny osmotického tlaku, které jsou způsobené akumulací iontů a umožňují cytoplazmě dosáhnout osmotické rovnováhy s vakuolou nebo extracelulárním prostorem (Kochhar a Gujral, 2020). Udržují integritu a fluiditu cytoplazmatické membrány tím, že stabilizují a chrání proteiny. Podílí se na proteinové hydrataci, zatímco nemění vlastnosti proteinů. Dále se účastní detoxikačních mechanismů ROS (Hayat et al., 2012; Bhattacharya a Kundu, 2020).

Syntéza osmolitů představuje pro rostlinu energeticky náročný proces (Hayat et al., 2012; Bhattacharya a Kundu, 2020). Jejich akumulace a syntéza je společná pro většinu rostlin, ale liší se tím, který kompatibilní solut využívají. To je

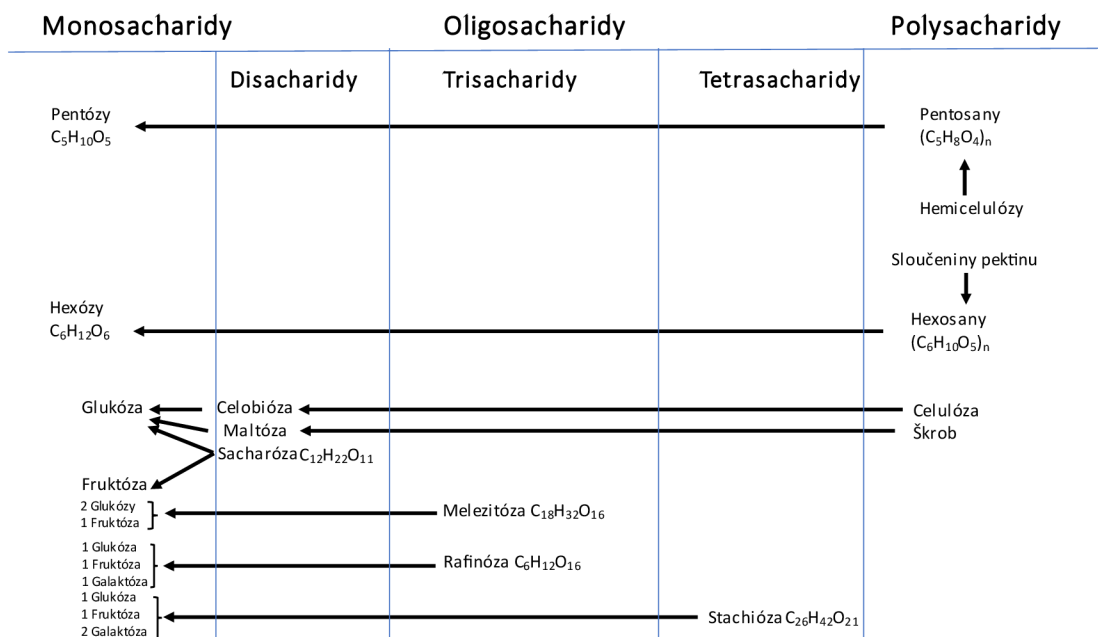
charakteristické pro daný druh rostliny. Tyto soluty se akumulují buď v cytosolu nebo v chloroplastech a pomocí specifických transportérů mohou být transportovány přes membránu. Stres může spustit jejich nevratnou syntézu (např. u glycin betainu) nebo změnit rovnováhu mezi jejich syntézou a katabolismem (např. u prolinu) nebo spustit uvolňování z jejich polymerních forem (např. uvolňování glukózy a fruktózy ze škrobu a fruktanů). Po odeznění stresu mohou být tyto monomery zpět repolymerizovány, nebo dojde k jejich metabolizování na primární produkty nebo energii (Kochhar a Gujral, 2020; Zivcak et al., 2016).

Mezi osmoticky aktivní látky řadíme cukry, cukerné alkoholy, aminokyseliny (zejména prolin) nebo aminy (Hayat et al., 2012; Kochhar a Gujral, 2020). Studie zaměřující se na zlepšení tolerance vůči abiotickému stresu se soustředí hlavně na sacharidy a aminokyseliny, jakožto primární metabolity podléající se na toleranci vůči rostlinnému stresu (Szepesi, 2020).

#### **1.2.4.1. Sacharidy**

Sacharidy jsou v živých organismech všudypřítomné látky, neboť se jedná o produkty fotosyntézy. Jedná se o základní organické látky, ze kterých se syntetizuje většina ostatních organických sloučenin nacházejících se v rostlinách. Sacharidy jsou hlavní složkou buněčných stěn a jsou výchozím bodem pro syntézu tuků a bílkovin. Velké množství sacharidů se oxiduje při dýchání, další část se hromadí jako rezervní zdroj energie. Sacharidy ve formě celulózy, jsou součástí dřeva a tvoří až čtvrtinu jejich suché hmotnosti. Rozpustné sacharidy snižují osmotický potenciál cytoplazmy uvnitř vakuoly a sacharidy jako pentozany, pektiny, gumy a slizy zvyšují schopnost pletiv zadržovat vodu (Bhattacharya a Kundu, 2020; Pallardy, 2008).

Sacharidy jsou složeny ze základních prvků, a to z uhlíku, vodíku a kyslíku. Podle toho, jakou funkci zastávají, mohou dále obsahovat také další prvky, jako je fosfor nebo dusík. Chemicky jsou sacharidy polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony. Sacharidy můžeme rozdělit do tří hlavních skupin na: monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy (Obr. 6) (Chibbar et al., 2016; McMurry, 2012).

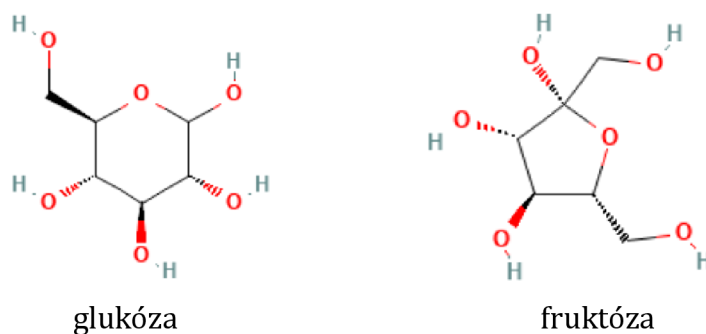


Obr. 6: Základní rozdělení sacharidů (upraveno dle Pallardy, 2008).

## Monosacharidy

Představují základní sacharidové jednotky, ze kterých se tvoří složitější sloučeniny a které není možno dále štěpit na menší cukry. Skládají z atomů uhlíku, ke kterým jsou připojeny atomy vodíku, alespoň jedné hydroxylové skupiny a buď aldehydové nebo ketonové skupiny. Počet atomů uhlíku v monosacharidech je tři až osm, ale nejběžnější počet je pět (pentózy) nebo šest (hexózy). Mnoho jednoduchých cukrů se vyskytuje v dřevinách obvykle ve velmi malých množstvích, pravděpodobně kvůli jejich rychlému zabudování do polysacharidů. Výjimkou jsou šesti uhlíkové cukry glukóza a fruktóza (McMurry, 2012; Pallardy, 2008). Volné pentózové cukry se v rostlinách vyskytují jen ve stopových množstvích, avšak jsou důležitými složkami buněčných stěn, jako např. arabinóza a xylóza (jako složky arabanů a xyланů). Ribóza mimo své přítomnosti v RNA, je součástí nukleotidových koenzymů ATP, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FAD nebo koenzymu A. Deoxyribóza se vyskytuje v nukleotidech, které tvoří DNA (Pallardy, 2008).

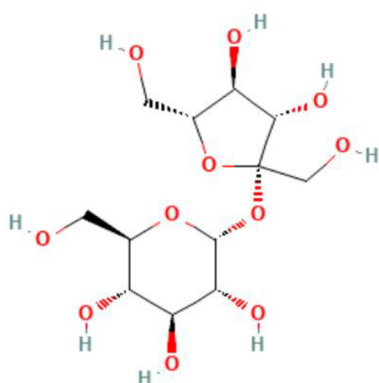
Glukóza (Obr. 7) je přítomna ve velkém množství v ovoci a také je pravděpodobně přítomna téměř v každé živé buňce. Fruktóza (Obr. 7) je také velmi častým cukrem, ačkoliv její koncentrace je o něco nižší (Chibbar et al., 2016). Fruktóza a glukóza slouží rostlinám jako zdroje uhlíku a energie. Fosforylace glukózy a fruktózy, případně jejich derivátů, představuje výchozí bod mnohých metabolických drah v buňkách nebo pro vzájemnou proměnu sacharidů. Dále jsou součástí reakcí na stresory a vystupují i jako signální molekuly. Mohou vychytávat ROS, čímž se podílí na obraně proti oxidačnímu poškození (Bogdanović et al., 2008; Couée et al., 2006).



Obr. 7: Vzorec glukózy a fruktózy (upraveno dle PubChem, 2004).

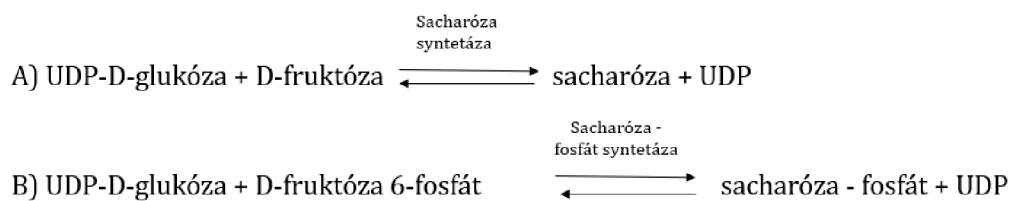
### Oligosacharidy

Oligosacharidy jsou složeny ze dvou až deseti monosacharidů vzájemně spojených glykosidickou vazbou. Mezi hlavní oligosacharidy řadíme disacharidy (např. sacharóza, maltóza), trisacharidy (např. rafinóza, melezitóza) a tetrasacharidy (např. stachyóza) (McMurry, 2012; Pallardy, 2008). Vysoká koncentrace v buňkách, široká distribuce a velký metabolický význam dělají ze sacharózy (Obr. 8) jeden z nejdůležitějších oligosacharidů (Pallardy, 2008). Představuje hlavní produkt fotosyntézy a jako neredukující sacharid s omezenou chemickou reaktivitou představuje základní transportní a zásobní molekulu ve většině rostlin. V mnohých rostlinách představuje více než 95 % suché hmotnosti, který je translokován floémem. Dále může být rostlinou využita i jako osmoticky aktivní látka (Lunn, 2016).



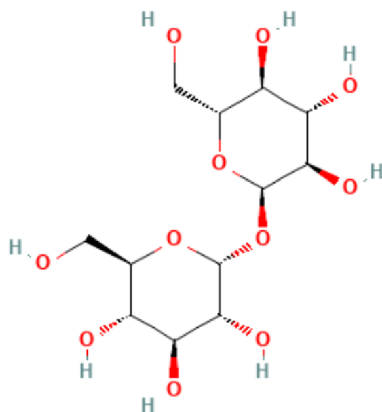
Obr. 8: Vzorec sacharózy (upraveno dle PubChem, 2004).

Syntéza sacharózy (Obr. 9A) probíhá zejména v cytosolu buněk listů, kde se za pomoci enzymu sacharóza syntetáza spojují glukózové a fruktózové jednotky  $\alpha(1,2)$  glykosidickou vazbou. Sacharóza může také vznikat degradací škrobu nebo interakcí s NADP-glukózou. V místě spotřeby je sacharóza rozkládána pomocí sacharázy (Obr. 9B), popř. invertázy a vzniklý uhlík a energie se využijí pro růst a akumulaci zásob jako je škrob, olej a fruktany (Chibbar et al., 2016; Lunn, 2016; Pallardy, 2008).



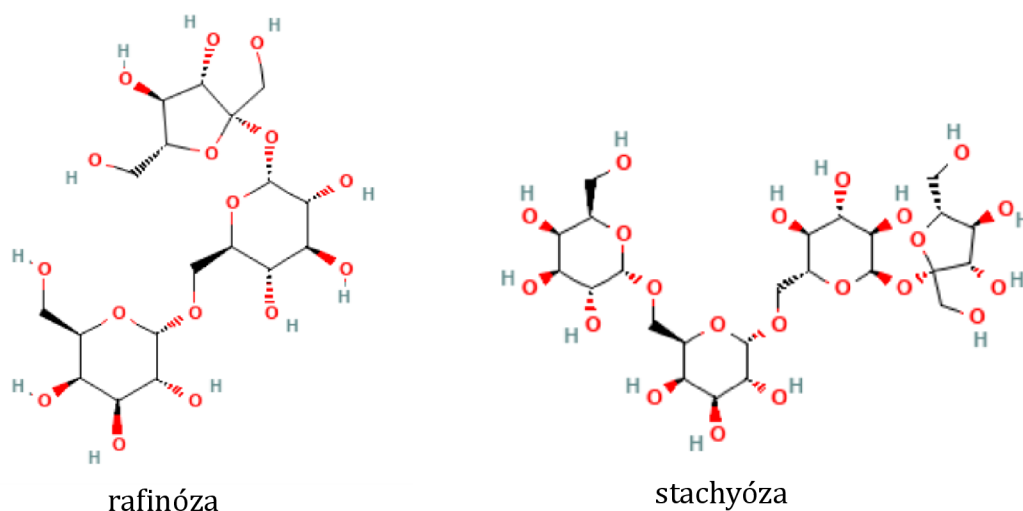
Obr. 9: Syntéza a degradace sacharózy (upraveno dle Pallardy, 2008).

Trehalóza (Obr. 10) je neredukující disacharid, složený ze dvou glukózových zbytků spojených nízkenergetickou  $\alpha, \alpha-1,1'-o$ -glykosidickou vazbou. To z ní dělá jeden z nejstabilnějších disacharidů vyskytujících se v přírodě. V rostlinách se trehalóza syntetizuje z glukóza-6-fosfátu a UDP-glukózy za účasti enzymu trehalóza-6-fosfát syntáza (Bhattachayra a Kunde, 2020). Trehalóza představuje jeden z nejdůležitějších kompatibilních metabolitů vyskytující se od řas až po vyšší rostliny. Stabilizuje integritu proteinů, cytoplazmatické membrány, snižuje teplotu fázového přechodu, tím, že udržuje lipidy v krystalické kapalně fázi. Také zastává signální roli v mnoha interakcích mezi rostlinou a mikroorganismy (Bhattachayra a Kunde, 2020; Szepesi, 2020).



Obr. 10: Vzorec trehalózy (upraveno dle PubChem, 2004).

**Rafinózova rodina oligosacharidů** (RFO) představuje třídu rozpustných sacharidů, které jsou syntetizovány ze sacharózy přidáním galaktózových skupin, které pochází z galaktinolu. Mezi tyto neredukující cukry patří trisacharid rafinóza (Obr. 11), tetrasacharid stachyóza (Obr. 11), pentasacharid verbaskóza, hexasacharid ajugóza a další. Akumulace RFO se liší v různých částech rostliny. Obecně bylo zjištěno, že rafinóza a stachyóza jsou přítomny ve všech rostlinných orgánech, zatím co distribuce verbaskózy a ajugózy zůstává omezena na zásobní pletiva pouze u některých rostlin. RFO s větším stupněm polymerace byly detegovány u rostliny vystavených chladovému stresu (Bhattachayra a Kunde, 2020; Sengupta et al., 2015).



