

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV
OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ



Certifikovaná metodika odolnosti ovocných plodin k suchu v *in vitro* podmínkách

Petra Jiroutová, Zuzana Kovalíková



CERTIFIKOVANÁ
METODIKA
2021



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.
UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ

Certifikovaná metodika odolnosti ovocných plodin k suchu v *in vitro* podmínkách

Petra Jiroutová, Zuzana Kovalíková



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.
2021

- Autoři:** Mgr. Petra Jiroutová, Ph.D.,
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy 129, 508 01 Hořice
- RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.,
Univerzita Hradec Králové, Rokitsanského 62/26, Hradec Králové, 50003
- Název:** Certifikovaná metodika odolnosti ovocných plodin k suchu v *in vitro* podmínkách
- Vydal:** VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy 129, 508 01 Hořice
Vydáno v roce 2021
- Dedikace:** Tato metodika (Certifikovaná metodika odolnosti ovocných plodin k suchu v *in vitro* podmínkách) byla vytvořena se státní podporou Technologické agentury ČR v rámci Programu ZÉTA (Program na podporu aplikovaného výzkumu). Identifikační kód projektu – TJ02000066 Výzkum laboratorní metody pro predikci tolerance ovocných plodin na sucho.
- Oponenti:** Bc. Tomáš Jan
Specialista pro peckoviny a skořápkaté ovoce, Národní odrůdový úřad,
ÚSTŘEDNÍ KONTROLNÍ A ZKUŠEBNÍ ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝ
- Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
vedoucí Skupiny molekulární fyziologie
Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci
a Ústav experimentální botaniky AVČR
- Další informace:** Ministerstvo zemědělství ČR schválilo publikaci jako certifikovanou metodiku a doporučilo ji pro využití v zemědělské praxi. Publikaci bylo uděleno Osvědčení číslo 148/2021-MZE-18140 v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

OBSAH

Abstrakt	7
Úvod	9
CÍL METODIKY	10
VLASTNÍ POPIS METODIKY	11
1. Založení počátečních <i>in vitro</i> kultur	12
2. Multiplikace <i>in vitro</i> explantátů	13
3. Osmotický stres	14
4. Sledování projevů rostlin	14
4.1. Vnější parametry	16
4.1.1. Čerstvá hmotnost, podíl vody a sušiny	16
4.1.2. Relativní obsah vody	17
4.1.3 Změna listové plochy	18
4.1.4. Změna obsahu listových barviv	19
4.2. Vnitřní parametry	19
4.2.1. Obsah rozpustných proteinů	19
4.2.2. Obsah kyslíkových radikálů	21
4.2.2.1. Stanovení obsahu peroxidu vodíku (H_2O_2)	21
4.2.2.2. Stanovení obsahu superoxidového radikálu	22
4.2.3. Stanovení obsahu malondialdehydu	23
4.2.4. Stanovení celkové antioxidační aktivity	24
4.2.5. Stanovení aktivity antioxidačních enzymů	25
4.2.5.1. Stanovení aktivity superoxid dismutázy (SOD, EC 1.15.1.1)	25
4.2.5.2. Stanovení aktivity katalázy (CAT, EC 1.11.1.6)	26
4.2.5.3. Stanovení aktivity askorbát peroxidázy (APX, EC 1.11.1.1)	26
4.2.6. Stanovení obsahu prolinu	26
4.2.7. Stanovení cukrů a cukerných alkoholů	27
4.2.8. Stanovení obsahu kyseliny abscisové	29
SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	30
POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	30
EKONOMICKÉ ASPEKTY	31
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	32
SEZNAM LITERATURY, KTERÁ PŘEDCHÁZELA METODICE	33

ABSTRAKT

Sucho se jednoznačně řadí mezi hlavní problémy, se kterými se musejí pěstitelé ovoce v současné době potýkat. Proto je důležité hledat ovocné druhy a odrůdy, které vykazují odolnost vůči suchu a studovat mechanismy, kterými se s těmito nepříznivými podmínkami vypořádávají. Takové poznatky jsou následně velmi důležité pro šlechtitele. V současné době není ověřena žádná ucelená laboratorní metoda pro výzkum sucha u ovocných plodin. Inovativnost navrhované metodiky spočívá ve využití biotechnologických metod a *in vitro* kultur, které umožňují testování výchozího materiálu v kontrolovaném laboratorním prostředí. Tato metoda umožňuje přidáním polyethylenglykolu (PEG) do kultivačního média uměle navodit podmínky vodního deficitu, jehož vliv na rostliny může být dále sledován za využití citlivých analytických metod. Předkládanou metodiku lze aplikovat nejen na ovocné druhy, na kterých byla testována, ale s minimálními úpravami i na celé spektrum dalších rostlinných druhů důležitých pro zemědělství a jako taková může být využita pro rychlý screening testovaného materiálu.

1. ÚVOD

Sucho je jedním z hlavních faktorů abiotického stresu, který má zásadní vliv na růst a vývoj rostlin. Odborníci očekávají, že vlivem globálních klimatických změn, bude nedostatek nebo nedostupnost vody v blízké budoucnosti stále aktuálnější a rozšířenější problém (Rosegrant and Cline, 2003). Již dnes sucho negativně ovlivňuje zemědělskou produkci rostlin po celém světě, a proto je důležité hledat rostlinné druhy a odrůdy, které vykazují odolnost vůči suchu a studovat mechanismy, kterými se s těmito nepříznivými podmínkami vypořádávají. Takové poznatky jsou velmi důležité pro šlechtitele, kteří se zabývají šlechtěním nových, odolnějších odrůd zemědělsky významných plodin. Tyto odrůdy v kombinaci s efektivním využíváním vodních zdrojů by v budoucnosti mohly významně napomoci k udržení potravinové bezpečnosti společnosti (Alizadeh *et al.*, 2015).

Nedostatek vody spouští v rostlinách množství obranných fyziologických a biochemických procesů. Z fyziologického hlediska je stres suchem v rostlinách doprovázen poklesem turgoru, snížením obsahu vody v buňkách a uzavřením průduchů. Mezi jednu z nejvíce viditelných reakcí rostlin na sucho patří zpomalení či úplné zastavení dlouhivého růstu a zmenšení listové plochy (Jaleel *et al.*, 2009). Zmenšováním listové plochy rostlina přímo snižuje plochu transpirace a tím výdej vody povrchem listu. Zotavení a obnova růstu listů závisí na míře působícího stresu a vývojové fázi daného listu. Obecně listy v rané fázi vývoje snadněji regenerují a obnovují svůj růst po návratu normálních podmínek, zatímco listy v pozdních fázích vývoje již většinou svůj růst znovu neobnovují (Anjum *et al.*, 2017). Mezi další typické morfologické odpovědi rostliny na stres suchem patří úbytek čerstvé a suché hmotnosti biomasy. Z hlediska produkce rostlin v zemědělství se tento jev považuje za velmi nežádoucí, neboť snižuje výnos zemědělských plodin. Hledání rostlinných druhů a šlechtění nových odrůd, které si i v podmínkách vodního deficitu dokáží zachovat výnosné hodnoty hmotnosti biomasy, proto patří mezi šlechtitelské cíle dnešní doby (Farooq *et al.*, 2009).

Mezi vnější projevy rostliny na stres suchem můžeme zařadit i změny v obsahu fotosyntetických pigmentů, především pak úbytek chlorofylu a karotenoidů, který se navenek projevuje žloutnutím a hnědnutím listů a následně celých rostlin (Jaleel *et al.*, 2009). Karotenoidy, na rozdíl od zeleného chlorofylu, mohou během stresové reakce fungovat také jako neenzymatické antioxidanty a tím přispívat ke zmírňování škodlivých následků způsobených stresem, proto se jejich hladina může působením mírného stresu dočasně i zvýšit (Young et Lowe, 2018).

Všechny výše zmíněné projevy rostlin (zpomalení růstu, zmenšování listové plochy, úbytek biomasy, změna obsahu listových barviv) způsobují pokles rychlosti fotosyntézy, což vede k absorpci vyššího množství světelné energie, než která by mohla být fotosyntézou spotřebována. Takový přebytek energie zapříčiňuje vznik reaktivních forem kyslíku, mezi které patří například peroxid vodíku nebo superoxidový radikál. Zvýšená koncentrace těchto reaktivních forem kyslíku způsobuje oxidativní stres a vede k nevratnému poškození buněčných struktur. Vlivem aktivních forem kyslíku

dochází například k peroxidaci esenciálních membránových lipidů, inaktivaci enzymů či k oxidaci proteinů (Wang *et al.*, 2018). Peroxidací lipidů vzniká produkt malondyaldehyd (MDA), který se dále hromadí v rostlinách a jehož obsah může sloužit jako ukazatel míry membránového poškození v důsledku oxidativního stresu (Farooq *et al.*, 2010). Obecně mají rostliny vyvinutý systém antioxidačních enzymů, který přispívá k ochraně rostlin proti cytotoxickému vlivu reaktivních forem kyslíku.

