

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyziologie rostlin



Reakce na abiotický stres u tkáňových kultur jabloně
(*Malus domestica* Borkh.)

(diplomová práce)

Bc. Daniel Krsek

Praha 2009

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Helena Lipavská, PhD.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma

Reakce na abiotický stres u tkáňových kultur jabloně (*Malus domestica* Borkh.)

vypracoval samostatně na Katedře fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2006-2009 za použití citované literatury. Souhlasím s případným zapůjčením diplomové práce pro studijní a účely.

Daniel Krsek

Poděkování

Poděkování patří především paní docentce RNDr. Heleně Lipavské, PhD. za trpělivý a laskavý přístup během celé doby mého studia. Dále děkuji RNDr. Haně Konrádové, PhD. za poskytnuté cenné rady a zajímavé podněty. Děkuji paní Olze Činglové za nezištnou pomoc a rady při laboratorní práci. Dále děkuji celému kolektivu naší laboratoře za utváření přátelské atmosféry, případnou pomoc a povzbuzení. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Abstract

Abiotic stress factors, primarily those which disturb plant water balance, cause extensive crop losses. With regard to sessile lifestyle, many mechanisms how to cope with these unfavourable conditions were developed during evolution of plants. As common impact of many of these stresses like drought, salinity or low temperatures is of osmotic nature, the osmotic adjustment represents important part of plant stress response. Mostly, this component of stress reaction is provided by organic compounds, which are referred to as compatible solutes, including polyhydroxyl compounds (sucrose, sugar alcohols, cyclitols, and oligosaccharides) and nitrogen-containing compounds (mainly proline). The effect of these solutes is not only osmotic, but also osmoprotective as they are able to preserve integrity of membranes and macromolecules by mimicking their water envelope. The compatible solutes also contribute to quenching of reactive oxygen species overproduced under these stress conditions. This study is focused on apple (*Malus domestica*) producing, beside sucrose, sugar alcohol sorbitol as primary photosynthetic product and transporting these carbohydrates along with raffinose family oligosaccharides (RFO) for a long distance. In vitro tissue cultures derived from leaves of two apple cultivars differing in stress sensitivity (cv. Šampion Red and cv. Idared) were used to investigate possible connection between differences in stress tolerance and particular soluble carbohydrate accumulation. Salinity caused an increase of total soluble carbohydrate content in more tolerant cv. Šampion Red, whilst the same stress cause opposite reaction in less tolerant cv. Idared. For the observed increase of soluble carbohydrates in this case hexoses were preferentially responsible. More severe growth inhibition of cv. Idared under this treatment was observed as well. Osmotic stress induced by nonpermeable osmoticum - PEG - caused the decrease of soluble carbohydrate content in contrast with the case of permeable osmoticum - mannitol, where the increase of soluble carbohydrate content was observed, although accumulation of the osmoticum itself was mainly responsible for this change. Interestingly, significant accumulation of sorbitol was not observed under any stress treatment in both cultivars. The content of raffinose, in raffinose-supported cultures, increased substantially under low temperature treatment in both cultivars indicating a role of these oligosaccharides in response to this specific stress. The results proved the value of the use of plant tissue cultures in the studies of stress response as it enables to distinguish the stress responses at the cell level from those requiring organ or whole plant organisation.

Obsah

Obsah	1
1. Úvod	3
Cíle	4
Seznam použitých zkratk:	5
2. Literární úvod	6
2.1 Základní rozdělení stresových faktorů	6
2.2 Salinita	7
2.2.1 Toxické účinky zasolení	7
2.2.2 Obranné mechanismy	7
2.3 Chladový stres	9
2.3.1 Dopady nízkých teplot na rostlinu	9
2.3.2 Obranné mechanismy	10
2.4 Osmotický stres	11
2.5 Oxidativní stres	11
2.6 Kompatibilní soluty	12
2.6.1 Sacharóza	12
2.6.1.1 Syntéza sacharózy	13
2.6.1.2 Sacharóza ve stresových reakcích	13
2.6.1.3 Signalizační role sacharózy	14
2.6.2 Trehalóza	15
2.6.2.1 Metabolismus trehalózy	15
2.6.2.2 Trehalóza a stres	15
2.6.3 Fruktany	16
2.6.4 Cukerné alkoholy	17
2.6.4.1 Sorbitol	18
2.6.4.1.1 Syntéza sorbitolu	18
2.6.4.1.2 Transport sorbitolu	19
2.6.4.1.3 Metabolismus sorbitolu v sinku	21
2.6.4.1.4 Regulace transportu a metabolismu sorbitolu v reakci na stres	22
2.6.4.1.5 Syntéza sorbitolu u transgenních rostlin	24
2.6.4.2 Proč se polyoly vyskytují u rostlin, u kterých nejsou primárními produkty fotosyntézy?	25
2.6.4.3 Cyklické cukerné alkoholy	26
2.6.4.3.1 Syntéza cyklicolů	27
2.6.4.3.2 Změny metabolismu cyklicolů při stresu	27
2.6.5 Sacharidy rafinóзовé řady	28
2.6.5.1 Syntéza RFO	29
2.6.5.2 Katabolismus RFO	30
2.6.5.3 Regulace metabolismu RFO při stresu	30
2.6.5.4 Vliv nedostatku vody na obsah RFO	32
2.7 Tkáňové kultury a studium stresových reakcí	32
3. Materiál a metody	34
3.1 Rostlinný materiál	34
3.2 Kultivace rostlinného materiálu	34
3.2.1 Kultivační postupy	34
3.2.1.1 Práce v aseptických podmínkách	34
3.2.1.2 Kultury stonkových segmentů jabloně <i>in vitro</i>	34
3.2.1.3 Odvození tkáňových kultur jabloně	35
3.2.1.4 Kultivační podmínky tkáňových kultur jabloně <i>in vitro</i>	35
3.2.1.5 Příprava kultivačních médií	35
3.3 Stanovení obsahu endogenních sacharidů	40
3.3.1 Příprava vzorků pro stanovení obsahu endogenních sacharidů	40
3.3.2 Měření obsahu endogenních sacharidů	41
3.4 Stanovení růstových parametrů	41
3.5 Statistické zpracování dat	41
3.6 Přehled experimentů	41
4. Experimentální část	44
4.1.1 Vliv typu exogenního sacharidu na růstové charakteristiky tkáňových kultur jabloně	44

4.1.2 Obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně při různém typu exogenního sacharidu.....	46
4.2.1 Ovlivnění růstu tkáňových kultur různou koncentrací exogenních sacharidů.....	50
4.2.2 Obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně při různé koncentraci exogenních sacharidů.....	51
4.3.1 Růst tkáňových kultur jabloně ovlivněných zasolením a osmotickým stresem.....	52
4.3.2 Obsah a spektrum endogenních sacharidů u tkáňových kultur jabloně ovlivněných zasolením a osmotickým stresem.....	56
4.4.1 Vliv penetrujícího a nepenetrujícího osmotika na růst tkáňových kultur jabloně.....	61
4.4.2 Vliv osmotického stresu na obsah endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně.....	62
4.5.1 Ovlivnění růstu tkáňových kultur jabloně chladovým stresem.....	65
4.5.2 Obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně vystavených chladovému stresu.....	68
4.6.1 Ovlivnění růstu tkáňových kultur jabloně osmotickým stresem a simulace stresu aplikací kyseliny abscisové.....	71
4.6.2 Obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně při osmotickém stresu a simulací stresu aplikací kyseliny abscisové.....	72
5. Diskuse.....	75
5.1 Vliv exogenních sacharidů na růst tkáňových kultur jabloně <i>in vitro</i>	75
5.2 Vliv exogenních sacharidů na obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně <i>in vitro</i>	77
5.3 Ovlivnění růstu a obsahu endogenních sacharidů různou koncentrací exogenního sacharidu.....	80
5.4 Vliv zasolení a osmotického stresu na růst tkáňových kultur jabloně.....	81
5.5 Vliv zasolení a osmotického stresu na obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně <i>in vitro</i>	83
5.6 Ovlivnění růstu, obsahu a spektra endogenních sacharidů penetrujícím a nepenetrujícím osmotikem..	85
5.7 Vliv chladového stresu na růst, obsah a složení endogenních sacharidů.....	87
5.8 Vliv simulace stresu aplikací kyseliny abscisové na obsah a spektrum endogenních sacharidů.....	89
5.9 Je syntéza cukerných alkoholů obecným mechanismem stresových reakcí?.....	92
6. Závěry.....	94
7. Seznam použité literatury.....	95

1. Úvod

Rostliny jsou vzhledem k přisedlému způsobu života vystaveny neustále se měnícím životním podmínkám, které nejsou vždy příznivé. Asi největší dopad na rozšíření rostlin a celosvětovou zemědělskou produkci mají abiotické stresy, zejména sucho, nízké teploty a zasolení. Tyto stresové faktory vedle svých specifík představují pro rostlinu osmotický stres, a z něj vyplývající zhoršenou dostupnost vody pro rostlinu. U rostlin se proto vyvinula řada mechanismů jak se s osmotickým stresem vypořádat na morfologické i fyziologické úrovni. Jedním z důležitých mechanismů je syntéza kompatibilních solutů. Tyto osmoticky aktivní látky se mohou hromadit v buňkách ve vysokých koncentracích a přesto nenarušovat buněčný metabolismus. Vedle samotného osmotického přizpůsobení mají tyto látky osmoprotektivní vlastnosti a jako zhášeci volných radikálů zabezpečují ochranu buněčných složek před oxidativním poškozením. Významnými zástupci kompatibilních solutů jsou neredukující sacharidy. Zajímavou skupinou těchto sacharidů jsou cukerné alkoholy. Většina poznatků o roli cukerných alkoholů ve stresových reakcích pramení ze studia metabolismu nejrozšířenějšího zástupce, manitolu. V naší laboratoři bylo v předcházejících letech sledováno ovlivnění cukerného metabolismu abiotickým stresem na příkladu dvou producentů manitolu a to celeru (*Apium graveolens* L.) a olivy (*Olea europaea* L.). Pro tuto diplomovou práci byla jako pokusný materiál zvolena jabloň (*Malus domestica* Borkh.), producent dalšího cukerného alkoholu sorbitolu. Jabloň vedle toho, že je zástupcem dřevin, sdílí s olivou další společný rys, kterým je syntéza sacharidů rafinózové řady. Sacharidy rafinózové řady se podobně jako cukerné alkoholy uplatňují při stresových reakcích u mnoha druhů rostlin, zejména při stresu nízkých teplot. Pro pochopení úlohy sacharidů při navození odolnosti k abiotickému stresu u jabloně byly použity dva různé kultivary lišící se odolností ke stresu a některým chorobám.

Cílem této diplomové práce je přispět k poznání změn cukerného metabolismu při stresových reakcích u jabloně (*Malus domestica* Borkh.) a porovnat případné rozdíly těchto charakteristik u dvou kultivarů s různou odolností ke stresu.

Dílčí cíle:

- Odvodit tkáňové kultury jabloně a najít optimální médium pro jejich kultivaci *in vitro*.
- Porovnat schopnost různých exogenních sacharidů sloužit jako zdroj uhlíku a energie pro tkáňové kultury jabloně *in vitro*.
- Stanovit, zda tkáňové kultury jabloně mohou využívat manitol jako zdroj uhlíku a energie.
- Sledovat vliv zasolení na růst, obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur obou kultivarů.
- Porovnat vliv osmotického stresu vyvolaného penetrujícím a nepenetrujícím osmotikem na růst, obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur obou kultivarů.
- Sledovat vliv nízkých teplot na růst, obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur obou kultivarů v závislosti na zásobení různým exogenním sacharidem.

Testovat možnost simulace stresu aplikací kyseliny abscisové na úrovni růstu, obsahu a spektra endogenních sacharidů tkáňových kultur obou kultivarů.

Seznam použitých zkratek:

3PGA	3-fosfoglyceraldehyd
A6PR	NADPH-dependentní aldóza-6-fosfátreduktáza
ABA	kyselina abscisová
AtGolS1/2/3	galaktinolsyntázy <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenosintrifosfát
DP	stupeň polymerace
F6P	fruktóza-6-fosfát
FBP	fruktóza-1,6-bisfosfát
FBPáza	fruktóza-1,6-bisfosfatáza
G1P	glukóza-1-fosfát
G6P	glukóza-6-fosfát
GGT	galaktan:galaktan galaktosyltransferáza
GS1/2	galaktinolsyntázy <i>Ajuga reptans</i>
GS	galaktinolsyntáza
HXK	hexokináza
IMT	inositolmetyltransferáza
Ins1P	myo-inositol-1-fosfát
IP3	inositol-1,4,5-trifosfát
LEA proteiny	proteiny syntetizované v pozdní fázi embryogeneze
MdSOT3/4/5	transportéry sorbitolu <i>Malus domestica</i>
NAD/NADH	nikotinamidadenindinukteotid
OMI	O-metyl-inositol
PAL	fenylalaninamoniumlyáza
PcSOT1/2	transportéry sorbitolu <i>Prunus cerasus</i>
PEG	polyetylen glykol
PGI	fosfogluoizomeráza
Pi	ortofosfát
PmPLT1/2	transportéry sorbitolu <i>Plantago major</i>
PmSDH1	sorbitoldehydrogenáza 1 <i>Plantago major</i>
PmSUC2	transportér sacharózy <i>Plantago major</i>
RFO	sacharidy rafinózové řady
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RS	rafinózasyntáza
RuBP	ribulóza-1,5-bisfosfát
S6P	sorbitol-6-fosfát
S6PP	sorbitol-6-fosfátfosfatáza
SAM	S-adenosylmethionin
SDH	NAD-dependentní sorbitoldehydrogenáza
SOX	sorbitoloxidáza
SPS	sacharózafosfátsyntáza
SPP	sacharózafosfátfosfatáza
STS	stachyózasyntáza
SuSy	sacharózasyntáza
T6P	trehalóza-6-fosfát
THF	tetrahydrofolát
TP	triózafosfát
TPP	trehalóza-6-fosfátfosfatáza
TPS	trehalóza-6-fosfátsyntáza
UDPG	UDP-glukóza

2. Literární úvod

2.1 Základní rozdělení stresových faktorů

Rostliny jsou po celý svůj život vystaveny nepříznivým životním podmínkám, se kterými se musí vzhledem k přisedlému způsobu života vyrovnat. Podle původu se stresové faktory dělí na abiotické a biotické.

Rozdělení stresových faktorů (Procházka et al., 1998):

Abiotické faktory:

- **fyzikální**
 - mechanické účinky větru
 - nadměrné záření (UV, viditelné)
 - extrémní teploty (horko, chlad, mráz)
- **chemické**
 - nedostatek vody (sucho)
 - nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)
 - nedostatek živin v půdě
 - nadbytek iontů solí a vodíku v půdě
 - toxické kovy a organické látky v půdě
 - znečištění ovzduší

Biotické faktory:

- **herbivorní živočichové**
- **patogenní mikroorganismy** (viry, mikrobi, houby)
- **vzájemné ovlivňování** (alelopatie, parazitismus)

Abiotické stresory jsou nejvýrazněji limitující faktory pro rostlinnou produkci. Bray et al. (2000) odhaduje, že celosvětově je 50-80 % potenciálního výnosu zemědělských plodin ztraceno vlivem působení abiotických stresových faktorů. Z abiotických stresových faktorů mají největší dopad na život rostlin ty, které ovlivňují vodní bilanci rostlin (sucho, zasolení, teplotní extrémy). Voda tvořící více než 90 % rostlinného těla je zcela nepostradatelná pro život rostlin. Díky svým unikátním biofyzikálním vlastnostem (vysoké výparné teplo, vysoká dielektrická konstanta a povrchové napětí) se vyskytuje v kapalném skupenství v širokém rozmezí teplot a je také dobrým rozpouštědlem. Voda je také nezbytným donorem elektronů při fotosyntéze. Je zřejmé, že dostupnost vody je tím nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím rozšíření rostlin na Zemi. U rostlin se proto vyvinula řada pasivních mechanismů s dlouhodobým charakterem (avoidance) omezujících narušení vnitřního prostředí rostliny jak v souvislosti s vodním stresem, tak i dalšími stresovými faktory (zesílení kutikuly, impregnace buněčných stěn, rezervoáry vody). Po průniku stresoru do

vnitřního prostředí rostliny a následnému spuštění kaskády procesů souhrnně označovaných jako stresová reakce se uplatňují z fyziologického hlediska zajímavější mechanismy aktivní odolnosti (tolerance).

2.2 Salinita

Jedním z významných stresových faktorů limitujících život a růst rostlin je zvýšený obsah solí v prostředí. Přibližně 10 % pevniny je v různé míře zasaženo zasolením, nebo sodicitou (zvýšeným obsahem sodíku). Z celkového rozsahu $1,5 \cdot 10^9$ ha zemědělsky využívané půdy je takto zasaženo 23 % (Rhoades a Loveday, 1990). K zasolování půd dochází primárně přírodní cestou, kdy se ze zvětralých hornin uvolňují soli do prostředí. Neméně významnými činiteli vedoucími k sekundárnímu zasolování půd je především nevhodné umělé zavlažování, odlesňování půd a nadměrné spásání rostlinného krytu (Pessaraki and Szabolcs, 1999).

2.2.1 Toxické účinky zasolení

U senzitivních rostlin probíhá reakce na přítomnost soli v půdě ve dvou fázích. Nejprve se projevuje zvýšený osmotický tlak v okolí kořenů rostliny výrazným zpomalením růstu prýtu. Kromě osmotického stresu má hlavní nepříznivý dopad na fyziologický stav rostliny toxický efekt Na^+ iontů, nastupující ve druhé fázi po průniku iontů do rostliny (Munns a Tester, 2008). Jejich toxicita je dána jejich velkým nábojem vzhledem k malé velikosti iontu a při velké koncentraci mohou narušovat hydrofobní interakce a hydratační obaly makromolekul. Sodíkové ionty se také váží do inhibičních míst některých enzymů, u jiných zase kompetují s K^+ ionty, které jsou nezbytné pro jejich aktivaci. Vysoká koncentrace K^+ iontů je také nezbytná pro vazbu tRNA na ribozom při proteosyntéze (Dajic, 2006).

2.2.2 Obranné mechanismy

Podle odolnosti k přítomnosti solí v prostředí lze rostliny rozdělit na glykofyty, které již při obsahu soli v půdě vyšším než 0,01 % vykazují zpomalení růstu a na halofyty, které jsou schopny v různé míře snášet obsah solí, především NaCl v půdě, někdy v poměrně vysokých koncentracích (až 20%) (Strogonov, 1964). Enzymatický aparát halofytů i glykofytů je velmi citlivý na přítomnost Na^+ iontů. Pro halofyty je nezbytné udržovat jejich nízkou koncentraci v cytoplazmě.

Hlavní mechanismy přizpůsobení rostlin pro růst v zasolených půdách jsou na úrovni anatomické, fyziologické i biochemické a lze je rozdělit do několika skupin (Dajic, 2006):

1. omezení příjmu iontů kořeny
2. omezení průniku iontů do fotosyntetických pletiv
3. aktivní vylučování iontů solnými vlásky a solnými žlázami
4. sukulence
5. sekvestrace iontů a jejich akumulace ve vakuole
6. biochemická přizpůsobení organel a makromolekul na vyšší obsah solí v buňce
7. akumulace kompatibilních solutů

Omezení vstupu iontů do rostliny závisí především na selektivitě kořenových buněk, přednostním nakládání K^+ před Na^+ do xylému a odstraňování iontů Na^+ z xylému v kořenech a stonku (Munns et al., 2002). Vstup iontů do rostliny je pasivní, hlavní bariérou pro jejich průnik do xylému je proto endodermis, která je u halofytních rostlin více suberinizována než u glykofytů. Část iontů proniklých do xylému může být odčerpávána zpět Na^+/H^+ antiportery na povrchu xylémových parenchymatických buněk. Bylo zjištěno, že rostliny s nízkou odolností k zasolení postrádají Na^+/H^+ transportéry na vakuolární membráně a nemohou tedy efektivně sekvestrovat Na^+ ionty, které se hromadí v cytoplazmě. Tyto rostliny pouze odvádějí Na^+ ionty zpět do kořenů, kde mohou být vyloučeny za účasti Na^+/H^+ antiporterů (Blumwald et al., 2000). Některé halofytní rostliny (*Aster tripolium*) regulují přísun solí do rostliny zavřením průduchů v přítomnosti vyšší koncentrace Na^+ iontů v apoplastu listů (Kerstiens et al., 2002). Také z tohoto důvodu se u halofytů vyskytuje především CAM a C4 typ fotosyntézy umožňující efektivní fixaci uhlíku i při zavřených průduších (Larcher, 1995). Dalším mechanismem je ukládání NaCl do starých listů, které následně odpadnou (Munns, 1993). U některých halofytních rostlin se vyvinuly specifické anatomické struktury pro vylučování solí. Do solných žlázek, které pokrývají epidermis celých nadzemních částí, jsou aktivně pumpovány ionty z palisádového parenchymu. Vedle iontových kanálů se u solných žlázek zřejmě uplatňuje i symplastický transport Cl^- (Echeverria, 2000). Jejich funkcí je odvést sůl na povrch rostliny, kde krystalizuje a může být následně smyta deštěm. Aktivní pumpování solí do omezené oblasti apoplastického prostoru vyvolává hromadný tok vody do této oblasti a rostliny spolu se solí ztrácí i velké množství vody. Solné žlázy jsou tak omezeny pouze na rostliny rostoucí v biotopech s dostatkem vody. Rostliny z aridnějších oblastí mají na povrchu epidermis solné vlásky, dvoubuněčné struktury, ve kterých se akumuluje sůl (Tester a Davenport, 2003).

Velké množství solí je u halofytních rostlin sekvestrováno do vakuoly, kde může jejich koncentrace dosahovat až 500 mM. U halofytních rostlin se se stárnutím zvyšuje obsah solí v pletivech. U mnoha z nich se proto vyvinula sukulence, díky které mohou přijmout velké množství vody a snížit tak vysokou koncentraci solí v rostlině (Dajic, 2006). Důležitým mechanismem, který rostlinám pomáhá omezit negativní dopady druhotného osmotického stresu a zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) vyvolaného zasolením, je syntéza kompatibilních solutů, o kterých bude pojednáno v samostatné kapitole (viz kapitola 2.6). Ke zvýšení obsahu neredukujících sacharidů vlivem zasolení dochází jak u glykofytních, tak i některých halofytních rostlin. Zvýšení celkového obsahu sacharidů bylo zaznamenáno u stonkových segmentů jabloně (*Malus domestica*) *in vitro* vystavených zasolení (Sotiropoulos, 2007). Ke zvýšení obsahu cukerných alkoholů dochází v listech jitrocele (*Plantago major*), celeru (*Apium graveolens*) nebo stonkových segmentech olivy (*Olea europaea*) (Pommerenig et al., 2007; Stoop a Pharr, 1994; Rejšková et al., 2007). K ochraně buněčných struktur napomáhá syntéza LEA proteinů a polyaminů (Tester a Davenport, 2003).