Obr. 11: Vzorec rafinózy a stachyózy (upraveno dle PubChem, 2004).

V rostlinách působí UDP-glukóza jako prekurzorová molekula pro biosyntézu RFO katalyzovanou různými enzymy, jako je galaktinol syntáza, rafinóza syntáza, stachyóza syntáza atd. Galaktinol syntáza indukuje produkci galaktinolu z myo-inositol a UDP-galaktózy. Následně rafinóza syntáza přenáší galaktózový zbytek galaktinolu na sacharózu katalyzující syntézu rafinózy. Podobně galaktinol interaguje s rafinózou v přítomnosti stachyóza syntázy za vzniku stachyózy a interakce galaktinolu se stachyózou vede k verbaskóze katalyzované verbaskóza syntázou. V dráze nezávislé na galaktinolu již přítomné RFO reagují navzájem a syntetizují vyšší členy RFO (Bhattachayra a Kunde 2020; Chibbar et al., 2016; Sengupta et al., 2015). S největší pravděpodobností je syntéza RFO typická pro vyšší rostliny, kde participuje v mnohých fyziologických procesech, jako např. ochrana embrya před vysycháním v době dozrávání nebo klíčení semen. RFO také představují transportní sacharidy ve floému a fungují i jako zásobní sacharidy. Vystupují také jako signální molekuly po napadení a poranění patogenem nebo se akumulují ve vegetativních orgánech při reakci na abiotické stresy (Chibbar et al.,

2016; Sengupta, et al., 2015). RFO stabilizují cytoplazmatickou membránu a proteiny během působení mrazu nebo sucha. Podporují osmotické vyrovnání a také umožňují sekvestraci sodných iontů do apoplastu nebo vakuol. Dále inhibují krystalizaci sacharózy (Bhattachayra a Kunde, 2020).

## **Fruktany**

Fruktany jsou ve vodě rozpustné fruktózové polymery (Szepesi, 2020). Slouží jako zásobní sacharidy asi u 12–15 % všech rostlin patřících k hvězdicotvarým (*Asterales*), lipnicotvarým (*Poales*) a k liliotvarým (*Liliales*). Jejich distribuce se v různých pletivech rostlin liší. Lze je nalézt jako dlouhodobé rezervy v cibulích a hlízách nebo jako dočasné zásoby v listech, stoncích a semenech (Bhattacharya a Kunde, 2020). V rostlinách hrají roli při toleranci vůči působení abiotického stresu. Přispívají k regulaci osmotické rovnováhy, udržují integritu membrán začleněním do membránových lipidů a jsou odolné vůči krystalizaci při působení nízkých teplot (Chibbar et al., 2016; Szepesi, 2020).

Biosyntéza fruktanů probíhá ve vakuolách a je citlivá na koncentraci sacharózy. Spoluprací specifických skupin enzymů, tzv. fruktosyl transferáz, se přenášejí fruktózové zbytky jedné sacharózy na jinou molekulu sacharózy, čím se tvoří fruktany s různou délkou řetězce (Chibbar et al., 2016; Bhattachayra a Kunde, 2020). Na základě glykosidické vazby mezi fruktózovými jednotkami a pozici glukózy lze v rostlinách rozpoznat pět hlavních strukturních typů, a to inuliny, levany, graminany, neo-inuliny a neo-levany (Bhattacharya a Kunde, 2020).

## **Polysacharidy**

Polysacharidy neboli složené sacharidy, lze hydrolyticky štěpit na menší sacharidové jednotky. Mezi nejdůležitější polysacharidy ve dřevinách řadíme celulózu a škrob. Celulóza je nejrozšířenější organickou sloučeninou a má nezastupitelnou funkci v buněčné stěně rostlin, kde tvoří kostru dřevin (Chibbar et al., 2016; McMurry, 2012; Pallardy, 2008).

Škrob je nejhojnějším zásobním polysacharidem dřevin, semen, plodů nebo hlíz. Z chemického hlediska škrob pozůstává ze dvou glukanových polymerů, amyulóza (lineární řetězec) a amylopektin (dlouhé molekuly s rozvětvenými postranními řetězci), které jsou uspořádány do trojrozměrné, semikrystalické struktury. Jednotlivé vrstvy dohromady tvoří škrobová zrna, které se vyskytují v živých buňkách zásobních orgánů, ve floémů, v chloroplastech buněk téměř všech listů. Množství škrobu se během sezóny liší a odráží potřeby rostliny. Díky  $\alpha$  vazbě se poměrně snadno hydrolyzuje na jednoduché cukry, čím poskytuje zdrojové



molekuly pro metabolické pochody a růst rostliny (Chibbar et al., 2016; Pallardy, 2008), nebo osmoprotektanty podílející se na zvýšené odolnosti vůči mrazu, suchu nebo zasolení (Seppänen et al., 2018).

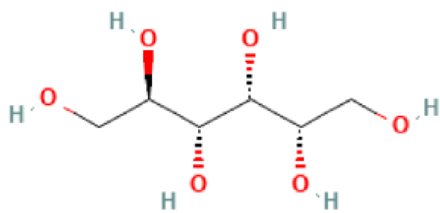
### **Cukerné alkoholy**

Cukerné alkoholy jsou primárními produkty fotosyntézy, které se dočasně hromadí v listech během světelné fáze fotosyntézy. Během tmavé fáze se přemisťují na místo spotřeby do jiných rostlinných orgánů. Cukerné alkoholy jsou aldózové nebo ketózové cukry, které jsou redukovány na příslušné hydroxylové (–OH) zbytky. Jsou běžně známé jako polyoly, polyalkoholy nebo vícesytné alkoholy. Představují ve vodě rozpustné molekuly s velmi podobnými fyzikálními, chemickými a biologickými vlastnostmi jako sacharidy (Chibbar, 2020; Pleyerová et al., 2022). Cukerné alkoholy lze rozdělit na dvě skupiny, cyklické a acyklické (Zulfiqar et al., 2020).

Díky malé molekulární velikosti a kompatibilní povaze je rostlina může využít jako kompatibilní soluty při osmotickém vyrovnání. Jejich výhodou je, že ani při vysoké koncentraci neovlivňují strukturu a funkci makromolekul. Proto jsou využívány k úpravě vodního potenciálu a ve vysokých koncentracích se využívají i ke stabilizaci struktury proteinů. Dále mohou regulovat redoxní systémy a vystupují jako molekulární chaperony nebo vychytávači ROS (Pleyerová et al., 2022; Zulfiqar et al., 2020).

Sorbitol (Obr. 12) je široce distribuovaný šestiuhlíkový cukerný alkohol. Je syntetizován jako fotosyntetický asimilát ve zralých listech spolu se sacharózou. U některých zástupců čeledi růžovitých (*Rosaceae*) a jitrocelovitých (*Plantaginaceae*) představuje hlavní formu fotosynteticky fixovaného uhlíku translokovaného prostřednictvím floému (Pleyerová et al., 2022). Např. v listech jablek je syntetizován jako hlavní fotosyntát (Teo et al., 2006).

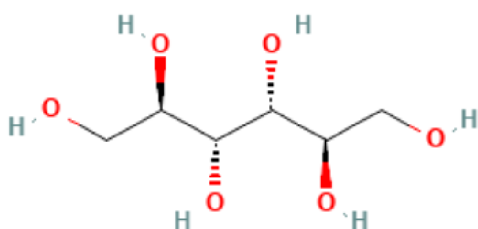
Biosyntéza sorbitolu začíná redukcí glukózy-6-fosfát na sorbitol-6-fosfát za účasti enzymu sorbitol-6-fosfát dehydrogenáza (neboli aldóza-6-fosfát reduktáza). Následně sorbitol-6-fosfát fosfatáza přeměňuje sorbitol-6-fosfát na sorbitol (Teo et al., 2006). V cílových pletivech je sorbitol metabolizován na fruktózu (Pleyerová et al., 2022). Pomocí biosyntézy sorbitolu jsou během regenerace NADPH/H<sup>+</sup> na NADP<sup>+</sup> pohlcovány elektrony co zmenšuje jejich tlak na fotosystém a zamezuje se nadměrné tvorbě ROS. Obsah, alokace a metabolismus sorbitolu jsou upravovány a tím dochází ke zmírnění stresu. Hladina sorbitolu kolísá i během vegetační sezony, kdy se v zimě hladina zvyšuje 2- až 3-násobně oproti létu. Bylo zjištěno, že vystavení suchu různých druhů třešní, jabloní a mišpulí vedlo také ke zvýšení hladiny sorbitolu. Naopak u broskve se hladina sorbitolu neměnila (Pleyerová et al., 2022).



Obr. 12: Vzorec sorbitolu (upraveno dle PubChem, 2004).

Manitol (Obr. 13) je široce distribuovaný, ve vodě rozpustný hexitol strukturně podobný manóze. Jeho přítomnost byla dokázána v mnohých krytosemenných rostlinách ze 70 čeledí. V rostlinách jeho syntéza začíná z manóza-6-fosfátu působením enzymů manóza-6-fosfát reduktáza, což vede k tvorbě manitol-1-fosfátu. Následně manitol-1-fosfátfosfatáza katalyzuje jeho defosforylaci za vzniku manitolu. Katabolický enzym, manitol dehydrogenáza, se podílí na přeměně manitolu na manózu, která slouží jako klíčový determinant zásoby manitolu v buňce a aktivuje obranu rostlin (Bhattacharya a Kunde, 2020; Zulfiqar et al., 2020).

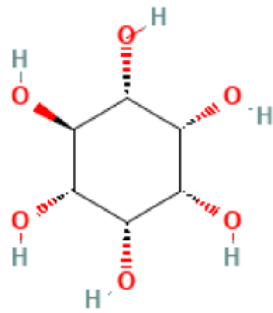
Manitol plní řadu funkcí včetně osmoregulace, vychytávání ROS během stresových podmínek, ukládání redukční energie, zásoby uhlíku, funkce kompatibilního osmolytu ve fotochemických pochodech a funguje jako hlavní translokovaný sacharid, když je sacharóza vyčerpána (Bhattacharya a Kunde, 2020). Experimentálně bylo zjištěno, že přenesením genu pro syntézu manitolu do rostlin následovala jeho akumulace vedoucí např. k vyšší toleranci vůči suchu u arašídů nebo salinitě u brambor (Zulfiqar et al., 2020).



Obr. 13: Vzorec manitolu (upraveno dle PubChem, 2004).

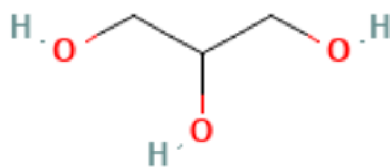
Inositoly představují rodinu esenciálních cyklohexitolů obsahující devět členů, z nichž nejběžnější formou je myo-inositol (Obr. 14). Jsou široce distribuovány v rostlinné říši a jsou funkčně nezbytné pro normální růst a vývoj, membránovou biosyntézu a přenos signálu. Kromě toho, že myo-inositol působí jako osmolyt, může fungovat jako signalizační meziprodukt nebo regulovat metabolické reakce při stresu. Dále reguluje transport rostlinných hormonů jako je auxin, podílí se na

biogenezi membrán, biosyntéze kyseliny fytové, imunitě rostlin a apoptóze. Důležité jsou také jeho deriváty, a to pinitol, galaktinol a ononitol, které jsou mimo jiné také osmoprotektivní látky. Díky tomu, že glykosidická vazba v myo-inositolu a jeho derivátech není hydrolyzačně labilní, jedná se o velmi stabilní sloučeniny (Bhattacharya a Kunde, 2020). Zvýšení produkce myo-inositolu zavedením genu pro jeho biosyntézu vedlo k větší toleranci k abiotickým stresorům, např. vůči suchu u huseníčku (*Arabidopsis*) nebo chladu u tolice vojštěšky (Zulfiqar et al., 2020).



Obr. 14: Vzorec inositolu (upraveno dle PubChem, 2004).

Glycerol (Obr. 15) je důležitou složkou všech glycerolipidů. Nachází se v plastidech a v cytoplasmě buněk (Bahieldin et al., 2013). Jako komaptibilní solut udržuje intracelulární rovnováhu, stabilizuje proteiny a proteinové komplexy a membrány. Dále brání produkci ROS, čím chrání buňky před oxidačním poškozením. Výsledné produkty metabolismu glycerolu dihydroxyacetonfosfát nebo dihydroxyaceton mohou být pro rostlinu toxické (Eastmond, 2004).



Obr. 15: Vzorec glycerolu (upraveno dle PubChem, 2004).

## Úloha sacharidů v stresových podmínkách

Akumulace cukrů a cukerných alkoholů, jako ochranná reakce před působením osmotického stresu, byla dokázána již mnohokrát. Převážně se jedná o disacharidy trehalózu a sacharózu, RFO, fruktany a z cukerných alkoholů hlavně o glycerol, sorbitol nebo manitol. Jejich koncentrace se zvyšuje během působení stresoru a po pomnutí stresoru hladina rychle klesá. Celková odezva je doprovázena vzestupem hladin glukózy, sacharózy a fruktózy, zatímco fruktany se hromadí až jako opožděná reakce (Bhattacharya a Kunde, 2020; Streeter et al., 2001).

Obecně je aktivita cukrů spojována s aklimatizací na dehydrataci, nízké teploty a s mrazuvzdorností, kdy stabilizují membrány a proteiny tím, že na jejich povrchu tvoří ochranný obal. Bylo zjištěno, že odolnější rostliny akumulují cukry dříve a ve větším množství, než rostliny méně odolné (Seppänen et al., 2018). Například přítomnost sacharózy a RFO může snížit teplotu fázového přechodu o více jak 30 °C, v přítomnosti fruktanů a glukanů o více jak 20 °C. Akumulace jednoduchých sacharidů ve dřevinách mimo jiné způsobuje upřednostnění vitrifikace vody před její krystalizací, což jim umožní přečkat i teploty okolo -40 °C. Nejméně náchylná na krystalizaci je trehalóza. Naopak, sacharóza při vyšších koncentracích snadno podléhá krystalizaci, ovšem přítomnost RFO tento trend zpomalují (Ambroise et al., 2019). Dále bylo například zjištěno, že ozimé obiloviny při teplotě -3 °C zvyšují aktivitu fruktanových hydroláz a invertáz v extracelulárním prostoru, čímž dochází ke štěpení fruktanů na jednodušší cukry. To se projevilo zvýšenou koncentrací sacharózy, glukózy a fruktózy v extracelulárním prostoru a sníženou hladinou fruktanů v intracelulárním prostoru (Takahasshi et al., 2021).