Mezi takové enzymy patří například superoxid dismutáza (SOD), kataláza (CAT) nebo peroxidáza (POD). Tyto enzymy reagují s reaktivními formami kyslíku a tím snižují jejich koncentrace v rostlině. SOD například způsobuje přeměnu O_2^- na H_2O_2 , který je následně redukován katalázou a peroxidázou za vzniku vody a molekulárního kyslíku. Zároveň tyto antioxidační enzymy regenerují další buněčné antioxidanty, mezi které patří například askorbát peroxidáza (APX), která také redukuje peroxid vodíku (Sun *et al.*, 2015; Caverzan *et al.*, 2012). Přestože vysoké hladiny reaktivních forem kyslíku způsobují nevratné poškození rostlinných buněk, v nízkých hladinách fungují jako signální molekuly a během působení stresových faktorů na rostlinu spouští obranné stresové odpovědi (D'Autréaux et Toledano, 2007).

Mezi další důležité reakce rostlin v podmínkách nedostatku vody patří snaha o udržení nízkého vodního potenciálu. Jedním z mechanismů, jak docílit zachování nízkého vodního potenciálu i během stresu suchem, je akumulace osmolytů a dalších kompatibilních látek, které jsou rozpustné v cytoplasmě (Sun *et al.*, 2015). Mezi nejznámější osmolyty patří glycin betain, cukry (manitol, sorbitol, trehalóza), polyaminy nebo prolin (Sharma *et al.*, 2019). Kromě osmolytické funkce působí ve stresových podmínkách aminokyselina prolin jako důležitá signální molekula, dále pomáhá skrze interakci s fosfolipidy stabilizovat membrány, hraje významnou roli jako zdroj energie a dusíku a pomáhá udržovat nízkou koncentraci reaktivních forem kyslíku (Szabados et Savouré, 2010).

Během adaptace rostlin na suchu dochází v rostlinách také k změnám v kvalitativním i kvantitativním zastoupení proteinů v buňkách. Během působení stresových faktorů spojených s dehydratací (sucho, zasolení, nízká teplota) se indukuje specifická skupina stresových proteinů se souhrnným označením – dehydriny. Dehydriny ve stresových podmínkách chrání buněčné struktury a cytoplazmatické i jaderné makromolekuly, dále pomáhají udržovat integritu buněčných membrán (Kosová *et al.*, 2010).

Adaptace rostlin na nedostatek vody je také neodmyslitelně spjata se zvýšenou koncentrací kyseliny abscisové (ABA). ABA patří mezi stresové rostlinné hormony a zásadním způsobem ovlivňuje zavírání průduchů, čímž snižuje transpiraci a přispívá k zachování obsahu vody v rostlině. Zvýšení endogenní hladiny kyseliny abscisové v rostlinách doprovází většinu stresových reakcí způsobených abiotickými faktory, jako jsou nízké teploty, zasolení, osmotický stres nebo sucho (Sah *et al.*, 2016).

CÍL METODIKY

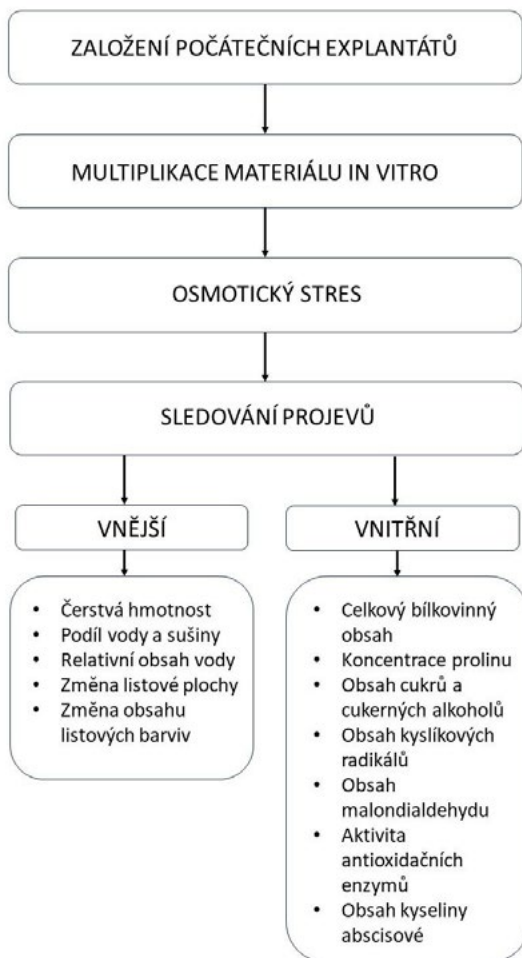
Cílem metodiky je zavedení vhodné laboratorní metody k predikci tolerance ovocných plodin na suchu. Navržená metodika je založena na *in vitro* kultivaci explantátů ovocných plodin. Tato metoda umožňuje přidavkem polyethylenglykolu

(PEG) do kultivačního média uměle navodit podmínky vodního deficitu, jehož vliv na rostliny může být dále sledován za využití citlivých analytických metod.

VLASTNÍ POPIS METODIKY

Metodiku lze rozdělit na dva základní kroky 1. založení a multiplikace explantátů, 2. sledování vlivu uměle vyvolaného osmotického stresu na vnější a vnitřní projevy rostlin (Obrázek 1).

1. Založení počátečních *in vitro* kultur
2. Multiplikace *in vitro* explantátů
3. Osmotický stres
4. Sledování projevů rostlin



Obrázek 1 Schematické zobrazení laboratorní metody pro predikci tolerance ovocných plodin na sucho

1. Založení počátečních *in vitro* kultur

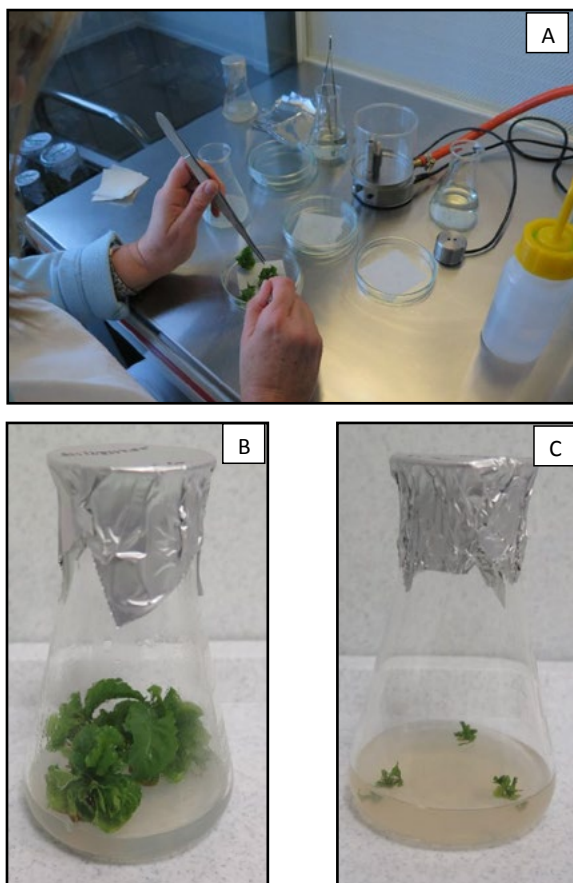
Rostlinný materiál určený k zakládání *in vitro* kultur je nutné předem prověřit z hlediska odrůdové stálosti. Pro zakládání počátečních explantátů je ideální použít narašené pupeny dormantních výhonů. Pro tyto účely jsou odebrané výhony ponechány k narašení cca 15 dní v laboratorních podmínkách při teplotě 20 °C. Z narašených pupenů jsou následně vypreparovány vrcholy o velikosti 5-15 mm, kterým je nutné odstranit šupiny a jiné povrchové struktury, bránící úspěšné sterilizaci. Sterilizace probíhá ponořením očištěných vrcholů do 0,15% roztoku chloridu rtuťnatého s přísadkou Tween 20, sloužícího jako smáčedlo, po dobu cca 1 minuty, ošetřené vrcholy jsou následně opláchnuty destilovanou vodou. Takto připravené explantáty jsou následně v aseptickém prostředí nasazeny na sterilní agarové Murashige & Skoog (MS) médium (Murashige et Skoog, 1962) s přísadkou vitamínů (Tabulka 1). *In vitro* kultura aktivně rostoucích vzrostných vrcholů je zavedena a dále udržována v Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml, jejichž hrdlo je zakryté hliníkovou fólií. Jedna kultivační nádoba obsahuje 25-30 ml média a 3-5 explantátů. Takto založené počáteční *in vitro* kultury jsou 4 týdny kultivovány za světelných podmínek dlouhého dne (16 hodin světlo/8 hodin tma), při teplotě 22 ± 1 °C. V průběhu kultivace je nutné explantáty vizuálně kontrolovat, zda nedochází ke kontaminaci média nežádoucími mikroorganismy. Takové kultury je nezbytné okamžitě vyřadit z dalšího pěstování. K úspěšnému založení *in vitro* kultury je vhodné použít alespoň 15 výchozích explantátů (v závislosti na dostupnosti materiálu).