2.3 Chladový stres

Teplota je dalším faktorem výrazně ovlivňujícím rozšíření rostlin a pěstování zemědělských plodin. Citlivost rostlin k nízkým teplotám se liší podle podnebného pásu, ale také nadmořské výšky, ze které daná rostlina pochází. U tropických rostlin se projevují známky poškození chladem již v rozmezí 12-15°C, většina zemědělských plodin z mírného pásma snáší krátkodobé poklesy teplot k 0°C. Citlivost rostlin k nízkým teplotám se také liší v rámci vývojového stadia rostliny. Proces, při kterém se postupně přirozeně zvyšuje odolnost rostlin k teplotám pod bodem mrazu, se nazývá chladová aklimace. Signálem pro její navození je, především u dřevin, zkracování fotoperiody v kombinaci s nízkou teplotou nebo působení nízkých teplot kolem 5°C převažující u bylin (Welling et al., 1997; Beck et al., 2004).

2.3.1 Dopady nízkých teplot na rostlinu

Dopady stresu nízkých teplot na rostlinu jsou rozdílné podle toho, zda je rostlina vystavena působení teplot nad bodem mrazu v rozmezí 0-15°C, nebo pod bodem mrazu. Teploty vyšší než 0°C výrazně ovlivňují zejména funkci biologických membrán, u kterých dochází

k přechodu ze stavu tekuté mozaiky do stavu pevného gelu, kdy může dojít k nevratnému poškození membrány projevujícího se výtokem solutů z buňky. Hraniční teplota, při které dochází k tomuto přechodu je v přímé souvislosti s nasyceností řetězců mastných kyselin v molekulách fosfolipidů. Rostliny odolnější k nízkým teplotám mají vyšší podíl cis-nenasycených mastných kyselin v molekulách fosfolipidů než rostliny citlivé (Murata a Los, 1997). Působením nízkých teplot také klesá rychlost fotosyntézy. Se zpomalením některých reakcí, zejména fixace CO₂ a fotorespirace inhibicí Rubisca, klesá schopnost zpracovávat excitační energii, což má za následek oxidativní poškození fotosytému II při větší ozářenosti (Allen a Ort, 2001). Dochází také ke snížení syntézy sacharózy vedoucí k hromadění triózafosfátů v chloroplastu. To má za následek nedostatek ortofosfátu (Pi) nezbytného pro regeneraci ATP v chloroplastu (Allen a Ort, 2001). Vlivem nízkých teplot dochází také k ovlivnění aktivity některých dalších proteinů. Velmi citlivá je vakuolární ATPáza zprostředkovávající odčerpávání H⁺ iontů z cytoplazmy do vakuoly. Zatímco u odolných rostlin zůstává vakuolární ATPáza aktivní i za nízkých teplot, u méně odolných rostlin dochází k její inaktivaci a následnému snížení pH cytoplazmy (Yoshida et al., 1999). Při teplotách pod bodem mrazu se již mohou v buňkách vytvářet nukleační centra ledu a růst krystalů ledu uvnitř buněk vede k jejich nevratnému poškození. Krystaly ledu vznikající extracelulárně vyvolávají druhotný osmotický stres, a v buňkách se tak s odváděnou vodou zvyšuje koncentrace solutů.

2.3.2 Obranné mechanismy

U rostlin vystavených působení nízkých teplot dochází k akumulaci kompatibilních solutů, zejména sacharidů, glycinbetainu, prolinu, ale i některých proteinů (LEA), které fungují jako kryoprotektanty a osmotika pomáhající vyrovnat se s druhotným osmotickým stresem (Crowe et al., 1990; Bartels a Nelson, 1994; Kishitani et al., 1994). U některých rostlin, zejména obilovin byla zjištěna přítomnost tzv. anti-freeze proteinů v apoplastu, které mají schopnost vázat se na povrch vznikajících ledových krystalků a inhibovat jejich další růst (Moffatt et al., 2006).

Signalizační dráhy uplatňující se při chladovém stresu nejsou dosud detailně popsány. Je zřejmé, že významnou úlohu hraje MAPkinázová signalizace zprostředkovaná Ca²⁺ ionty, jejichž koncentrace v cytoplazmě výrazně vzrůstá při poklesu teploty. Transgenní rostliny se zvýšenou sekvestrací Ca²⁺ iontů do vakuoly jsou k nízkým teplotám velmi citlivé (Sung et al., 2003).

2.4 Osmotický stres

Osmotický stres vzniká nejen v důsledku nedostatku vody, ale je průvodním jevem předchozích dvou popsaných stresů, zasolení a nízkých teplot. Působením zmíněných stresorů dochází k podstatným změnám vodního potenciálu omezujícím dostupnost vody pro rostlinu. Odpověď rostliny na nedostatek vody závisí na stáří rostliny, vývojovém stadiu a může se lišit v rámci jednotlivých orgánů. V počáteční fázi dochází ke ztrátě turgoru a zastavení růstu nadzemní části, které napomáhá akumulaci solutů a osmotickému přizpůsobení rostliny. Kořeny pokračují v růstu, a rostlina tak může získat vodu z hlubších vrstev půdy. Při prohlubování vodního deficitu může dojít až k plazmolýze buněk. Následkem nedostatku vody může také docházet ke zvýšení koncentrace solutů a následnému narušení hydratačních obalů makromolekul. Vlivem vodního deficitu je také významně omezena fotosyntéza, při mírném vodním deficitu zejména zavřením průduchů, při silném stresu se již výrazně projevuje omezení aktivity fotosyntetických enzymů (Rubisco) (Lawlor a Cornic, 2002; Bota et al., 2004). Jednou z podstatných adaptací rostlin na nedostatek vody je akumulace kompatibilních solutů, zejména sacharidů, prolinu a glycinbetainu (Ramanjulu a Bartels, 2002). Významně se také zvyšuje produkce chaperonů a LEA proteinů zajišťujících stabilitu proteinů a membrán (Wang et al., 2004). Při omezené dostupnosti vody se také zvyšuje exprese akvaporinů usnadňujících buňkám zásobení vodou (Sarda et al., 1999). U některých rostlin dochází vlivem nedostatku vody, ale i zasolení k akumulaci polyaminů, jak bylo zjištěno u rýže (*Oryza sativa*), nebo *A. thaliana*. Polyaminy se uplatňují jako zhášeci ROS (Bartels a Sunkar, 2005). Velká část genů, jejichž produkty se podílejí na reakci při osmotickém stresu je aktivována kys. abscisovou (ABA), část z nich je aktivována alternativní drahou nezávislou na ABA.

2.5 Oxidativní stres

Produkce částečně redukovaných forem kyslíku (ROS) je nevyhnutelným průvodním jevem aerobního metabolismu všech živých organismů. Do této skupiny volných radikálů patří singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), superoxidový radikál (O_2^-), hydroxylový radikál (OH^\cdot) a peroxid vodíku (H_2O_2). K jejich produkci dochází při metabolických pochodech spojených s dýcháním a fotosyntézou (Couée et al., 2006). Za běžných podmínek je jejich produkce udržována na poměrně nízké úrovni, ta se však výrazně zvyšuje vlivem druhotného působení abiotických (nedostatek vody, nízké teploty, zasolení, nadměrná ozáření) i

biotických (napadení patogeny) stresových faktorů. Nadměrná produkce ROS v buňce může vést k peroxidaci fosfolipidů buněčných membrán, oxidaci proteinů, ale také poškození RNA a DNA (Mittler, 2002). Kyslíkové radikály jsou také součástí signálních drah aktivujících obranné mechanismy při stresové reakci (Knight a Knight, 2001). Minimalizace oxidativního poškození buněk se účastní některé enzymy (superoxiddismutáza, askorbátperoxidáza, glutathionperoxidáza, kataláza), kys. askorbová, glutathion a v neposlední řadě kompatibilní soluty. U mnoha kompatibilních solutů bylo experimentálně prokázáno, že se významně podílejí na zhášení volných radikálů *in situ*, přestože přesný reakční mechanismus není znám (Cuin a Shabala, 2007).

2.6 Kompatibilní soluty

Jednou z cest, jak se organizmy mohou bránit negativním dopadům abiotických stresových faktorů popsaných v předchozích kapitolách je akumulace kompatibilních solutů. Jedná se o heterogenní skupinu látek, které se mohou v buňce hromadit ve vysokých koncentracích, a přesto nenarušovat metabolické pochody v buňce (Nuccio et al., 1999; Hasegawa et al., 2000). Jejich molekuly jsou při běžném pH v cytoplazmě buňky elektroneutrální a vysoce rozpustné ve vodě. Mezi tyto látky zahrnujeme neredukující sacharidy včetně cukerných alkoholů, kvarterní amoniové sloučeniny (glycinbetain, prolinbetain), aminokyseliny (prolin) a terciární sulfoniové sloučeniny. Funkcí těchto látek je vedle osmotického přizpůsobení buněk při nedostatku vody, či nadměrné koncentraci solí v prostředí také stabilizace makromolekul (Rhodes a Hanson, 1993). To je umožněno vysokou hydroxylací molekul kompatibilních solutů, díky které se mohou vázat na buněčné povrchy a makromolekuly a stabilizovat tak jejich trojrozměrnou strukturu (Hasegawa et al., 2000). Některé kompatibilní soluty se také účastní zhášení volných kyslíkových radikálů (ROS), které vznikají druhotně při působení abiotických stresových faktorů (Cuin a Shabala, 2007).

2.6.1 Sacharóza

Tento disacharid je vůbec nejrozšířenějším sacharidem v rostlinné říši. Kromě vyšších rostlin se vyskytuje také u řas a některých sinic. K její syntéze dochází ve fotosynteticky aktivních pletivech, odkud je transportována, většinou s dalšími sacharidy, do sinkových pletiv, ve kterých slouží jako zdroj uhlíku a energie. Sacharóza je často ve velkém množství skladována jako zásobní sacharid v kořenech (cukrová řepa), stoncích (cukrová třtina) nebo

plodech. Sacharóza je také důležitou signální molekulou ovlivňující expresi některých genů důležitých pro buněčné dělení, diferenciaci a některé vývojové procesy (kvetení, diferenciaci cév) (Lunn a MacRae, 2003). V neposlední řadě se sacharóza uplatňuje při abiotickém stresu jako osmoprotektant, ale slouží také jako energetická rezerva pro rychlé obnovení metabolismu při zlepšení podmínek (Strand et al., 2003).

2.6.1.1 Syntéza sacharózy

Sacharóza je syntetizována v cytoplasmě z triózafosfátů transportovaných z chloroplastu. Z trióz je za účasti fruktóza-1,6-bisfosfátaldolázy syntetizován fruktóza-1,6-bisfosfát. Fruktóza-1,6-bisfosfát je následně defosforylován na fruktóza-6-fosfát. V následujícím kroku je z UDP-glukózy a fruktóza-6-P syntetizován sacharóza-6-P za katalýzy sacharózafosfátsyntázy (SPS). Tento enzym je alostericky aktivován glukóza-6-P a inhibován anorganickým fosfátem. Jeho aktivita je také ovlivňována fosforylací, která je řízena vnějšími faktory (osmotický stres, světlo) i vnitřními faktory (Lunn a MacRae, 2003). V následujícím kroku je odštěpen fosfát za účasti sacharózafosfátfosfatázy (SPP). Oba enzymy spolu zřejmě mohou vytvářet komplex (Lunn et al., 2000).

2.6.1.2 Sacharóza ve stresových reakcích

Vzhledem k přítomnosti sacharózy ve větší či menší míře u všech zástupců rostlinné říše, vyvinuly se u některých rostlin regulační mechanismy umožňující efektivní využití jejích osmotických a osmoprotektivních účinků při stresových reakcích. U rajčete (*Solanum lycopersicum* cv. Volgogradskij) byla prokázána přímá souvislost mezi odolností kultivaru k zasolení a obsahem sacharózy. Akumulace sacharózy byla zapříčiněna především posílením syntézy aktivací SPS vlivem zasolení (Khelil et al., 2007). U kultivarů třtiny (*Saccharum sp.*) odolných k nízkým teplotám byl zaznamenán 3,5 násobný nárůst obsahu sacharózy v listech po vystavení rostlin 10°C, zatímco u citlivých kultivarů se obsah sacharózy nezměnil (Du a Nose, 2002). Aktivace biosyntetické dráhy pro sacharózu je také podstatná pro navození odolnosti k mrazu u *A. thaliana*. Již 30 minut po vystavení rostlin *A. thaliana* 4°C byla posttranslačně aktivována SPS. Později došlo také ke zvýšení exprese SPS a fruktóza-1,6-bisfosfatázy (FBPázy) vedoucí k posílení syntézy sacharózy (Stitt a Hurry, 2002; Strand et al., 1999). Posttranslační aktivace SPS nízkými teplotami byla popsána i u semenáčků brukve (Sasaki et al., 2001). U mutantu *esk-1* odolného k mrazu byl

zjištěn větší nárůst obsahu celkových sacharidů a především sacharózy při chladové aklimaci než u méně odolného ekotypu *Ler* a mutantu *frs-1* citlivého k nízkým teplotám. Spolu s akumulací sacharidů došlo u tohoto mutantu ke snížení teploty, při které se začínají vytvářet nukleární centra ledu. Obsah sacharózy se zvýšil nejen v symplastu, ale i apoplastu. Právě apoplastická akumulace sacharózy byla výrazně vyšší u nejvíce odolných rostlin mutantu *esk-1* (Reyes-Díaz et al., 2008). Také transformované rostliny *A. thaliana* se zvýšenou expresí SPS vykazovaly vyšší odolnost k mrazu po chladové aklimaci. Takto transformované rostliny po aklimaci při 5°C bez problémů odolávaly -9°C, zatímco linie s potlačenou expresí SPS, nebo FBPazy přežívaly při nejnižší teplotě -5°C. U rostlin se zvýšenou expresí SPS také nedocházelo k výrazné inhibici fotosyntézy jako u ostatních linií, u kterých byl i obsah sacharózy v dospělých listech nižší (Strand et al., 2003).

2.6.1.3 Signalizační role sacharózy

Při stresových reakcích je sacharidům přisuzována především osmotická a osmoprotekční funkce, některé výsledky z poslední doby svědčí o jejich regulační úloze v navození odolnosti. Vlivem nízkých teplot dochází u mnoha rostlin k akumulaci rozpustných sacharidů a následné chladové aklimaci. U buněčných kultur ječmene (*Hordeum vulgare*) byla prokázána silná ovlivnění chladové aklimace koncentrací sacharózy v médiu, která se pohybovala od 1 do 30 g.l⁻¹. Při vyšších koncentracích sacharózy v médiu docházelo ke zvýšení exprese genu *dhn1* pro dehydrin u kultur pěstovaných při 25°C. Tento dehydrin je exprimován při chladové aklimaci. Takto ošetřené kultury vykazovaly odolnost k nízkým teplotám srovnatelnou s aklimatizovanými kulturami, které rovněž exprimovaly *dhn1*. Tento účinek je specifický pro sacharózu, při použití manitolu ke zvýšení chladové odolnosti nedošlo (Tabaei-Aghdaei et al., 2003). Podobných výsledků bylo dosaženo také rostlin *A. thaliana*, které přijímaly exogenní sacharózu z média s obsahem sacharózy 0-40 mM. U celistvých rostlin je pro navození odolnosti k chladu nezbytné světlo (Gray et al., 1997). Rostliny, kterým bylo exogenně dodáváno vyšší množství sacharózy byly odolnější k nízkým teplotám i při kultivaci ve tmě. Tyto rostliny měly také zvýšenou expresi genu *cor78* kódujícího LEA protein, který byl využit jako marker chladové aklimace. Bylo zjištěno, že tato reakce je specifická pro sacharózu. Tato regulace v přírodních podmínkách může rostlinám napomáhat při chladové aklimaci v podmínkách, kdy se střídá světelná perioda s chladnější temnotní periodou. Sacharóza akumulovaná během světelné fáze dne

přetrvávající v chladnější temnostní fázi zřejmě slouží jako signál, který ovlivňuje zvýšení odolnosti k nízkým teplotám (Rekarte-Cowie et al., 2008).

2.6.2 Trehalóza

Dalším zástupcem neredukujících sacharidů uplatňujících se při stresových reakcích u rostlin je trehalóza. Jedná se o disacharid skládající se ze dvou glukózových podjednotek (α -D-glucopyranosyl-1,1- α -D-glucopyranosid). Na rozdíl od sacharózy, která je specifická pouze pro rostlinnou říši a fotosyntetizující prokaryota, trehalóza se vyskytuje u prokaryot (bakterie) i eukaryot (rostliny, houby, bezobratlí) (Goddijn a Smeekens, 1998). Schopnost syntetizovat trehalózu je tak zřejmě evolučně mnohem starší, než je tomu u sacharózy. U těchto organismů se trehalóza uplatňuje při abiotickém stresu jako osmoprotektant, dále jako zásobní sacharid (houby), je i hlavním sacharidem hemolymfy u hmyzu (Elbein et al., 2003).

2.6.2.1 Metabolismus trehalózy

Syntéza trehalózy u rostlin probíhá ve 2 krocích. Nejprve z glukóza-6-fosfátu (G6P) a UDP-glukózy (UDPG) vzniká trehalóza-6-fosfát (T6P) za katalýzy trehalóza-6-fosfátsyntázy (TPS). Trehalóza-6-fosfát je následně defosforylován trehalóza-6-fosfátfosfatázou (TPP). U *A. thaliana* a *Oryza sativa* bylo nalezeno 9 různých genů pro TPS a TPP (Iordachescu a Imai, 2008). Obsah trehalózy je v rostlinách udržován na velmi nízké úrovni její pomalou syntézou a vysokou aktivitou trehalázy ve všech pletivech. Tento enzym trehalózu štěpí na dvě molekuly glukózy (Müller et al., 2001).

2.6.2.2 Trehalóza a stres

U rostlin byla trehalóza zjištěna poměrně nedávno nejprve u tzv. „rostlin vzkříšení“, které odolávají úplné desikaci pletiv. U těchto rostlin je v plně dehydratovaném stavu obsah trehalózy v pletivech poměrně vysoký. U vranečku *Selaginella lepidophylla* tvoří 10-12 % sušiny, u *Myrothamnus flabellifolius* a *Sporobolus stapfianus*, zástupců cévnatých rostlin tvoří trehalóza přibližně 3 % sušiny (Drennan et al., 1993; Bianchi et al., 1993; Moore et al., 2007). Až na těchto několik výjimek přítomnost trehalózy u vyšších rostlin dlouho unikala pozornosti vzhledem k její velmi nízké koncentraci v pletivech. U *Medicago sativa*

a *Oryza sativa* dochází k mírnému zvýšení obsahu trehalózy v kořenech po vystavení stresu zasolení, nicméně její obsah je stále příliš nízký na uplatnění osmoprotektivních účinků (Fougere et al., 1991; Garcia et al., 1997). Z korelace mezi hladinou T6P a indukcí některých genů účastnících se reakce na biotický i abiotický stres vyplývá, že úloha trehalózy a zejména T6P při stresových reakcích je spíše signalizační (Schluepman et al., 2004). Analýzou genové exprese u *A. thaliana* byly zaznamenány významné rozdíly v expresi enzymů pro syntézu trehalózy (TPS a TPP) při zasolení, chladovém i osmotickém stresu (Iordachescu a Imai, 2008).

Transformace pouze jedním genem buď pro TPS nebo TPP vedla ke zpomalenému růstu, žloutnutí listů a sterilitě rostlin (Goddijn et al., 1997; Pilon-Smits et al. 1998). U rýže transformované fúzním genem kódujícím TPS i TPP z *E.coli* se stresově inducibilním promotorem se žádné negativní dopady neprojeví. Transformované rostliny účinněji vylučovaly Na^+ v podmínkách zasolení, což vedlo k udržení poměru Na^+/K^+ srovnatelného s rostlinami, které nebyly stresu vystaveny. Tento poměr je klíčový pro navození odolnosti k zasolení. U netransformovaných rostlin byl tento poměr výrazně posunut ve prospěch Na^+ (Garg et al., 2002; Jang et al., 2003). Zvýšení odolnosti k nízkým teplotám, zasolení a nedostatku vody bylo dosaženo také u rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*) transformovaných *AtTPS* (Almeida et al., 2005). Rovněž vnesení genu pro TPS1 z *E. coli* do chloroplastů vedlo ke zvýšení odolnosti k nedostatku vody bez negativních dopadů produkce trehalózy u takto transformovaných rostlin. Transformované rostliny ochotně klíčily a rostly i v podmínkách silného osmotického stresu, zatímco u kontrolních rostlin došlo k zastavení růstu v časných fázích vývoje semenáčků, následně k rozpadu tylakoidů a ztrátě chlorofylu. V tomto případě trehalóza v chloroplastech zřejmě funguje jako osmoprotektant chránící tylakoidní membrány (Lee et al., 2003). Rovněž analýzou exprese nativních TPS a TPP u *A. thaliana* bylo prokázáno, že trehalóza hraje podstatnou roli při stresových reakcích. Ke změnám exprese většiny z 9 genů pro TPS a TPP došlo po vystavení rostlin chladu, osmotickému stresu, zasolení, nedostatku vody, oxidativnímu stresu, UV-B i vysokým teplotám. Přesný mechanismus působení trehalózy ve stresových reakcích u rostlin však zůstává otázkou (Iordachescu a Imai, 2008).

2.6.3 Fruktany

Fruktany jsou ve vodě rozpustné polymery fruktózy vyskytující se u některých druhů rostlin, zejména z čeledí *Poaceae*, *Liliaceae* a *Asteraceae*. U těchto rostlin se uplatňují jako

důležité zásobní sacharidy, ale také jako kompatibilní soluty (Spollen a Nelson, 1994; Pilon-Smits et al., 1999). Tyto sacharidy jsou syntetizovány ve vakuole ze sacharózy za účasti fruktosyltransferáz.

U rýže, která sama fruktany neprodukuje, bylo dosaženo zvýšení odolnosti k nízkým teplotám po transformaci 2 geny kódujícími fruktosyltransferázy z *Triticum aestivum*. U transformovaných rostlin bylo zaznamenáno zvýšení obsahu oligo- a polysacharidů, který se v dospělých listech pohyboval mezi 3,7-16,2 mg.g⁻¹. Kromě osmoprotektivní funkce, může akumulace fruktanů ve vakuole vedoucí ke zvýšení osmotického tlaku působit jako signál vedoucí k indukci genů podléjících se na stresové reakci (Kawakami et al., 2008). U několika dalších rostlin *Beta vulgaris* (Pilon-Smits et al., 1999), *Trifolium repens* (Jenkins et al., 2002) bylo dosaženo zvýšení odolnosti k nedostatku vody po transformaci geny pro fruktosyltransferázy.