Sacharidy také mají nezastupitelnou roli, během působení ROS. ROS vznikají důsledkem aerobního metabolismu při jeho normálním fungování. Řadíme sem superoxidový aniont ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), hydroxylový radikál ( $\text{HO}\bullet$ ), singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ) a peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Produkce a eliminace ROS je v organismu v rovnováze, avšak působením stresorů dochází k jejich prudké akumulaci, co vede k peroxidaci lipidů, oxidaci nukleových kyselin a inaktivaci proteinů, což má za následek spuštění apoptózy (Dumanović et al., 2021). Sacharidy mají ve vztahu k ROS duální roli. Mohou se podílet na metabolických dráhách vedoucích k vzniku ROS, ale také mohou podporovat pochody, které významně přispívají k jejich zhášení. Například sacharóza v nízké koncentraci funguje jako signální molekula, naopak při vysoké koncentraci vystupuje přímo jako antioxidant. Dostupnost sacharózy a glukózy může ovlivnit expresi genů související s metabolismem askorbátu, antokyanů nebo dalších fenolových látek vystupujících jako antioxidanty (Bolouri-Moghaddam et al., 2010; Solfanelli et al., 2006). Přímého zhášení radikálů se účastní převážně ve vodě rozpustné sacharidy jako sacharóza, RFO a fruktany. Předpokládá se, že při zhášení dochází k vzniku cukerného radikálu, který je recyklován na cukr pomocí antioxidantních molekul, jako například askorbát či antokyanů. ROS přednostně cílí

na HO—C—H vazby cukrů, a proto zhášecí kapacita cukrů koreluje s počtem —OH skupin. Například sacharóza má díky osmi —OH skupinám vyšší potenciál než glukóza a fruktóza s pěti skupinami. Cukerné alkoholy manitol, sorbitol, myo-inozitol, nebo polyhydroxysacharidy, jako fruktany, jsou také účinné při odstraňování volných radikálů (Bolouri-Moghaddam et al., 2010).

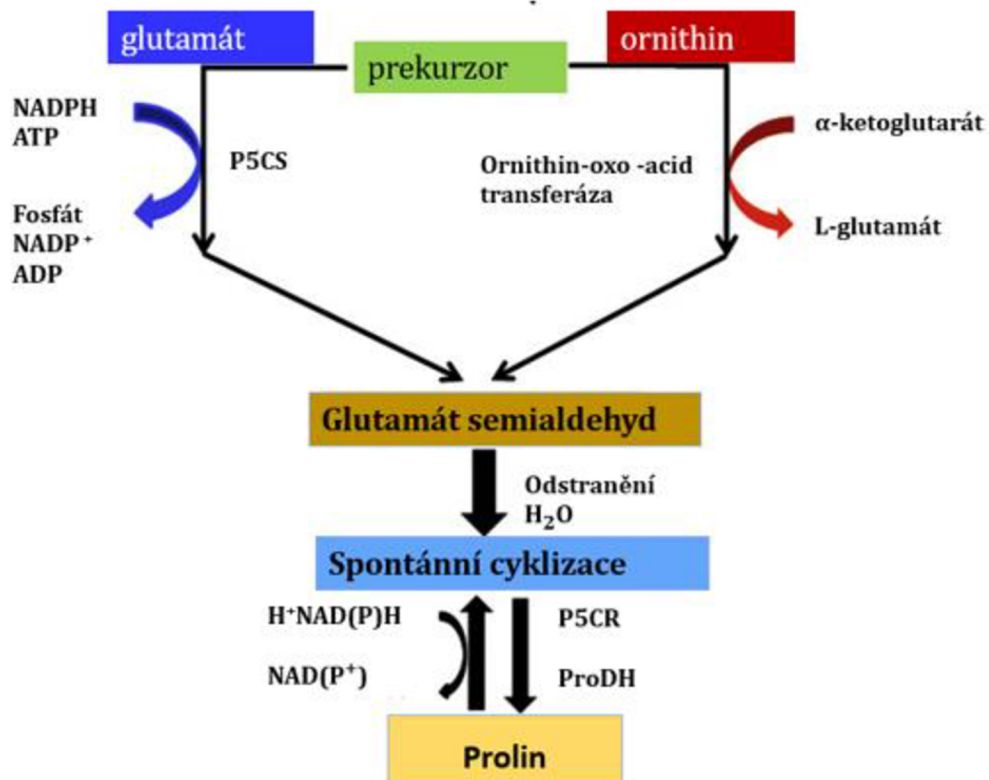
Důležitá je i funkce sacharidů při signalizaci stresu, kdy mohou fungovat jako primární posel při signalizaci stresu a regulovat genovou expresi. U rostlin více tolerantních vůči suchu byly zaznamenány změny v expresy hlavně u genů, které měly souvislost s metabolismem sacharózy a škrobu (Bhattachayra a Kunde, 2020).

#### **1.2.4.2. Aminokyselina prolin**

Prolin je jednou ze základních aminokyselin (Hayat et al., 2012). U rostlin se prolin shromažďuje v cytosolu buňky, kde podporuje stabilizaci bílkovinných struktur, membrán a dalších kompartmentů buňky (Kochlhar a Gujlar, 2020). Může vystupovat jako vychytáveč ROS nebo fungovat jako molekulární chaperon, který stabilizuje strukturu proteinu. Dále může akumulace prolinu ovlivňovat cytosolové pH a tak vyrovnat i redoxní stav buněk. Akumulace prolinu může být i součástí stresového signálu ovlivňujícího adaptivitu odpovědi (Verbrugen a Hermans, 2008) Prolin se také podílí na rekonstrukci chlorofylu a také slouží jako zdroj dusíku a energie při obnově růstu (Dai, 2019). Prolin umožňuje rostlinám snížit jejich vodní potenciál a udržovat potřebný turgor během působení stresorů. Prolin, který se akumuluje jako reakce na stres z dehydratace, je regulován ABA, jejíž signální dráhy záleží na podmínkách a na druhu rostliny (Fichman et al., 2015).

Syntéza prolinu (Obr. 16) probíhá dvěma způsoby: přes glutamát a přes ornitin. Syntéza přes ornitin je typická hlavně pro mladé rostliny, naopak syntéza přes glutamát je hlavním zdrojem prolinu během osmotického stresu. Glutamát se převádí na prolin dvěma po sobě jdoucími redukcemi, které jsou katalyzované pyrrolin-5-karboxylát syntázou (P5CS) a pyrrolin-5-karboxylát reduktázou (P5CR). P5CS je bifunkční enzym katalyzující nejprve aktivaci glutamátu fosforylací a poté redukcí labilního meziprojektu c-glutamylfosfátu na glutamátový semialdehyd, který je v rovnováze s pyrrolin-5-karboxylátem (P5C). Pokud je biosyntéza prováděna přes ornitin, tak ornitin může být transaminován na P5C mitochondriálně lokalizovaným enzymem ornitin aminotransferázou. K rozkladu prolinu dochází v mitochondriích za účasti prolin hydrogenázy (ProDH) a P5C dehydrogenázy (P5CDH), které převedou prolin zpět na glutamát (Hayat et al., 2012; Verbrugen a Hermans, 2008). K rozkladu prolinu dochází zejména po odeznění stresoru, kdy je potřeba snížit jeho vysoké hladiny (Szabados a Savoure, 2010).

Za fyziologicky normálních podmínek se hladina volného prolinu liší v jednotlivých rostlinných orgánech a také je závislá na stáří rostliny. Nejvíce prolinu se nachází v květech, pylových zrnech a v semenech, nejméně je v kořenech. Jeho zvýšené hladiny jsou přirozenou reakcí rostliny na nepříznivé podmínky a míra akumulace úzce souvisí s adaptačními a tolerančními mechanizmy (Verbrugen a Hermans, 2008).



Obr. 16: Syntéza a degradace prolinu (upraveno dle Meena et al., 2019). P5CS - pyrrolin-5-karboxylát syntáza, P5CR - pyrrolin-5-karboxylát reduktáza, ProDH - prolin hydrogenáza.

## 2. Praktická část

### 1.3. Materiál a metody

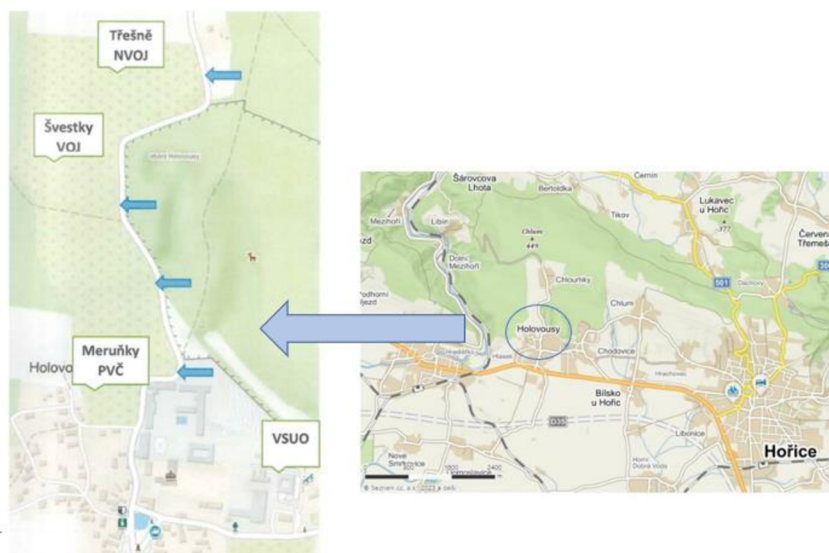
#### 1.3.1. Rostlinný materiál

Pro sledování hladin osmoticky aktivních látek v pupenech bylo zvoleno šest genotypů od dvou druhů ovocných stromů, a to třešní a meruněk. Zvolené genotypy se lišily v míře citlivosti na chlad a dehydrataci (Tab. 1).

Tab. 1: Přehled potenciálně citlivých a odolných genotypů třešní a meruněk

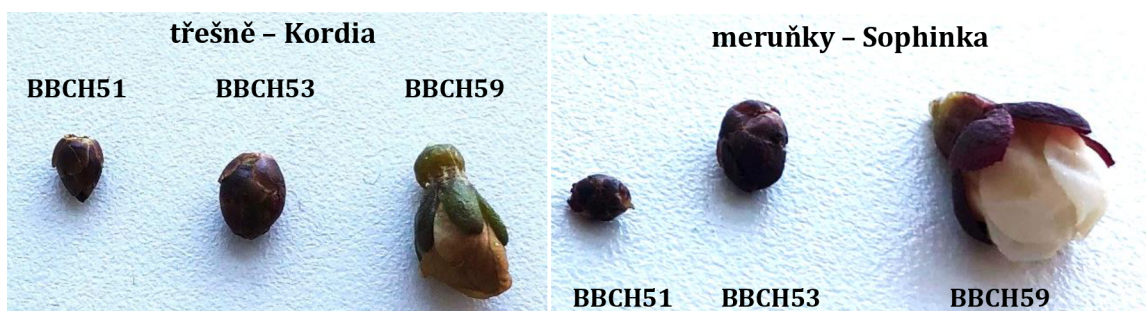
	<b>Meruňky</b>	<b>Třešně</b>
Odolné	Betinka	Amid
	Harogem	Early Korvik
	Leskora	Regina
Citlivé	Candela	Jacinta
	Harcot	Justýna
	Sophinka	Kordia

Odběry pupenů se prováděly v sadech Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského (VŠÚO) v Holovousech ve třech stanovených termínech, které odpovídaly významným fenologickým fázím (BBCH51, BBCH53 a BBCH59). Pupeny meruněk byly odebírány v termínech 1.3.2022, 21.3.2022, 30.3.2022 (Betinka, Candela) a 4.4.2022 (Harcot, Harogem, Leskora a Sophinka). Data odběru pro třešně byly 1.3.2022, 30.3.2022 a 20.4.2022. Poloha sadů je vyobrazena na (Obr. 17) Pupeny byly uloženy do označených zkumavek a během přepravy byly drženy na ledu. Do doby analýz byly uchovávány při teplotě -5 °C.



Obr. 17: Umístění sadů (převzato z mapy.cz).

Na obrázku (Obr. 18) můžeme vidět jednotlivé fenofáze u dvou vybraných genotypů, a to třešně Kordia a meruňky Sophinka. Fenofáze BBCH51 představuje nalévání pupene, kdy je pupen plně kryt a chráněn obaly. BBCH53 neboli fenofáze počátku rašení pupene (červený kalich s lehce viditelnou špičkou korunních lístků – zelená špička), kdy je pupen nalitý a fyziologicky aktivní. BBCH59 neboli fenofáze balonu, kdy květní obaly praskají a dochází ke kvetení. V této fázi je květ nejvíce náchylný k jarním mrazům, protože už není chráněn obaly (Meier et al., 2009).



Obr.18: Jednotlivé fenofáze u dvou vybraných genotypů.



### 1.3.2. Charakteristika vybraných genotypů

#### Třešně

Třešeň je vzrostlý strom z čeledi růžovitých (*Rosaceae*), průměrně dosahuje výšky 10 m a šířky 8 – 10 m. Jedná se o diploidní, většinou cizosprašnou rostlinu. Pro třešně je charakteristická pravidelná úroda. Řadíme ji mezi nejranější ovoce, kvete brzy na jaře jako druhá, po meruňce. Pupeny třešně jsou během kvetení citlivé na mraz, proto pro ni bývají nebezpečné jarní mrazy. Třešně se nemohou pěstovat v mrazových kotlinách nebo v oblastech vystavených mrazivým větrům ze severu. Další problém u třešní představuje nedostatečné opylení květů a navíc hrozí opylení od jiné, ve stejnou dobu kvetoucí třešně. To je jedním z důvodů, proč byly vyšlechtěny samosprašné odrůdy. Třešně dělíme podle času plození na rané a pozdní. Nejvhodnější lokality jsou teplé oblasti s dostatkem slunečního svitu v kopcovitém terénu do 350 m n. m. s průměrnou roční teplotou nad 8 °C (Dohnálek, 1939; Kutina et al., 1991; Zelený et al., 2019)

#### *Amid*

Habitus stromu je vzpřímený se středně silným růstem. Dle doby kvetení ji řadíme mezi středně rané. Zrání je rané, okolo 5. třešňového týdne, s vysokou a pravidelnou plodností. Plody jsou velké, srdčité, tmavě červené s pevnou dužinou, tzv. chrupky. Chuťově jsou aromatické a středně šťavnaté. Amid je vysoce odolný proti moniliové hnilobě plodů a proti praskání plodů. Květy jsou středně odolné proti mrazu (Zelený et al., 2019).

#### *Early Korvik*

Habitus stromu je vzpřímený až polovzpřímený se středně silným růstem. Dle doby kvetení jej řadíme mezi středně pozdní. Zrání je rané, okolo 4. třešňového týdne, s vysokou plodností. Plody jsou velké, srdčité, tmavě hnědočervené s pevnou tmavě červenou dužinou, tzv. chrupky. Chuťově jsou sladké a středně šťavnaté. Early Korvik je málo náchylný k praskání plodů. Květy jsou středně odolné k poškození jarními mrazy (Zelený et al., 2019).

#### *Jacinta*

Habitus stromu je polovzpřímený se silným růstem. Dle doby kvetení ji řadíme mezi středně pozdní. Zrání je rané, okolo 2. – 3. třešňového týdne, s velmi vysokou plodností. Plody jsou velké, srdčité, tmavě červené se středně pevnou dužinou, tzv. polochrupky. Chuťově jsou středně šťavnaté. Jacinta je středně odolná proti moniliové chorobě plodů a středně odolná vůči praskání plodů. Plody obsahují větší pecku (Zelený et al., 2019).

### *Justýna*

Habitus stromu je rozložitý a mírně převislý se středně silným růstem. Dle doby kvetení ji řadíme mezi středně pozdní. Zrání je rané, okolo 5. – 6. třesňového týdne. Plody jsou velké, kulovité hnědočervené s pevnou růžovou dužinou, tzv. chrupky. Chuťově jsou středně šťavnaté. Justýna je středně odolná proti praskání plodů a květy jsou středně odolné proti pozdním jarním mrazům (Zelený et al., 2019).

### *Kordia*

Habitus stromu je polovzpřímený až rozložitý se silným, později se středně silným růstem. Dle doby kvetení ji řadíme mezi středně pozdní. Zrání je rané, okolo 5. – 6. třesňového týdne, s vysokou plodností. Plody jsou s pevnou růžovou dužinou, tzv. chrupky. Kordia je velmi odolná proti praskání plodů. Květy jsou náchylné k pozdním jarním mrazům (Zelený et al., 2019).