Tabulka 1 Složení základního pevného MS média pro kultivaci *in vitro* kultur

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

2. Multiplikace *in vitro* explantátů

Pro výzkum predikce tolerance ovocných plodin na sucho v *in vitro* podmínkách je nutné disponovat dostatečným množstvím rostlinného materiálu k testování, tzn. desítky až stovky vitálních *in vitro* explantátů s diferencovaným růstovým vrcholem a kvalitním olistěním. Z tohoto důvodu jsou založené počáteční explantáty přeneseny a dále pěstovány na multiplikačním médiu, tj. MS médiu obohaceném o 6-benzylaminopurin (BAP) $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (Obrázek 2). BAP je regulátor růstu patřící mezi cytokininy, který indukuje dělení buněk a stimuluje tvorbu nových prýtů (Bessler, 1997). Kultivace explantátů na multiplikačním médiu probíhá za stejných, výše uvedených světelných a teplotních podmínek (16 hodin světlo/8 hodin tma; $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), přičemž pasážování a následný přenos explantátů na čerstvé médium je prováděno v aseptickém prostředí každé 4 týdny.



Obrázek 2 Multiplikace *in vitro* explantátů A-pasážování explantátů ve sterilním prostředí; B-explantáty před pasážováním (4 týdny); C-čerstvě přepasávané explantáty

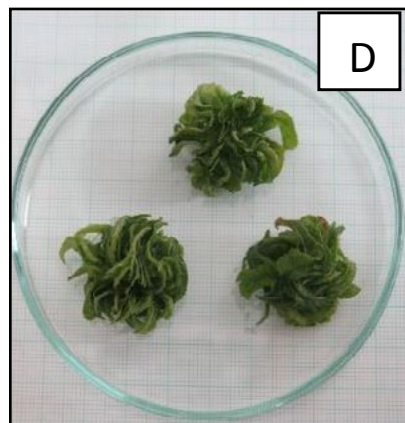
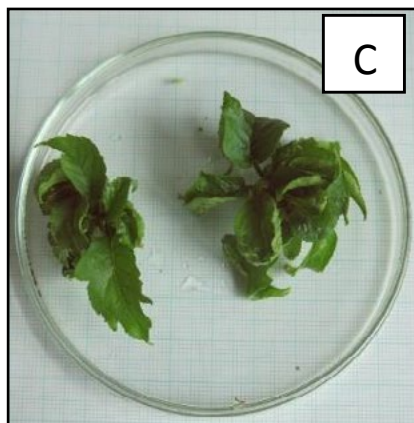
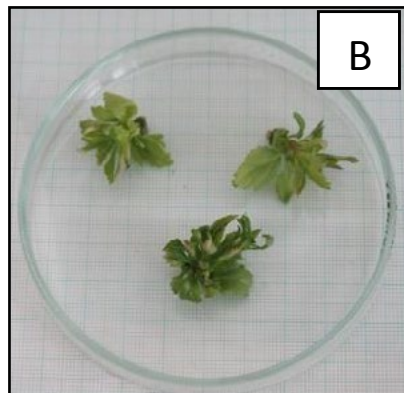
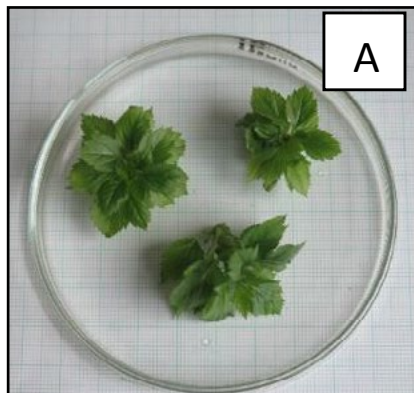
3. Osmotický stres

Stresové podmínky vodního deficitu lze v *in vitro* kulturách simulovat přidáním osmotika např. polyethylenglykolu (PEG) do kultivačního média. PEG představuje ve vodě rozpustný vysokomolekulární polymer široce využívaný k vyvolání vodního (resp. osmotického) stresu u vyšších rostlin snížením vodního potenciálu v živném médiu. Hlavní výhodou použití *in vitro* technik s obohaceným PEG médiem je rychlý screening různých rostlinných kultur v laboratorních podmínkách. Právě proto je PEG široce používán pro identifikaci genotypů tolerovaných vůči suchu za stimulovaných osmotický stres (Bhadra *et al.*, 2017).

V průběhu optimalizace metody byly testovány účinky tohoto polymeru s rozdílnou molární hmotností PEG 4000 a PEG 6000. Účinnost PEG 4000 byla za použitých koncentrací a podmínek neprůkazná, předkládaná metodika tedy jako osmotikum k vyvolání stresu ze sucha využívá výhradně PEG 6000 (a to v maximální koncentraci 50 g.L⁻¹). Pro účely testování tolerance ovocných rostlinných druhů k suchu v *in vitro* podmínkách je PEG rozpuštěn v ultra čisté destilované vodě a přidán do výchozího MS média před sterilizací, tak aby bylo dosaženo požadované koncentrace. Při pravidelném pasážování jsou vzrostlé vrcholy explantátů rostoucích na multiplikačním médiu přeneseny na médium s přísádkem osmotika (v případě kontrolních rostlin na klasické multiplikační médium) a dále kultivovány za standardních výše uvedených světelných a teplotních podmínek (16 hodin světlo/8 hodin tma; 22 ± 1 °C) po dobu 4 týdnů.

4. Sledování projevů rostlin

Předkládaná metodika je založena na sledování jak vnitřních tak vnějších parametrů, které jsou v rostlinách vyvolány reakcí na osmotický stres. V podmínkách vodního deficitu patří mezi prvotní reakce rostlin redukce růstu a dělení buněk a snížení vody v pletivech. Z hlediska vnějších parametrů metodika sleduje čerstvou hmotnost explantátů, podíl obsahu sušiny a vody v pletivech a změny listové plochy explantátů ovocných druhů pěstovaných v *in vitro* podmínkách (Obrázek 3).

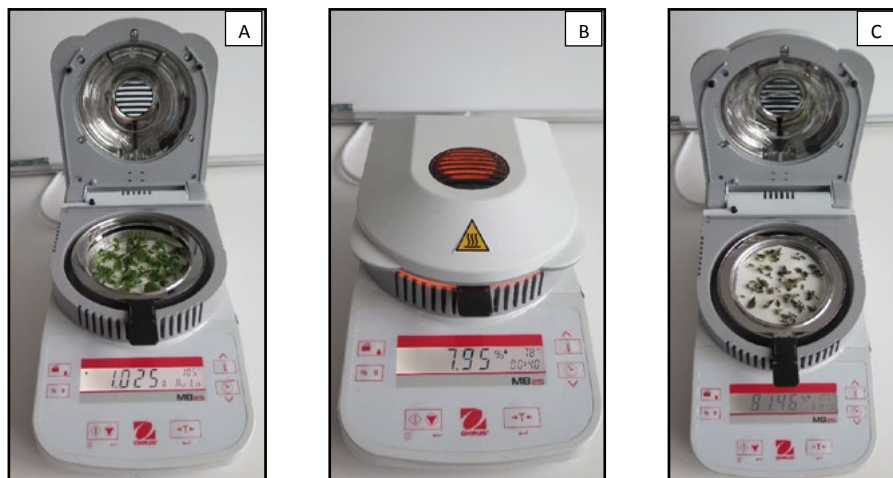


Obrázek 3 *In vitro* explantáty (4 týdny od pasážování) A - explantáty jabloně odrůda 'Idared' - kontrolní rostliny kultivované na MS médiu; B - explantáty jabloně odrůda 'Idared' - stresované rostliny kultivované na MS médiu s přidavkem PEG; C - explantáty třešně odrůda 'Sunburst' - kontrolní rostliny kultivované na MS médiu; D - explantáty třešně odrůda 'Sunburst' - stresované rostliny kultivované na MS médiu s přidavkem PEG

4.1. Vnější parametry

4.1.1. Čerstvá hmotnost, podíl vody a sušiny

Čerstvá hmotnost explantátu je stanovena pomocí analytických laboratorních vah (s přesností 0,1 mg). Před vážením je nutné pomocí pinzety explantát vyjmout z kultivační nádoby a řádně očistit od zbytků média. Podíl vody a sušiny lze jednoduše stanovit pomocí analyzátoru vlhkosti (např. MB25, Ohaus) (Obrázek 4). Do analyzátoru vlhkosti se vloží 0,5-1g očištěných explantátů. Pro rychlejší a přesnější analýzu je vhodné explantáty skalpelem rozřezat na menší části, které se budou rychleji a rovnoměrněji vysušovat. Explantáty jsou následně vysušeny až do konstantní hmotnosti analyzátozem vlhkosti při sušící teplotě 105 °C a výsledné hodnoty procentuálního zastoupení vody a sušiny ve vzorku jsou odečteny z přístroje.



Obrázek 4 Stanovení podílu vody a sušiny pomocí analyzátoru vlhkosti MB25, Ohaus. A - očištěné a zvážené čerstvé explantáty umístěné v analyzátoru vlhkosti před zahájením sušení; B - vysoušení vzorku; C - vysušené explantáty po skončení analýzy vlhkosti.