2.6.4 Cukerné alkoholy

Významnou skupinou sacharidů využívaných mnoha rostlinami ve stresových reakcích jsou cukerné alkoholy. Cukerné alkoholy (polyoly) jsou redukované formy aldóz, nebo ketóz. Jejich uhlíkatý řetězec může být lineární (acyklické polyoly neboli alditoly), nebo cyklický (cyklické polyoly neboli cyklitoly). Cukerné alkoholy jsou běžnými sacharidy u mnoha prokaryot i eukaryot. Bylo vypočítáno, že přibližně 30 % veškerého uhlíku fixovaného rostlinami tvoří právě cukerné alkoholy (Bieleski, 1982). Nejrozšířenějším je manitol, který byl zjištěn u více než 100 rostlinných druhů, zejména z čeledí *Rubiaceae* (kávovník), *Oleaceae* (ptačí zob, jasan, oliva) a *Apiaceae* (celer, mrkev, petržel). Vyskytuje se i u některých parazitických rostlin (*Orobanchae*, *Striga*, *Thesium*) (Robert et al., 1999; Simier et al., 1998). Dalšími jsou sorbitol, o kterém bude pojednáno v samostatné kapitole, a z této trojice nejméně běžný galaktitol známý u čeledí *Celestraceae* a *Scrophulariaceae*. U výše zmíněných rostlin jsou polyoly, spolu se sacharózou primárními produkty fotosyntézy. Vedle zdroje energie a uhlíkatých skeletů se polyoly také uplatňují jako kompatibilní soluty. Díky vysoké hydroxylaci molekuly se mohou efektivně vázat na povrchy membrán a proteinů, a nahrazovat tak hydratační obaly za nedostatku vody. Metabolismus cukerných alkoholů je také výhodnější z energetického hlediska – při jejich rozkladu se uvolňuje větší množství ATP než při rozkladu stejného množství sacharózy.

2.6.4.1 Sorbitol

Sorbitol (D-glucitol) je po manitolu druhým nejrozšířenějším cukerným alkoholem u vyšších rostlin. Tento šestiuhlíkatý polyol je důležitým transportním sacharidem u čeledi *Rosaceae*, zahrnující hospodářsky významné ovocné dřeviny – jabloň (*Malus*), hrušeň (*Pyrus*), broskvoň (*Prunus*), třešeň (*Prunus*), a *Plantaginaceae* (*Plantago*) (Loescher, 1987).

U rostlin produkujících tento cukerný alkohol je sorbitol mnohdy převažujícím transportním sacharidem. Bylo zjištěno, že u jabloně tvoří 65-70 % celkového obsahu sacharidů transportovaných floémem (Klages et al, 2001).

2.6.4.1.1 Syntéza sorbitolu

Nejvíce poznatků o biosyntéze sorbitolu pochází ze studia metabolismu tohoto cukerného alkoholu u jabloně. Prekurzorem pro syntézu sorbitolu je, podobně jako u sacharózy glukóza-6-fosfát (G6P). Glukóza-6-fosfát vzniká izomerací fruktóza-6-fosfátu (F6P) za účasti cytosolické fosfoglukoizomerázy (PGI). Vlastní syntéza sorbitolu potom probíhá ve dvou krocích. G6P je nejprve přeměněn na sorbitol-6-fosfát (S6P) za katalýzy NADPH-dependentní aldóza-6-fosfátreduktázy (A6PR) (Negm a Loescher, 1981, Zhou et al., 2003). V následujícím kroku je S6P defosforylován sorbitol-6-fosfátfosfatázou (S6PP) za vzniku sorbitolu. Bylo zjištěno, že pro aktivitu S6PP je nezbytná přítomnost Mg^{2+} (Zhou et al., 2003). Přítomnost Mg^{2+} také zvyšuje afinitu A6PR ke G6P (Negm a Loescher, 1981). Z experimentů *in vitro* s izolovanou cytosolickou PGI vyplývá, že S6P je silným kompetitivním inhibítorem tohoto enzymu. Vzhledem k velké míře konzervovanosti PGI u různých druhů rostlin autoři předpokládají, že tento enzym může hrát důležitou roli v rozdělování uhlíku mezi sacharózu a sorbitol. Syntéza sacharózy u sorbitol produkujících rostlin tak může být zpětně ovlivňována produkcí S6P (Zhou a Cheng, 2008). Syntéza sorbitolu probíhá, podobně jako u manitolu, v dospělých listech, odkud je tento cukerný alkohol transportován do sinkových pletiv. Analýzy intracelulárního rozdělení sorbitolu u mezofylových buněk jitrocele (*Plantago major*, *P. maritima*) a broskvoně (*Prunus persica*) ukazují, že většina celkového obsahu sorbitolu je ve vakuole (50-90 %), kam je zřejmě aktivně transportován z cytosolu. Nejvyšší koncentrace tohoto polyolu však byla zjištěna ve stromatu chloroplastů. Jestli zde dochází k přímé syntéze sorbitolu, nebo je do tohoto

kompartmentu aktivně transportován z cytosolu zůstává otázkou. Sorbitol se ve stromatu chloroplastů zřejmě uplatňuje při osmoregulaci (Nadwodnik a Lohaus, 2008).

2.6.4.1.2 Transport sorbitolu

Přestože sorbitol často tvoří významný podíl transportních sacharidů u sorbitol-produkujících druhů rostlin, o mechanismech jeho transportu ze zdrojových listů do sinkových pletiv bylo donedávna známo minimum informací. Teprve v posledních letech byly charakterizovány transportéry, které se účastní nakládání sorbitolu do floému ve zdrojových listech a jeho následného vykládání v sinkových orgánech. U většiny růžovitých dřevin (*Rosaceae*) se vyskytuje přechodný typ floému s převládajícím symplastickým plněním floému, což bylo zatím prokázáno u broskvoně (*Prunus*) a jabloně (*Malus*) (Gamalei, 1989; Moing et al., 1997, Reidel et al., 2009).

U jabloně (*Malus domestica* Borkh cv. Fuji) byly identifikovány 3 transportéry - MdSOT3, MdSOT4 a MdSOT5, které se účastní nakládání sorbitolu do floému. Tyto transportéry jsou přítomny ve velkém množství ve floému nejmenších žilek zdrojových listů. Úloha MdSOT4 je nejasná, vzhledem k velmi nízkému transportu sorbitolu u kvasinek transformovaných genem pro tento přenašeč. Přenašeče MdSOT3 a MdSOT5 se významně liší svojí afinitou k sorbitolu, což by umožňovalo efektivní regulaci nakládání floému při různých koncentracích sorbitolu (Watari et al., 2004). Zůstává však otázkou, do jaké míry se tyto transportéry účastní nakládání floému. Reidel et al. (2009) vzhledem k mnohem vyššímu obsahu sorbitolu v mezofylu, než je tomu u druhů rostlin s apoplastickým nakládáním floému předpokládá, že sorbitol je u jabloně nakládán především symplastickou cestou a transportéry se zřejmě účastní pouze navrácení uniklého sorbitolu z apoplastu zpět do floému (Reidel et al., 2009). U jitrocele (*Plantago*), jako zástupce bylinných sorbitol-produkujících rostlin je situace odlišná. Vyskytuje se zde uzavřený typ floému s minimem plazmodezmatických spojení mezofylu s průvodními buňkami, tedy s převažujícím apoplastickým nakládáním floému (Gamalei, 1989; Nadwodnik a Lohaus, 2008). U jitrocele byly charakterizovány 2 transportéry pro sorbitol, PmPLT1 a PmPLT2. Jedná se o H⁺ symportéry s poměrně nízkou specifitou (jsou schopny transportovat i manitol) a nízkou afinitou k sorbitolu v porovnání s transportéry u jabloně, což by napovídalo rozdílnému mechanismu nakládání floému u těchto rostlin (Watari et al., 2004). Tyto transportéry jsou lokalizovány v průvodních buňkách sítkovic zdrojových listů, kde

spolu s transportéry pro sacharózu zprostředkovávají nakládání floému těmito sacharidy. Analýzou floémových exudátů jitrocele bylo zjištěno, že obsah sacharózy ve floému přibližně 4krát převyšuje obsah sorbitolu. Při vystavení rostlin zasolení tento poměr klesá na polovinu ve prospěch sorbitolu (Pommerrenig et al., 2007).

Poměrně málo informací je známo o mechanismech transportu sorbitolu z floému do sinkových pletiv. U višně (*Prunus cerasus* L. cv. Montmorency) bylo zjištěno, že sorbitol při vykládání z floému přechází do apoplastu, odkud je aktivně transportován zpět to symplastu. Z plodů višně, kde dochází k výrazné akumulaci sorbitolu během zrání byl izolován transportér sorbitolu PcSOT1, jehož stoupající hladina koreluje se zvyšujícím se obsahem sorbitolu. Výrazná exprese genu *PcSOT1* byla zaznamenána i ve vyvíjejících se listech. Ta se s dospíváním listu postupně snižuje. Druhý popsany transportér sorbitolu PcSOT2 se uplatňuje pouze v raném stadiu vývoje plodu. Oba tyto transportéry jsou H⁺ symportéry s vysokou specifitou pro sorbitol (Gao et al., 2003). Výše zmíněné transportéry MdsOT4 a MdsOT5 se zřejmě také účastní transportu sorbitolu do sinkových pletiv u jabloně. *MdsOT4* i *MdsOT5* se silně exprimují v květech, které jsou významným sinkovým orgánem. Vysoká exprese *MdsOT5* byla zaznamenána v dormantních pupenech jabloně, kde může akumulovaný sorbitol sloužit jako ochrana před chladovým stresem. Watari et al. (2004) usuzují, že se oba tyto transportéry mohou uplatňovat v raných stádiích vývoje listu, kdy se účastní transportu sorbitolu do mladých listů, jako sinkového orgánu, později dochází k utlumení jejich exprese, která se následně opět zvyšuje v souvislosti s dospíváním listu. To by mohlo souviset s postupnou přeměnou listu v čase ze sinkového na zdrojový orgán, kde se tyto transportéry účastní importu sorbitolu do vyvíjejících se listů, tak následně i jeho exportu z dospělých listů (Watari et al., 2004). Reidel et al. (2009) však apoplastickou cestu nakládání sorbitolu do floému u jabloně zpochybňují.

U prorůstajících vegetativních pupenů broskvoně (*Prunus persica* L. Batsch cv. Redhaven) bylo zjištěno, že při ošetření exogenními hexózy (glukózou a fruktózou) je import sorbitolu do tohoto silného sinku inhibován na membránové úrovni, zřejmě posttranslační regulací přenašeče. Experimenty se substrátovými analogy hexokinázy naznačují, že tato selektivní inhibice je zprostředkována hexokinázovou signální dráhou (Maurel et al., 2004). Nedávno byly u *Arabidopsis thaliana* identifikovány geny s vysokou mírou podobnosti s transportéry sorbitolu i manitolu, přestože využívá jako transportní sacharidy pouze sacharózu a v malém množství rafinózu. Analýzou produktu jednoho z těchto genů, *AtPLT5*, bylo zjištěno, že se jedná o transportér schopný přenášet široké spektrum polyolů,

cyklitolů i některých monosacharidů. Tento gen je exprimován v malém množství v celé rostlině, jeho funkce je však nejasná (Klepek et al., 2005).

2.6.4.1.3 Metabolismus sorbitolu v sinku

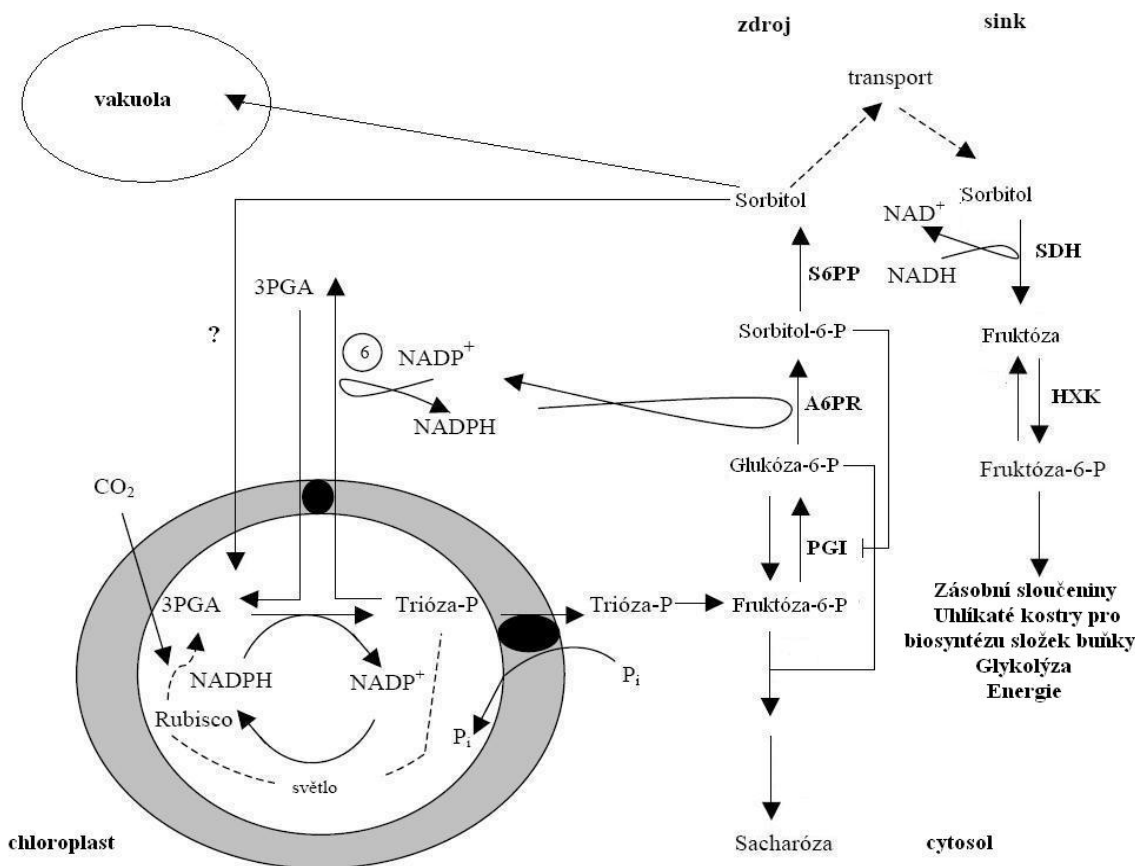
Klíčovým enzymem pro utilizaci sorbitolu je NAD-dependentní sorbitoldehydrogenáza (SDH) katalyzující přeměnu sorbitolu na fruktózu (Negm a Loescher, 1979). Druhou cestou, jakou může být sorbitol metabolizován je jeho přeměna na glukózu za katalýzy sorbitoloxidázy (SOX). Tento enzym, narozdíl od SDH nevyžaduje přítomnost NAD jako kofaktoru. Jeho aktivita v rostlinných pletivech je však velmi nízká, a předpokládá se, že v metabolismu sorbitolu se tento enzym významněji neuplatňuje (Yamaki, 1980; Loescher a Everard, 1996). SDH je vysoce aktivní v sinkových pletivech, jako jsou vyvíjející se listy, apex, kořeny nebo vyvíjející se plody (Loescher et al., 1982; Merlo a Passera, 1991; Archbold et al., 2004; McQueen a Minchin, 2005). Je lokalizována v cytoplasmě, vakuole, ale i ve stromatu chloroplastů. Vzhledem k přítomnosti vysoké koncentrace sorbitolu ve stromatu chloroplastů a jeho nespornému příspěvku k osmotickému potenciálu této organely můžeme usuzovat na podíl SDH při osmoregulaci chloroplastů. Sorbitoldehydrogenáza se v této organelle může podílet na regulaci syntézy škrobu přeměnou sorbitolu na fruktózu (Wang et al., 2009).

Aktivitu SDH ovlivňuje řada vnějších i vnitřních faktorů. K výrazným změnám aktivity tohoto enzymu dochází při přeměně sinku ve zdroj u listů. V počátečním stadiu vývoje listu jabloně (*Malus domestica*) je SDH vysoce aktivní. S postupujícím vývojem listu a zvyšující se fotosyntetickou produkcí se aktivita SDH utlumuje, naopak narůstá aktivita A6PR a list se stává zdrojovým. Na podzim kdy dochází k poklesu fotosyntetické produkce aktivita A6PR klesá, zároveň opět narůstá aktivita SDH až do opadu listu, umožňující štěpení akumulovaného sorbitolu na fruktózu (Loescher et al., 1982). Bylo zjištěno, že SDH je ve vakuolách mezofylových buněk přítomna v elektrondenčních granulích, které jsou považovány za zásobní proteiny. Uvolnění SDH z těchto granulí je zřejmě zodpovědné za nárůst aktivity SDH na podzim při senescenci listu (Wang et al., 2009). Vzájemná regulace metabolismu sacharózy a sorbitolu byla zkoumána u transgenní jabloně (*Malus domestica*) s potlačenou expresí A6PR, tedy sníženou syntézou sorbitolu. U těchto rostlin došlo ke snížení aktivity SDH v sinkových listech a zároveň zvýšení aktivity SuSy. Po exogenním dodání sorbitolu se aktivita SDH zvýšila, což ukazuje na regulaci exprese a aktivity tohoto enzymu dostupností substrátu. Exogenní ošetření sacharózou naopak vedlo k potlačení

aktivitu SDH a transkripce příslušného genu. To ukazuje na vzájemné propojení obou metabolických drah pro využití sorbitolu a sacharózy (Loescher et al., 1982; Merlo a Passera, 1991; Zhou et al., 2006). Přítomnost dvou metabolických systémů a jejich vzájemná regulace u rostlin produkujících cukerné alkoholy s sebou přináší vyšší plasticitu v zajištění stálého přísunu sacharidů do sinků (Zhou et al., 2006).

2.6.4.1.4 Regulace transportu a metabolismu sorbitolu v reakci na stres

Sorbitol se podobně jako manitol také uplatňuje při reakcích na abiotický stres. U jitrocele (*Plantago major*) došlo při ošetření 400 mM NaCl ke zvýšení exprese genů *PmPLT1* i *PmPLT2* kódujících transportéry pro sorbitol v izolovaných cévních svazcích. Zvýšení hladiny mRNA *PmPLT2* bylo zaznamenáno již 2 hodiny po ošetření, pro *PmPLT1* to bylo 6 hodin. Hladina obou transkriptů zůstává zvýšená po celou dobu působení stresoru. Vzhledem k rychlejšímu a výraznějšímu nástupu exprese *PmPLT2* lze usuzovat na podstatnější účast tohoto transportéru na zvýšeném nakládání sorbitolu do floému při zasolení. Následně dochází ke snížení exprese *PmSUC2*, genu pro transportér sacharózy. Dochází také ke snížení aktivity *PmSDH1*, klíčového enzymu pro využití sorbitolu. Tyto změny následně vedou ke zvýšení koncentrace sorbitolu v mezofylu i floému. Vzrůstá také vzájemný poměr sorbitolu a sacharózy ve floému z 20 % sorbitolu u kontrolních rostlin až na 40 % u rostlin vystavených stresu. To je způsobeno přednostním nakládáním sorbitolu do floému vlivem zvýšení exprese genů kódujících transportéry *PmPLT1* a *PmPLT2* v průvodních buňkách sítkovic (Pommerrenig et al., 2007). U dospělých listů rostlin jabloně vystavených nedostatku vody dochází k nárůstu obsahu sorbitolu, zatímco obsah sacharózy zůstává nezměněn (Šircelj et al., 2005). Nárůst obsahu sorbitolu v dospělých listech může být zapříčiněn poklesem aktivity SDH v sinkových listech. U rostlin broskvoně vystavených nedostatku vody dochází k poklesu aktivity SDH v sinkových listech vedoucí k následné akumulaci sorbitolu. Dochází také k omezení transportu sorbitolu ze zdrojových listů a poklesu aktivity *S6PDH*. Sorbitol se následně akumuluje v sinkových i zdrojových listech a účastní se tak osmotického přizpůsobení (Lo Bianco et al., 2000).



Obr. 2.1: Schéma syntézy, transportu a katabolizmu sorbitolu v rostlinách: 6 – nereversibilní triózafosfátdehydrogenáza, 3PGA – 3-fosfoglycerinaldehyd, PGI – fosfogluoizomeráza, A6PR – aldóza-6-fosfátreduktáza, S6PP – sorbitol-6-fosfátfosfatáza, SDH – sorbitoldehydrogenáza, HXK – hexokináza. Upraveno dle Stoop et al. (1996).

Meng et al. (2008) prokázali, že v reakci na abiotický stres u jabloně vedoucí k akumulaci sorbitolu při stresu se uplatňuje signální dráha kys. abscisové. Experimenty s celistvými rostlinami i oddělenými listy ukázaly, že jak samotné exogenní ošetření kys. abscisovou (ABA), tak i ošetření kys. abscisovou kombinované s osmotickým stresem (20% PEG v kultivačním médiu) vyvolává akumulaci sorbitolu. To je zřejmě zapříčiněno posílením syntézy sorbitolu. Měřením enzymové aktivity bylo zaznamenáno zvýšení aktivit S6PDH i S6PP, s maximem u kombinovaného ošetření exogenní ABA a PEGem. Dále bylo zjištěno posílení transportu sorbitolu floémem a snížení aktivity SDH v kořenech vedoucí k jeho akumulaci v tomto orgánu (Meng et al., 2008).

2.6.4.1.5 Syntéza sorbitolu u transgenních rostlin

Pro protektivní účinky sorbitolu jako kompatibilního solutu byla zkoumána možnost jeho využití v produkci plodin se zvýšenou odolností ke stresu. U rostlin tabáku, s vneseným genem pro S6PDH (A6PR) se vedle zvýšení odolnosti k zasolení a nedostatku vody projevíly i negativní dopady produkce sorbitolu. Rostliny, které akumulovaly sorbitol v listech v rozmezí 2-3 $\mu\text{mol/g}$ čerstvé hmotnosti se fenotypově nelišily od kontrolních. Se vzrůstající koncentrací sorbitolu se však objevily chlorotické leze na listech a bylo zaznamenáno zpomalení růstu. Rostliny s obsahem sorbitolu mezi 15-20 $\mu\text{g/g}$ čerstvé hmotnosti již byly sterilní a měly zhoršené regenerační schopnosti (Sheveleva et al., 1998).