### *Regina*

Habitus stromu je se středně silný vzrůstem a dobře tvarovatelnou korunou. Dle doby kvetení ji řadíme mezi pozdní. Zrání je středně pozdní, okolo 6. - 7. třesňového týdne, s vysokou plodností. Plody jsou tmavě červené, velké a srdčité, s tuhou, červenou a šťavnatou dužinou, tzv. chrupky. Regina je vysoce odolná proti praskání plodů (Ekozahradnictví, nedatováno; Zahradnictví Flos, nedatováno; Zahradnictví Spomyšl, nedatováno).

## **Meruňky**

Meruňka je strom s dobře stavěnou korunou z čeledi růžovitých (*Rosaceae*). Jedná se o diploidní, většinou samosprašnou rostlinu. Kvete velmi brzy na jaře a často je poškozena zimními mrazy nebo pozdními jarními mrazy. Květ snese mírný mráz, plody nikoliv. Vegetační období začíná u meruňek velmi brzy. Pokud v zimě nastane několik teplých dní, meruňka může vykvést a malé plody následně zmrznou. V oblastech, kde se vyskytují pozdější mrazíky, je její pěstování velmi omezené. Meruňka je velmi náročná na stanoviště. Ideální jsou polohy s průměrnou roční teplotou nad 8,5 °C a ročním úhrnem srážek okolo 550 – 600 mm (Dohnálek, 1939; Kutina et al., 1991; Zelený et al., 2019).

### *Betinka*

Habitus stromu je silný a vzpřímený. Plodnost se řadí mezi střední až vysokou. Zrání je okolo 24. července. Plody jsou střední až velké, slupka je oranžová, na osluněné straně červená, pevná. Dužina je jemná a snadno se odděluje od pecky. Chuťově je šťavnatá a dobrá. Betinka je odolná proti šarce švestky (FYTOS fruit, nedatováno).

### *Candela*

Habitus stromu je typický polosloupcovitým typem růstu. Plodnost se řadí mezi vysokou. Zrání je okolo 15. července. Plody jsou kulovité, středně velké s váhou až 54 g. Slupka je oranžová, na osluněné straně růžová. Dužina je oranžová, středně pevná. Chuťově je velmi sladká a šťavnatá. Candela je vysoce odolná proti šarce švestky (Krška et al., 2016; Zahradnictví Spomyšl, nedatováno).

### *Harcot*

Habitus stromu je středně bujný. Zrání je okolo 30. července s velkou a pravidelnou plodností. Plody jsou střední až velké s kulovitým tvarem. Slupka je oranžová, na osluněné straně červená. Dužina má oranžovou barvu, je tuhá a středně ulpívá na pecce. Chuťově je aromatická, středně šťavnatá a sladká. Harcot je středně odolný proti houbovým chorobám, vysoce odolný proti šarce švestky. Harcot je vysoce odolný proti zimním a předjarním mrazům (VŠÚO, nedatováno).

### *Harogem*

Habitus stromu je středně bujný až bujný. Zrání je okolo 30. července s velkou a pravidelnou plodností. Plody jsou středně velké, slupka je oranžová, na osluněné straně červená. Dužina je tuhá a dobře se oddělující od pecky. Chuťově je aromatická, středně šťavnatá a sladká. Harogem je středně odolný proti houbovým chorobám a vysoce odolný proti mrazu ve dřevě, pupenech i květech (VŠÚO, nedatováno)

### *Leskora*

Habitus stromu je středně silný. Zrání je okolo 6. července s velkou a pravidelnou plodností. Plody jsou střední s hmotností 40 g, nejsou náchylné k otláčení. Slupka je oranžová na osluněné straně oranžovo – červená. Dužina je oranžová, středně tuhá a dobře se oddělující od pecky. Chuťově je aromatická a šťavnatá. Květní pupeny Leskory jsou velmi málo odolné proti mrazu. Je středně odolná proti gnomonii a monilii (VŠÚO, nedatováno).

### *Sophinka*

Habitus stromu je kompaktní a vzpřímený. Zrání je okolo 27. – 29. července se střední až vysokou plodností. Plody jsou větší s hmotností až 65 g a nejsou náchylné k otláčení. Slupka má žluto oranžové zbarvení. Dužina je pevná. Chuťově je velmi dobrá. Sophinka je vysoce odolná proti šarce švestky a má vyšší odolnost proti mrazu (Zahradnictví Spomyšl, nedatováno).

### 1.3.3. Stanovení cukrů a cukerných alkoholů

0,2 – 0,3 g pupenů se zhomogenizovalo v třecí misce s 2 ml 80% etanolu. Homogenát se přenesl do 2 ml mikrozkušavky a zahříval při 80 °C v termobloku (Thermo-Shaker, Grant-bio) po dobu 20 minut. Poté se homogenát centrifugoval 10 minut při 4500 rpm (MPW-55 Microcentrifuge, MPW, Polsko), a vzniklý supernatant se odebral do čisté zkumavky. Pelet se resuspendoval s 1 ml 80% ethanolu a zahříval 20 minut při 80 °C. Po centrifugaci 10 minut při 4500 rpm se supernatanty spojily. Pelet se znovu resuspendoval s 1 ml 50% ethanolu, zahříval 20 minut při 80 °C a centrifugoval 10 minut při 4500 rpm. Supernatant se poté přidal ke směsi předchozích (Carillo a Gibon 2011). Ve spojených supernatantech se stanovil obsah jednoduchých cukrů a cukerných alkoholů pomocí HPLC-DAD-RID. Separace probíhala na NH<sub>2</sub> koloně (250 mm x 4,6 mm, 3,0 μm; Arion) s využitím isokratické eluce mobilní fáze acetonitril:voda 75:25 s průtokem 1 ml/l. Teplota kolony byla 35 °C, nástřik vzorků 20 μl a vlnová délka 191 nm. Parametry RID zdroje: teplota 35 °C, pozitivní polarita. Jako standardy pro sestavení kalibračních křivek (Příloha 1) se použily komerčně dostupné sacharidy (Sigma-Aldrich), přičemž celkový obsah cukrů se vyjádřil v mg na g čerstvé hmotnosti (FW). Reprezentativní chromatogramy jsou vyobrazeny v příloze (Příloha 2 a Příloha 3).

### 1.3.4. Stanovení prolinu

Pro stanovení obsahu prolinu se využily výše popsané supernatanty. Pro samotnou reakci bylo smícháno 500 μl supernatantu a 1000 μl reakčního činidla. Reakční činidlo se skládalo z ninhydrinu, ledové kyseliny octové, etanolu a vody v poměru 1:60:20:20. Směs se zahřívala v termobloku po dobu 20 minut při teplotě 95 °C. Po ochlazení v ledové drti na teplotu zhruba 25 °C, se zkumavky centrifugovaly 5 minut při otáčkách 10 000 rpm. Absorbance vložek se měřila spektrofotometricky při vlnové délce 520 nm (spektrofotometr Cintra 101, Francie). Jako standard pro sestavení kalibrační křivky (Příloha 4) se použil komerčně dostupný prolin (Sigma-Aldrich) a celkový obsah se vyjádřil jako μmol prolinu na g FW (Carillo a Gibon 2011).

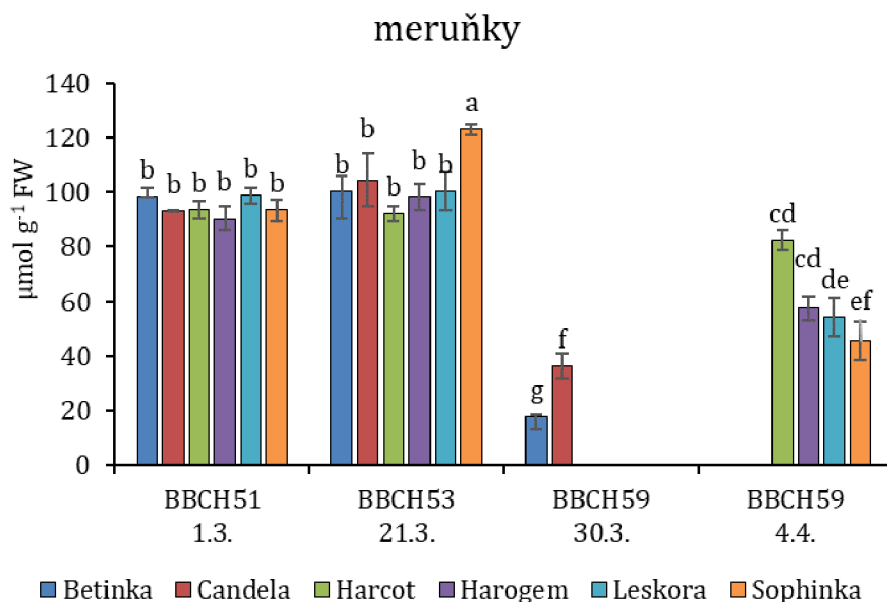
### 1.3.5. Statistické zpracování dat

U všech analýz byla pro každou odrůdu a fenofázi vykonána 3 měření. Statistické zpracování dat proběhlo s pomocí programu GraphPad Prism 9 (LLC, San Diego, CA, USA) využitím jednorozměrné analýzy variance (Anova) a Tukeyho testu na hladině významnosti  $p < 0,05$ . Tabulky a grafy byly vytvořeny v programu MS Excel (Microsoft, USA).

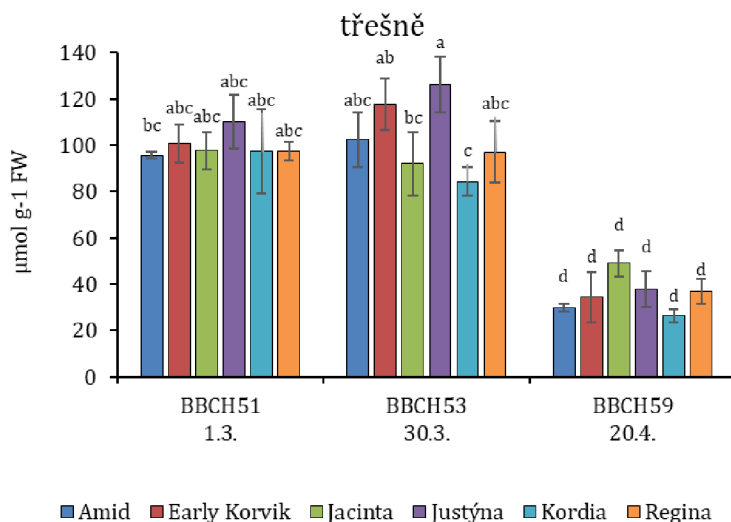
## 1.4. Výsledky

### 1.4.1. Obsah prolinu

Obsah prolinu se mezi prvními dvěma termíny sběru lišil jen minimálně. U meruněk (Obr. 19) byl zaznamenán mírný nárůst, výrazněji jen v případě genotypu 'Sophinka'. U třešní (Obr. 20) se neprojevil jednoznačný trend, mírný nárůst byl u genotypů 'Amid', 'Early Korvik' a 'Justýna'. Naopak hodnoty u genotypů 'Jacinta' a 'Kordia' mírně poklesly. Zásadní rozdíl mezi ovocnými druhy nebyl pozorován. Výrazný pokles prolinu byl ale zaznamenán s přechodem pupenů do květu, a to u všech testovaných genotypů a stromů. V případě meruněk se projevila větší variabilita mezi genotypy, kdy nejvýraznější pokles byl u genotypů 'Betinka' (více než 5násobek), 'Candela' a 'Sophinka' (více než 2,5násobek). Naopak u odrůdy 'Harcot' byl pokles jen minimální. V případě třešní byl pokles relativně konstantní a dosahoval hodnoty okolo 2,5-3,5násobků.



Obr. 19: Obsah prolinu ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW) v pupenech vybraných genotypů meruněk v jednotlivých fenofázích. Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).



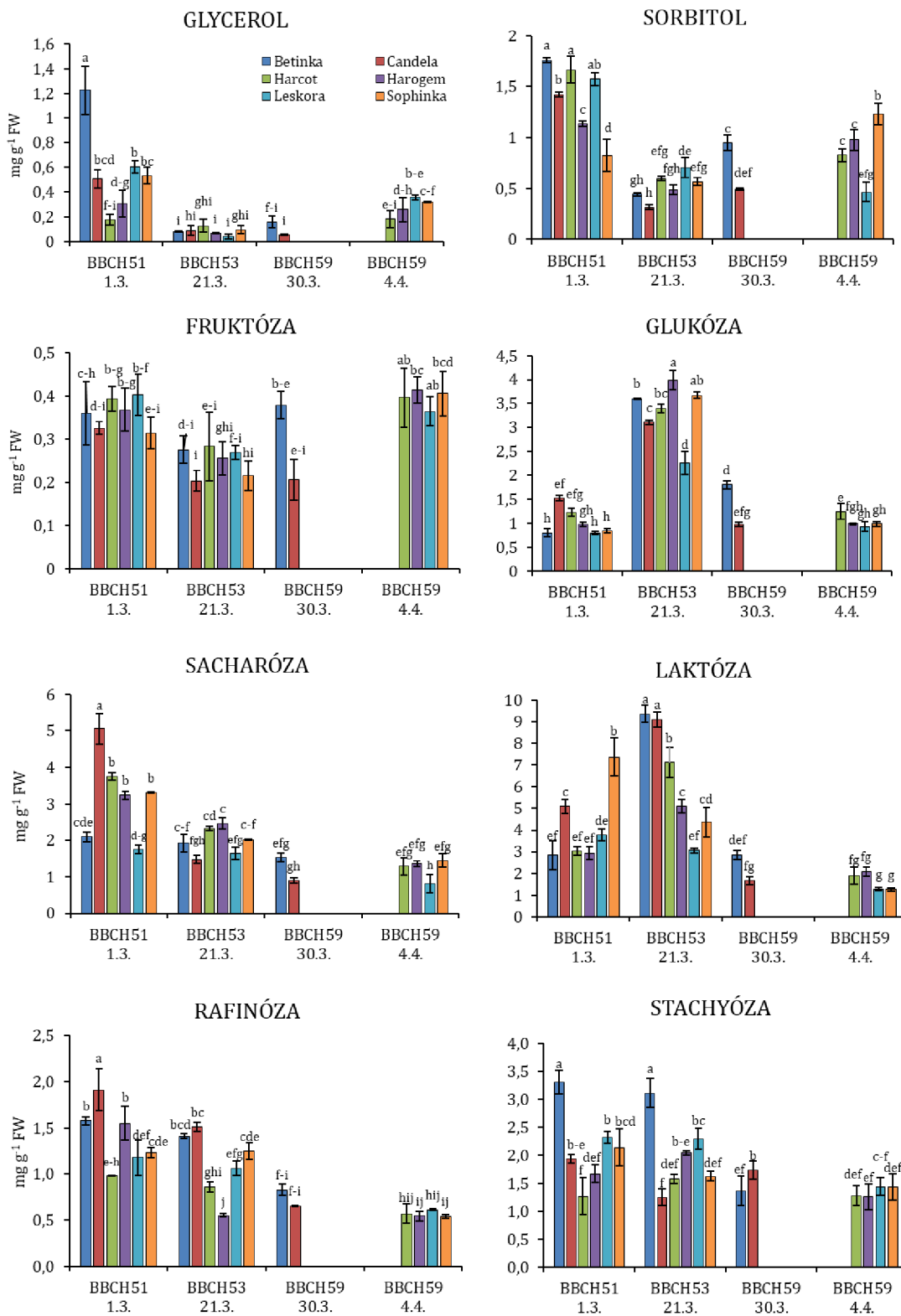
Obr. 20: Obsah prolinu ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW) v pupenech vybraných genotypů třešní v jednotlivých fenofázích. Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

#### 1.4.2. Obsah cukrů a cukerných alkoholů

Celkově byl hodnocen obsah monosacharidů fruktóza a glukóza, disacharidů sacharóza a laktóza, trisacharidu rafinóza, tetrasacharidu stachyóza a cukerných alkoholů glycerol a sorbitol. Obsah cukrů a cukerných alkoholů narůstá s přechodem do fáze dormance, kde tyto slouží jako ochrana před zamrznutím. Následně s přechodem pupenů do fáze růstu může dojít k jejich pozvolnému poklesu - jako výsledek jejich spotřeby v energetickém metabolismu.