4.1.2. Relativní obsah vody

Ke stanovení relativního obsahu vody (RWC) je pomocí analytických laboratorních vah (s přesností 0,1 mg) naváženo 0,5⁻¹ g čerstvé hmoty explantátu (FW), navážené explantáty jsou následně ponořeny do destilované vody po dobu 4 hodin a znovu zváženy. Tím je určena hmotnost explantátů po úplném nasycení vodou (TW). Osušené a zvážené explantáty jsou poté přeneseny na Petriho misky a sušeny v horkovzdušné sušárně při teplotě 105 °C (např. Memmert UN30) až k dosažení konstantní hmotnosti (Obrázek 5), ta je následně zaznamenána jako hmotnost sušiny (DW). Výsledný relativní obsah vody je stanoven pomocí vzorce:

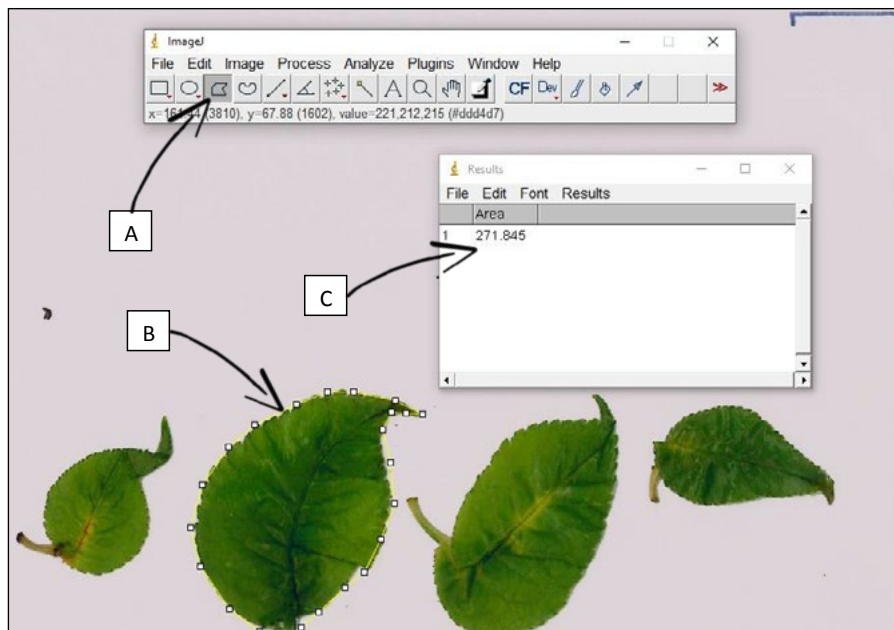
$$\text{RWC (\%)} = \frac{\text{fresh weight (FW)} - \text{dry weight (DW)}}{\text{turgid weight (TW)} - \text{dry weight (DW)}} \times 100$$



Obrázek 5 Stanovení relativního obsahu vody v pletivech. A - horkovzdušná sušárna Memmert UN30; B - segmenty explantátů připravené v Petriho misce k vysušení; C - vysušené segmenty explantátů po skončení sušení

4.1.3 Změna listové plochy

K určení celkové listové plochy je explantát vyjmut z kultivační nádoby a očištěn od zbytku média. Pomocí skalpelu a pinzety nebo preparační jehly jsou následně odděleny jednotlivé listy, které jsou následně vloženy do průhledné folie, přeneseny na milimetrový papír a vyfotografovány pomocí fotoaparátu s vysokým rozlišením. Výsledné fotografie jsou vyhodnoceny v programu ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>), listové plochy daného explantátu jsou jednotlivě měřeny za pomoci funkce „polygon selections“ (Obrázek 6).



Obrázek 6 Určení velikosti listové plochy pomocí softwaru ImageJ. A - nástroj „polygon selections“ k výběru listové plochy; B - listová plocha ohraničená pomocí nástroje „polygon selections“; C - automaticky vypočítaná listová plocha v mm²

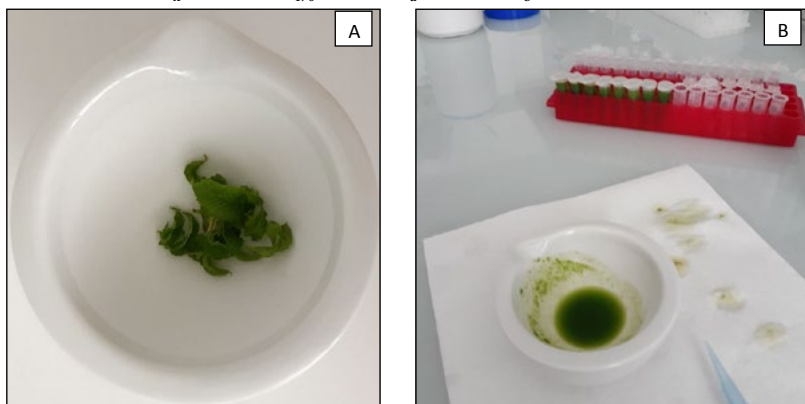
4.1.4. Změna obsahu listových barviv

Obsah listových barviv lze stanovit spektrofotometrickou metodou. Spektrofotometrické stanovení chlorofylů *a* a *b* v extraktu pigmentů spočívá v měření absorpčních maxim v červené oblasti viditelného spektra, kde karotenoidy neabsorbují (neruší stanovení). Výpočet koncentrace obou chlorofylů v extraktu umožňují rovnice se známými molárními absorpčními koeficienty stanovenými pro příslušné rozpouštědlo. Při analýze chlorofylů je důležité zabránit jejich degradaci, proto je doporučeno pracovat v nepřímém osvětlení a bez zbytečných časových ztrát. Obsah fotosyntetických pigmentů je spektrofotometricky stanovován v metanolovém extraktu. Pro přípravu extraktu je 0,1 g čerstvé hmotnosti explantátu utřeno ve třecí misce se 2 ml 100% metanolu (Obrázek 7). Kvůli vysokému odparu čistého metanolu je nutno pracovat rychle. Výsledný homogenát se přesune do 2ml mikrozskumavky a centrifuguje 15 minut při 3500 rpm. Následně je pomocí spektrofotometru měřena absorbance supernatantů při vybraných vlnových délkách, jedná se o 666 nm (chlorofyl *a*), 653 nm (chlorofyl *b*), 470 nm (celkové karotenoidy) a 750 nm (korekce nespecifické absorbance). Jako slepý vzorek je použit čistý metanol. Obsah pigmentů je následně stanoven dle rovnic odvedených Wellburnem (1994). Výsledky jsou vyjádřeny jako mg.l^{-1} extraktu. Do rovnic dosazujeme absorbance korigované o absorpncí zákalu (např. $A_{666} - A_{750}$).

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

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

$$C_x = (1000 A_{470} - 2,86 C_a - 129,2 C_b) / 221 \text{ (mg.l}^{-1}\text{)}$$



Obrázek 7 Stanovení obsahu listových barviv. A - explantát ve třecí misce připravený k homogenizaci; B - vzniklý homogenát po přidání 100% metanolu a řádné homogenizaci

4.2. Vnitřní parametry

4.2.1. Obsah rozpustných proteinů

Dle metody podle Bradfordové lze určit obsah rozpustných proteinů ve vzorku. Tato metoda patří mezi takzvané kolorimetrické metody a je založena na interakci proteinů s barvivem Coomassie blue. Proteiny v kyselém prostředí reagují s barvivem Coomassie

blue, přičemž se mění původní načervenalé-hnědé zbarvení (maximum absorbance při 465 nm) na modré (maximum absorbance při 610 nm) a to v závislosti na množství proteinů v prostředí (Obrázek 8). Rozdíly mezi oběma formami barviva jsou nejlépe viditelné při vlnové délce 595 nm. Použitá metodika pro stanovení celkových rozpustných proteinů dle Bradfordové je selektivní pro proteiny s větší molekulovou hmotností. Z toho důvodu tato metoda neumožňuje stanovit volné aminokyseliny a proteiny do velikosti 3 kDa. Použití této metody umožňuje stanovení proteinů v intervalu koncentrací od 100 do 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výhodou je, že barevná reakce je poměrně rychlá a komplexy proteinů s barvivem jsou stabilní v čase od 5 do 60 minut, což umožňuje stanovení koncentrace proteinů i v poměrně velké sérii vzorků.

K analýze obsahu proteinů je potřeba 0,1 g čerstvého rostlinného materiálu, který se ve vychlazené třecí misce utře s 2 ml fosfátového pufru. Před každou analýzou je nutno připravit vždy čerstvý pracovní roztok fosfátového pufru. 50mM fosfátový pufr (pH 7,0) se připraví smícháním zásobních roztoků K_2HPO_4 a KH_2PO_4 v poměru 1 : 1, přičemž jednotlivé roztoky jsou připraveny rozpuštěním 8,71 g K_2HPO_4 respektive 6,80 g KH_2PO_4 vždy v 1000 ml destilované vody. Hodnota pH obou zásobních roztoků se upraví potenciometrem s 0,1 M KOH. Takto připravené roztoky jsou při uchování v tmavých lahvích v lednici dlouho stabilní a jsou tak připraveny k přípravě čerstvého fosfátového pufru. Homogenát vzniklý utřením rostlinného materiálu ve fosfátovém pufru je následně přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifuguje se ve vychlazené centrifuzě 15 minut při 14000 rpm a teplotě 4 °C. K výsledným 30 μl supernatantu se přidá 970 μl komerčně dostupného Bradfordova činidla. Po opatrném promíchání je po 5 minutách na spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Jako slepý vzorek se použije 30 μl fosfátového pufru a 970 μl Bradfordova činidla. Pro sestavení kalibrační křivky se jako standard použije komerčně dostupný bovinní sérový albumin o různé koncentraci. K 30 μl roztoku standardu se vždy přidá 970 μl Bradfordova činidla. Výsledný obsah proteinů ve vzorku se vypočítá pomocí naměřené absorbance daného vzorku a přepočítáním dle sestavené kalibrační křivky. Obsah proteinů se vyjádří v jednotkách mg proteinů na g čerstvé hmotnosti.