U tomelu (*Diospyros kaki* Thunb.) transformovaného genem pro S6PDH (A6PR) byl obsah sorbitolu desetkrát vyšší než u tabáku transformovaného tímto genem. Rostliny s vyšší produkcí sorbitolu vykazovaly vyšší toleranci k zasolení (měřenou jako aktivita fotosystému II). Vyšší produkce sorbitolu u transformovaných rostlin byla však spojena se zhoršeným růstem a zkrácením internodií (Gao et al., 2001). Výše zmíněné negativní dopady produkce sorbitolu u transgenních rostlin, které samy sorbitol nesyntetizují, mohou být způsobeny inhibicí aktivity PGI vlivem akumulace S6P. To je způsobeno nepřítomností specifické S6PP (Zhou et al., 2003). Následkem je snížení dostupnosti G6P (Zhou a Cheng, 2008). Dalším možným vysvětlením je vzrůstající koncentrace sorbitolu v cytoplazmě, protože tyto rostliny postrádají transportní systém pro ukládání sorbitolu do vakuoly. Ten se tak hromadí v cytoplazmě a osmotická nerovnováha cytoplazmy a vakuoly může mít na rostlinu výše zmíněné negativní dopady (Deguchi et al., 2004).

U rostlin tabáku transformovaných binárním vektorem, nesoucím gen pro S6PDH i SDH ke zpomalení růstu ani tvorbě lézí nedocházelo. Možnou příčinou je zachování hladiny myo-inositolu, jehož obsah je u rostlin tabáku transformovaných pouze genem pro S6PDH nižší, vzhledem k nižšímu obsahu G6P jako prekurzoru pro syntézu myo-inositolu. Jejich společným prekurzorem je G6P. Vnesením dalšího metabolického sinku odčerpávajícího G6P tedy může dojít k narušení signálních kaskád závislých na inositol-1,4,5-trifosfátu (IP3) Tomu by nasvědčovala nepřítomnost lézí u rostlin transformovaných pouze genem pro S6PDH po exogenním ošetření myo-inositolem (Sheveleva et al., 1998). Dalším rysem těchto rostlin byl paradoxně vyšší obsah sacharózy v sinkových pletivech vlivem snížené aktivity SuSy inhibované zvýšeným obsahem fruktózy vznikající degradací sorbitolu. Vnesení celého metabolického aparátu jak pro syntézu, tak i degradaci sorbitolu

představuje účinný nástroj, jak využít protektivních účinků sorbitolu při působení stresu s potlačením negativních účinků na růst a produkci rostlin (Deguchi et al., 2006).

2.6.4.2 Proč se polyoly vyskytují u rostlin, u kterých nejsou primárními produkty fotosyntézy?

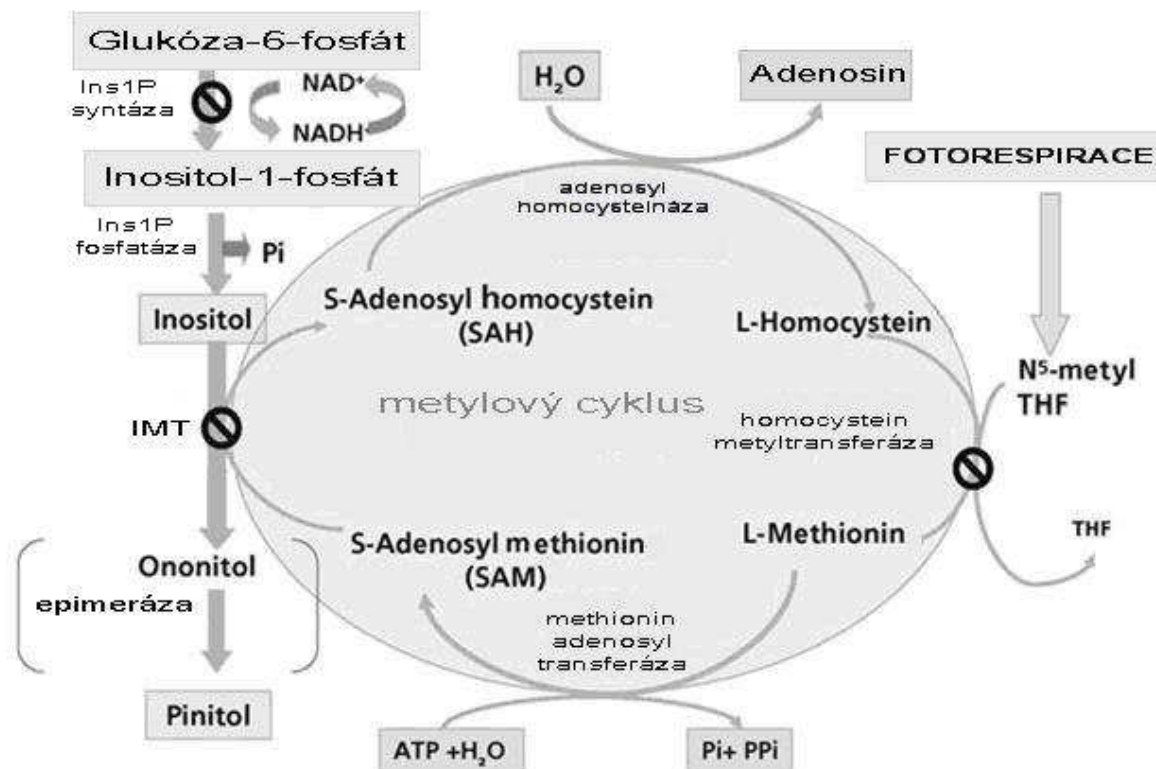
Přestože se do nedávné doby předpokládalo, že schopnost syntetizovat sorbitol je specifická pouze pro úzký okruh rostlin z čeledí *Rosaceae* a *Plantaginaceae* a přítomnost tohoto cukerného alkoholu u jiných rostlin byla považována pouze za výjimku, současné výsledky naznačují, že biosyntéza sorbitolu je zřejmě mnohem rozšířenějším jevem. Sekvence podobné genům pro SDH byly nalezeny v genomech rostlin z různých čeledí jednoděložných, dvouděložných, ale i nahosemenných rostlin, které sorbitol nesyntetizují jako primární fotosyntetický produkt (Ohta et al., 2005). Ohta et al. (2005) popsali přítomnost sekvence pro SDH v genomu rajčete (*Lycopersicon esculentum*) a enzymaticky charakterizovali izolovaný protein jako NAD dependentní SDH (Ohta et al., 2005). Roessner-Tunali et al. (2003) u rajčete detekovali přítomnost malého množství sorbitolu. Jednou z možných funkcí SDH u rajčete je odbourávání arabitolu, který může také sloužit jako substrát SDH. Arabitol se v rostlině akumuluje při infekci houbovými patogeny, které tento polyol produkují jako osmotikum důležité pro příjem vody z hostitelské rostliny (Clark et al., 2003). Podobně u rostlin bobu (*Vicia faba*) infikovaného houbovými patogeny dochází k akumulaci arabitolu a manitolu, které se účastní zhášení ROS produkovaných rostlinou při obranné reakci (Link et al., 2005). Důležitost polyolů v interakcích rostlina-patogen byla potvrzena u rostlin tabáku s vneseným genem pro celerovou manitoldehydrogenázu, které vykazovaly vyšší odolnost k houbovým chorobám (Jennings et al., 2002). U rýže (*Oryza sativa*) byl identifikován další enzym účastnící se syntézy sorbitolu, A6PR. Bylo zjištěno, že v semenech a zejména embryích dochází k výrazné akumulaci tohoto enzymu v průběhu dozrávání, s maximem v desikační fázi. Dynamika nárůstu obsahu A6PR zde sledovala průběh akumulace ABA. Během klíčení A6PR zcela vymizela. Tento enzym byl také detekován v menším množství ve stoncích dospělých rostlin. Obsah A6PR v pletivech zde významně stoupl po vystavení rostlin osmotickému stresu, zasolení a ošetření ABA. Jistě stojí za povšimnutí, že tento nárůst byl zaznamenán pouze u kultivarů s vyšší odolností k nedostatku vody, zatímco u citlivých kultivarů zůstal obsah enzymu na velmi nízké úrovni. Přítomnost A6PR ve zralých semenech byla zaznamenána také u dalších zkoumaných hospodářsky významných

zástupců čeledi *Poaceae* (kukuřice, pšenice, ječmen, oves, čirok). Stresem zapříčiněná akumulace A6PR v prýtu však byla zjištěna pouze u rýže (Karuna et al., 2000).

Přesná funkce cukerných alkoholů u rostlin, které tyto látky neprodukují jako primární fotosyntetické produkty, ale do nichž byly vneseny geny pro jejich syntézu také není zcela zřejmá. U mnoha těchto transgenních rostlin se projevují abnormality růstu a vývoje, např. zpomalení růstu, žloutnutí, stáčení listů, sterilita (Sheveleva et al., 1998; Abebe et al., 2003; Deguchi et al., 2004). Tyto negativní dopady lze omezit vnesením genů jak pro syntézu tak i degradaci příslušného cukerného alkoholu (Deguchi et al., 2006). Takto transformované rostliny vykazují zvýšení odolnosti k některým stresovým faktorům, které vzhledem k poměrně nízkému obsahu polyolů v pletivech nelze připisovat osmotickému přizpůsobení buněk (Abebe et al., 2003; Chiang et al., 2005).

2.6.4.3 Cyklické cukerné alkoholy

Druhou skupinou cukerných alkoholů jsou cyklické cukerné alkoholy, neboli cyklitolů. Nejjednodušším cyklickým hexitolem, který je běžnou součástí buněk všech živých organismů je myo-inositol. Fosfatidylinositol je významným strukturním fosfolipidem buněčných membrán, inositolfosfáty jsou důležitou složkou signálních kaskád. Volný inositol a především jeho metylované deriváty D-ononitol a D-pinitol mají zejména u některých halofytních rostlin funkci kompatibilních solutů (Paul a Cockburn, 1989; Sheveleva et al., 1997). Metabolismus těchto cyklitolů je nejlépe prozkoumán u *Mesembryanthemum crystallinum*. Syntéza cyklitolů je také úzce spojena se syntézou dalších sacharidů. Z myo-inositolu a UDP-galaktózy vzniká galaktinol, donor galaktózy při syntéze dalších, z hlediska stresové odpovědi významných sacharidů a sice RFO (viz kapitola 2.6.5).



Obr. 2.2: Schéma syntézy myo-inositolu, ononitolu a pinitolu a přídružený metylový cyklus. IMT – O-metyltransferáza, THF – tetrahydrofolát. Upraveno dle Sengupta et al. (2008).

2.6.4.3.1 Syntéza cyklitolů

Prvním krokem biosyntézy myo-inositolu je přeměna G6P na myo-inositol-1-P (Ins1P) katalyzovaná myo-inositol-1-P syntázou (Ins1P syntázou). Následně je odštěpen fosfát za účasti monofosfatázy (Ins1P fosfatázy) a vzniká myo-inositol. U některých rostlin může být myo-inositol metylován na D-ononitol za účasti O-metyltransferázy (IMT). Tento enzym využívá jako donor metylové skupiny S-adenosylmethionin. Ten může být následně epimerizován na pinitol (Loewus a Murthy, 2000; Sengupta et al., 2008).

2.6.4.3.2 Změny metabolismu cyklitolů při stresu

Bylo prokázáno, že také cyklitoly jsou některými rostlinami využívány jako kompatibilní soluty. Podobně jako v případě metabolismu byly osmoprotektivní funkce cyklitolů poprvé prokázány u *Mesembryanthemum crystallinum*. U tohoto fakultativního halofytu dochází při nedostatku vody nebo v přítomnosti NaCl v půdě ke zvýšení exprese IMT a následně akumulaci ononitolu a pinitolu, které mohou tvořit až 2/3 celkového obsahu sacharidů (Paul a Cockburn, 1989; Vernon a Bohnert, 1992; Agarie et al., 2009). Také u

divoké halofytní rýže *Porteresia coarctata* dochází při zasolení ke zvýšení exprese genů pro Ins1P syntázu i IMT a následnému zvýšení obsahu pinitolu z $3,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ na $30 \mu\text{mol.g}^{-1}$. Vlivem zasolení dochází také ke zvýšení fotorespirace, vedoucí k vyšší produkci S-adenosylmethioninu (SAM) a posílení syntézy pinitolu (viz obr.) (Sengupta et al., 2008). U *Eucalyptus astringens* je důležitým kompatibilním solutem další zástupce metylovaných derivátů myo-inositolu, quebrachitol. Jeho obsah v listech stromů rostoucích v podmínkách silného vodního stresu je výrazně vyšší (5 % sušiny) než u stromů v lesním porostu (2 % sušiny), které vodnímu stresu vystaveny nebyly. V obou případech zůstal obsah quebrachitolu stabilní v průběhu celého roku. V zimních měsících se tak quebrachitol zřejmě uplatňuje také jako kryoprotektant (Arndt et al., 2008). Porovnáním 13 druhů rodu *Eucalyptus* bylo zjištěno, že druhy z aridních oblastí využívají k osmotickému přizpůsobení quebrachitol, zatímco ty z vlhčích oblastí při náhlém nedostatku vody akumulují sacharózu, která může být po pominutí vodního stresu rychle metabolizována. U druhů z aridních oblastí je quebrachitol stabilním metabolitem, který rostlinami není primárně využíván jako zdroj uhlíku a energie, ale slouží především k osmotickému přizpůsobení buněk (Merchant et al., 2006; Arndt et al., 2008).

2.6.5 Sacharidy rafinózové řady

Poslední skupinou sacharidů ve funkci kompatibilních solutů, o kterých bude v tomto přehledu pojednáno, jsou sacharidy rafinózové řady (RFO). Většina rostlin je schopna produkovat sacharidy rafinózové řady (RFO) alespoň v nějaké fázi svého vývoje. Některé rostliny RFO využívají jako významné transportní a zásobní sacharidy (Keller a Pharr, 1996).

Chemicky jsou sacharidy rafinózové řady odvozeny od molekuly sacharózy, na kterou jsou připojeny galaktosylové zbytky α -1,6-glykosidickou vazbou. Jsou syntetizovány v dospělých listech, i sinkových pletivech, jako jsou např. kořeny a hlízy. Sacharidy rafinózové řady se svými chemickými vlastnostmi podobají sacharóze. Jsou to neredukující sacharidy, dobře rozpustné ve vodě. Rostliny využívající RFO jako transportní sacharidy pocházejí zejména z čeledí *Cucurbitaceae*, *Lamiaceae*, *Oleaceae* a *Scrophulariaceae* (Keller a Pharr, 1996). RFO jsou také významné transportní sacharidy některých dřevin. Ve floémové šťávě jabloně (*Malus pumila*) je rafinóza (0,45%) po sorbitolu (9 %) a sacharóze (6 %) sacharidem s třetí nejvyšší koncentrací (Kollar a Seemüller, 1990). Některé rostliny skladují RFO ve vysokých koncentracích (25-80 % hmotnosti sušiny) ve hlízách (*Stachys*

sieboldii), semenech (soja), nebo přímo v listovém mezofylu (*Ajuga reptans*). Kromě zásobní a transportní funkce se RFO uplatňují také jako kompatibilní soluty a osmoprotektanty (Hoekstra et al., 2001).

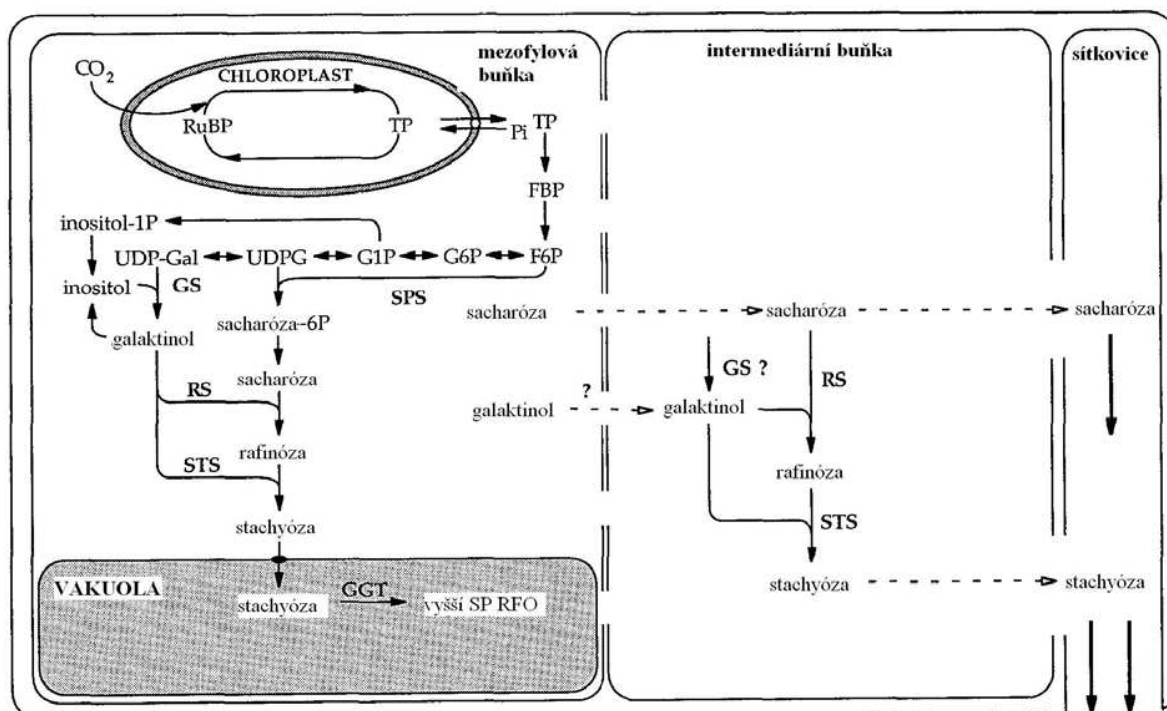
2.6.5.1 Syntéza RFO

RFO jsou syntetizovány za účasti α -galaktosyltransferáz. Prvním krokem syntézy RFO je syntéza rafinózy ze sacharózy a galaktinolu za katalýzy rafinózasyntázy. Dalším připojením galaktosylu vzniká stachyóza za účasti stachyózasyntázy (Kandler a Hopf, 1982; Keller a Pharr, 1996). Stachyóza syntetizovaná v cytoplazmě je následně transportována do vakuoly. Pro syntézu RFO je tedy nezbytná přítomnost galaktinolu, který vzniká z UDP-galaktózy a myo-inositolu za účasti galaktinolsyntázy (GS). Galaktinolsyntáza je klíčovým enzymem pro syntézu RFO (Handley et al., 1983). U zběhovce (*Ajuga reptans*) bylo zjištěno, že RFO zde tvoří 2 pooly – zásobní a transportní. Stachyóza a větší oligomery syntetizované v mezofylu dráhou nezávislou na galaktinolu pomocí galaktan:galaktan galaktosyltransferázy (GGT) jsou ukládány ve vakuole, kde tvoří zásobní pool. Stachyóza syntetizovaná v intermediárních buňkách galaktinol-dependentní dráhou ze sacharózy vytváří tak transportní pool (Bachmann a Keller, 1995; Bachmann et al., 1994). Molekuly stachyózy a rafinózy vzhledem ke své velikosti nemohou procházet plazmodezmy zpět do mezofylu. Z intermediárních buněk je stachyóza odváděna symplastickou cestou po koncentračním gradientu do sítkovic (Haritatos et al., 1996; Turgeon, 1996).

U zběhovce byly identifikovány 2 izoformy GS, GS-1 a GS-2. GS-1 je dominantní v mezofylových buňkách. Předpokládá se, že se účastní syntézy zásobního poolu, zatímco GS-2 je exprimována v intermediárních buňkách, kde se účastní syntézy RFO transportního poolu (Sprenger a Keller, 2000). Další prodlužování řetězce RFO (DP>4) je katalyzováno galaktan:galaktan galaktosyltransferázou (GGT) (Braun a Keller, 2000). Jedná se o galaktosyltransferázu nezávislou na galaktinolu s kyselým pH optimem ukazujícím na lokalizaci ve vakuole. Jako substrát je využívána rafinóza i stachyóza. Tento enzym je inhibován vysokou koncentrací sacharózy. Sacharóza zde zřejmě funguje jako kompetitivní akceptor galaktosylu vedoucí k zastavení prodlužování řetězce. Dalšími inhibitory jsou galaktóza a galaktinol (Haab a Keller, 2002).

2.6.5.2 Katabolismus RFO

Katabolismus RFO zajišťují α -galaktosidázy. Ty se rozdělují do 2 skupin, na kyselé a zásadité podle závislosti jejich aktivity na pH. Pro kyselé α -galaktosidázy je preferenčním substrátem rafinóza, zatímco pro zásadité je to stachyóza (Keller a Pharr, 1996). U plodů *Cucumis melo* však byla popsána i zásaditá α -galaktosidáza, která preferenčně štěpila rafinózu. Kyselé α -galaktosidázy jsou silně inhibovány galaktózou (Gao a Schaffer, 1999).



Obr. 2.3: Metabolismus RFO v listu *Ajuga reptans*. F6P – fruktóza-6-fosfát, FBP – fruktóza-1,6-bisfosfát, G1P – glukóza-1-fosfát, G6P – glukóza-6-fosfát, GGT – galaktan:galaktan galaktosyltransferáza, GS – galaktinolinsyntáza, RS – rafinózasyntáza, RuBP – ribulóza-1,5-bisfosfát, SPS – sacharózafosfátsyntáza, STS – stachyózasyntáza, TP – triózafosfát. Upraveno podle Bachmann a Keller (1995).

2.6.5.3 Regulace metabolismu RFO při stresu

U topolu (*Populus tremuloides*) bylo zjištěno, že akumulace RFO v pupenech koreluje se snižující se teplotou v zimních měsících. Podle Coxe a Stushnoffa (2001) je zvyšování obsahu RFO způsobeno potlačením aktivity α -galaktosidázy, která je zodpovědná za štěpení rafinózy (Cox a Stushnoff, 2001). Podobná dynamika byla zjištěna i u nahosemenných rostlin (*Pinus strobus* L., *Juniperus virginiana* L., *Pinus virginiana* L.), u kterých byl měřen obsah rafinózy a sacharózy v průběhu roku. Obsah obou sacharidů stoupal se snižující se teplotou, s maximem během zimních měsíců (Hinesley et al., 1992). Strimbeck

et al. (2007) prokázali závislost odolnosti k nízkým teplotám a obsahu sacharózy a zejména rafinózy u borovice (*Pinus*), jedle (*Abies*) a smrku (*Picea*).