V případě meruněk (Obr. 21) došlo s přechodem mezi prvními dvěma fenofázemi BBCH51 (nalitý pupen) a BBCH53 (rašící pupen) k nárůstu obsahu glukózy (více jak 4násobně u tolerantních genotypů 'Betinka', 'Harogem' a senzitivního genotypu 'Sophinka') a laktózy (3násobně u 'Betinky' a 2,3násobně u 'Harcot'). Nárůst může být důsledkem štěpení složitějších sacharidů za potřeby uvolnění energie a stavebních jednotek pro růst pupenů. U ostatních cukrů došlo k poklesu. Prudký pokles byl zaznamenán u glycerolu, nejvýrazněji u genotypů 'Betinka' a 'Leskora' - až 15násobně, a sorbitolu u genotypů 'Betinka' a 'Candela' - 4násobně.

S přechodem pupenů do květu (BBCH59) se hladiny cukrů opět výrazněji změnil, byl zaznamenán pokles u glukózy (výrazněji u genotypů 'Candela', 'Harogem' a 'Sophinka', 3 - 4násobně), laktózy (5,5násobně u 'Candely') a sacharózy (více jak 2násobně u 'Leskory'). Naopak u fruktózy nastal nárůst (výrazněji u genotypů 'Harogem' a 'Sophinka'). Celkově ve všech fenofázích byl její obsah relativně nízký.



Obr. 21: Obsah cukrů a cukerných alkoholů ( $\text{mg g}^{-1} \text{FW}$ ) v pupenech vybraných genotypů merunek v jednotlivých fenofázích. Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

Obsah rafinózy a stachyózy s přechodem mezi fenofázemi klesal. U rafinózy výrazněji u genotypů 'Betinka', 'Candela' a 'Harogem'. U stachyózy v případě 'Betinky' a 'Sophinky'.

V případě třešňi (Obr. 22) byl trend mírně odlišný, kdy k nárůstu obsahu glukózy a laktózy došlo jen u dvou genotypů, konkrétně 'Early Korvik' a 'Regina'. U ostatních genotypů nastal pokles. Výrazný pokles hladiny byl zaznamenán u senzitivních genotypů 'Jacinta' a 'Justýna' u fruktózy (3násobně, resp. 4,5násobně) a sorbitolu (více jak 3násobně). Prudký pokles byl zaznamenán u glycerolu v případě tolerantních genotypů 'Early Korvik' (14násobně) a 'Amid' (7násobně). U senzitivních genotypů byl pokles nízký.

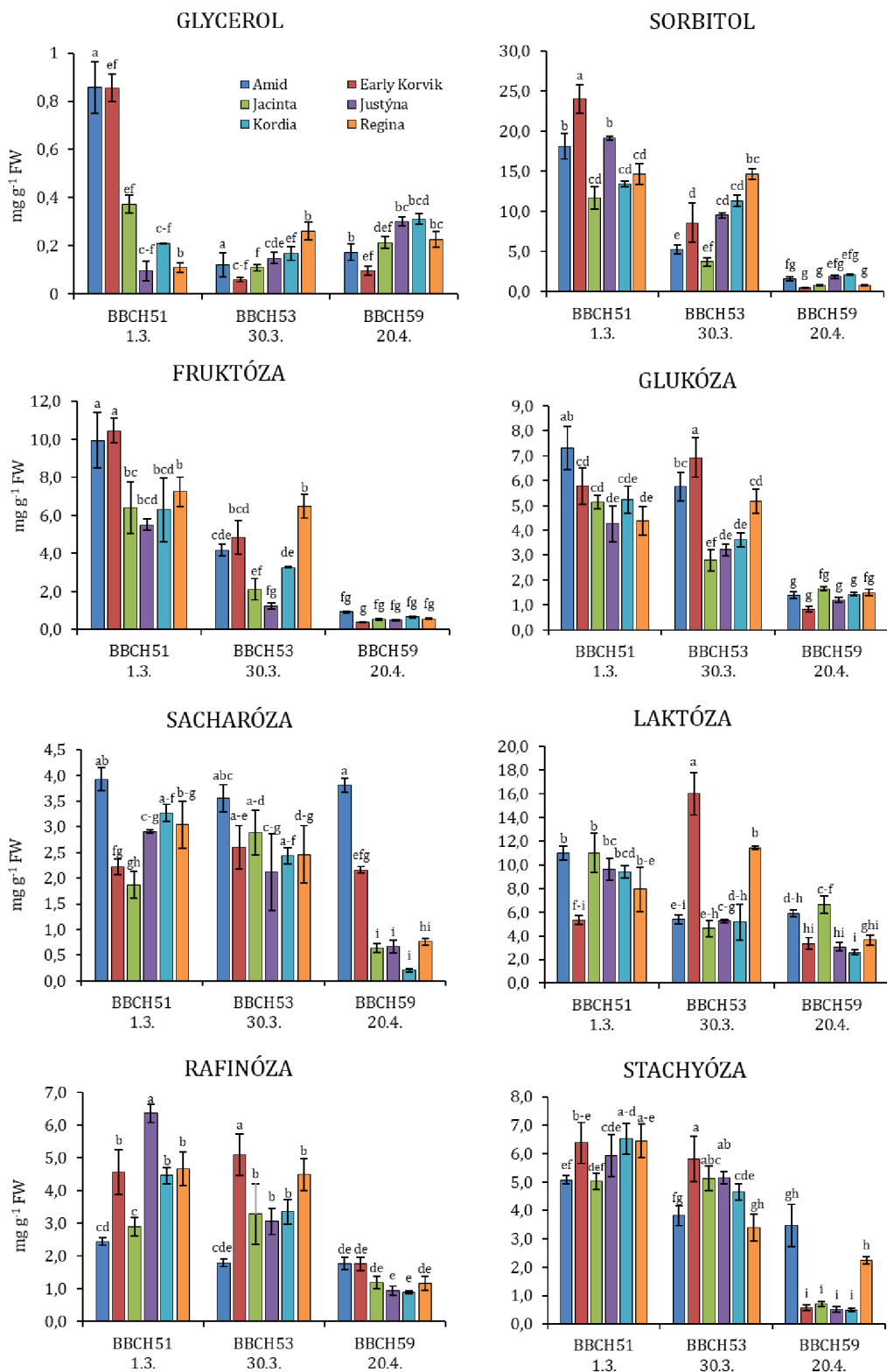
S přechodem pupenů do květu byl pozorován ještě výraznější pokles, zejména u fruktózy, glukózy, sacharózy a sorbitolu.

I v případě třešňi docházelo s přechodem mezi fenofázemi k poklesu obsahu rafinózy a stachyózy, výrazněji s přechodem do fáze květu. U rafinózy, téměř 4násobně u genotypů 'Koradia' a 'Regina' a u stachyózy až 10násobně u genotypů 'Early Korvik', 'Justýna' a 'Kordia'.

Porovnáme-li ovocné druhy mezi sebou, můžeme říci, že množství fruktózy u meruněk bylo ve fenofázi BBCH51 mnohonásobně nižší než u třešňi. Ve fenofázi BBCH59 už byly jejich koncentrace srovnatelné, ale trend byl odlišný. Jak už bylo řečeno u meruněk, s přechodem do květu koncentrace stoupla, kdežto u třešňi se snížila. Koncentrace sorbitolu u třešňi ve fenofázi BBCH51 byla mnohonásobně vyšší než u meruněk. Ovšem ve fenofázi BBCH59 již byly koncentrace u obou ovocných druhů srovnatelné. Trend i množství glycerolu byly velmi podobné v odpovídajících fenofázích, tedy v BBCH53 pokles a v BBCH59 mírný nárůst, s výjimkou třešně 'Regina', u které v BBCH59 glycerol poklesl.

Celkově lze tvrdit, že tolerantnější genotypy meruněk měly buď hodnoty měřených cukrů nižší, nebo u nich změny s přechodem mezi fenofázemi nebyly tak markantní. V případě třešňi tomu bylo přesně naopak, kdy vyšší hodnoty cukrů byly zaznamenány u tolerantnějších genotypů.





Obr. 22: Obsah cukrů a cukerných alkoholů ( $\text{mg g}^{-1}$  FW) v pupenech vybraných genotypů třešní v jednotlivých fenofázích. Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují dle Tukeyova testu statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

### 3. Diskuze

Rostliny temperátního pásu jsou během růstu vystaveny mnoha různorodým podmínkám prostředí. Současné předpovědi klimatických modelů naznačují, že události, jako jsou jarní mrazy a teplé zimy, by mohly být častější kvůli změnám souvisejícím s globálním oteplováním. Teplejší zimy v temperátním pásu zvyšují riziko nedostatečného chlazení ovocných stromů, jelikož potřebují k uvolnění z endodormance a následnému kvetení dostatečně dlouhou dobu při nízkých teplotách. Mrazy, ke kterým dochází po výrazně teplém období na začátku jara, někdy nazývané též falešné jaro, jsou zase příčinou vážného poškození pupat u mnoha ovocných stromů (Götz et al., 2014; Kaya et al., 2021a).

Studium fyziologických procesů rostlin v závislosti na teplotě u různých druhů a kultivarů má velký význam pro zlepšení fenologických modelů a tím i zlepšení budoucích předpovědí. Dalším nezbytným nástrojem pro zlepšení kvetení je monitorování dormance pupenů a následné správné provádění zemědělských opatření, jako je ochrana před poškozením mrazem (Balderman et al., 2018; Kaufmann a Blanke, 2017; Michailidis et al., 2018).

Dormance u rostlin je umožněna potlačením mnoha fyziologických procesů jako je fotosyntéza, metabolismus proteinů a respirace. Na přečkání extrémních podmínek na začátku (v zimě) a na konci (brzy na jaře) doby odpočinku mnoho listnatých stromů využívá změny v jejich metabolismu a různé regulátory růstu (zejména ABA a GA) (Balderman et al., 2018). Za přechod z endo- do ekodormance lze označit začátek kvetení. Cukry, zejména sacharóza, oligosacharidy, aminokyseliny, fenolové sloučeniny a organické kyseliny patří mezi důležité metabolity spojené s otevíráním pupenů při nucené deaklimatizaci (Balderman et al., 2018). Bylo také dokázáno, že metabolismus sacharidů je nejvíce citlivý na nízké teploty (Farokhzad et al., 2018) a sacharidy hrají hlavní roli při kontrole růstu a vývoje pupenů během dormance a jejího uvolnění (Kaufmann a Blanke, 2017). Srovnávací proteomická a transkriptomická analýza odhalila, že geny a proteiny spojené s energetickým metabolismem a oxidačně-redukčními reakcemi hrály důležitou roli při uvolňování dormance pupenů japonských meruněk (Michailidis et al., 2018).

Je prokázáno, že pupeny jsou odolnější vůči chladu ve fázi vegetačního klidu, zatímco jejich citlivost na chlad se zvyšuje během fáze nalévání pupenů. Klíčovou roli ve vyrovnání se s poškozením od jarních mrazů by mohlo hrát pochopení fyziologických mechanismů pupenů a květů v podmínkách nízké teploty a stanovení vztahu mezi biochemickými látkami v pupenech a jejich mrazuvzdorností (Götz et al., 2014; Kaya et al., 2021a; Michailidis et al., 2018).

Na odolnosti dřevin vůči jarním mrazům se podílí několik klíčových faktorů, jako je genotyp, fáze růstu, tvorba ledových krystalů, vlhkost a stav výživy. Většina studií,

kteře se zabývaly mrazovou tolerancí pupenů, se zaměřovaly na fyziologické reakce pupenů během endodormance, konkrétně změny v množství cukrů, bílkovin a dalších metabolitů. Sacharidy zabraňují nukleaci ledu v apoplastu, snižují dehydrataci buněk, stabilizují membránu a vycytávají ROS. (Farokhzad, et al., 2018). Tyto studie se shodují, že koncentrace rozpustných sacharidů v různých pletivech se zvyšuje během podzimní/zimní aklimatizace a klesá během jarní deaklimatizace. Např. přechod pupenů do květu u černého rybízu je spojen s remodelací metabolismu, kde je zvýšený obsah organických kyselin a několika aminokyselin. Mimo jiné kumulace ve vodě rozpustných sacharidů v rostlinných buňkách mění teplotu tuhnutí čímž ovlivňuje míru poškození a smrti buněk. Také zvýšený obsah sorbitolu a sacharózy v pestících pupenů broskvoně byl spojen se zvýšenou mrazuvzdorností pestíku (Kaya et al., 2021a). Kdežto obsah glukózy, fruktózy, sacharózy, sorbitolu a celkových cukrů v mrazem poškozených květech jabloní a hrušní byl vyšší než obsah cukrů květů nepoškozených (Hudina a Štampar, 2006).

V naší studii jsme se z těchto důvodů také zaměřily na monitoring obsahu cukrů a cukerných alkoholů během přechodu z endodormance do ekodormance a během začátku kvetení neboli ve fenofázích BBCH51, BBCH53 a BBCH59. Také jsme braly v potaz, zdali variabilita v jejich obsahu může mít souvislost s deklarovanou potenciální citlivostí/odolností vůči mrazu.

V našich vzorcích třešní byl nejvyšší obsah fruktózy a glukózy ve fenofázi BBCH51, což lze označit za přechod mezi endodormancí a ekodormancí. Ve fenofázi BBCH53, tedy kdy se naléval pupen, koncentrace klesala téměř u všech genotypů. Obdobné výsledky zaznamenali i Balderman et al. (2018) a Michailidis et al. (2018) ve vzorcích pupenů třešní, kdy ve fázi endodormance byly nalezeny pouze redukující cukry glukóza a fruktóza. S přechodem do ekodormance se jejich obsah zvyšoval. Během dalších fází směřujících k prasknutí pupene a s následným rozvojem květu nastal pokles. V těchto fázích byla také identifikována i maltóza. Pokles obsahu glukózy je možné vysvětlit aktivací pentozofosfátového cyklu s přechodem z dormance. Ten je jednou z cest degradace glukózy, čímž se tvoří dostatek donorů elektronů a meziproduktů včetně NADPH. Mezi hlavní enzymy oxidativní a neoxidativní dráhy pentozofosfátového cyklu patří glukóza-6-fosfátdehydrogenáza a 6-fosfoglukonátdehydrogenáza. Jejich upregulace byla pozorována u révy vinné s uvolňováním z endodormance (Yuxi et al., 2018).