Obrázek 8 Stanovení obsahu proteinů. Roztoky standardu o různé koncentraci k sestavení kalibrační křivky.

4.2.2. Obsah kyslíkových radikálů

Obsah kyslíkových radikálů (konkrétně superoxidového radikálu a peroxidu vodíku) lze spektrofotometricky stanovit použitím kolorimetrických reakcí.

4.2.2.1. Stanovení obsahu peroxidu vodíku (H_2O_2)

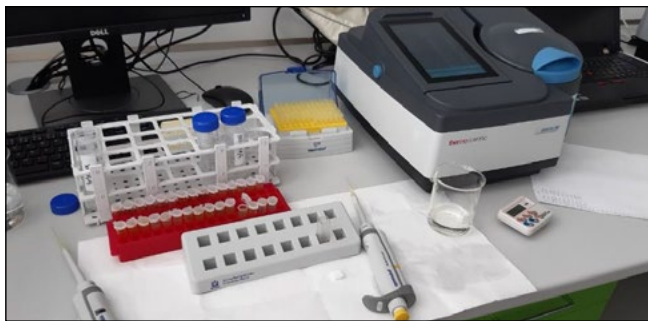
Obsah H_2O_2 v různých druzích rostlin se obvykle pohybuje v jednotkách až desítkách μmol na 1 gram suché hmotnosti. Principem stanovení je tvorba např. žluté zbarveného komplexu peroxidu vodíku s ionty titanu (Obrázek 9). Před analýzou je potřeba si připravit činidla, která budou pro reakci nezbytná. Jedná se o 50 mM fosfátový pufr (pH 7,0), jehož příprava je uvedena v podkapitole 4.2.1. Obsah rozpustných proteinů, dále bude potřeba 0,5% roztok $TiCl_4$ v 20% H_2SO_4 , při jehož přípravě je smícháno 31,12 ml 96% H_2SO_4 s 218,88 ml destilované vody a do takto připraveného a vychladlého roztoku je následně přidáno 1,25 ml $TiCl_4$ (pozor: kvůli extrémně rychlé sublimaci $TiCl_4$ nutno pracovat velmi rychle a v digestoři). Pro samotnou analýzu se ve vychlazené třecí misce ponořené v ledové drti utře 0,1 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu s 2 ml fosfátového pufru. Takto připravený homogenát se přesune do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifuguje ve chlazené centrifuzě 15 minut při 14000 rpm a teplotě 4 °C. Supernatant (500 μl) se následně přenese do čisté mikrozkušavky a smíchá s 250 μl 0,5% roztoku $TiCl_4$ v 20% H_2SO_4 . Po promíchání a opakované centrifugaci - 15 minut při 14000 rpm a teplotě 4 °C se vzorky nechají ohřát na laboratorní teplotu. Na spektrofotometru se změří absorbance při vlnové délce 410 nm. Jako slepý vzorek se použije 500 μl fosfátového pufru a 250 μl 0,5% roztoku $TiCl_4$ v 20% H_2SO_4 a jako standard pro sestrojení kalibrační křivky se použije 30% H_2O_2 o různé koncentraci. K 500 μl roztoku standardu se vždy přidá 250 μl 0,5% roztoku $TiCl_4$ v 20% H_2SO_4 a po promíchání a opakované centrifugaci - 15 minut při 14000 rpm a teplotě 4 °C se vzorky nechají ohřát na laboratorní teplotu. Na spektrofotometru se následně změří absorbance při vlnové délce 410 nm. Skutečný obsah peroxidu vodíku ve vzorku se přepočítá dle sestrojené kalibrační křivky a vyjádří se v μmol H_2O_2 na 1 gram čerstvé hmotnosti.



Obrázek 9 Stanovení obsahu reaktivních forem kyslíku. Vzorky připravené k měření absorbance pomocí spektrofotometru

4.2.2.2. Stanovení obsahu superoxidového radikálu

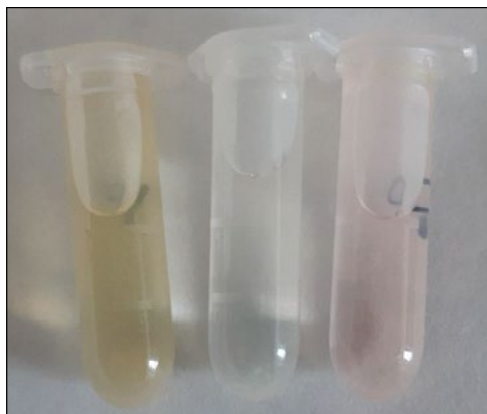
Superoxidový radikál (přesněji superoxidový aniontový radikál) je možné kvantitativně nepřímou reakcí s hydroxylaminem, čímž vzniká dusitan (nitrit). Obsah nitritu se pak kvantifikuje po přidání sulfanilamidu a naftylaminu tzv. Griessovou reakcí. Obsah nitritu je v rostlinách v přirozených podmínkách velmi nízký, proto se zkráslení způsobené právě endogenním obsahem nitritu považuje za zanedbatelné. Obsah superoxidového radikálu stanovený touto metodou se pohybuje řádově do desítek mikrogramů na gram suché hmotnosti. Stejně jako v dříve zmíněných metodách, je i před samotnou analýzou obsahu superoxidového radikálu nezbytná příprava reakčních činidel. Jedná se opět o 50 mM fosfátový pufr (pH 7,0), jehož příprava byla popsána v podkapitole 4.2.1. Obsah rozpustných proteinů, dále bude k analýze potřeba 10 mM hydroxylamin, který vznikne smícháním 0,165 ml 50% hydroxylaminu s 250 ml destilované vody. 17 mM sulfanilamid, pro jehož přípravu se rozpustí 0,732 g sulfanilamidu ve 250 ml destilované vody a 7 mM α -naftylamin, který lze připravit rozpuštěním 0,251 g α -naftylaminu ve 250 ml destilované vody. Všechna výše zmíněná činidla (vyjma fosfátového pufru) je třeba skladovat v tmavých nádobách se zábrusem a v lednici (vyjma α -naftylaminu). Ke stanovení obsahu superoxidového radikálu se ve vychlazené třecí misce ponořené v ledové drti rozetře 0,1 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu s 2 ml fosfátového pufru. Takto připravený homogenát se přesune do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifuguje ve chlazené centrifuzě 15 minut při 14000 rpm a teplotě 4 °C. Následně se k 250 μ l fosfátového pufru přidá 30 μ l hydroxylaminu a 300 μ l supernatantu homogenátu. Směs se promíchá a nechá se 15 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Poté se přidá 300 μ l sulfanilamidu a po promíchání se inkubuje 15 minut při laboratorní teplotě. V dalším kroku se přidá 300 μ l naftylaminu a po promíchání se opět inkubuje 15 minut při laboratorní teplotě. Na závěr se přidá 300 μ l dietyléteru. Výsledná reakční směs je světle- až tmavěružové barvy v závislosti na obsahu vytvořeného dusitanu. V slepém vzorku, který se připravuje souběžně, se vzorek nahradí fosfátovým pufrům o objemu 300 μ l. Pomocí spektrofotometru (Obrázek 10) se změří absorbance výsledné směsi ve skleněné kyvetě při vlnové délce 530 nm. Jako standard pro sestavení kalibrační křivky se použije NaNO_2 o různé koncentraci. Poustupuje se stejně, jako při samotné analýze, pouze se vzorek nahradí roztokem 300 μ l standardu o různé koncentraci. Obsah superoxidového radikálu se vyjádří jako μ g radikálu na 1 gram čerstvé hmotnosti.



Obrázek 10 Stanovení obsahu reaktivních forem kyslíku. Spektrofotometrické stanovení absorbancí.

4.2.3. Stanovení obsahu malondialdehydu

Malondialdehyd (MDA) je hlavní rozkladný produkt polynenasycených mastných kyselin. MDA je reaktivní sloučenina, která může atakovat např. dusíkaté báze v DNA. Je hlavní látkou, která reaguje s kyselinou 2-tiobarbiturovou (TBA) a proto se stanovení MDA přesněji označuje také jako „TBARS“ (Tio-Barbituric Acid Reactive Substances). Obsah MDA se běžně prezentuje jako parametr míry testovaného stresového vlivu. Obsah TBARS se v kontrolních rostlinách pohybuje řádově v μmol na 1 gram suché hmotnosti. K analýze bude potřeba 0,1% TCA, která se připraví rozpuštěním 0,1 g kyseliny trichloroctové ve 100 ml destilované vody a roztok 0,5% TBA v 20% TCA, pro jehož přípravu se 20 g kyseliny trichloroctové smíchá se 100 ml destilované vody a přidá se 0,5 g kyseliny 2-tiobarbiturové. Pro rozpuštění TBA je potřebné roztok mírně zahřívát. Upozornění: nutno pracovat v chirurgických rukavicích a dostatečně větrat, protože TBA dráždí oči, dýchací cesty a pokožku. Samotná analýza začíná přípravou vzorku, při které se ve třecí misce utře 0,2 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu s 2 ml 0,1% TCA. Vzniklý homogenát se přenese do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifuguje 15 minut při 14000 rpm a teplotě 20 °C. K 0,5 ml supernatantu se následně přidá 1,5 ml 0,5% TBA v 20% TCA. Směs se promíchá a nechá se 30 minut inkubovat ve vodní lázni nebo v sušárně při teplotě 90 °C. Poté se zkumavky prudce ochladí ve vodě s ledovou drtí (Obrázek 10). Vzorky se opět centrifugují 15 minut při 14000 rpm a teplotě 20 °C. Po ohřátí na laboratorní teplotu se ve spektrofotometru ve skleněné kyvetě změří absorbance při 532 nm (komplex MDA-TBA) a 600 nm (korekce nespécifického zákalu). Ve slepém vzorku, který je připravován souběžně, se vzorek nahradí 0,1% TCA o objemu 0,5 ml (Obrázek 11). Obsah MDA resp. TBARS se určí jako rozdíl absorbancí $A_{532} - A_{600}$ s použitím molového absorpčního koeficientu $155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Výsledky na základě známého ředění vyjádříme jako μmol MDA na g čerstvé hmotnosti.