Vliv nízkých teplot na aktivitu a expresi GS byl zkoumán u semen fazolu (*Phaseolus vulgaris*) a rostlin *A. thaliana*. U *A. thaliana* významně vzrostl obsah GS mRNA ve všech částech rostliny již po 8h vystavení rostlin 4°C. Po vrácení rostlin do pokojové teploty obsah GS mRNA opět klesl na původní hodnotu (Liu et al., 1998). Později byly u *A. thaliana* identifikovány 3 geny pro GS, které se různou měrou uplatňují v reakci na stres. Exprese *AtGolS1* a 2 je indukována při nedostatku vody a zasolení a *AtGolS3* chladovým stresem. Exprese *AtGolS3* je regulována transkripčním faktorem DREB1A, naproti tomu *AtGolS1* a 2 transkripčním faktorem DREB2. Promotory *AtGolS1* a 2 obsahují kromě DRE (drought responsive element) příbuzného motivu také ABA-responzibilní element (ABRE), jejich exprese je také narozdíl od *AtGolS3* slabě indukována kys. abscisovou. V souladu se zvýšenou expresí *GolS* vlivem stresu došlo k akumulaci rafinózy a stachyózy, což vedlo ke zvýšení tolerance k danému stresovému faktoru (Taji et al., 2002). U *A. thaliana* byla popsána aktivace GS1 tepelným šokem (37°C po 2h). Exprese GS1 je indukována HSF1 (heat shock factor 1) a HSF3 (heat shock factor 3), následně dochází i ke zvýšení obsahu RFO. U mutantních rostlin deficientních v genu *GolS1* však nebyly zjištěny žádné negativní dopady teplotního stresu oproti kontrolním rostlinám (Panikulangara et al., 2004). Aktivita GGT není příliš citlivá k nízkým teplotám, syntéza větších RFO tedy může sloužit jako alternativní zásoba uhlíku při teplotách, kdy je syntéza škrobu zastavena (Bachmann et al., 1994; Haab a Keller, 2002).

RFO se jako osmoprotektanty zřejmě uplatňují i u „rostlin vzkříšení“. U listů *Xerophyta viscosa* v dehydratovaném stavu byla zjištěna významná akumulace rafinózy a sacharózy (Bianchi et al., 1991; Müller et al., 1997). S akumulací rafinózy se vzrůstajícím vodním deficitem v listech klesal obsah myo-inositolu. Po opětovném zalití rostlin byla akumulovaná rafinóza spolu se sacharózou degradována. Uhlíkaté skelety obou těchto sacharidů jsou zřejmě využívány k opravě poškození buněčné stěny a plazmatické membrány vzniklých během dehydratace, jak naznačuje i zvýšení obsahu myo-inositolu (Peters et al., 2007).

U transgenních rostlin petunie (*Petunia x hybrida* cv. Mitchell) s vnesenou α -galaktosidázou v antisense orientaci, tedy sníženou degradací rafinózy, došlo ke zvýšení odolnosti k nízkým teplotám z -4°C u kontrolních na -8°C u transgenních rostlin. Obsah rafinózy u transgenních rostlin byl 12-22krát vyšší (Pennycooke et al., 2003). Některé rostliny produkují jak RFO, tak i cukerné alkoholy (oliva, jabloň). U rostlin oliv (*Olea*

europaea L.) pěstovaných *in vitro* došlo k akumulaci RFO v poměru k ostatním sacharidům po vystavení nízkým teplotám (4°C). Při stresu zasolení obsah RFO naopak klesl, objevil se však nárůst obsahu manitolu. Zjištěné výsledky ukazují na odlišné uplatnění různých druhů sacharidů u rostlin s velkou diverzitou fotosyntetických produktů v reakci na stres (Rejšková et al., 2007).

U rostlin *Arabidopsis* vystavených oxidativnímu stresu (ROS) dochází ke zvýšení obsahu galaktinolu a rafinózy. To ukazuje, že obě tyto sloučeniny působí v reakci na stres nejen jako osmoprotektanty a osmotika, ale účastní se i zhášení volných radikálů (Nishizawa et al., 2008).

2.6.5.4 Vliv nedostatku vody na obsah RFO

U rostlin citrusu (*Citrus reshni*) vystavených nedostatku vody dochází ke zvýšení obsahu rafinózy a zvýšení exprese rafinózasyntázy v kořenech (Gimeno et al., 2009). U *Coleus* při vystavení suchu dochází k poklesu celkového obsahu RFO, zřejmě způsobenému snížením fotosyntetické aktivity a poklesem aktivity GS. Dalším možným vysvětlením je posílení syntézy O-metyl-inositolu (OMI), jehož syntetická dráha sdílí s dráhou syntézy RFO myo-inositol jako společný intermediát. Obsah OMI v listech u rostlin vystavených nedostatku vody byl 30-krát vyšší než obsah RFO a galaktinolu. OMI, podobně jako ostatní cyklitoly může fungovat jako osmotikum a osmoprotektant (Pattanagul a Madore, 1999). Při vystavení rostlin *Coleus* stresu zasolení jsou produkovány RFO o vyšším stupni polymerace (DP 5-8). Tyto RFO, které jsou ukládány ve vakuole, slouží zřejmě jako dočasná zásoba uhlíku nahrazující škrob, jehož obsah je v časných fázích působení zasolení redukován. Skladování větších polymerů ve vakuolách mezofylových buněk je při zasolení výhodné z hlediska nižšího příspěvku k poklesu osmotického potenciálu vakuol, který je již tak dost nízký vzhledem k uloženým iontům. Při působení stresu byly převažujícími transportními sacharidy sacharóza a OMI, které jsou v sinkových pletivech využívány pro syntézu RFO s vyšším DP (Gilbert et al., 1997).

2.7 Tkáňové kultury a studium stresových reakcí

Použití buněčných a tkáňových kultur při studiu stresových reakcí u rostlin umožňuje na rozdíl od celistvých rostlin a orgánových kultur sledovat mechanismy, které se uplatňují na buněčné úrovni. Výhodou je homogenita působení stresového faktoru, možnost

kvantifikace enzymových aktivit a stupně přežití buněk (Lutts et al., 2004). V komplexní odpovědi celistvé rostliny na působení stresových faktorů se vedle těchto mechanismů uplatňují orgánově specifické a transportní mechanismy vyžadující organizovanou strukturu pletiv. Korelace odpovědi na stresový faktor mezi tkáňovými kulturami a celistvými rostlinami proto značně kolísá. Použití tkáňových a buněčných kultur při studiu stresových reakcí však může pomoci lépe objasnit děje odehrávající se na buněčné úrovni, jak můžeme ilustrovat na příkladu regulace metabolismu manitolu během stresu. V suspenzních kulturách olivy vystavených zasolení roste exprese transportéru pro manitol OeMaT a zvyšuje se tak příjem manitolu z média. Současně také klesá aktivita MTD což vede k intracelulární akumulaci manitolu (Conde et al., 2007). Také u stonkových segmentů pěstovaných *in vitro* a celistvých rostlin vystavených zasolení byla zaznamenána akumulace manitolu na úkor obsahu ostatních sacharidů (Gucci et al., 1998; Rejšková et al., 2007). Také u dalšího zástupce významných producentů manitolu, celeru, byla zaznamenána podobná reakce na stres zasolení u celistvých rostlin i tkáňových kultur. V listech celistvých rostlin celeru vystavených salinitě byl zjištěn nárůst obsahu manitolu s rostoucí koncentrací NaCl v substrátu, zatímco obsah sacharózy a škrobu klesal (Everard et al., 1994). U tkáňových kultur celeru vystavených zasolení byl zjištěn mírný nárůst obsahu manitolu v poměru k ostatním sacharidům (Šuťáková, 2006). U celeru dochází k akumulaci manitolu při zasolení díky poklesu aktivity MTD a poklesu exprese příslušného genu (Stoop a Pharr, 1994). Z výše zmíněných případů lze usuzovat na osmotickou a osmoprotektivní funkci manitolu za podmínek stresu. Heterotrofní tkáňové a buněčné kultury lze tedy s úspěchem využít ke studiu změn metabolismu sacharidů za stresových podmínek, které mohou ukazovat na jejich funkci ve stresové reakci. Do zjištěných výsledků se tak nepromítá vliv transportu a fotosyntézy, která je často stresem výrazně ovlivněna.

3. Materiál a metody

3.1 Rostlinný materiál

Stonkové segmenty a tkáňové kultury jabloně (*Malus domestica* Borkh.) cv. Idared a cv. Šampion Red kultivované v podmínkách *in vitro*. Kultivar Idared se vyznačuje nižší odolností zejména k nízkým teplotám a některým chorobám (padlí, strupovitost).

3.2 Kultivace rostlinného materiálu

Kultivace rostlinného materiálu byla prováděna na Katedře fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

3.2.1 Kultivační postupy

3.2.1.1 Práce v aseptických podmínkách

Veškerá manipulace s kulturami byla prováděna v aseptickém prostředí laminárního flowboxu. Nástroje a Petriho misky byly sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru při 150°C po dobu 3 h. V průběhu práce byly nástroje sterilizovány ponořením do 70% ethanolu a opálením v plameni.

3.2.1.2 Kultury stonkových segmentů jabloně *in vitro*

Kultury stonkových segmentů jabloně obou kultivarů *in vitro* byly získány z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o. Stonkové segmenty byly pěstovány ve 100 ml Erlenmayerových baňkách s cca 25 ml modifikovaného MS média podle Lynche (1997) (viz tabulka 3.1 a 3.2), které byly uzavřeny sterilně dvojitou vrstvou aluminiové folie. Pro udržování kultur byly stonky nařezány na segmenty nesoucí dva nody, které byly následně umístěny do baněk po čtyřech. Kultury byly přesazovány po 6-7 týdnech po dosažení velikosti cca 2/3 výšky baňky. Kultivační podmínky: teplota: 23 ± 3°C, fotoperioda: 16 h, ozáření: 250 μmol.m⁻².s⁻¹

3.2.1.3 Odvození tkáňových kultur jabloně

Stonkové segmenty pěstované *in vitro* byly nařezány na čepelové, nodální a internodální části, které byly přeneseny na indukční médium. Byla testována různá média uvedená v tabulce 3.3 a 3.4. Pro internodální segmenty byla použita média Fujii a Nito (1972) a Coffin (1976). Růst kalusu na těchto médiích nebyl optimální a v raném stadiu vývoje kalusu se projevilo hnědnutí kultury. Pro odvození tkáňové kultury z listových segmentů byla použita média Chong a Taper (1974), Pech et al., (1975), Shenk a Hildebrandt (1972) a Hurwitz a Agrios (1984). Na médiu Shenk a Hildebrandt (1972) vyvíjející se kalus hnědl podobně jako v předchozích dvou případech. Na médiích Chong a Taper (1974) byl růst kalusu dobrý, projevilo se však výrazné dřevnatění kalusů. Jako nejvhodnější se jevílo médium Hurwitz a Agrios (1984), které bylo následně používáno pro kultivaci tkáňových kultur. Pro optimalizaci jejich růstu byl testován vliv exogenního zásobení sacharózou, sorbitolem, a sacharózou a sorbitolem v poměru 1:1. Kalus odvozený z nodálních a internodálních segmentů silně dřevnatěl již v rané fázi růstu. Proto bylo v jednotlivých experimentech pracováno pouze s tkáňovými kulturami odvozenými z listové čepele.

3.2.1.4 Kultivační podmínky tkáňových kultur jabloně *in vitro*

Odvozené tkáňové kultury z listových segmentů byly pěstovány se subkultivačním intervalem 14 dní ve 100 ml Erlenmayerových baňkách s cca 25 ml média Hurwitz a Agrios (1984), které bude v textu označováno jako standardní (viz tabulka 3.5, 3.6). Kultivační podmínky: teplota: $23 \pm 3^\circ\text{C}$, fotoperioda: 16 h, ozáření: $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.2.1.5 Příprava kultivačních médií

Rostlinný materiál byl kultivován na MS médiu modifikovaném podle Lynche (1997) (viz tabulka 3.1, 3.2) pro udržovací kultury stonkových segmentů a médiu Hurwitz a Agrios (1984) (viz tabulka 3.5, 3.6) pro indukci a růst tkáňových kultur jabloně. Zásobní roztoky byly připraveny podle tabulek 3.1, 3.2, 3.5 a 3.6 a skladovány v lednici při 4°C . Vzhledem k časté kontaminaci byl roztok A před uskladněním sterilizován v autoklávu a myo-inositol byl dovažován bezprostředně před přípravou médií. Při přípravě roztoku C (chelát železa) byly obě složky naváženy zvlášť, rozpuštěny v přibližně stejném objemu vody a zahřáty na stejnou teplotu (přibližně 80°C). Následně byly obě složky smíchány a výsledný roztok byl doplněn na 500 ml. Roztok byl promícháván do vychladnutí na pokojovou teplotu. Složení zásobních roztoků média Hurwitz a Agrios (1984) je uvedeno v tabulce 3.5. Další složky kultivačního média byly dopipetovány ze zásobních roztoků dle tabulky 3.6. Vzhledem

k rozkladu rafinózy při vyšší teplotě byl tento sacharid přidáván do média až po zklávoání filtrací přes sterilní filtr (0,45 μm). Růstové regulátory kromě kys. gibberelové a kys. abscisové byly do média přidány před klávoáním. Kyselina gibberelová a kyselina abscisová byly filtrovány do zklávoaného média přes sterilní filtr (0,45 μm). Protože se kyselina abscisová rozkládá na světle, byly kultury po dobu experimentu umístěny v tmavém kultivačním boxu. Růstové regulátory byly uchovávány ve vodných roztocích při 4°C, typy použitých rozpouštědel jsou uvedeny v tabulce 3.7. Kultivační média byla sterilizována v autoklávu 20 minut při teplotě 122°C a tlaku 144 kPa.

zásobní roztok	složení	hmotnost složky [mg/l média]	koncentrace v zásobním roztoku [g/0,5l]	objem zásobního roztoku [ml/l média]
A makroprvky	NH ₄ NO ₃	1650	16,5	50
	KNO ₃	1900	19,0	
	CaCl ₂	331	3,31	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	3,7	
	KH ₂ PO ₄	170	1,7	
B mikroprvky	KI	0,83	0,083	5
	H ₃ BO ₃	6,2	0,062	
	MnSO ₄ .H ₂ O	22,3	2,23	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	1,69	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,86	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	
	CoCl ₂	0,025	0,0025	
C chelát železa	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	2,78	5
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,2	3,73	
D vitamíny	myo-inositol	100	10,0	5
	kys. nikotinová	0,5	0,05	
	pyridoxin-HCl	0,5	0,05	
	thyamin-HCl	0,1	0,5	
	glycin	2	0,2	

Tab. 3.1: Složení kultivačního média MS modifikovaného podle Lynche (1997).

	hmotnosť složky na 1l média
sacharóza	30 g
6-benzylaminopurin (BAP)	1 mg
kys. 3-indolmáseľná (IBA)	0,1 mg
kys. gibereľová (GA ₃)	1 mg
agar	8 g
pH	5,7-5,8

Tab. 3.2: Ďalšie složky modifikovaného MS média pre udržiavacie kultúry stonkových segmentů (Lynch 1997).

	složení [mg/l]	Chong a Taper (1974)	Coffin (1976)	Fuji a Nito (1972)	Pech et al. (1975)	Liu et al. (1983)	Hurwitz a Agrios (1984)
makroprvky	NH ₄ NO ₃	1650	1650	60	1650	-	1650
	NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	-	-	300	-
	KNO ₃	1900	1900	-	1900	2500	1900
	CaCl ₂	331	331	-	331	151	331
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	240	370	400	370
	KH ₂ PO ₄	170	170	40	170	-	170
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	170	-	-	-
	KCl	-	-	80	-	-	-
mikroprvky	KI	0,83	0,83	-	0,83	1	0,83
	H ₃ BO ₃	6,2	6,2	0,6	6,2	5	6,2
	MnSO ₄ ·H ₂ O	22,3	22,3	0,53	22,3	13,2	22,3
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6	0,05	8,6	1	8,6
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,027	0,25	0,1	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,05	0,025	0,2	0,025
	CoCl ₂	0,025	0,025	-	0,025	0,05	0,025
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	8,3	27,8	15	27,8
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,2	37,2	37,2	37,2	20	37,2

	složení	Chong a Taper (1974)	Coffin (1976)	Fujii a Nito (1972)	Pech et al. (1975)	Liu et al. (1983)	Hurwitz a Agrios (1984)
vitamíny	myo-inositol	100	100	0,1	100	1000	200
	kys. nikotinová	0,5	0,5	1	1	5	-
	pyridoxin-HCl	0,5	0,5	1	1	0,5	-
	thyamin-HCl	0,1	0,1	0,1	1	5	1
	Ca panthotenát	-	-	10	1	-	-
	biotin	-	-	0,01	0,01	-	-
	kys. askorbová	-	-	-	50	-	-
aminokyseliny	cystein	-	-	10	0,01	-	-
	asparagin	-	-	-	0,18	-	-
	glycin	2	2	-	-	-	-

Tab 3.3: Složení testovaných médií pro odvození tkáňových kultur jabloně.

	složení	Chong a Taper (1974)	Coffin (1976)	Fujii a Nito (1972)	Pech et al. (1975)	Liu et al. (1983)	Hurwitz a Agrios (1984)
další složky média	NAA	2 mg/l	-	2 mg/l	1 mg/l	-	2 mg/l
	2,4-D	-	0,25 mg/l	-	-	0,5 mg/l	1 mg/l
	kinetin	0,2 mg/l	0,2 mg/l	0,2 mg/l	-	0,1 mg/l	0,2 mg/l
	BAP	-	-	-	0,1 mg/l	-	-
	CPA	-	-	-	-	2 mg/l	-
	adenin	-	-	5 mg/l	-	-	-
	thiomočovina	-	-	-	25 mg/l	-	-
	sacharóza	30 g/l	30 g/l	20 g/l	40 g/l	30 g/l	30 g/l
	agar	5,5 g/l	5,5 g/l	8 g/l	8 g/l	8 g/l	8 g/l
	pH	5,6-5,8	5,6-5,8	6,3	5,8	5,8	5,7

Tab 3.4: Další složky testovaných médií pro odvození tkáňových kultur jabloně.

zásobní roztok	složení	koncentrace v zásobním roztoku [g/0.5l]	objem zásobního roztoku [ml/l média]
A makroprvky	NH ₄ NO ₃	16,5	50
	KNO ₃	19,0	
	CaCl ₂	3,31	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,7	
	H ₂ PO ₄	1,7	
B mikroprvky	KI	0,083	5
	H ₃ BO ₃	0,062	
	MnSO ₄ ·H ₂ O	2,23	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,69	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,86	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	
	CoCl ₂	0,0025	
C chelát železa	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,78	5
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3,73	

Tab. 3.5: Složení zásobních roztoků kultivačního média Hurwitz a Agrios (1984) pro tkáňové kultury jabloně.

	hmotnost složky na 1l média
sacharóza	15 g
sorbitol	15 g
kys. 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D)	1 mg
kys. naftalenoctová (NAA)	2 mg
kinetin	0,2 mg
myo-inositol	200 mg
thyamin-HCl	1 mg
agar	8 g
pH	5,7

Tab. 3.6: Další složky média Hurwitz a Agrios (1984) pro tkáňové kultury jabloně.

růstový regulátor	rozpouštědlo
ABA	1M NaOH
BAP	1M NaOH
IBA	96% etanol
GA ₃	96% etanol
2,4-D	96% etanol
NAA	1M NaOH
kinetin	1M NaOH

Tab. 3.7: Rozpouštědla použitá při přípravě roztoků růstových regulátorů.

3.3 Stanovení obsahu endogenních sacharidů

3.3.1 Příprava vzorků pro stanovení obsahu endogenních sacharidů

Vzorky z tkáňové kultury byly odebrány do předem zvážených mikrozkuvek a byla u nich zjištěna čerstvá hmotnost. Poté byly vzorky zmrazeny v tekutém dusíku a lyofilizovány po dobu 16-18 h (Lyovac GT 2, FINN-AQUA). Po lyofilizaci byla stanovena hmotnost sušiny. Vysušené vzorky byly následně inkubovány po dobu 10 minut v 0,5 ml 80% metanolu v termobločku vytemperovaném na 75°C. Vzorky byly poté opět vysušeny na vakuové odparce Speed Vac Plus SC110 A, Savant (cca 3 hodiny). K sušině byla poté přidána ultračistá voda (Milli Q Millipore) v množství závislém na suché hmotnosti vzorku (tab. 3.7). Vzorky byly následně vloženy do ultrazvukové lázně (Julabo USR 05) a poté centrifugovány (Eppendorf centrifuge 5415 C) po dobu 10 minut při 14000 otáčkách za minutu. Supernatant byl odebrán pomocí injekční stříkačky a jehly a přefiltrován do čisté mikrozkuvky přes membránový filtr Millex Millipore (0,45 µm). Do doby měření byly vzorky skladovány při -18°C.

hmotnost sušiny [mg]	objem vody [ml]
5-10	0,3
10-20	0,5
20-30	1,0

Tab. 3.8: Množství vody přidávané ke vzorku podle hmotnosti sušiny.

3.3.2 Měření obsahu endogenních sacharidů

Stanovení obsahu endogenních sacharidů bylo prováděno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Parametry měřicího systému: refraktometrická detekce (Shodex RI-71), isokratická pumpa Spectra Physics, teplota 80°C, předkolonky Hema-Bio 1000 SB+Q, kolona IEX Pb^{2+} (Watrex, ČR), pro zjištění obsahu sacharidů rafinóзовé řady kolona IEX Ca^{2+} , počítačový program CSW 1.7 (DataApex Ltd.), eluent demineralizovaná voda (MilliQ), rychlost průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, objem injikovaného vzorku $10 \mu\text{l}$, standardy sacharidů: Sigma.

3.4 Stanovení růstových parametrů

U tkáňových kultur byla zjištěna počáteční hmotnost. Po přibližně 2 týdnech kultivace byla zjištěna výsledná hmotnost. Ze získaných hodnot byl následně vypočítán růstový koeficient. Ten je roven přírůstku biomasy vztaženému na jednotku počáteční hmotnosti.

Vzorec pro výpočet růstového koeficientu:

$$c = (m_t - m_0) / m_0$$

m_0čerstvá hmotnost biomasy v čase $t=0$

m_tčerstvá hmotnost biomasy po čase t

3.5 Statistické zpracování dat

Pro vzájemné porovnání variant byla použita analýza variance (ANOVA). V případě normálního rozdělení byl použit Tukey-Kramerův srovnávací test. Pokud nebylo rozdělení hodnot normální, byl použit Kruskal-Wallisův srovnávací test.