Naopak, Götz et al. (2014) poukázali, že během nalévání pupene (BBCH51) třešně obsahovaly glukózu, fruktózu a sacharózu. V nalitých pupenech (BBCH53) bylo jejich množství o 50 % vyšší a obsah glukózy a fruktózy dále rostl. Toto u našich vzorků platí jen pro genotypy 'Early Korvik' a 'Regina', kde byl obsah glukózy vyšší u BBCH53 než u BBCH51. Dále s rozvojem pupene bylo pozorováno zvýšení obsahu redukujících cukrů (Götz et al., 2014), což je v rozporu s našimi výsledky, které

naopak vyjadřují pokles. Náhlý nárůst a akumulaci redukcujících cukrů, lze vysvětlit rozkladem oligo- a polysacharidů během začátku ontogenetického vývoje. Se zahájením fotosyntézy dochází opět k oživení jejich syntézy (Balderman et al., 2018).

V případě sacharózy nastal v práci Michailidis et al. (2018) pokles s přechodem od ekodormance do plného rozvití pupene. U našich vzorků byl pokles pozorován u genotypů 'Amid', 'Justýna', 'Kordia' a 'Regina' mezi fenofázemi BBCH51 a BBCH53. S přechodem do fenofáze BBCH59 už byl pokles pozorován u všech genotypů.

Obsah laktózy v našich výsledcích klesal s přechodem do BBCH53 s výjimkou genotypů 'Early Korvik' a 'Regina', kde byl pozorován nárůst. Ve fenofázi BBCH59 byly hodnoty buďto srovnatelné anebo nižší než v BBCH53. Obdobný pokles zaznamenali i Michailidis et al. (2018).

Lasheen a Chaplin (1977) analyzovali cukry v pupenech dvou kultivarů broskvoně. Po celou dobu prosince a ledna došlo k přechodnému poklesu koncentrace glukózy, pravděpodobně v důsledku přeměny glukózy na sacharózu. Poté následoval stálý nárůst po celé jaro. Naproti tomu u všech našich vzorků meruněk byl prokázán vyšší obsah glukózy pouze v druhé fenofázi (BBCH53). Nejvyšší nárůst byl pozorován u genotypů 'Harogem', 'Betinka' a 'Sofinka'. Během fenofáze BBCH59 byla koncentrace glukózy nízká. Kdežto u třešně byl mírný nárůst pozorován jen u genotypů 'Early Korvik' a 'Regina' a to s přechodem z BBCH51 na BBCH53. Co se fruktózy týče, v práci Lasheen a Chaplin (1977) v polovině února a začátkem března hladina fruktózy prudce vzrostla a dosáhla vrcholu v polovině března, poté se během zbytku března její koncentrace prudce snížila. To může naznačovat dřívější využití fruktózy spíše než glukózy a sacharózy v květu. U našich vzorků je patrný pokles fruktózy u třešně, přičemž během BBCH59 už její hodnoty byly téměř nulové, což poukazuje na její využití v rostlině. U meruněk ve fenofázi BBCH59 k poklesu fruktózy nedošlo, avšak její koncentrace ve všech třech fenofázích byly velmi nízké.

(Kaya et al., 2021a) pozorovali změny v koncentraci organických látek dvou kultivarů meruněk, jednoho tolerantního vůči mrazu a druhého citlivého na mráz v květním lůžku a pestíku. Bylo zjištěno, že bod smrti u buněk pestíku byl při nižších teplotách než u květního lůžka u obou kultivarů v době květu. Byly zjištěny rozdíly v obsahu organických kyselin a rozpustných cukrů u jednotlivých kultivarů i u pestíku a květního lůžka. Obsah organických kyselin byl vyšší v kultivaru meruněk odolnějších vůči mrazu než u kultivaru meruněk citlivých k mrazu. Kdežto obsah organických kyselin byl nižší v orgánu odolném vůči mrazu, tedy v pestíku, než v orgánu citlivém na mráz (květní lůžko). Z toho vyplývá, že odolnější kultivar, nikoli orgán, měl více daných látek, a tedy i vyšší odolnost proti mrazu. V našem případě se tento trend potvrdil pouze u třešně nikoli u meruněk, kdy odolnější genotypy třešně obsahovaly více cukrů (Kaya et al., 2021a).

V případě cukerných alkoholů bylo srovnání s publikovanými studiiemi nejednoznačné. Výsledky pro sorbitol odpovídaly akumulárnímu trendu jako v práci Michailidis et al. (2018), kde jeho hladina klesala s přechodem mezi fenofázemi. Naopak, pro glycerol byl zaznamenán opačný trend, a to nárůst ve srovnání s poklesem v naší práci.

Vosnjak et al. (2021) porovnávali množství sorbitolu, fruktózy, glukózy a sacharózy v třešních. Pořadí naměřeného množství cukrů odpovídalo našemu, kdy nejvíce bylo sorbitolu, fruktózy, glukózy a nejméně sacharózy. Podíváme-li se na zastoupení jednotlivých cukrů v pupenech, můžeme tvrdit, že nejvíce se v pupenech vyskytoval sorbitol a nejméně sacharóza.

Bylo zjištěno, že obsah cukrů patřících do rafinóзовé oligosacharidové rodiny, tedy rafinóza a stachyóza, v průběhu zimních aklimatizačních procesů narůstá a opět pozvolna klesá, kdy v průběhu aktivního růstu je jejich obsah relativně nízký. Tento trend se potvrdil i ve vzorcích pupenů meruněk a třešní, kdy byl zjištěn pokles obsahu rafinózy s pozvolným přechodem z dormance do aktivního růstu. Nejvýraznější pokles byl pozorován u meruňkových odrůd 'Candela' a 'Harogem' a u třešňové odrůdy 'Justýna'. V případě stachyózy byl tento pokles u třešní ještě výraznější, a to u genotypů 'Early Korvik', 'Justýna' a 'Kordia'. Tento pokles odpovídá výsledkům v práci Lasheen a Chaplin (1977), kdy byl obsah stachyózy v pupenech na začátku dormance nízký a poté se obsah stabilně zvyšoval až do poloviny března, poté následoval trvalý pokles.

Vliv na celkovou koncentraci cukrů může mít i celkový obsah škrobu. Při vystavení nízkým teplotám dochází k jeho hydrolýze a značnému zvýšení volných sacharidů, zejména glukózy, fruktózy a sacharózy (Farokhzad et al., 2018). Bylo zjištěno, že mobilizace předem uložených zásob škrobu v pestíku měla pozitivní vliv na odolnost vůči mrazu, a koncentrace sacharidů byla výrazně nižší u poraněných květních pupenů broskvoně a hroznů než u těch zdravých (Viti et al., 2008).

Kaufmann a Blanke (2017) rozlišili odrůdy třešní na dvě skupiny, a to klimakterické (obsahující více škrobu) a neklimakterické (obsahující méně škrobu), kde byly mimo dalších použity i genotypy 'Kordia' (skupina 1) s počátečním nižším a konstantním obsahem škrobu a sorbitolem a 'Regina' (skupina 2) s počátečním větším obsahem škrobu a sorbitolu. Po dokončení období ochlazování v endodormanci vstupuje pupen do ekodormance, ve které faktory prostředí mohou iniciovat kvetení. V této fázi zůstal obsah glukózy, fruktózy, sorbitolu a škrobu konstantní. V případě našich vzorků byl obsah fruktózy, glukózy a sorbitolu ve fenofázi BBCH51 asi poloviční oproti Kaufmann a Blanke (2017).

Jednotlivé kultivary a genotypy se od sebe mohou lišit nejen v odolnosti vůči chladu/mrazu, ale i v tom, kterou látku syntetizují a také v tom, kdy danou látku

akumulují. Tyto skutečnosti se také mohou lišit v závislosti na teplotě a dané fenofázi u jednotlivých kultivarů (Salazar-Gutierrez et al., 2014; Pedryc, et al., 2004).

Výsledky práce Farokhzad et al. (2018) ukazují, že pozdní ořešákový genotyp měl nejvyšší obsah rozpustných cukrů a prolinu a nejnižší množství škrobu a bílkovin ve srovnání s růstovými genotypy rané a střední sezóny. Bolat et al. (1995) porovnáním obsahu sacharidů v květních pupenech kultivarů meruněk (‘Salak’ a ‘Tebereze’) zjistili, že mrazuvzdornost pozitivně koreluje s obsahem sacharózy, a negativně koreluje s obsahem škrobu. Celková cukernatost v rostlinách *Vitis amurensis* (extrémně odolná vůči mrznutí) a jejich kříženců byla vyšší než u *V. vinifera* (odolná). Extrémně odolné kultivary obsahovaly obecně větší množství glukózy, fruktózy a rafinózy, než ty pouze odolné (Pedryc et al., 2004). Vyšší koncentrace glukózy, fruktózy a sacharózy byly pozorované u tolerantního genotypu meruňky (‘İğdir Şalak’) ve srovnání s citlivým (‘Mihralibey’). Kromě toho, u tolerantního genotypu byly pozorovány i vyšší koncentrace organických kyselin a aminokyselin (zejména prolin, glutamin a arginin) (Kaya et al., 2021a; Kaya et al., 2021b).

Námi měřené koncentrace cukrů byly vyšší u tolerantnějších genotypů pouze u třešní (‘Amid’, ‘Early Korvik’ a ‘Regina’). U meruněk měly citlivější genotypy (‘Candela’, ‘Harcot’ a ‘Sophinka’) vyšší obsah cukrů než ty tolerantnější.

Další významnou sloučeninou zapojenou do aklimatizačních procesů je prolin. Může působit jako prostředník osmotické úpravy, stabilizátor proteinů a membrán. Bylo zjištěno, že odolnost pupenů vůči chladu a mrazuvzdornost v dormantním stavu přímo závisí na množství prolinu. U ořešáků byl nejvyšší obsah prolinu pozorován v genotypech s pozdním růstem, tedy u genotypů více odolných vůči chladu. Naopak nejnižší obsah prolinu byl pozorován v raném růstovém genotypu. Zimní pupeny obsahovaly nejvíce prolinu, který během dalšího vývoje postupně klesal. Během nízkých teplot odolnost proti chladu a obsah prolinu byly paralelní - když začala teplota stoupat, prolin začal klesat (Farokhzad, et al., 2018). U našich genotypů nebyl mezi prvními dvěma fenofázemi výrazný rozdíl. S přechodem do fenofáze BBCH59 už byla koncentrace prolinu u všech genotypů nižší, což je v souladu s Farokhzad et al. (2018). Obdobně i v práci Michailidis et al. (2018) hladina prolinu klesala nebo byla konstantní.

Vyšší koncentrace prolinu byly zaznamenány i u tolerantních genotypů meruňky ve srovnání s citlivými. V naší práci jsme výrazný rozdíl mezi genotypy nezaznamenaly.

Vzhledem k tomu, že vzorky pupenů a květů byly odebírány přímo z výsadby v sadech, je nutné brát v potaz i možný vliv počasí na akumuláční trend studovaných látek. Obecně lze duben 2022 označit za velmi chladný, větrný a suchý. Mrazivé počasí se v tomto měsíci vyskytlo ve třech vlnách. Ačkoliv teploty neklesaly příliš hluboko pod bod mrazu, jejich dlouhotrvající a opakované působení ve spojení

s nedostatkem vody způsobilo na řadě ovocných stromů poškození květních orgánů a vyvíjejících se plodů. Chladové období v dubnu a květnu negativně ovlivnilo zejména květní pupeny teplomilných peckovin a třešní (Němcová a Buchtová, 2022). V oblastech výsadby VŠÚO byly zaznamenány hlubší mrazy (-4 °C) v období kvetení meruněk (kolem 4. dubna) a slabší mrazy (-1,1 °C) v období kvetení třešní (kolem 20. dubna) (Příloha 5; ČHMÚ, 2022). Celkově byly nejvíce poškozeny květy u genotypů 'Harcot' a 'Harogem' (VŠÚO, 2022), ačkoli v nich byly zaznamenány nejvyšší hodnoty prolinu a sacharidů ze všech meruňkových genotypů a navíc genotyp 'Harogem' je považován za mrazově odolnější díky svému kanadskému původu. U třešní byly nejvíce poškozeny květy genotypů 'Kordia' a 'Early Korvik', u kterých byl zaznamenán nejnižší obsah prolinu a relativně nízký obsah sacharidů, ačkoli 'Early Korvik' je také považován za relativně mrazuvzdorný.

Jedním z prostředků, díky kterým lze urychlit výběr mrazuvzdorných sazenic jsou ekologicky nezávislé studie v mrazicích komorách (Pedryc et al., 2004). Při porovnání mrazuvzdornosti generativních pupenů podle podílu obsahu krystalizované vody k celkovému obsahu vody, ať už v průběhu chlazení či ohřevu, lze odrůdy s nižším obsahem krystalizované vody považovat za odolnější. Pro námi zvolené genotypy byla dle práce Bilavčík et al., (2022) a mrazových kalorimetrických testů navržena míra tolerance, a to následovně: pro meruňky 'Harogem' > 'Leskora' > 'Sophinka' > 'Harcot' > 'Candela' > 'Betinka'; a třešně 'Regina' > 'Justyna' > 'Jacinta' > 'Amid' > 'Kordia' > 'Early Korvik' (VŠÚO, 2022).

Dle dostupných informací mají tolerantní odrůdy obecně vyšší obsah sacharidů a prolinu. V našem případě se toto potvrdilo jen pro tolerantní genotypy třešní, 'Amid', 'Early Korvik' a 'Regina', které však při výše zmíněných mrazových testech zaostávají (krom 'Kordia'). Naopak u meruněk byly u tolerantních odrůd nižší hodnoty cukrů a prolinu, avšak v mrazových testech jsou na popředních místech ('Harogem' a 'Leskora').

Pro jednoznačné určení citlivosti/tolerantnosti pro vybrané genotypy jsou nutná další pozorování, které zahrnou více vegetačních sezón a další chemické analýzy látek, které se podílejí na aklimatizačních procesech, jako například obsah škrobu, aminokyselin nebo organických kyselin.

## Závěr

Cílem bakalářské práce bylo sledovat dynamiku osmoticky aktivních látek v pupenech vybraných tolerantních a senzitivních genotypů dvou ovocných stromů v různých fenofázích vývoje pupene s cílem zhodnotit, jak spolu souvisí obsah stanovených látek a citlivost daného genotypu.

Z pohledu obsahu osmoticky aktivních látek lze říci, že se v pupenech ve vysoké koncentraci nachází prolin, jehož koncentrace několikanásobně převyšovaly koncentrace cukrů a cukerných alkoholů. Obecně byly hodnoty prolinu u obou ovocných stromu relativně obdobné, avšak pokles s přechodem do kvetení byl markantnější u třešní.

V případě cukrů u meruněk došlo s přechodem mezi fenofázemi BBCH51 a BBCH53 k nárůstu obsahu glukózy a laktózy a k výraznému poklesu glycerolu i sorbitolu. S přechodem do fáze kvetení (BBCH59) se hladiny cukrů opět výrazněji změnily. Byl zaznamenán pokles u glukózy, laktózy a sacharózy. Naopak u fruktózy nastal nárůst.

V případě třešní byl trend mírně odlišný, kdy k nárůstu obsahu glukózy a laktózy došlo jen u dvou genotypů, konkrétně 'Early Korvik' a 'Regina'. U ostatních genotypů nastal pokles. Výrazný pokles hladiny byl zaznamenán u fruktózy, glycerolu a sorbitolu. S přechodem pupenů do květu byl pozorován ještě výraznější pokles.