Obrázek 11 Stanovení obsahu malondialdehydu. Vzorky připravené k měření absorbance, zleva vzorek z explantátu jabloně, slepý vzorek, vzorek z explantátu třešně

4.2.4. Stanovení celkové antioxidační aktivity

Stanovení celkové antioxidační aktivity dává představu o množství antioxidačních látek, tedy redukčně aktivních látek, které jsou schopné působit proti radikálům. Tato metoda se často používá ke kvantifikaci antioxidační síly daného extraktu. Vyšší antioxidační aktivita tedy odráží vyšší redukční potenciál. Nejběžnější používanou metodou pro toto stanovení je reakce s 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylem (DPPH), což je stabilní radikál (v roztoku metanolu fialové barvy), který se po smíchání s látkou poskytující atom vodíku mění na redukovanou formu (ztrácí se fialové zbarvení) (Obrázek 12). Pro určení aktivity se obvykle používá kalibrační graf připraven s různými koncentracemi Troloxu. 60 μM DPPH se připraví rozpuštěním 2,4 mg DPPH v 100 ml 100% metanolu. Roztok je potřeba připravit vždy čerstvý a chránit ho před degradací světlem. Při přípravě vzorku se ve třecí misce se utře 0,1 g čerstvé hmotnosti se 2 ml 100% metanolu. Kvůli vysokému odparu je nutno pracovat rychle. Vzniklý homogenát se přenese do 2 ml mikrozkušavky a centrifuguje 15 minut při 3500 rpm. K 1,5 ml roztoku DPPH se přidá 30 μl supernatantu a po promíchání se vzorky inkubují ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Absorbance se měří ve spektrofotometru při vlnové délce 595 nm. Antioxidační aktivita se vyjádří v procentech dle vzorce:

$$\% \text{ zhášení} = \frac{(AB-AA)}{AB} \times 100$$

kde AB = absorbance slepého vzorku (100% metanol) a AA = absorbance vzorku po 30 minutách. V případě použití Troloxu jako standardu pro sestavení kalibrační křivky, se výsledky vyjádří jako mM ekvivalentu Troloxu na gram čerstvé hmotnosti. K 1,5 ml roztoku DPPH se přidá 30 μl roztoku standardu o různé koncentraci. Vzorky se inkubují stejným způsobem a absorbance odečte při 595 nm.



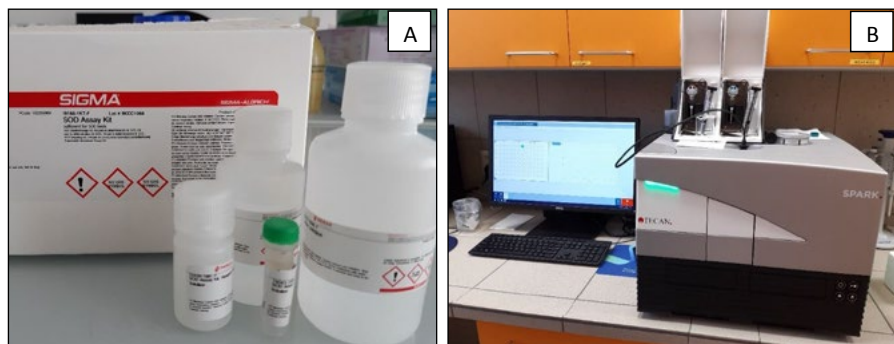
Obrázek 12 Stanovení celkové antioxidační aktivity. DPPH test – barevná změna DPPH v důsledku redukce volným atomem vodíku

4.2.5. Stanovení aktivity antioxidantních enzymů

K analýze antioxidantních enzymů je nutné připravit 50mM fosfátový pufr (pH 7,0) viz 4.2.1 Obsah rozpustných proteinů. Pro udržení funkčnosti extrahovaných proteinů se do připraveného pufru přidává 1% (nerozpustný) polyvinylpyrrolidon (1 g/100 ml). Pro přípravu vzorků ke stanovení aktivity vybraných antioxidantních enzymů (superoxid dismutázy, katalázy a askorbát peroxidázy) se ve vychlazené třecí misce ponořené v ledové drti utře 0,2 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu se 1,5 ml fosfátového pufru. Homogenát je následně přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifuguje v chlazené centrifuze 15 minut při 14000 rpm a teplotě 4 °C. Vzorky je nutné po celou dobu práce uchovávat na ledu.

4.2.5.1. Stanovení aktivity superoxid dismutázy (SOD, EC 1.15.1.1)

Superoxid dismutáza katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku a kyslík. Celková aktivita SOD se běžně stanovuje pomocí komerčně dostupných kitů. Obvykle je principem stanovení inhibice tvorby superoxidových iontů generovaných během oxidace xantinu a tyto superoxidové ionty redukují „tetrazolium nitroblue“ na „tetrazolium nitroblue - diformazán“. Přítomnost SOD snižuje hladinu superoxidu, čímž klesá i tvorba zmíněného diformazán-derivátu. Pro stanovení enzymu se postupuje dle návodu příslušného kitu (např. 19160 Sigma-Aldrich SOD Determination Kit) (Obrázek 13).



Obrázek 13 Stanovení aktivity superoxid dismutázy. A – komerčně dostupný kit ke stanovení SOD. B – vyhodnocení analýzy pomocí přístroje Spark® multimode microplate readeru

4.2.5.2. Stanovení aktivity katalázy (CAT, EC 1.11.1.6)

Kataláza je tetramér čtyř polypeptidů obsahující porfyrine jádro s atomem Fe^{3+} . Nachází se v různých organelách, vyjma chloroplastů, a její hlavní funkcí v listech je odbourávání peroxidu vodíku v peroxisomech. Je hlavním enzymem odpovědným za tzv. hrubou destrukci peroxidu vodíku (udává se rozklad 100 000 a více molekul H_2O_2 za sekundu). Ke stanovení aktivity katalázy se do 4ml skleněné kyvety postupně přidává 2,94 ml fosfátového pufru a 0,05 ml supernatantu dříve připraveného vzorku (viz 4.2.5 Stanovení aktivity antioxidantních enzymů). Enzymatická reakce se zahájí přidáním 0,01 ml 35% H_2O_2 . Změna absorbance (na základě rozkladu peroxidu vodíku) se zaznamená při vlnové délce 240 nm na začátku reakce a po jedné minutě průběhu. Jako slepý vzorek se používá fosfátový pufr. V případě potřeby lze objem supernatantu nebo peroxidu vodíku upravit. Aktivita CAT se vypočítá s použitím molárního absorpčního koeficientu $\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a vyjádří se jako μmol za min^{-1} na g čerstvé hmotnosti. Po stanovení proteinů metodikou podle Bradfordové je možný převod na mg proteinů.

4.2.5.3. Stanovení aktivity askorbát peroxidázy (APX, EC 1.11.1.1)

Askorbát peroxidáza je přítomna ve všech živých organismech. Její afinita k H_2O_2 je na úrovni μM , co zabezpečuje jemnou regulaci hladiny H_2O_2 a uplatňuje se tedy v signální roli ROS. Její aktivitu lze stanovit jako oxidaci askorbátu (sledujeme pokles absorbance).

Pro stanovení aktivity askorbát peroxidázy se do 4ml skleněné kyvety postupně přidává 2 ml fosfátového pufru, 0,55 ml zásobního roztoku 0,5 mM kyseliny askorbové (vzniklého rozpuštěním 8,806 mg kyseliny askorbové ve 100 ml destilované vody) a 0,225 ml zásobního roztoku peroxidu vodíku (tj. 250 mM H_2O_2 , který se připraví předem smícháním 2,85 ml 30% H_2O_2 se 100 ml destilované vody). Enzymatická reakce se zahájí přidáním 0,225 ml supernatantu dříve připraveného vzorku (viz 4.2.5 Stanovení aktivity antioxidantních enzymů). Pokles absorbance se zaznamená při vlnové délce 290 nm na začátku reakce a po jedné minutě průběhu. Jako slepý vzorek se používá fosfátový pufr. Aktivita APX se vypočítá s použitím molárního absorpčního koeficientu $\epsilon = 2,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a vyjádří se jako μmol za min^{-1} na g čerstvé hmotnosti. Po stanovení proteinů metodikou podle Bradfordové je možný převod na mg proteinů.