3.6 Přehled experimentů

1. Závislost růstu tkáňových kultur a obsahu endogenních sacharidů na zásobení exogenním sacharidem

V prvním experimentu byly tkáňové kultury jabloně kultivaru Šampion Red a Idared pěstovány na médiu s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu, nebo 3 % obsahu sacharózy, sorbitolu, manitolu, a rafinózy. Experiment byl proveden ve dvou opakováních pro oba kultivary. V navazujícím experimentu byly tkáňové kultury kultivaru Šampion Red vysazeny na médium s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu, nebo 3 % a 5 % sacharózy, nebo

sorbitolu. Experiment byl proveden ve dvou opakováních. U těchto kultur byl sledován růstový koeficient, podíl obsahu vody na čerstvé hmotnosti, a obsah a spektrum endogenních sacharidů pomocí HPLC.

2. Působení zasolení a nízkého osmotického potenciálu

V prvním variantě experimentu byly tkáňové kultury obou kultivarů vystaveny působení NaCl v koncentraci 50, 100, 150 mM, nebo 2 % manitolu. Experiment byl proveden ve dvou variantách, a to na médiu s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu (provedeno ve 2 opakováních), nebo 3 % sacharózy (provedeno ve 3 opakováních). U kultur byl sledován růstový koeficient, podíl obsahu vody na čerstvé hmotnosti, a obsah a spektrum endogenních sacharidů pomocí HPLC.

3. Působení penetrujícího a nepenetrujícího osmotika

V tomto experimentu byly tkáňové kultury vystaveny působení osmotického stresu. Ten byl vyvolán přidáním 9 % PEGu ($M_r = 4000$), nebo manitolu v 1% koncentraci (provedeno ve 2 opakováních), v návazném experimentu 3 % a 6 % PEGu ($M_r = 4000$), nebo 2% manitolu (provedeno v 1 opakování). Navážka byla zvolena dle tabulky 3.8. V tomto experimentu bylo použito médium se směsí 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu. Byl stanoven růstový koeficient, podíl obsahu vody na čerstvé hmotnosti a obsah a složení endogenních sacharidů.

Manitol

médium (bez agaru)	osmotický potenciál (MPa)	médium (bez agaru)	osmotický potenciál (MPa)
MS bez cukru	-0,28	½ MS bez cukru	-0,15
MS + 1 % manitol	-0,44	½ MS + 1 % manitol	-0,31
MS + 3 % manitol	-0,73	½ MS + 3 % manitol	-0,60
MS + 5 % manitol	-1,04	½ MS + 5 % manitol	-0,91
MS + 7 % manitol	-1,34	½ MS + 7 % manitol	-1,21
MS + 9 % manitol	-1,63	½ MS + 9 % manitol	-1,50

PEG

médium (bez agaru)	osmotický potenciál (MPa)	médium (bez agaru)	osmotický potenciál (MPa)
MS bez cukru	-0,28	½ MS bez cukru	-0,15
MS + 3 % PEG	-0,32	½ MS + 3 % PEG	-0,20
MS + 6 % PEG	-0,36	½ MS + 6 % PEG	-0,23
MS + 9 % PEG	-0,43	½ MS + 9 % PEG	-0,30
MS + 12 % PEG	-0,60	½ MS + 12 % PEG	-0,47

Tab. 3.9: Osmotické potenciály kultivačních médií s přidavkem osmotika (převzato od Mgr. Aleny Bartoníčkové, 1999).

4. Expozice kultur chladovému stresu

V tomto experimentu byly tkáňové kultury obou kultivarů vystaveny působení teploty 4°C po dobu 10-15 dnů. Nejprve byla sledována dynamika obsahu endogenních sacharidů v třídních intervalech po dobu 15 dnů na médiu s 1,5% sacharózy a 1,5% sorbitolu, v následujícím experimentu byly kultury vysazené na médium se 3 % sacharózy, nebo 3 % rafinózy. Obě tyto varianty byly provedeny ve dvou opakováních. Byl sledován růstový koeficient, podíl obsahu vody na čerstvé hmotnosti a obsah a spektrum endogenních sacharidů.

5. Simulace stresu aplikací kyseliny abscisové

V experimentu byly tkáňové kultury obou kultivarů vysazené na médium s přidavkem 9 % PEGu nebo 25μmol kys. abscisové nebo kombinaci 9 % PEGu a 25μmol kys. abscisové. Pro experiment bylo použito médium s 1,5% sacharózy a 1,5% sorbitolu. Byl sledován růstový koeficient, podíl obsahu vody na čerstvé hmotnosti a obsah a spektrum endogenních sacharidů. Experiment byl proveden ve dvou opakováních.

4. Experimentální část

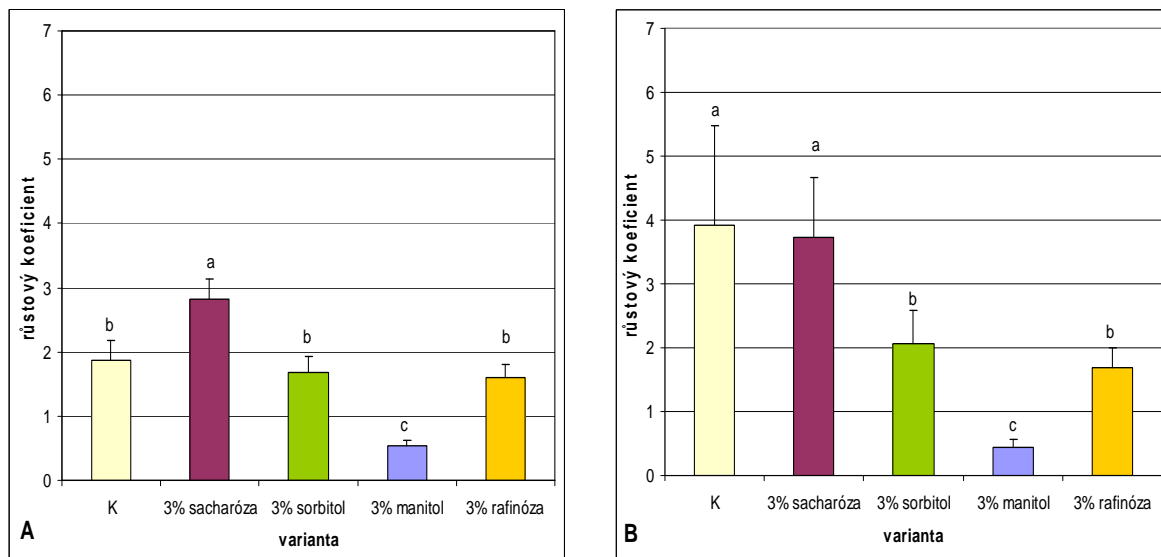
Výsledky experimentů jsou uvedeny ve formě sloupcových grafů. Jednotlivé sloupce vyjadřují průměrnou hodnotu daného parametru. Chybové úsečky jsou grafickým vyjádřením směrodatných odchylek, n vyjadřuje počet stanovení, ze kterých je vypočítán průměr. Statisticky významný rozdíl je vyjádřen odlišnými písmeny nad sloupci.

4.1.1 Vliv typu exogenního sacharidu na růstové charakteristiky tkáňových kultur jabloně

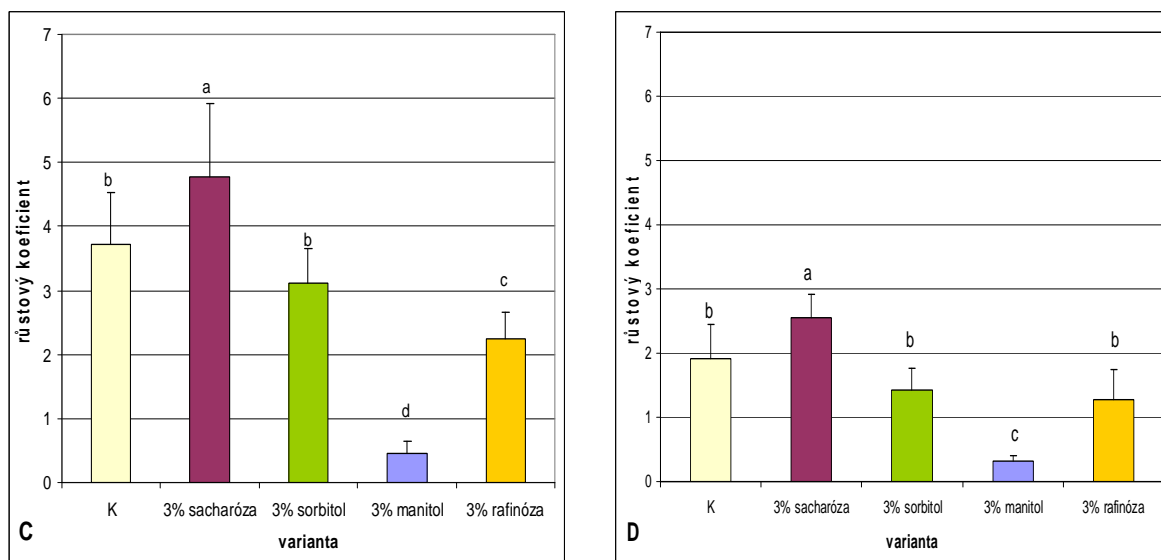
Cílem tohoto experimentu bylo charakterizovat vliv různých exogenních sacharidů na růst tkáňových kultur jabloně. Tkáňové kultury jabloně *Malus domestica* cv. Šampion Red a Idared byly pěstovány na médiích Hurwitz a Agrios (1984) s přidavkem 3% sacharózy, sorbitolu, rafinózy, manitolu, nebo směsi 1,5% sacharózy a 1,5% sorbitolu (kontrolní varianta) (**graf 1A-D**). Médium Hurwitz a Agrios (1984) použité pro kultivaci udržovacích tkáňových kultur jabloně bude v textu označováno jako standardní (viz. kapitola 3.2.1.4). Výše zmíněné sacharidy sloužily jako výhradní zdroj uhlíku a energie pro danou variantu. Růst tkáňových kultur byl vyjádřen pomocí růstového koeficientu. Ten byl vypočítán jako přírůstek čerstvé hmotnosti kultury za dobu kultivace vztažený na jednotku hmotnosti na počátku kultivace. Výsledky pro kultivar Šampion Red jsou uvedeny v grafu 1A, B, pro kultivar Idared v grafu 1C, D. U prvního opakování u kultivaru Šampion Red a prvního i druhého opakování u kultivaru Idared (**graf 1A, C, D**) byl zaznamenán lepší růst tkáňových kultur na médiu se sacharózou jako jediným sacharidem v porovnání s ostatními variantami. Pouze u druhého opakování u kultivaru Šampion Red (**graf 1B**) byl růst varianty pěstované na sacharóze srovnatelný s kontrolní variantou na směsi 1,5% sacharózy a 1,5% sorbitolu. Ovšem hodnoty růstových koeficientů kontrolní varianty ve druhém opakování vykazují ve srovnání s ostatními stanoveními velkou variabilitu. Kultury pěstované na médiu s 3 % rafinózy vykazovaly srovnatelné růstové charakteristiky s kulturami na 3 % sorbitolu. Na médiu s 3 % manitolu byl přírůstek hmotnosti kultur výrazně omezen.

U kultur byl také stanoven podíl vody na čerstvé hmotnosti (**graf 1E-H**). Výsledky pro kultivar Šampion Red jsou uvedeny v grafu 1E, F, pro kultivar Idared v grafu 1G, H. U obou kultivarů je pozorovatelná tendence k nejvyššímu obsahu vody na médiu se

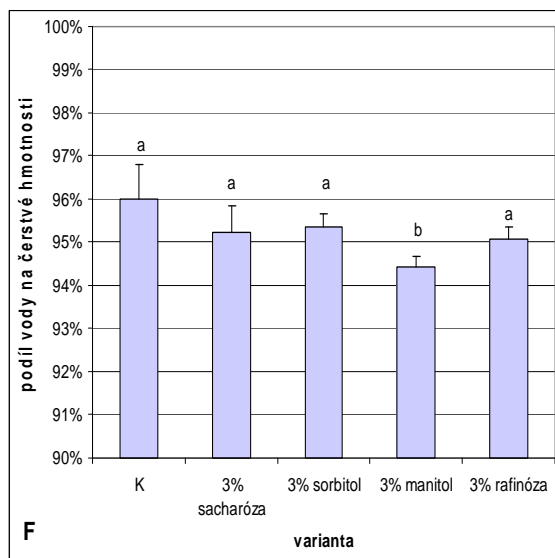
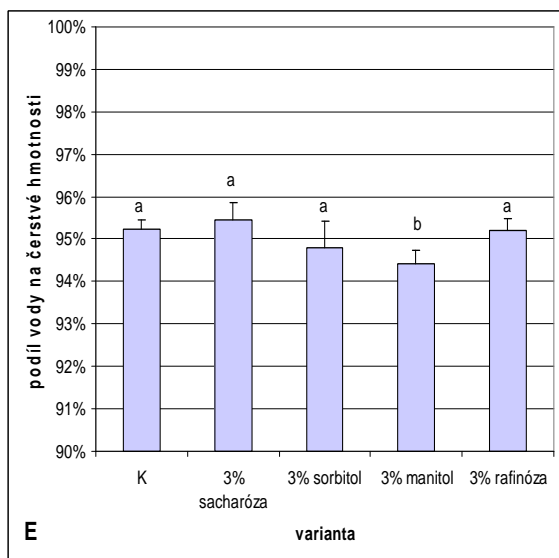
sacharózou. Průkazně nejvyšší obsah vody byl však zaznamenán pouze v případě obou opakování u kultivaru Idared. U variant pěstovaných na médiu se sorbitolem, rafinózou nebo směsí sacharózy a sorbitolu byl obsah vody srovnatelný. U varianty pěstované na médiu s manitolem byl obsah vody průkazně nejnižší.



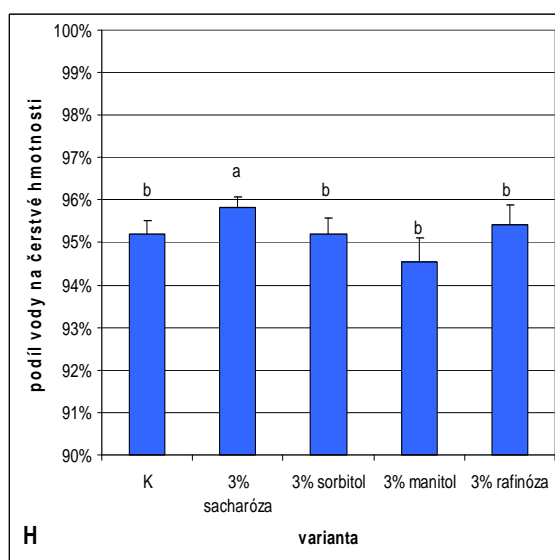
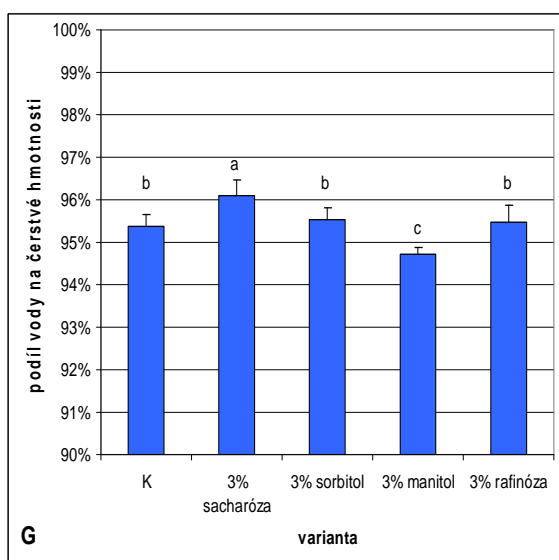
Graf 1A, B: Růst tkáňových kultur jabloně kultivaru Šampion Red v závislosti na zásobení různým exogenním sacharidem. **A** – 1. opakování, **B** – 2. opakování; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).



Graf 1C, D: Růst tkáňových kultur jabloně kultivaru Idared v závislosti na zásobení různým exogenním sacharidem. **C** – 1. opakování, **D** – 2. opakování; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).



Graf 1E, F: Podíl obsahu vody na čerstvé hmotnosti tkáňových kultur jabloně kultivaru Šampion Red v závislosti na zásobení různým exogenním sacharidem. **E** – 1. opakování, **F** – 2. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).



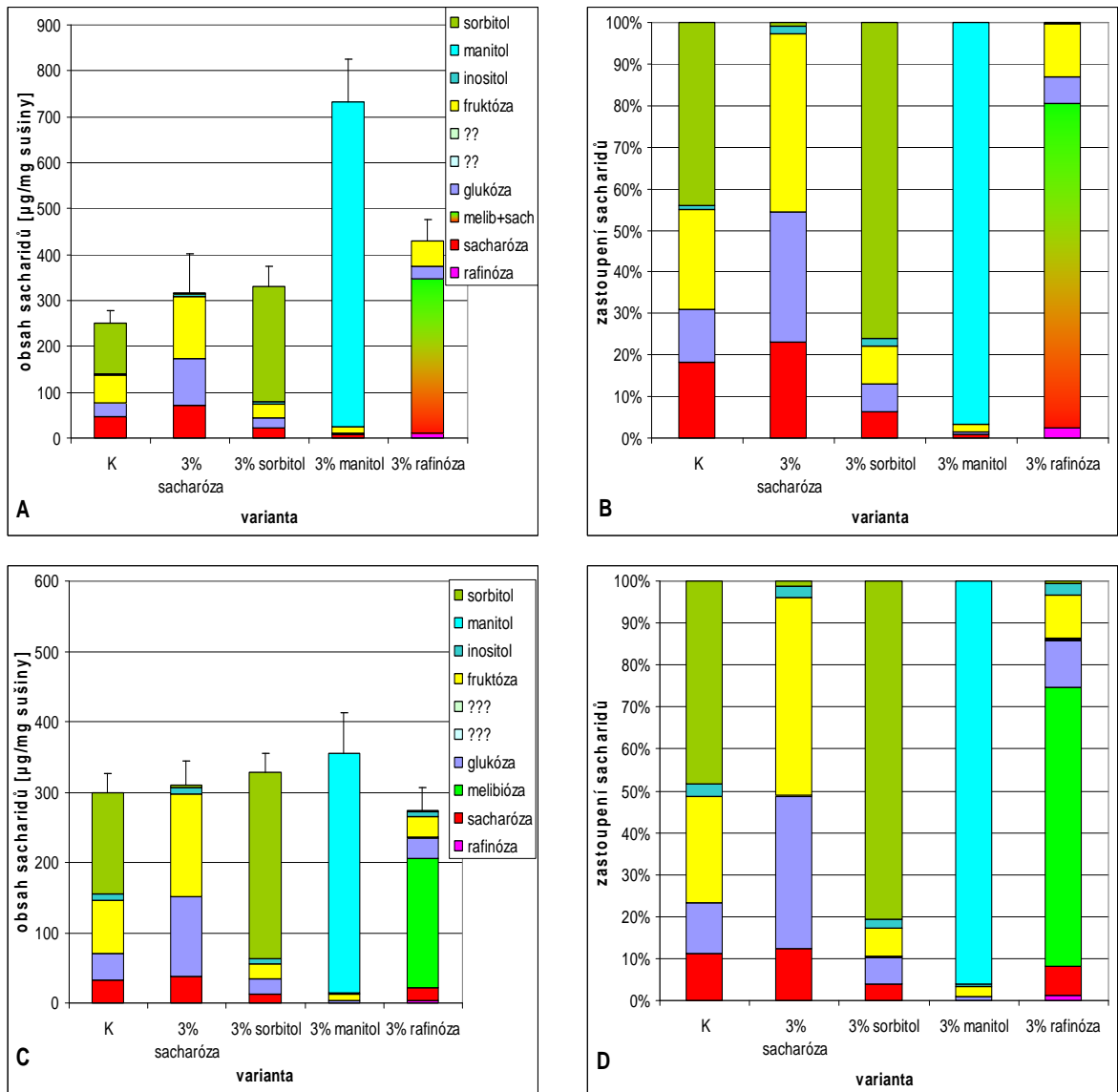
Graf 1G, H: Podíl obsahu vody na čerstvé hmotnosti tkáňových kultur jabloně kultivaru Šampion Red v závislosti na zásobení různým exogenním sacharidem. **G** – 1. opakování, **H** – 2. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).

4.1.2 Obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně při různém typu exogenního sacharidu

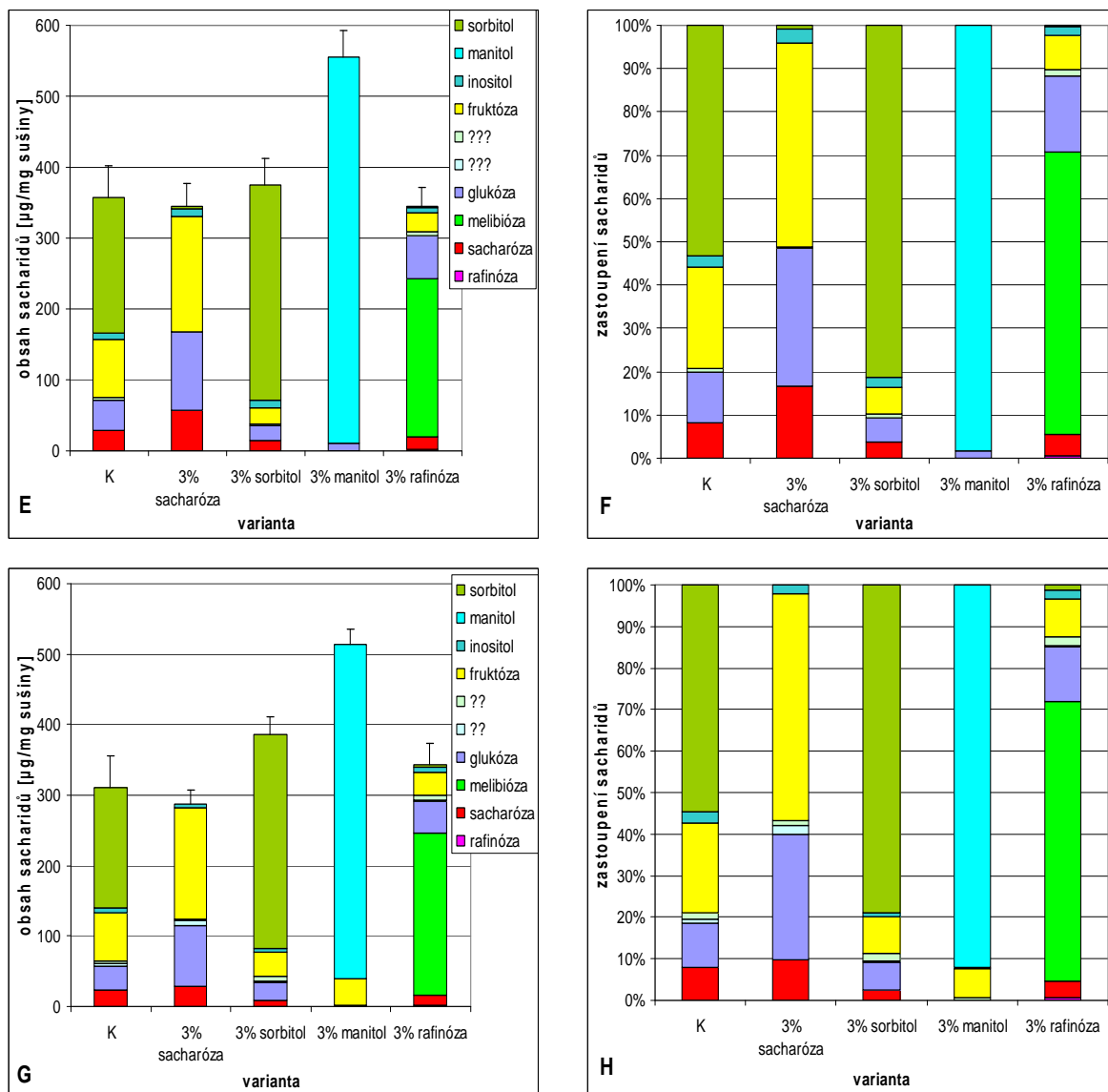
U tkáňových kultur kultivarů Šampion Red a Idared použitých pro stanovení růstových charakteristik byl sledován obsah endogenních sacharidů. Tkáňové kultury byly pěstovány na standardním médiu s 3 % sacharózy, sorbitolu, rafinózy, nebo manitolu jako výhradního

sacharidu v médiu. Jako kontrolní bylo použito médium s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu. Výsledky jsou prezentovány ve dvou typech sloupcových grafů vyjadřujících jednak obsah celkových sacharidů (**graf 2A, C, E, G**) a dále procentuální zastoupení jednotlivých sacharidů v rámci sacharidového spektra (**graf 2B, D, F, H**). Chybové úsečky v grafech vyjadřují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot pro jednotlivé sacharidy jsou uvedeny v tabulkách (**tabulka 4.1-4.4**). V případě prvního opakování u kultivaru Šampion Red (**graf 2A, B**) byla použita jiná kolona než v následujících opakováních, na které se lépe dělí rafinóza od sacharózy, naopak není možné rozlišit sacharózu od melibiózy. Proto jsou uvedeny pouze souhrnné hodnoty pro tyto dva sacharidy (viz kapitola 3.3.2). U obou kultivarů byl celkový obsah sacharidů na médiu s 3 % sacharózy nebo rafinózy srovnatelný s kontrolním médiem. Pouze v prvním opakování byl u kultivaru Šampion Red v případě rafinózy zaznamenán výrazně vyšší obsah sacharidů. Na médiu s 3 % sorbitolu byl celkový obsah sacharidů vyšší než tomu bylo u kontrolní varianty. Nejvyšší obsah sacharidů byl zaznamenán u kultur pěstovaných na médiu s 3 % manitolu.