Ve vztahu k citlivosti nebo odolnosti jednotlivých genotypů byl trend u obou druhů odlišný. Genotypy meruněk považované za tolerantnější vykazovaly buď hodnoty měřených cukrů nižší, popřípadě změny s přechodem mezi fenofázemi nebyly tak markantní. U třešní tomu bylo přesně naopak, kdy vyšší hodnoty cukrů byly zaznamenány u tolerantnějších genotypů.

Z výsledků vyplývá, že každý druh akumuluje osmoticky aktivní látky v jiné míře. Ke správnému vyhodnocení odolnosti dané rostliny je ještě potřeba více studií, které by porovnály více druhů i genotypů. Poté, na základě jejich citlivosti k mrazu a suchu, se mohou vybrat ty nejodolnější, které budou splňovat podmínky pěstitele na daném místě.



## Seznam použité literatury

1. AMBROISE, V., et al. 2020. *The Roots of Plant Frost Hardiness and Tolerance*. Plant and Cell Physiology. 61 (1), s. 3–20. doi: 10.1093/pcp/pcz196
2. ANJUM, S.A., et al. 2011. *Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress*. African Journal of Agricultural Research. 6, s. 2026–2032. doi: 10.5897/AJAR10.027
3. ARIAS, N.S., et al. 2015. *Freezing avoidance by supercooling in Olea europaea cultivars: the role of apoplastic water, solute content and cell wall rigidity*. Plant, Cell & Environment. 38 (10), s. 2061–2070. doi: 10.1111/pce.12529
4. BAHIELDIN, A., et al. 2013. *Control of glycerol biosynthesis under high salt stress in Arabidopsis*. Functional Plant Biology. 41 (1), s. 87-95. doi: 10.1071/FP13005
5. BALDERMANN, S., et al. 2018. *Selected Plant Metabolites Involved in Oxidation-Reduction Processes during Bud Dormancy and Ontogenetic Development in Sweet Cherry Buds (Prunus avium L.)*. Molecules. 23 (5), s. 1197. doi: 10.3390/molecules23051197
6. BECK, C. 2010. *An Introduction to Plant Structure and Development: Plant Anatomy for the Twenty-First Century*. 2. vyd. Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511844683
7. BHATTACHARYA, S., KUNDU, A. 2020. *Sugars and Sugar Polyols in Overcoming Environmental Stresses*. Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives. John Wiley & Sons Ltd. doi: 10.1002/9781119552154.ch4
8. BILAVČÍK, A. et al. 2022. *Characterization of frost damage in generative buds of fruit trees*. Úroda, vědecká příloha časopisu. 12, s. 9-15
9. BOBÁK, M., et al. 1992. *Botanika: Anatomia a morfológia rastlín*. Slovenské pedagogické nakladateľství Bratislava. ISBN 80-08-00687-0
10. BOGDANOVIĆ, J., et al. 2008. *Role of fructose in the adaptation of plants to cold-induced oxidative stress*. European Biophysics Journal. 37, s. 1241–1246. doi: 10.1007/s00249-008-0260-9
11. BOLAT, I., GULCAN, R., AKSOY, U. 1995. *The relationship between frost resistance and seasonal changes in carbohydrate contents in flower buds in apricot (cvs. Salak and Tebereze)*. Acta Horticulturae. 384, s. 323-328. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.384.49
12. BOLOURI-MOGHADDAM, M.R., et al. 2010. *Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells*. FEBS Journal. 277 (9), s. 2022–2037. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07633.x
13. BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. ISBN 0943088399
14. CARILLO, P., GIBON, Y. 2011. *Protocol: Extraction and Determination of Proline*. Dostupné z:

[https://www.researchgate.net/publication/211353600\\_PROTOCOL\\_Extraction\\_and\\_determination\\_of\\_proline](https://www.researchgate.net/publication/211353600_PROTOCOL_Extraction_and_determination_of_proline)

15. CATTANI, A.M., et al. 2018. *Chapter Nine - The Control of Bud Break and Flowering Time in Plants: Contribution of Epigenetic Mechanisms and Consequences in Agriculture and Breeding*. Advances in Botanical Research. 88, s. 277–325. doi: 10.1016/bs.abr.2018.10.002
16. CHIBBAR, R.N., et al. 2016. *Carbohydrate Metabolism*. Reference Module in Food Science. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00089-5
17. CHINNUSAMY, V., et al. 2006. *Gene regulation during cold acclimation in plants*. Physiologia Plantarum. 126, s. 52-61. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00596.x
18. COUÉE, I., et al. 2006. *Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants*. Journal of Experimental Botany. 57 (3), s. 449–459. doi: 10.1093/jxb/erj027
19. ČESKÝ HYDROMETEOROLOGICKÝ ÚSTAV. 2022. Denní data dle zákona 123/1998 Sb. Meteorologická sonda Holovousy U Vojáka [online]. [cit. 30.04.2023]. Dostupné z: <http://a.la-a.la/chart/cl.php?probe=11359169>
20. DAI, W. 2019. *Stress Physiology of Woody Plants*. Taylor & Francis Group. ISBN 9780429190476
21. DOHNÁLEK, F. 1939. *Ovocný strom a jeho pěstění*. Prometheus.
22. DUMANOVIĆ, J., et al. 2021. *The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview*. Frontiers in Plant Science. doi: 10.3389/fpls.2020.552969
23. EASTMOND, P.J. 2004. *Glycerol-insensitive Arabidopsis mutants: gli1 seedlings lack glycerol kinase, accumulate glycerol and are more resistant to abiotic stress*. The Plant Journal. 37 (4), s. 617-625. doi: 10.1111/j.1365-313X.2003.01989.x
24. EKOZAHRADNICTVÍ (nedatováno). *Třešeň – REGINA – pt*. [Cit. 18.4.2023]. Dostupné z: <https://www.ekozahradnictvi.cz/produkt/tresen-regina>
25. EVERT, R.F. 2006. *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. Annals of Botany. 3. vyd. 99 (4), s. 785-786. doi: 10.1093/aob/mcm015
26. FAROKHZAD, A., et al. 2018. *Biochemical changes in terminal buds of three different walnut (Juglans regia L.) genotypes during dormancy break*. Biochemical Systematics and Ecology. 76, s. 52-57. doi: 10.1016/j.bse.2017.12.002
27. FAROOQ, M., et al. 2009. *Plant drought stress: effects, mechanisms and management*. Agronomy for Sustainable Development. 29 (1), s. 185–212. doi: 10.1051/agro:2008021
28. FICHMAN, Y., et al. 2015. *Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation*. Biological Reviews. 90 (4), s. 1065-1099. doi: 10.1111/brv.12146

29. FYTOS FRUIT (nedatováno). *Betinka* [Cit. 10.4.2023]. Dostupné z: <https://www.fytos.cz/ovocne-stromky/merunky/betinkas/>
30. GÖTZ, K.P., et al. 2014. *Seasonal changes of physiological parameters in sweet cherry (Prunus avium L.) buds*. Scientia Horticulturae. 172, s. 183-190. doi: 10.1016/j.scienta.2014.04.012
31. HAYAT, S., et al. 2012. *Role of proline under changing environments: a review*. Plant Signaling & Behavior. 7 (11), s. 1456-1466. doi: 10.4161/psb.21949
32. HEIDARVAND, L., MAALI-AMIRI, R. 2010. *What happens in plant molecular responses to cold stress?* Acta Physiologiae Plantarum 32, s. 419-431. doi: 10.1007/s11738-009-0451-8
33. HIRAYAMA, T., SHINOZAKI, K. 2010. *Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future*. The Plant Journal. 61 (6), s. 1041-1052. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04124.x
34. HONG-BO, S., et al. 2005. *LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 45 (3-4), s. 131-135. doi: 10.1016/j.colsurfb.2005.07.017
35. HORVATH, D.P., et al. 2003. *Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy*. Trends in Plant Science. 8 (11), s. 535. doi: 10.1016/j.tplants.2003.09.013
36. HUDINA, M., ŠTAMPAR, F. 2006. *Influence of Frost Damage on the Sugars and Organic Acids Contents in Apple and Pear Flowers*. European Journal of Horticultural Science 71 (4), s.161-164. ISSN 1611-4426
37. JIMÉNEZ, S., et al. 2013. *Physiological, biochemical and molecular responses in four Prunus rootstocks submitted to drought stress*. Tree Physiology. 33 (10), s. 1061-1075. doi: 10.1093/treephys/tpt074
38. KAUFMANN, H., BLANKE, M. 2017. *Changes in carbohydrate levels and relative water content (RWC) to distinguish dormancy phases in sweet cherry*. Journal of Plant Physiology. 218, s. 1-5. doi: 10.1016/j.jplph.2017.07.004
39. KAUTZ, B., et al. 2015. *PEG and drought cause distinct changes in biochemical, physiological and morphological parameters of apple seedlings*. Acta Physiologiae Plantarum. 37. 162. doi: 10.1007/s11738-015-1914-8
40. KOCHHAR, S.L., GUJRAL, S.K. 2020. *Plant Physiology Theory and Applications*. 2. vyd. Cambridge University Press. ISBN 9781108486392
41. KOZŁOWSKI, T.T., PALLARDY S.G. 1997. 3 - *Physiological Regulation of Vegetative Growth*. Physiological Ecology. s. 73-165. doi: 10.1016/B978-012424210-4/50003-6
42. KAYA, O., et al. 2021a. *Can organic acid and sugar compositions be used to predict cell death point limits? Receptacle and pistil organs of apricot (Prunus armeniaca L.)*. Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali. 32, s. 493-509. doi: 10.1007/s12210-021-01007-y
43. KAYA, O., et al. 2021b. *Frost tolerance in apricot (Prunus armeniaca L.) receptacle and pistil organs: how is the relationship among amino acids,*

- minerals, and cell death points?*. International Journal of Biometeorology 65, s. 2157–2170. doi: 10.1007/s00484-021-02178-x
44. KRŠKA, B., VACHŮN, Z. 2016. *Apricot breeding at the Faculty of Horticulture in Lednice*. Agronomy. 6 (2). doi: 10.3390/agronomy6020027
45. KUTINA, J., et al. 1991. *Pomologický atlas*. Brázda, Praha. ISBN 80-209-0089-6
46. LANG, G.A., et al. 1987. *Endo-, para-, and eco-dormancy: physiological terminology and classification for dormancy research*. HortScience. 22 (3), s. 371–377. doi: 10.21273/HORTSCI.22.3.371
47. LASHEEN, A.M., CHAPLIN, C.E. 1977. *Seasonal Sugar Concentration in Two Peach Cultivars Differing in Cold Hardiness*. Journal of the American Society for Horticultural Science. 102 (2), s. 171-174. doi: 10.21273/JASHS.102.2.171
48. LUNN, J.E. 2016. *Sucrose Metabolism*. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons. doi: 10.1002/9780470015902.a0021259.pub2
49. MCMURRY, J. 2007. *Organická chemie*. VUTIUM, Brno. ISBN 978-80-214-3291-8
50. MEENA, M., et al. 2019. *Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions*. Heliyon. 5 (12). doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02952
51. MEIER, U., et al. 2009. *The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants-history and publications*. Journal für Kulturpflanzen. 61(2), s. 41–52. doi: 10.5073/JfK.2009.02.01
52. METEOROLOGICKÁ SONDA HOLOVOUSY U VOJÁKA. 2022. *Vývoj teploty vzduchu a rozložení srážek v období 1.3. – 30.4. 2022*. [Cit. 1.5.2023]. Dostupné z: <http://a.la-a.la/chart/cl.php?probe=11359169>
53. MICHAILIDIS, M., et al. 2018. *Metabolic mechanisms underpinning vegetative bud dormancy release and shoot development in sweet cherry*. Environmental and Experimental Botany. 155, s. 1-11. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.06.024
54. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2023. *PubChem Compound Summary for CID 753, Glycerol*. [Cit. 18.4.2023]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycerol>
55. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2023. *PubChem Compound Summary for CID 892, Inositol*. [Cit. 18.4.2023]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Inositol>
56. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2023. *PubChem Compound Summary for CID 5780, Sorbitol*. [Cit. 18.4.2023]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sorbitol>

57. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2023. *PubChem Compound Summary for CID 5793, D-Glucose*. [Cit. 18.4.2023].  
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Glucose>
58. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2023. *PubChem Compound Summary for CID 5988, Sucrose*. [Cit. 18.4.2023].  
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sucrose>
59. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2023. *PubChem Compound Summary for CID 6251, Mannitol*. [Cit. 18.4.2023].  
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mannitol>
60. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2023. *PubChem Compound Summary for CID 7427, Trehalose*. [Cit. 18.4.2023].  
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trehalose>
61. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2023. *PubChem Compound Summary for CID 439242, Raffinose*. [Cit. 18.4.2023].  
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Raffinose>
62. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2023. *PubChem Compound Summary for CID 439531, Stachyose*. [Cit. 18.4.2023].  
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Stachyose>
63. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2023. *PubChem Compound Summary for CID 439709, beta-D-fructofuranose*. [Cit. 18.4.2023].  
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-D-fructofuranose>
64. NĚMCOVÁ, V., BUCHTOVÁ, I. 2022. *Situační a výhledová zpráva – Ovoce*. Ministerstvo zemědělství. ISSN 1211-7692
65. NILSSON, J.E., ERIKSSON, G. 1986. *Freeze testing and field mortality of Pinus sylvestris (L.) in northern Sweden*. Scandinavian Journal of Forest Research 1 (1-4), s. 205-218, doi: 10.1080/02827588609382412
66. OLSEN, J.E. 2003. *Molecular and Physiological Mechanisms of Bud Dormancy Regulation*. Acta Horticulturae. 618, s. 437-453. doi: 10.17660/ActaHortic.2003.618.52
67. PALLARDY, S.G. 2008. *Physiology of Woody Plants*. 3. vyd. Elsevier. ISBN 978-0-12-088765-1
68. PEDRYC, A., et al. 2004. *Changing of Buds' Sugar Content in Grape Cultivars with Different Cold Tolerance*. Acta Horticulturae. 640, s. 213-217. doi: 10.17660/ActaHortic.2004.640.23
69. PLEYEROVÁ, I., et al. 2022. *Versatile roles of sorbitol in higher plants: luxury resource, effective defender or something else?* Planta. 256 (1), s. 13. doi: 10.1007/s00425-022-03925-z
70. PROCHÁZKA, S., et al. 1998. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0586-2
71. RICKES, L.N., et al. 2019. *Differential expression of the genes involved in responses to water-deficit stress in peach trees cv. Chimarrita grafted onto two*

- different rootstocks*. *Bragantia*. 78 (1), s. 60-70. doi: 10.1590/1678-4499.2017372
72. RÍOS, G., et al. 2014. *Epigenetic regulation of bud dormancy events in perennial plants*. *Frontiers in Plant Science*. 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00247
73. SALAZAR-GUTIÉRREZ, M.R., et al. 2014. *Variation in cold hardiness of sweet cherry flower buds through different phenological stages*. *Scientia Horticulturae*. 172, s. 161-167. doi: 10.1016/j.scienta.2014.04.002
74. SENGUPTA, S., et al. 2015. *Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants*. *Frontiers in Plant Science*. 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00656
75. SEPPÄNEN, M.M., et al. 2018. *Growth, freezing tolerance, and yield performance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars grown under controlled and field conditions in northern latitudes*. *Canadian Journal of Plant Science*. 98 (5), s. 1109-1118. doi: 10.1139/cjps-2017-0305
76. SLAVÍKOVÁ, Z. 2002. *Morfologie rostlin*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0327
77. SLOVÁKOVÁ, L., MISTRÍK, I. 2007. *Fyziologické procesy rastlín v podmienkach stresu*. Univerzita Komenského Bratislava. ISBN 978-80-223-2322-2
78. SOLFANELLI, C., et al. 2006. *Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 140 (2), s. 637-646. doi: 10.1104/pp.105.072579
79. STREETER, J.G., et al. 2001. *Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance*. *Plant, Cell & Environment*. 24. S. 429-438. doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00690.x
80. SZABADOS, L., SAVOURÉ, A. 2010. *Proline: a multifunctional amino acid*. *Trends in Plant Science*. 15 (2), s. 89-97. doi: 10.1016/j.tplants.2009.11.009
81. SZEPESI, Á. 2020. *Chapter 30 - Role of metabolites in abiotic stress tolerance*. *Plant Life Under Changing Environment*. Academic Press. s. 755-774. doi: 10.1016/B978-0-12-818204-8.00033-3
82. TAKAHASHI, D., et al. 2021. *Responses of the Plant Cell Wall to Sub-Zero Temperatures: A Brief Update*. *Plant and Cell Physiology*. 62 (12), s. 1858-1866. doi: 10.1093/pcp/pcab103
83. TEO, G., et al. 2006. *Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103 (49), s. 18842-18847. doi: 10.1073/pnas.0605873103
84. VERBRUGEN, N., HERMANS, C. 2008. *Proline accumulation in plants: a review*. *Amino Acids*. 35, s. 753-759. doi: 10.1007/s00726-008-0061-6
85. VITI, R., et al. 2008. *Apricot Flower Bud Development: Main Biological, Physiological and Environmental Aspects Related to the Appearance of Anomalies*. *International Journal of Plant Developmental Biology*. 2 (1), s. 25-34.