4.2.6. Stanovení obsahu prolinu

Prolin (Pro) je z chemického hlediska unikátní aminokyselina, protože jeho molekula obsahuje cyklický pyrrolidinový postranní řetězec. K akumulaci volného prolinu v buňkách rostlin dochází v případě abiotického i biotického stresu. Detekce prolinu je založena na reakci ninhydrinu s aminokyselinami. Navzdory interferenci ostatních aminokyselin s ninhydrinem je tato metoda poměrně specifická, protože vlivem stresu se obsah volného prolinu zvyšuje podstatně více než je tomu u jiných volných aminokyselin. Detekční limit této metody je v rozsahu 0,1 až 36 μmol volného prolinu.

Činidla nezbytná pro detekci prolinu jsou 3% SSA, 6M H_3PO_4 a kyselý ninhydrin. 3% SSA připravíme jednoduše rozpuštěním 3 g kyseliny sulfosalicylové ve 100 ml destilované vody. Pro přípravu 6M H_3PO_4 se 40,5 ml 85% H_3PO_4 smíchá s 59,5 ml destilované vody. Kyselý ninhydrin je připraven rozpuštěním 1,25 g ninhydrinu za zvýšené teploty ve 30 ml ledové kyseliny octové a 20 ml 6 M H_3PO_4 . Takto připravený roztok je stabilní při teplotě 4 °C přibližně 24 hodin.

Při přípravě vzorku se ve třecí misce se utře 0,3 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu s 5 ml 3% SSA. Takto připravený homogenát se přenese do 15ml zkumavky a centrifuguje 20 minut při 4500 rpm a teplotě 20 °C. Ke 2 ml vzniklého supernatantu se přidá 2 ml ledové kyseliny octové a 2 ml kyselého ninhydrinu. Směs se promíchá a nechá se 1 hodinu inkubovat ve vodní lázni při teplotě 90-100 °C. Poté se zkumavky prudce ochladí ve vodě s ledovou drtí na teplotu cca 25 °C. Po ochlazení se přidají 3 ml toluenu a směs se důkladně 20x protřepe (barevný komplex prochází do toluenu). Upravený vzorek se dá inkubovat na 24 hodin do tmy při laboratorní teplotě. Absorbance vrchní toluenové vrstvy se změří při vlnové délce 520 nm. Jako slepý vzorek se použije čistý toluen a jako standard pro sestavení kalibrační křivky se použije prolin o různé koncentraci. Poustupuje se stejně, vzorek se nahradí roztokem standardu o různé koncentraci. Celkový obsah prolinu se na závěr vyjádří jako μ mol prolinu na g čerstvé hmotnosti.

4.2.7. Stanovení cukrů a cukerných alkoholů

Samotná analýza stanovení cukrů (glukózy, fruktózy, sacharózy) a cukerných alkoholů (manitolu, sorbitolu a glycerolu) začíná přípravou vzorku, při které se ve třecí misce utře 0,2 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu se 2 ml 80% etanolu. Následně se homogenát přenese do 2 ml mikrozkušavky a zahřívá při 80 °C po dobu 30 minut. Poté se homogenát centrifuguje 10 minut při 4500 rpm. Vzniklý supernatant se odebere do čisté zkumavky, pelet se resuspenduje s 0,75 ml 50% etanolu a opět se zahřívá při 80 °C po dobu 30 minut. Po centrifugaci 10 minut při 4500 rpm se supernatanty spojí. Pelet se znovu resuspenduje s 0,75 ml 50% etanolu, následně se vzorek opět se zahřívá při 80 °C po dobu 30 minut a znovu centrifuguje 10 minut při 4500 rpm, vzniklý supernatant se přidá ke směsi předchozích. Ve spojených supernatantech se stanoví obsah jednoduchých cukrů a cukerných alkoholů pomocí UHPLC-MS (Obrázek 14).



Obrázek 14 Stanovení obsahu cukrů a cukerných alkoholů. Systém UHPLC-MS - UHPLC Infinity II 1290 a Triple Quadropole 6470 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

4.2.8. Stanovení obsahu kyseliny abscisové

Vzorky určené ke stanovení obsahu kyseliny abscisové je nutné ihned po odběru zmrazit v tekutém dusíku a do doby analýzy skladovat při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby se zamezilo degradaci hormonu. Hmotnost čerstvé hmoty by měla být v rozmezí 0,05-1 g. Následná příprava vzorku a extrakce kyseliny abscisové začíná utřením zmraženého odebraného materiálu ve třecí misce s tekutým dusíkem až na jemný prášek, který se přenesení do 1,5 ml mikrozkušavky vychlazené v tekutém dusíku. Třecí miska se dvakrát propláchně 0,25 ml extrakčního roztoku (směs metanol/destilovaná voda/kyselina mravenčí v poměru 15/4/1) vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a přidá se do mikrozkušavky s rozdrceným rostlinným materiálem. Takto připravené vzorky se inkubují 1 hodinu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně centrifugují 30 minut při 15000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzniklý supernatant se přesune do čisté mikrozkušavky, pelet se resuspenduje s 0,25 ml extrakčního činidla, nechá se 30 minut inkubovat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a opět centrifuguje 30 minut při 15000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzniklý supernatant se spojí s tím, který vznikl první centrifugací a takto připravený vzorek je následně purifikován.

Cílem purifikace je očištění vzorků od co nejvíce látek, které by mohli interferovat v průběhu analýzy. Během purifikace je zároveň nutné zamezit ztrátám analyzované látky během purifikace. Při purifikaci se využijí dva typy SPE (soli phase extraction) kolonek, C18 pro odstranění většiny lipofilních látek a MCX kolonka, která rozdělí vyzizolované fytohormony do tří frakcí. Pracovní postup purifikace začíná promytím SPE C18 kolonky 5 ml metanolu a následným nanesením a prokapáním 5 ml extrakčního roztoku. Poté je na kolonku nanesen vzorek, který se po prokapání kolonkou odpaří ve vakuové odparce SpeedVac při $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ na přibližně 1/10 objemu. Ten je následně rozpuštěn v 1 ml 1M kyseliny mravenčí a nanesen na aktivovanou SPE kolonku Oasis MCX (aktivace promytím 5 ml metanolu a následně s 5 ml 1M kyseliny mravenčí). Po prokapání vzorku se kolonka promyje znovu 5 ml 1 M kyseliny mravenčí a poté se pod kolonku umístí čisté zkumavky a kolonky se promyjí 5 ml 100% metanolem, eluent obsahující extrahovanou kyselinu abscisovou se ve zkumavkách odpaří do sucha pomocí vakuové odparky SpeedVac při teplotě $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odparek je před samotnou analýzou rozpuštěn v 50 μl 10% acetonitrilu a centrifugován při 15 000 g po dobu 10 minut při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant je následně přenesen do vialky a připraven k analýze pomocí HPLC-MS.

Postup a nastavení parametrů pro HPLC-MS jsou velmi specifické a mohou se odlišovat dle použitého přístroje. Pro konkrétní přístroj by měly být parametry optimalizované experimentálně. Dále jsou proto uvedeny pouze obecné pokyny, vycházející z konkrétního nastavení přístroje použitého při vzniku metodiky. Do HPLC se vstříkne alikvotní část, tj. 1/2 z extraktu připraveného ze 100 mg čerstvé hmotnosti nebo 1/10 z extraktu připraveného z 1 g čerstvé hmotnosti. Podmínky HPLC: mobilní fáze: směs A: 5mM kyselina octová ve vodě a B: 5mM kyselina octová v acetonitrilu. Program gradient: od 10% - 50% B za 20 min při průtoku 0,25 ml.min⁻¹; Vypláchnout kolonu 100% B po dobu 5 minut a ekvilibrovat na počáteční podmínky po dobu 10 minut.

SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Komplexně zpracovaná metodika pro výzkum sucha u ovocných plodin pomocí moderních biotechnologických postupů nebyla v České republice doposud publikována. Inovativnost předložené metodiky spočívá ve využití biotechnologických a analytických metod, které umožňují testování výchozího materiálu v kontrolovaném laboratorním prostředí. Metodika přehledně a souhrnně popisuje všechny postupy, které lze využít ke stanovení odolnosti ovocných druhů vůči suchu v laboratorních podmínkách. Využití kultivace explantátů v *in vitro* podmínkách, simulace stresových podmínek a následná celistvá analýza vnějších i vnitřních reakcí testovaného materiálu na stres suchem umožňuje rychlé a plošné testování odolnosti ovocných druhů k suchu. Právě pro svou rychlost, jednoduchost a komplexnost sledovaných parametrů je předkládaná metoda vhodná k primárnímu screeningu a selekci odrůd ovocných druhů odolných vůči nedostatku vody. Na výsledky získané na základě laboratorního testování je nezbytné navázat sledováním odolnosti vhodných odrůd v polních podmínkách, které jsou časově i technicky náročné, proto je vhodná prvotní selekce odolných odrůd již v laboratorních podmínkách.

POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika laboratorní metody pro predikci tolerance ovocných plodin na sucho může být využita pro rychlý screening testovaného materiálu. Předkládanou metodu lze aplikovat nejen na ovocné druhy, na kterých byla zhotovena, ale s minimálními úpravami i na celé spektrum rostlinných druhů. Mezi potenciální uživatele metodiky patří tedy všechna pracoviště, kde je rostlinný materiál množěn pomocí *in vitro* kultur a pracoviště s analytickým zázemím. V mnoha případech se může jednat o jedno a to samé výzkumné pracoviště, případně lze využít spolupráce mezi různými pracovišti ve smyslu kultivace rostlinného materiálu na jednom pracovišti a analýzy vybraných parametrů druhým pracovištěm. Metodika nabízí nástroje pro sledování mnoha vnitřních a vnějších projevů vyvolaných v rostlinách v důsledku sucha. V předkládané metodice jsou projevy ovocných druhů vyhodnocovány na základě mnoha morfologických, fyziologických a biochemických parametrů. Tento obsáhlý komplex testů lze upravovat dle možností potenciálního uživatele metodiky a není nezbytné pro účely rutinního prvotního testování obsáhnout všechny sledované parametry. Nicméně, čím více testů potenciální uživatel obsáhne, tím přesnějších a spolehlivějších závěrů dosáhne.

Metodika byla testována na pěti odrůdách jableň ('Car Alexander', 'Fragrance', 'Idared', 'Malinové holovouské' a 'Rubinstep'), čtyřech odrůdách třešně ('Kaštánka', 'Napoleonova', 'Regina', 'Sunburst') a jedné třešňové podnoži (P-HL-C). Na základě získaných dat je možné předběžně sestavit orientační pořadí vybraných odrůd vzhledem k jejich schopnosti odolávat stresu suchem. U jableň výsledky naznačují nejvyšší míru tolerance u odrůdy 'Malinové holovouské' a další odrůdy v pořadí s klesající mírou tolerance jsou 'Fragrance', 'Car Alexander',

‘Rubinstep’ a ‘Idared’. U třešní bylo předběžné pořadí sestaveno následovně: ‘Napoleonova’, ‘Regina’, ‘Kaštánka’, podnož P-HL-C a Sunburst (řazeno od nejvyšší míry tolerance po nejnižší).

EKONOMICKÉ ASPEKTY

Pomocí moderních biotechnologických a analytických technik, jako je kultivace rostlin *in vitro*, spektrofotometrie nebo hmotnostní spektrometrie, lze komplexně sledovat vliv sucha na testované rostliny z morfologického, fyziologického a biochemického hlediska. Využití laboratorních podmínek a kultivace materiálu *in vitro* umožňuje na malé ploše připravit velké množství rostlinného materiálu. Analytické metody a metody hodnocení jednotlivých parametrů jsou zvoleny tak, aby v jednom vzorku bylo možné analyzovat a sledovat více parametrů, což výrazně přispívá ke zrychlení, zpřesnění a zlevnění této metody. Další výhodou využití *in vitro* kultur k predikci tolerance sucha je stálost kontrolovaného prostředí, která je nezávislá na vnějších vlivech a střídání ročních období. Experimenty lze tedy provádět kontinuálně po celý rok, což má opět za následek zrychlení získávání potřebných informací. Konkrétní ekonomická náročnost významně záleží na aktivitách potenciálního uživatele a aktuálního vybavení jeho zázemí. Metoda lze být upravována ve smyslu snížení počtu sledovaných parametrů v testovaných rostlinách za účelem úspory finančních nákladů na pořizování analytického vybavení. Nicméně je nezbytné mít na vědomí že, čím více testů potenciální uživatel obsáhne, tím přesnějších a spolehlivějších závěrů dosáhne.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alizadeh, V.; Shokri, V.; Soltani, A.; Yousefi, M.A. Effects of Climate Change and Drought-Stress on Plant Physiology. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res* 2015, 3, 38–42.
- Anjum, S.A.; Ashraf, U.; Zohaib, A.; Tanveer, M.; Naeem, M.; Ali, I.; Tabassum, T.; Nazir, U. Growth and developmental responses of crop plants under drought stress: A review. *Zemdirb. Agric.* 2017, 104, 267–276.
- Bessler, B. The Use of 6-Benzylaminopurine for Rapid Multiplication of Tillandsias. *HortSci* 1997, 32, 256–258, doi:10.21273/HORTSCI.32.2.256.
- Bhadra, S.; Roy, B.; Ghimiray, T.S. Polyethyleneglycol mediated rapid in vitro screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for drought tolerance. *Ind. J. Gen. Plnt. Bree.* 2017, 78, 142.
- Caverzan, A.; Passaia, G.; Rosa, S.B.; Ribeiro, C.W.; Lazzarotto, F.; Margis-Pinheiro, M. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet. Mol. Biol.* 2012, 35, 1011–1019, doi:10.1590/S1415-47572012000600016.
- D'Autréaux, B.; Toledano, M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8, 813–824, doi:10.1038/nrm2256.
- Farooq, M.; Wahid, A.; Kobayashi, N.; Fujita, D.; Basra, S.M.A. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* 2009, 29, 185–212
- Farooq, M.; Wahid, A.; Lee, D.-J.; Cheema, S.A.; Aziz, T. Drought stress: Comparative Time Course Action of the Foliar Applied Glycinebetaine, Salicylic Acid, Nitrous Oxide, Brassinosteroids and Spermine in Improving Drought Resistance of Rice: Improving rice drought tolerance. *J. Agron. Crop Sci.* 2010, 196, 336–345.
- Jaleel, C.A.; Manivannan, P.; Wahid, A.; Farooq, M.; Al-Juburi, H.J.; Somasundaram, R.; Panneerselvam, R. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 2009, 11, 100–105.
- Kosová, K.; Práčil, I.; Vítámvás, P. Role of Dehydrins in Plant Stress Response. In *Handbook of Plant and Crop Stress*, Third Edition; Pessarakli, M., Ed.; Books in Soils, Plants, and the Environment; CRC Press, 2010; Vol. 20102370, pp. 239–285 ISBN 978-1-4398-1396-6.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. - *Physiol. Plant.* 1962, 15, 473-497.
- Rosegrant, M.W.; Cline, S.A. Global food security: challenges and policies. *Science* 2003, 302, 1917-1919, doi: 10.1126/science.1092958.
- Sah, S.K.; Reddy, K.R.; Li, J. Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science* 2016, 7, 571, doi:10.3389/fpls.2016.00571.

- Sharma, A.; Shahzad, B.; Kumar, V.; Kohli, S.K.; Sidhu, G.P.S.; Bali, A.S.; Handa, N.; Kapoor, D.; Bhardwaj, R.; Zheng, B. Phytohormones Regulate Accumulation of Osmolytes Under Abiotic Stress. *Biomolecules* 2019, 9, 285, doi:10.3390/biom9070285.
- Sun, C.; Li, X.; Hu, Y.; Zhao, P.; Xu, T.; Sun, J.; Gao, X. Proline, Sugars, and Antioxidant Enzymes Respond to Drought Stress in the Leaves of Strawberry Plants. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 2015, 33, 625–632.
- Szabados, L.; Saviouré, A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 2010, 15, 89–97, doi:10.1016/j.tplants.2009.11.009.
- Wang, Z.; Li, G.; Sun, H.; Ma, L.; Guo, Y.; Zhao, Z.; Gao, H.; Mei, L. Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biol. Open* 2018, 7, bio035279.
- Wellburn, A.R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology* 1994, 144, 307–313, doi:10.1016/S0176-1617(11)81192-2.
- Young, A.; Lowe, G. Carotenoids—Antioxidant Properties. *Antioxidants* 2018, 7, 28.

SEZNAM LITERATURY, KTERÁ PŘEDCHÁZELA METODICE

- Kovalikova, Z.; Jiroutova, P.; Toman, J.; Dobrovolna, D.; Drbohlavova, L. Physiological Responses of Apple and Cherry In Vitro Culture under Different Levels of Drought Stress. *Agronomy* 2020, 10, 1689.



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

Ministerstvo zemědělství, odbor zemědělských komodit, Těšnov 65/17, Praha 1, 110 00

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

148/2021-MZE-18140

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: Certifikovaná metodika odolnosti ovocných plodin k suchu v in vitro podmínkách

Autoři: Mgr. Petra Jiroutová, Ph.D., RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.

Název organizace: **Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.**

Místo vydání: **Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.**

Rok vydání: **2021**

Tato metodika (certifikovaná metodika odolnosti ovocných plodin k suchu v in vitro podmínkách) byla vytvořena se státní podporou Technologické agentury ČR v rámci Programu ZÉTA (Program na podporu aplikovaného výzkumu), identifikační kód projektu – TJ02000066 Výzkum laboratorní metody pro predikci tolerance ovocných plodin na suchu

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? **ANO**

V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“, je výsledek typu N_{met} zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce: **www.vsuo.cz**

V Praze dne *15. 1. 2021*

Razítko odborného orgánu státní správy



Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:
Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Miroslava Czetmayer Ehrlichová
ředitelka odboru zemědělských komodit

Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V Praze dne

18. 1. 2021

Mgr. Jan Radoš
pověřen zastupováním ředitele odboru

Poznámky:

Poznámky:

Poznámky:

**Certifikovaná metodika odolnosti ovocných plodin
k suchu v *in vitro* podmínkách**

Autoři: Mgr. Petra Jiroutová, Ph.D., RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.

Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

Grafická úprava a sazba: Jan Slezák - OUTSOURCING

Tisk: Repopaint s.r.o.

ISBN 978-80-87030-81-3