Velmi se ovšem lišila sacharidová spektra u jednotlivých variant. U kontrolní varianty představoval sorbitol zhruba polovinu endogenních sacharidů, z ostatních sacharidů byla nejvýrazněji zastoupena fruktóza, následována glukózou a sacharózou představující asi 10 % celkového obsahu sacharidů. U kultur na médiu s 3 % sacharózy, dosahoval také tento sacharid pouze 10-20 % celkového obsahu endogenních sacharidů. Na médiu s 3 % sorbitolu tvořil tento cukerný alkohol téměř 80 % všech rozpustných sacharidů, zbylých 20 % náleží zejména hexózám a v malé míře (do 5 %) také sacharóze. U kultur na médiu s 3 % manitolu zaujímal manitol přijatý z média více než 90 % rozpustných sacharidů. Zbývajících necelých 10 % tvořily hexózy se zanedbatelným množstvím inositolu. U varianty pěstované na médiu s 3 % rafinózy je majoritní složkou sacharidového spektra melibióza. Zhruba 25 % obsahu se dělí mezi fruktózu, glukózu a sacharózu, a malé množství rafinózy. U všech variant byly zjištěny dva neznámé sacharidy. Oba tyto sacharidy jsou však minoritní složkou sacharidového spektra, pouze u kultur na médiu s 3 % sacharózy byl obsah jednoho z nich výraznější.



Graf 2A-D: Obsah endogenních sacharidů a zastoupení sacharidů u tkáňových kultur jabloně kultivaru Šampion Red v závislosti na zásobení různým exogenním sacharidem. **A, B** - 1. opakování, **C, D** - 2. opakování; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulce 4.1 a 4.2.



Graf 2E-H: Obsah endogenních sacharidů a zastoupení sacharidů u tkáňových kultur jabloně kultivaru Idared v závislosti na zásobení různým exogenním sacharidem. **G, H** - 1. opakování; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulce 4.3 a 4.4.

	rafinóza	sacharóza	melib+sach	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
K	0,00	11,80	0,00	8,52	13,46	1,54	0,00	19,47	45,92
3% sacharóza	0,00	26,47	0,00	14,81	21,85	3,83	0,00	1,56	27,04
3% sorbitol	0,00	7,59	0,00	12,05	8,98	4,56	0,00	69,62	84,35
3% manitol	0,00	5,34	0,00	5,33	5,72	0,00	42,54	0,00	44,11
3% rafinóza	6,74	0,00	77,11	6,17	13,96	2,57	0,00	0,58	94,10

Tabulka 4.1: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 2A.

	rafinóza	sacharóza	melibióza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
K	0,00	6,47	0,00	5,44	8,76	2,00	0,00	13,35	27,01
3% sacharóza	0,00	16,92	0,00	15,88	15,22	1,69	0,00	1,84	34,38
3% sorbitol	0,00	2,44	0,00	4,38	4,78	1,87	0,00	26,26	27,11
3% manitol	0,00	0,00	0,00	2,01	4,87	0,89	53,35	0,83	58,27
3% rafinóza	3,36	7,26	19,74	6,81	12,48	2,89	0,00	1,00	31,22

Tabulka 4.2: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 2C.

	rafinóza	sacharóza	melibióza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
K	0,00	10,49	0,00	8,74	12,91	3,12	0,00	19,51	44,63
3% sacharóza	0,00	15,64	0,00	12,39	18,50	2,16	0,00	1,40	32,39
3% sorbitol	0,00	3,39	0,00	5,88	5,99	3,60	0,00	32,92	37,12
3% manitol	0,00	0,00	0,00	6,50	0,00	0,56	36,71	0,00	38,40
3% rafinóza	0,76	4,98	19,73	8,37	8,49	2,36	0,00	1,22	26,02

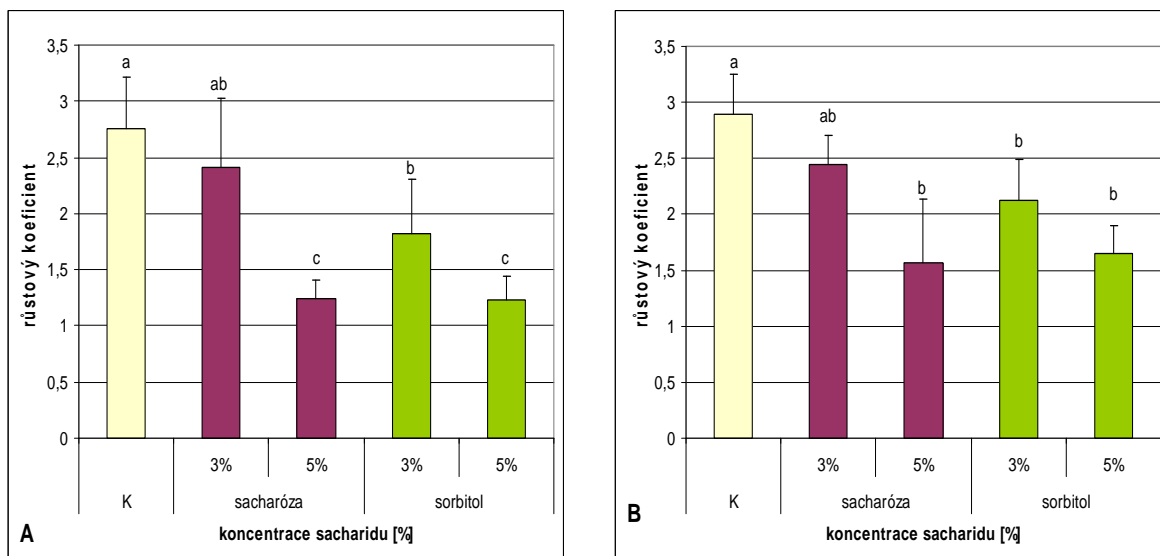
Tabulka 4.3: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 2E.

	rafinóza	sacharóza	melibióza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
K	0,00	6,80	0,00	6,25	9,54	1,36	0,00	16,90	31,50
3% sacharóza	0,00	9,66	0,00	19,15	19,04	1,70	0,00	0,00	46,46
3% sorbitol	0,00	2,47	0,00	3,60	5,64	1,26	0,00	16,25	19,22
3% manitol	0,00	0,00	0,00	1,52	14,55	0,53	19,98	0,00	23,81
3% rafinóza	1,99	4,41	21,13	8,10	8,18	1,12	0,00	3,84	21,24

Tabulka 4.4: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 2G.

4.2.1 Ovlivnění růstu tkáňových kultur různou koncentrací exogenních sacharidů

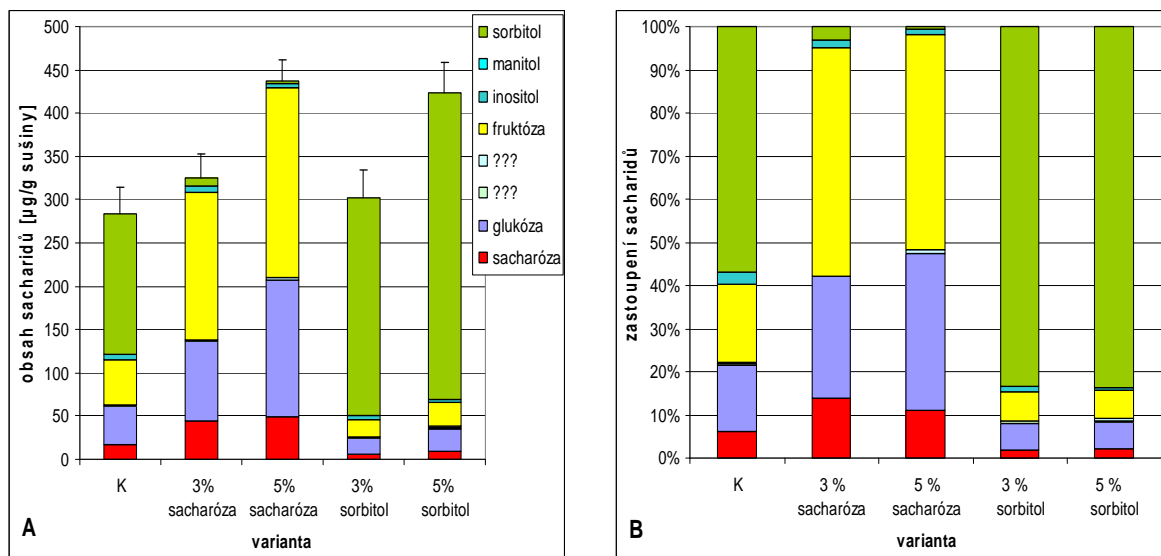
Cílem tohoto experimentu bylo zjistit vliv různého obsahu sacharózy nebo sorbitolu v médiu na růst tkáňových kultur. Tkáňové kultury jabloně *Malus domestica* cv. Šampion Red byly kultivovány na médiích s 3 % a 5 % sacharózy nebo sorbitolu, nebo směsi 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu (**graf 3A, B**). Poslední varianta sloužila jako kontrolní. Růst tkáňových kultur byl vyjádřen pomocí růstového koeficientu. Experiment byl proveden ve dvou opakováních. Nejlepší růst byl pozorován na médiích s 1,5 % sacharózou a 1,5 % sorbitolem, i když rozdíl mezi touto variantou a kulturou pěstovanou na 3% sacharóze nebyl průkazný. U kultur pěstovaných na médiu se 3 % sacharózy nebo sorbitolu jako jediným sacharidem v médiu byl zaznamenán lepší růst než u kultur se stejným sacharidem v 5% koncentraci. Lepší růst kultur byl pozorován na médiu se sacharózou jako jediným sacharidem v médiu v porovnání s kulturami pěstovanými na sorbitolu. Rozdíly mezi variantou pěstovanou na médiu s 3 % sacharózy nebo 3 % sorbitolu však nebyly statisticky průkazné.



Graf 3A, B: Růst tkáňových kultur jabloně kultivaru Šampion Red v závislosti na koncentraci exogenního sacharidu. **A** – 1. opakování, **B** – 2. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).

4.2.2 Obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně při různé koncentraci exogenních sacharidů

U kultur z druhého opakování experimentu použitých pro stanovení růstových charakteristik na médiích s 3 % a 5 % sorbitolu, nebo sacharózy byl sledován obsah endogenních sacharidů (**graf 4A, B**). Se zvyšující se koncentrací sacharidu v médiu stoupal celkový obsah sacharidů. Zatímco u kultur pěstovaných na médiu se sacharózou tvořily převážnou část sacharidového spektra hexózy, u kultur na médiu se sorbitolem přibližně stejnou část sacharidového spektra ~85 % zaujímal sorbitol. S rostoucí koncentrací sacharidu v médiu se vzájemný poměr jednotlivých sacharidů téměř nezměnil, pouze na médiu s vyšší koncentrací sacharózy došlo ke zvýšení podílu glukózy na úkor fruktózy. Ve spektru byly zaznamenány dva neznámé sacharidy. Oba tyto sacharidy byly minoritní složkou sacharidového spektra.



Graf 4A, B: Obsah endogenních sacharidů (A) a zastoupení sacharidů (B) u tkáňových kultur jabloně kultivaru *Šampion Red* v závislosti na koncentraci exogenního sacharidu. 2. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulce 4.5.

	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
K	10,95	7,46	4,67	1,87	0,00	25,23	30,68
3% sacharóza	18,71	13,37	27,57	1,58	0,00	3,69	27,52
5% sacharóza	21,11	14,25	14,04	1,19	0,00	0,69	25,06
3% sorbitol	3,01	4,93	4,93	1,35	0,00	27,94	31,36
5% sorbitol	2,51	4,01	4,33	0,99	0,00	28,81	34,74

Tabulka 4.5: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 4A.

4.3.1 Růst tkáňových kultur jabloně ovlivněných zasolením a osmotickým stresem

V tomto experimentu byly tkáňové kultury vystaveny působení stresu salinity vyvolaného přidáním 50, 100 a 150 mM NaCl do média. Vzhledem k zastavení růstu a silnému hnědnutí kultur pěstovaných na médiu se 150 mM NaCl jsou výsledky pro tuto variantu uvedeny pouze u prvního opakování. Osmotický stres byl vyvolán přidáním 2% manitolu jako penetrujícího osmotika do média. Experiment byl proveden ve dvou variantách, a to na standardním médiu se směsí 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu (**grafy 5A, B**; provedeno ve dvou opakováních) a na médiu s 3 % sacharózy (**graf 5C-E**; provedeno ve třech opakováních). Média s příslušným sacharidem, ale bez NaCl nebo osmotika sloužila jako kontrolní média pro danou variantu. Pro tento experiment byly použity tkáňové kultury obou kultivarů, *M. domestica* cv. Šampion Red a cv. Idared. Růst tkáňových kultur byl vyjádřen pomocí růstového koeficientu.

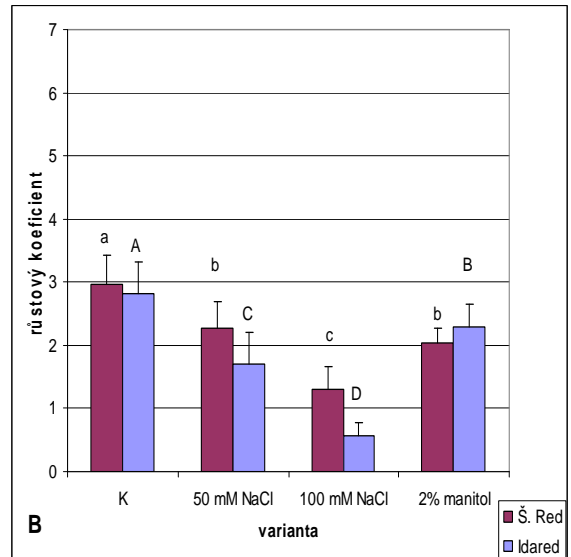
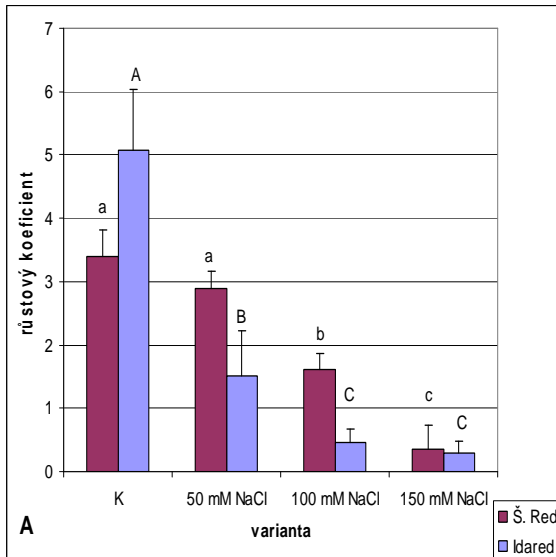
Médium s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu.

U kultur pěstovaných na médiu s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu (**graf 5A, B**) s přidavkem 50 mM NaCl byl zaznamenán horší růst u kultivaru Idared ve srovnání s kultivarem Šampion Red. Další zhoršení růstu na médiu se 100 mM NaCl se projevilo u obou kultivarů, u kultivaru Idared výrazněji. Osmotický stres vyvolaný přidavkem 2 % manitolu (**graf 5B**) do média vedl ke zhoršení růstu ve srovnání s kontrolní variantou zhruba ve stejném rozsahu jako působení 50 mM NaCl. V tomto případě byl méně citlivý cv. Idared.

Médium s 3 % sacharózy.

V případě kultur pěstovaných na médiu se 3 % sacharózy (**graf 5C-E**) lze u všech tří opakování pozorovat výraznější pokles růstového koeficientu u kultur obou kultivarů na médiu se 100 mM NaCl ve srovnání s 50 mM NaCl. Růst na médiu s přidavkem manitolu byl srovnatelný s variantou s 50 mM NaCl v médiu podobně jako u kultur pěstovaných na směsi 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu.

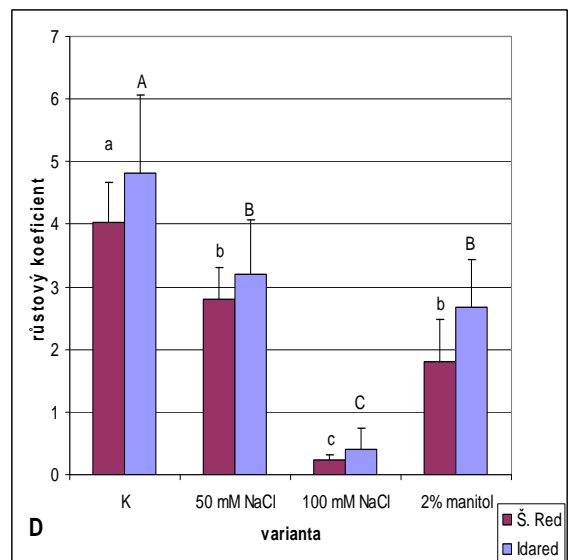
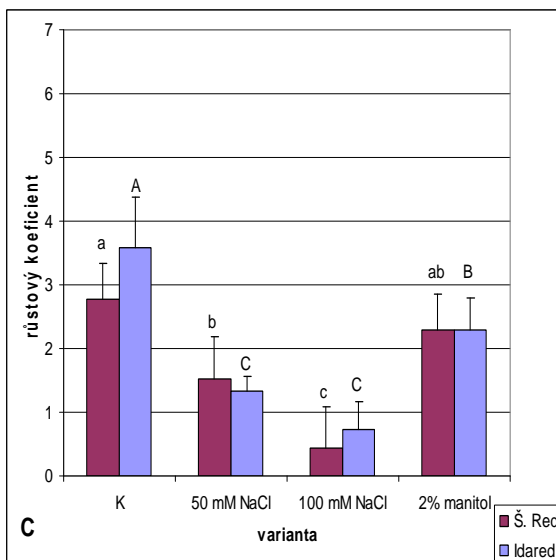
Dále byl u kultur stanoven podíl obsahu vody na čerstvé hmotnosti (**graf 5F-J**). U kultur pěstovaných na médiu s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu byl u prvního opakování zaznamenán u obou kultivarů pokles obsahu vody při mírném stresu zasolení, který se se zvyšujícím se stresem dále prohluboval. Kultury pěstované na médiu s přidavkem manitolu vykazovaly obsah vody srovnatelný s variantou se 100 mM NaCl v médiu. U prvního a třetího opakování kultivace na médiu s 3 % sacharózy (**graf 5H, J**) byl zaznamenán rozdíl v obsahu vody mezi oběma kultivary na médiu se 100 mM NaCl. U ostatních variant nejsou rozdíly mezi kultivary statisticky průkazné. Obsah vody u varianty pěstované na médiu s 50 mM NaCl byl srovnatelný s kontrolou. U všech tří opakování byl obsah vody u kultur pěstovaných na médiu se 100 mM NaCl a 2 % manitolu nižší než u kultur vystavených 50 mM NaCl a kontrolní varianty.

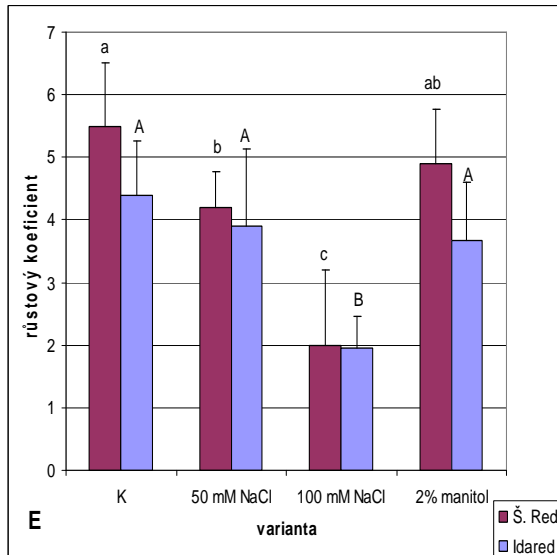


Graf 5A, B: Růst tkáňových kultur jabloně vystavených zasolení a sníženému osmotickému potenciálu média.

Médium s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu.

A – 1. opakování, **B** – 2. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).