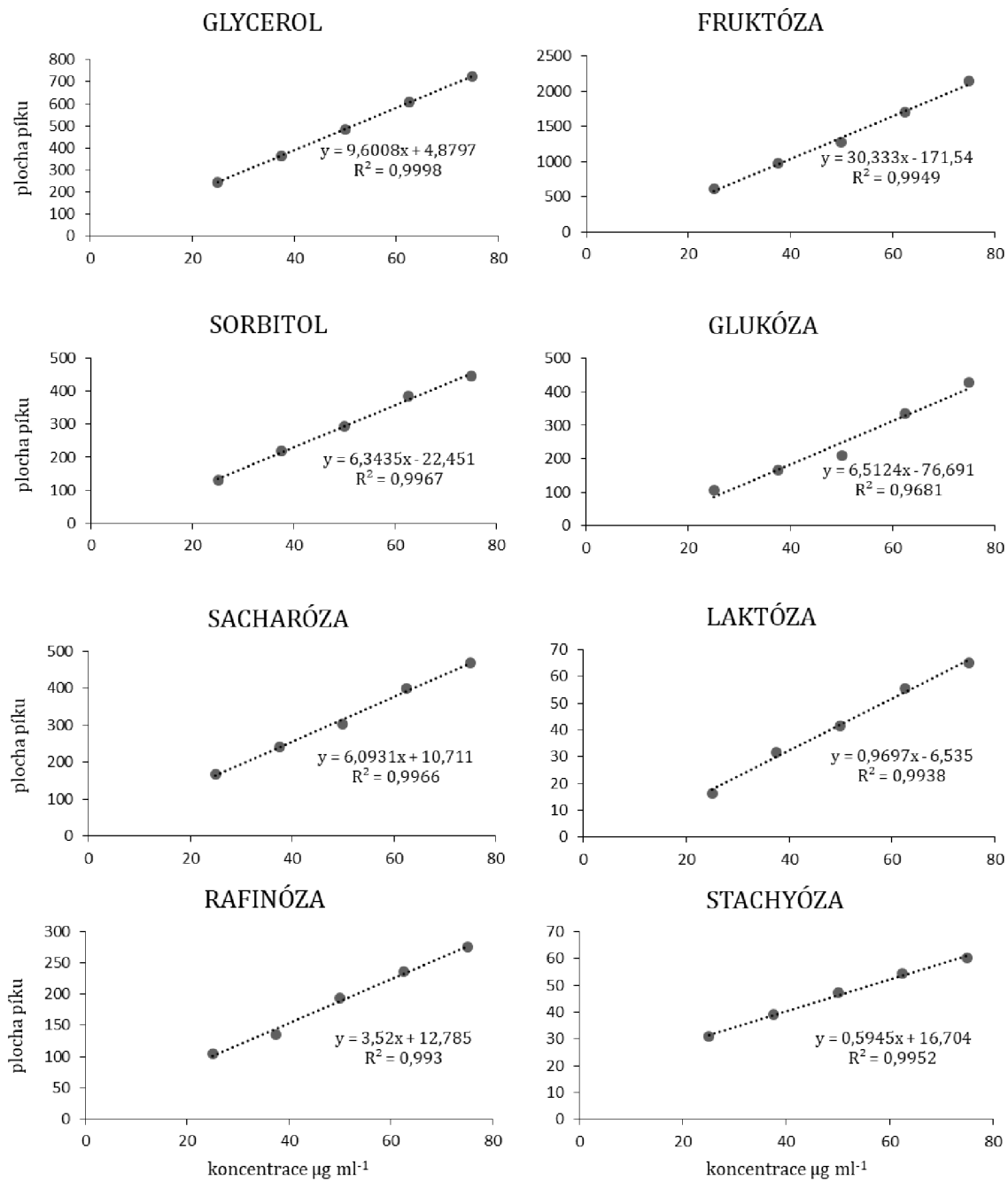
86. VOSNJAK, M., et al. 2021. *Summer pruning of sweet cherry: a way to control sugar content in different organs*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 102 (3), s. 1216-1224. doi: 10.1002/jsfa.11459
87. VOTRUBOVÁ, O. 1997. *Anatomie rostlin*. Praha: Karolinum. ISBN 80-7184-046-7
88. VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY. 2022. Odborná zpráva projektu NAZV (QK21010200 – Šlechtění ovocných druhů na odolnost k abiotickým vlivům v kombinaci s vysokým obsahem antioxidantů v plodech). [Cit. 1.5.2023]
89. VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY (nedatováno). *Odrůdy meruňky* [Cit. 10.4.2023]. Dostupné z: [https://www.vsuo.cz/images/FILES/OvocnarskaProdukceAProdej/Skolkar skeVypestky/Odrudy\\_merunky.pdf](https://www.vsuo.cz/images/FILES/OvocnarskaProdukceAProdej/Skolkar skeVypestky/Odrudy_merunky.pdf)
90. WASSAN, S., et al. 2021. *Effect of frost on plants, leaves, and forecast of frost events using convolutional neural networks*. International Journal of Distributed Sensor Networks. 17 (10). doi: 10.1177/15501477211053777
91. YUXI, Z., et al. 2018. *Dynamic of carbohydrate metabolism and the related genes highlights PPP pathway activation during chilling induced bud dormancy release in tree peony (Paeonia suffruticosa)*. Scientia Horticulturae. 242, s. 36-43. doi: 10.1016/j.scienta.2018.07.022
92. ZAHRADNICTVÍ FLOS (nedatováno). *Třešeň 'Regina'* [Cit. 10.4.2023]. Dostupné z: <https://www.zahradnictvi-flos.cz/prunus-avium-regina-tresen-pozdni-chrupka-regina.html>
93. ZAHRADNICTVÍ SPOMYŠL (nedatováno). *Meruňka 'Candela'* [Cit. 10.4.2023]. Dostupné z: <https://www.zahradnictvi-spomysl.cz/merunka-candela/>
94. ZAHRADNICTVÍ SPOMYŠL (nedatováno). *Meruňka 'Sophinka'* [Cit. 10.4.2023]. Dostupné z: <https://www.zahradnictvi-spomysl.cz/merunka-sophinka/>
95. ZAHRADNICTVÍ SPOMYŠL (nedatováno). *Třešeň pozdní – chrupka 'Regina'* [Cit. 10.4.2023]. Dostupné z: <https://www.zahradnictvi-spomysl.cz/tresen-regina/>
96. ZELENÝ, L. 2019. *Šlechtění ovoce v Holovousích*. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy. ISBN 978-80-87030-72-1
97. ZIVCAK, M., et al. 2016. *Chapter 5 - Osmotic Adjustment and Plant Adaptation to Drought Stress*. Drought Stress Tolerance in Plants. 1, s. 105-143. doi: 10.1007/978-3-319-28899-4\_5
98. ZULFIQAR, F., et al. 2020. *Osmoprotection in plants under abiotic stresses: new insights into a classical phenomenon*. Planta 251, 3. doi: 10.1007/s00425-019-03293-1

## **Přílohy**

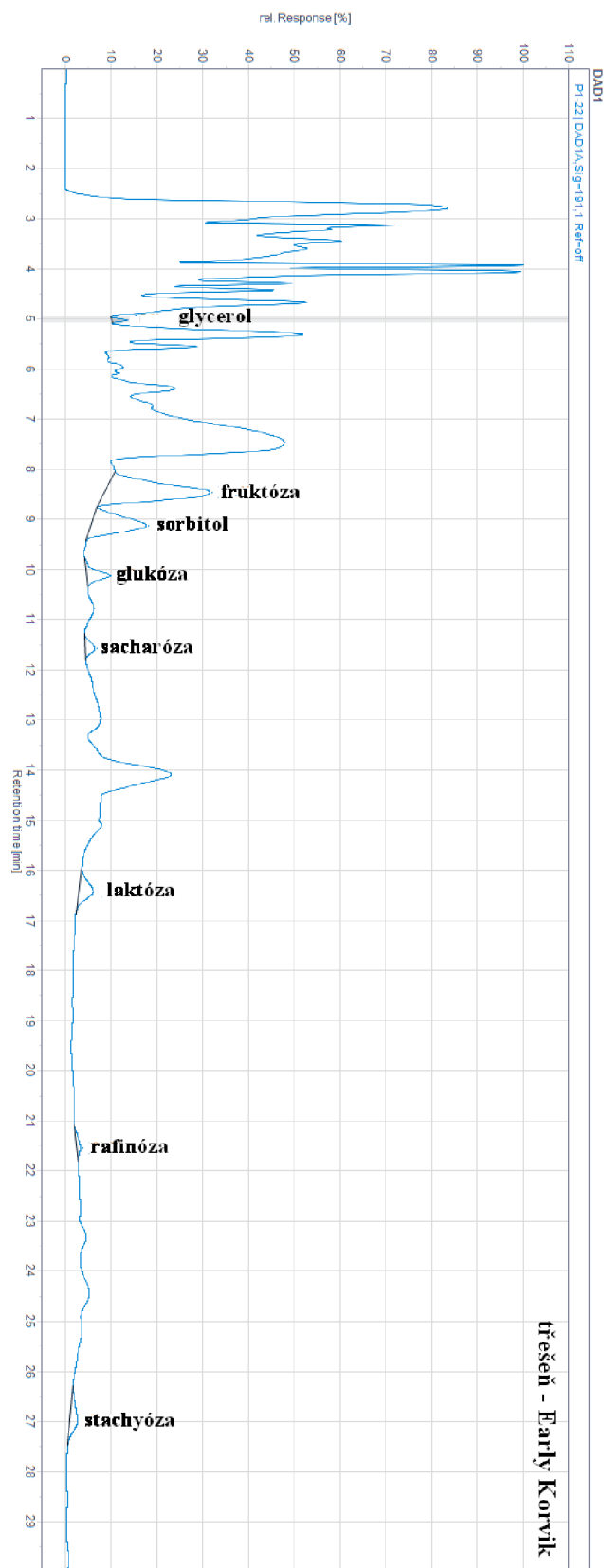
1. Kalibrační křivky pro cukry a cukerné alkoholy
2. Reprezentativní chromatogram analýzy cukru třešňového genotypu 'Early Korvik'
3. Reprezentativní chromatogram analýzy cukru meruňkového genotypu 'Candela'
4. Kalibrační křivka pro prolin
5. Vývoj teploty vzduchu a rozložení srážek v období 1.3. – 30.4.2022



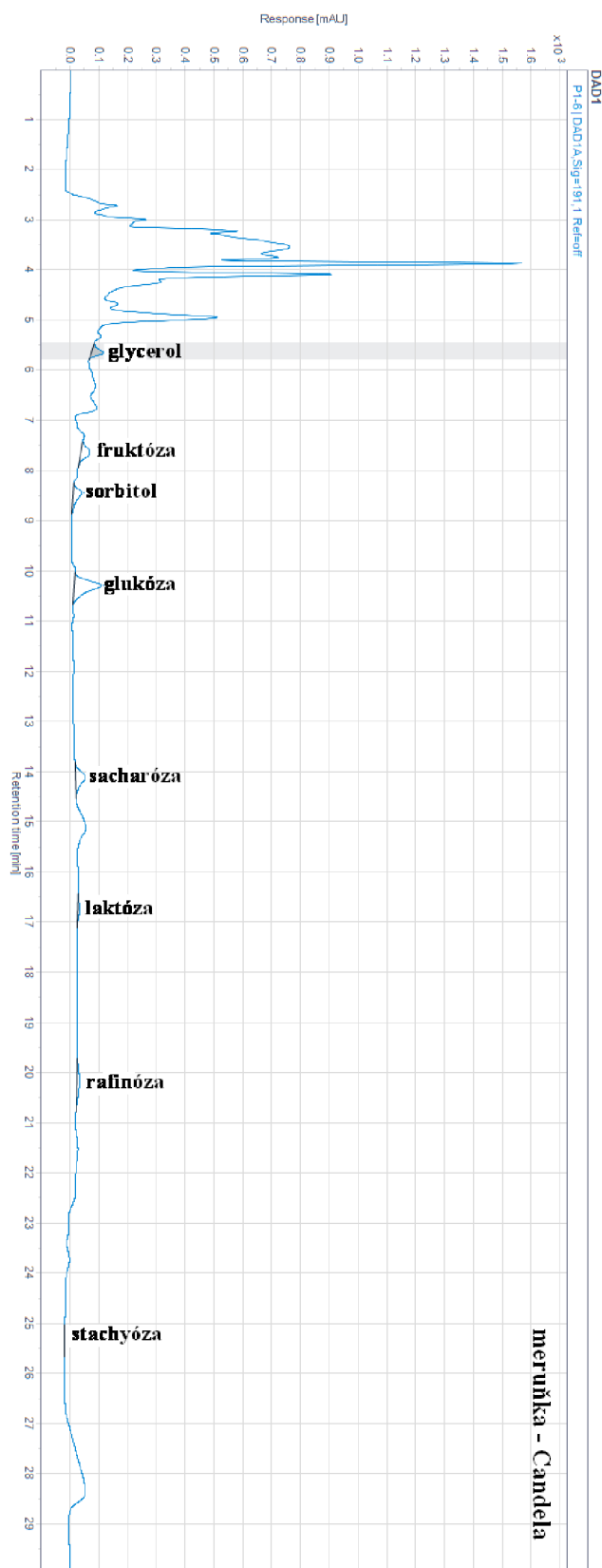
## Kalibrační křivky pro cukry a cukerné alkoholy



## Reprezentativní chromatogram analýzy cukru třešňového genotypu 'Early Korvik'



## Reprezentativní chromatogram analýzy cukru meruňkového genotypu 'Candela'



**Kalibrační křivka pro prolin**