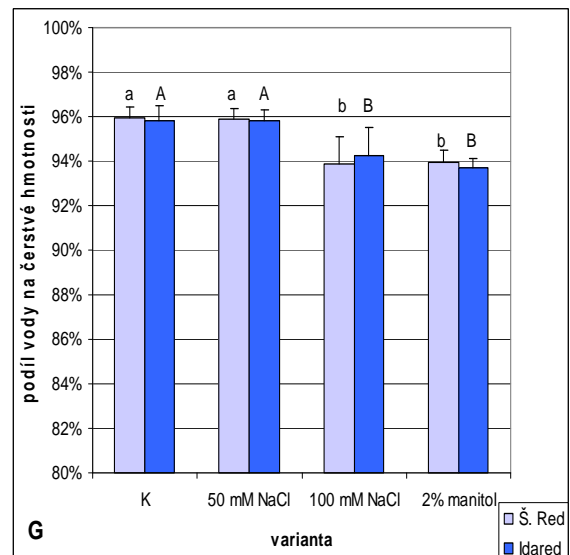
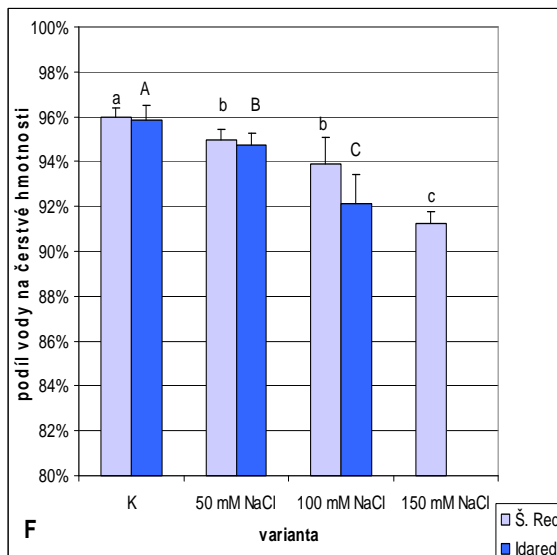




Graf 5C-E: Růst tkáňových kultur jabloně vystavených zasolení a sníženému osmotickému potenciálu média.

Médium s 3 % sacharózy.

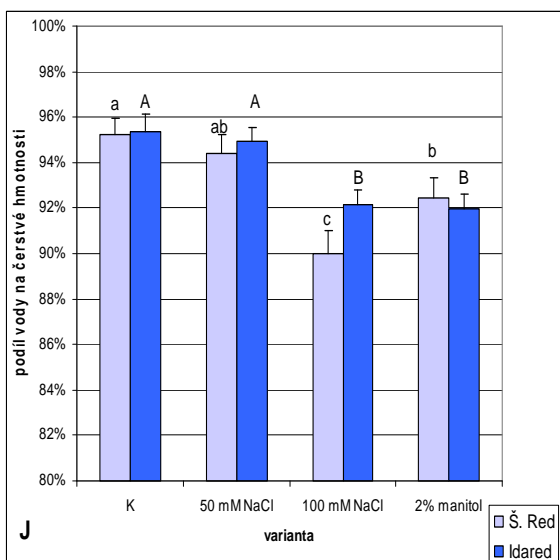
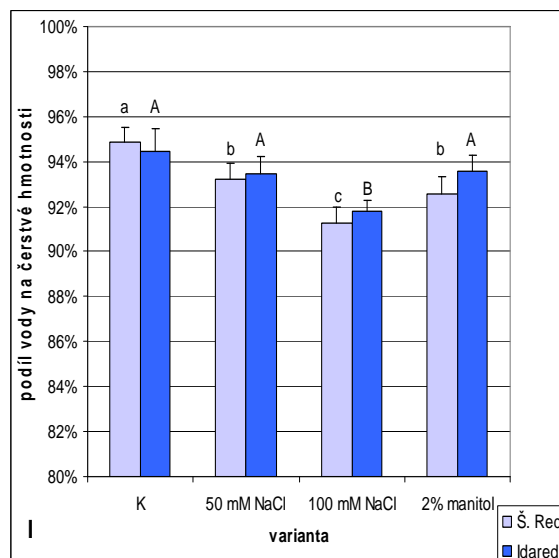
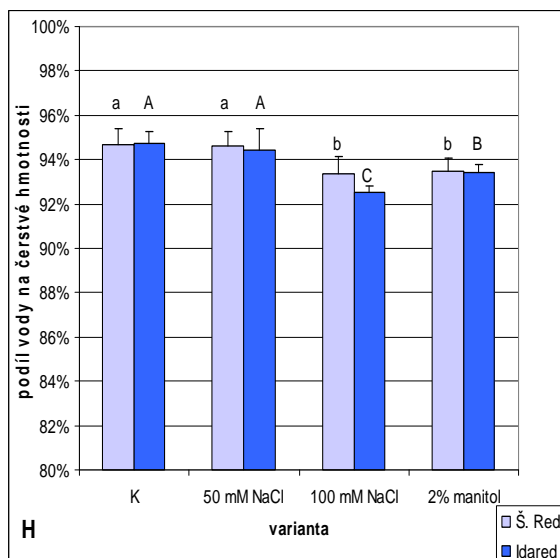
C – 1. opakování, **D** – 2. opakování, **E** – 3. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).



Graf 5F, G: Podíl vody na čerstvé hmotnosti tkáňových kultur jabloně vystavených zasolení a sníženému osmotickému potenciálu média.

Médium s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu.

F – 1. opakování, **G** – 2. opakování, **H** – 3. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).



Graf 5H-J: Podíl vody na čerstvé hmotnosti tkáňových kultur jabloně vystavených zasolení a sníženému osmotickému potenciálu média.

Médium s 3 % sacharózy.

H - 1. opakování, **I** - 2. opakování, **J** - 3. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).

4.3.2 Obsah a spektrum endogenních sacharidů u tkáňových kultur jabloně ovlivněných zasolením a osmotickým stresem

Tkáňové kultury, u kterých byly stanoveny růstové charakteristiky, byly použity také pro stanovení obsahu endogenních sacharidů. Experiment byl proveden ve dvou variantách a to na médiu s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu, nebo 3 % sacharózy.

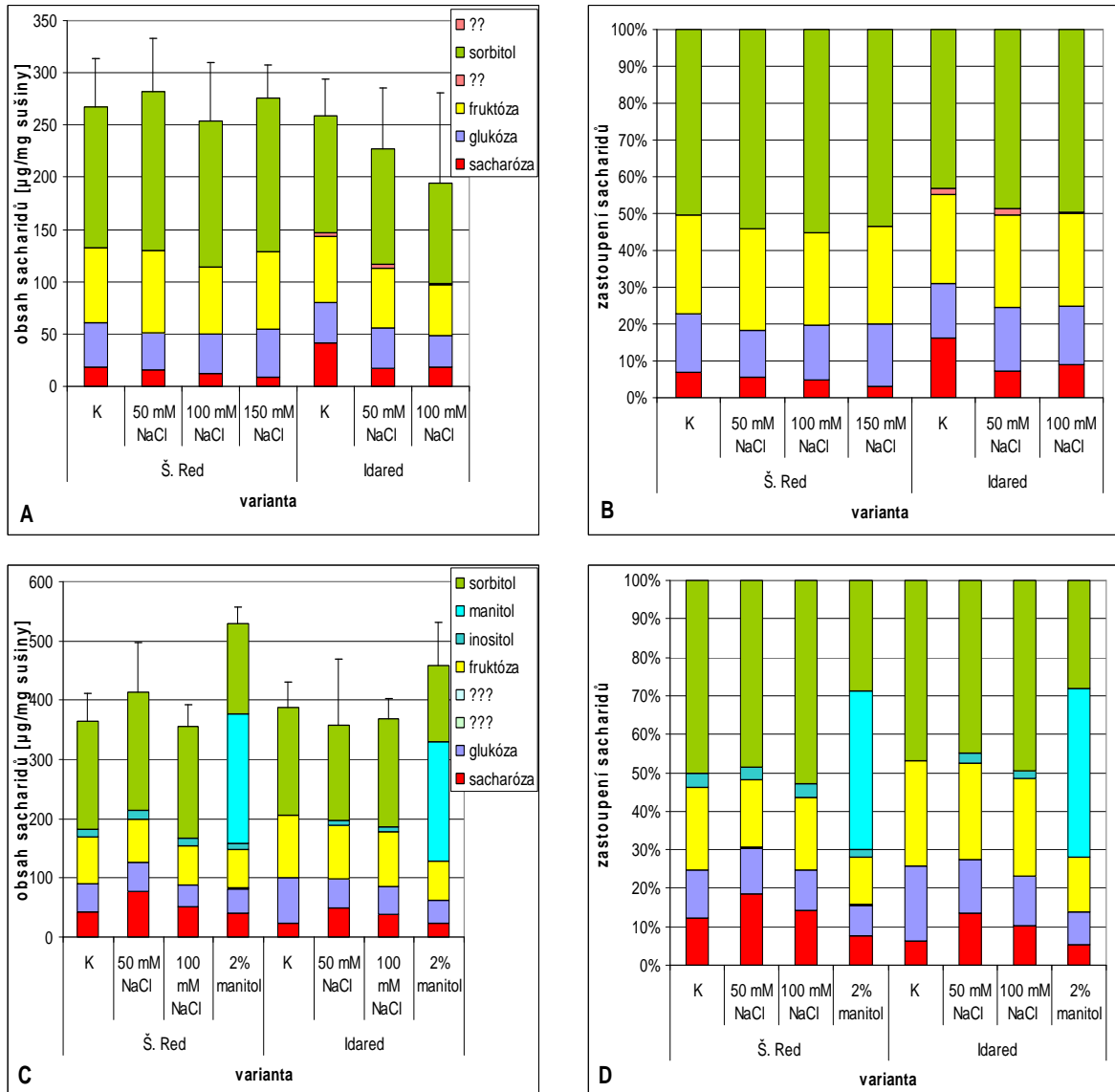
Tkáňové kultury s 1,5 % sorbitolu a 1,5 % sacharózy v médiu

U obou opakování (**graf 6A, C**) celkový obsah sacharidů v případě kultivaru Šampion Red při mírném stresu zasolení vzrostl, při silnějším stresu opět klesl na úroveň srovnatelnou s kontrolní variantou. V případě varianty pěstované s přidavkem 150 mM NaCl v médiu se projevilo okamžité zastavení růstu kultur a v případě kultivaru Idared také silné hnědnutí.

V prvním opakování jsou proto uvedeny výsledky pouze pro kultivar Šampion Red. Ve druhém opakování byla proto varianta s přidavkem 150 mM NaCl v médiu nahrazena variantou se 2 % manitolu. Kultivar Idared vykazoval klesající tendenci celkového obsahu sacharidů se vzrůstajícím stresem zasolení, rozdíly ovšem nejsou statisticky průkazné, v případě druhého opakování celkový obsah sacharidů stagnoval. Zejména ve druhém opakování se také projevíly změny v sacharidovém spektru. Při mírném stresu zasolení byl zaznamenán nárůst obsahu sacharózy na úkor hexóz u obou kultivarů. Se silnějším stresem obsah sacharózy klesl. U varianty s přidavkem manitolu zaujímal tento cukerný alkohol ~40 % rozpustných sacharidů na úkor ostatních sacharidů.

Tkáňové kultury s 3 % sacharózy v médiu

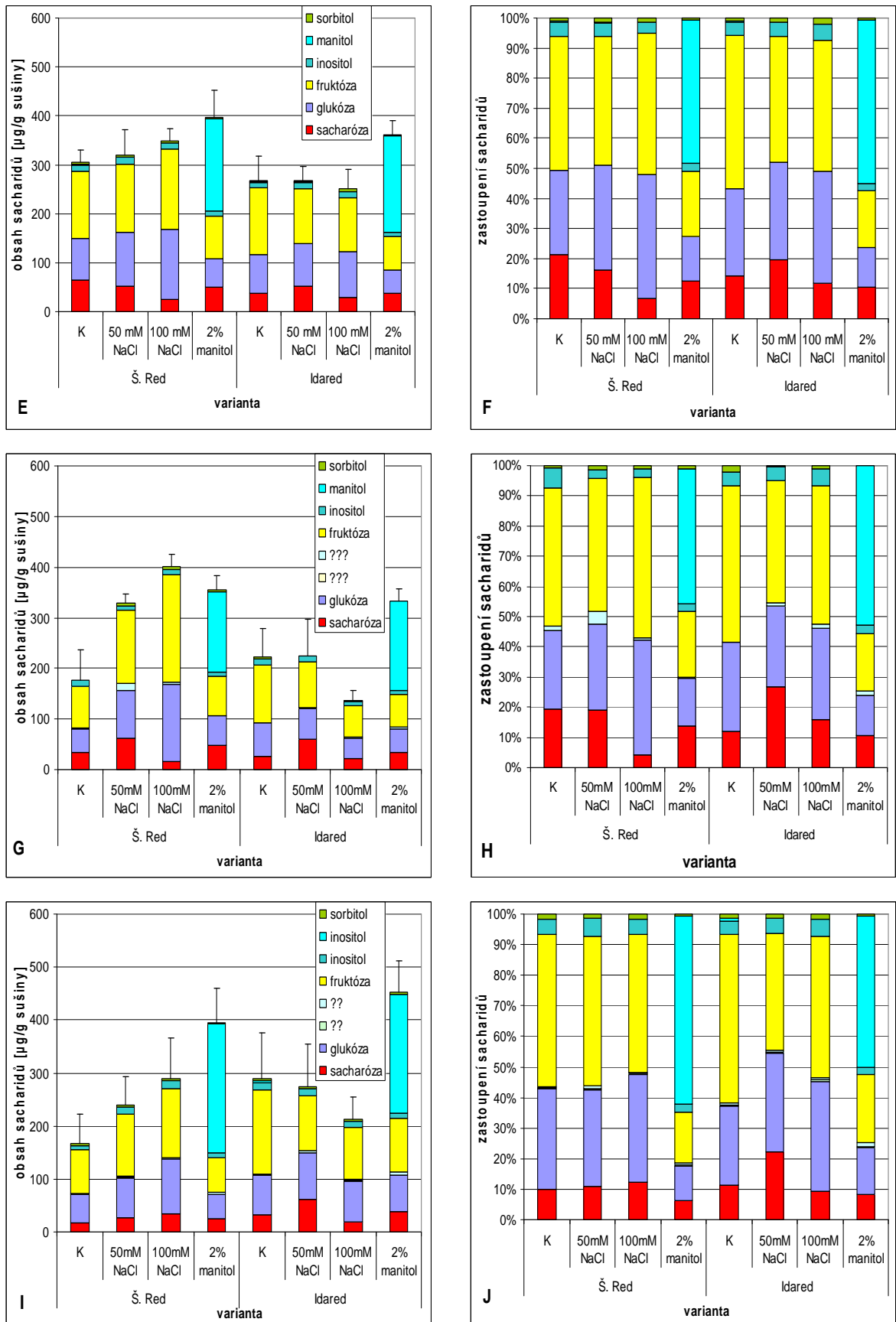
U všech tří opakování (**graf 6E, G, I**) měl celkový obsah sacharidů u kultivaru Šampion Red vzrůstající tendenci, na rozdíl od kultivaru Idared, kde byl obsah sacharidů u varianty s 50 mM NaCl v médiu srovnatelný s kontrolní variantou, se silnějším stresem zasolení klesal. V prvních dvou opakováních (**graf 6F, H**) byl za nárůst obsahu sacharidů u kultivaru Šampion Red přednostně odpovědný nárůst obsahu hexóz, především glukózy, zatímco obsah sacharózy se se zvyšujícím se stresem zasolení snižoval. Ve třetím opakování (**graf 6J**) obsah sacharózy se zvyšujícím se stresem u kultivaru Šampion Red mírně vzrostl. Sorbitol tvořil u všech variant minoritní složku celkových sacharidů ~1-2 %. Nejvíce zastoupeným sacharidem u všech variant kromě varianty s 2 % manitolu v médiu byla fruktóza tvořící přibližně 45 % celkových sacharidů. U kultur pěstovaných na médiu s přidavkem 2 % manitolu tvořil manitol přibližně 50 % celkového obsahu sacharidů, fruktóza zde tvořila pouze 20 % u obou kultivarů. U všech tří opakování byl podíl sacharózy u kultivaru Idared na médiu s 50 mM NaCl vyšší než u kontrolní varianty. U varianty s přidavkem 2 % manitolu byl celkový obsah sacharidů nejvyšší. U této varianty jako jediný nebyl sorbitol v sacharidovém spektru zastoupen. Obsah sacharózy byl u kultivaru Šampion Red značně heterogenní. Zatímco v prvním opakování obsah tohoto sacharidu klesl již při mírném stresu zasolení, ve druhém opakování se projevil mírný nárůst. Teprve při silnějším stresu zasolení její obsah opět klesl. V případě kultivaru Idared byla zaznamenána akumulace sacharózy spolu se snížením obsahu hexóz při mírném stresu, při silnějším stresu obsah sacharózy klesl na úroveň kontrolní varianty.



Graf 6A-D: Obsah a spektrum endogenních sacharidů u tkáňových kultur jabloně vystavených zasolení a sníženému osmotickému potenciálu média.

Médium s 1,5 % sorbitolu a 1,5 % sacharózy.

A, B – 1. opakování, **C, D** - 2. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; úsečky znázorňují směrodatné odchytky. celkových obsahů sacharidů. Směrodatné odchytky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulce 4.6 a 4.7.



Graf 6E-J: Obsah a spektrum endogenních sacharidů u tkáňových kultur jabloně vystavených zasolení a sníženému osmotickému potenciálu média.

Médium s 3 % sacharózy.

E, F – 1. opakování; **G, H** - 2. opakování; **I, J** – 3. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých

		sacharóza	glukóza	fruktóza	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	7,67	10,33	12,42	22,84	46,47
	50 mM NaCl	7,93	15,78	17,44	30,07	50,89
	100 mM NaCl	4,88	14,64	19,40	26,62	55,86
	150 mM NaCl	1,43	11,39	11,65	12,34	31,58
Idared	K	7,83	7,71	13,01	12,63	35,98
	50 mM NaCl	5,32	9,67	15,31	30,77	57,36
	100 mM NaCl	7,27	20,50	18,64	43,89	87,06

Tabulka 4.6: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 6A (1. opakování).

		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	23,58	11,39	13,81	3,32	0,00	25,25	46,36
	50 mM NaCl	20,23	13,80	18,08	2,94	0,00	41,17	82,39
	100 mM NaCl	11,69	5,63	10,65	2,57	0,00	24,26	37,46
	2% manitol	11,36	3,98	9,04	2,02	15,34	11,76	28,68
Idared	K	8,60	9,36	15,54	0,00	0,00	26,92	42,12
	50 mM NaCl	26,17	17,93	26,41	11,99	0,00	50,03	111,36
	100 mM NaCl	10,33	13,68	12,70	9,78	0,00	14,54	34,80
	2% manitol	10,17	10,69	12,54	0,00	37,47	21,22	72,83

Tabulka 4.7: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 6C (2. opakování).

		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	33,91	15,09	29,85	4,02	1,07	0,90	25,50
	50 mM NaCl	13,11	22,48	24,19	2,61	0,25	1,91	51,74
	100 mM NaCl	4,78	14,42	12,73	3,60	0,11	1,13	24,84
	2% manitol	13,18	8,87	16,68	2,37	26,03	0,89	56,20
Idared	K	13,17	19,66	31,34	1,91	1,45	1,08	50,16
	50 mM NaCl	15,61	14,74	21,68	2,07	0,75	1,26	29,01
	100 mM NaCl	5,16	20,22	20,85	3,04	0,16	1,93	39,90
	2% manitol	13,77	7,30	16,39	1,05	34,79	0,63	29,18

Tabulka 4.8: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 6E (1. opakování).

		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	21,11	11,60	31,82	4,82	0,00	0,98	58,64
	50mM NaCl	14,48	11,71	13,66	1,28	0,00	2,57	18,60
	100mM NaCl	8,55	17,12	13,16	2,69	0,00	1,06	25,11
	2% manitol	12,94	8,30	10,34	1,59	17,67	1,14	27,85
Idared	K	10,36	25,35	34,54	4,81	0,00	2,27	56,36
	50mM NaCl	32,45	27,02	38,31	4,31	0,00	1,20	72,55
	100mM NaCl	10,59	5,92	9,46	2,35	0,00	1,23	20,27
	2% manitol	6,20	9,70	15,13	3,03	10,51	0,00	23,89

Tabulka 4.9: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 6G (2. opakování).

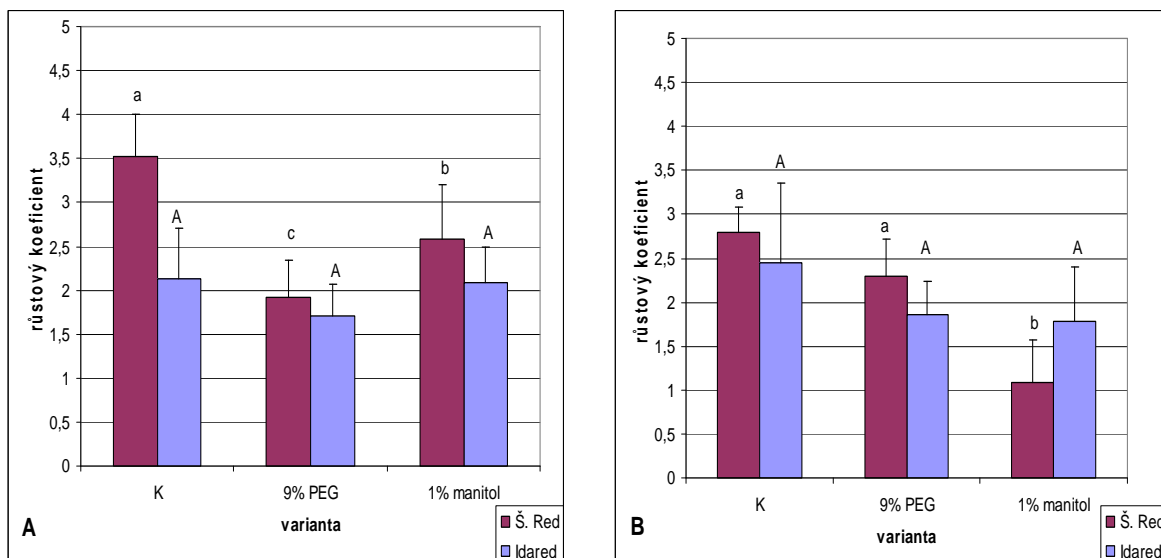
		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	31,49	20,58	45,27	4,81	3,33	0,79	86,96
	50mM NaCl	10,95	16,12	29,55	2,77	0,00	2,04	42,29
	100mM NaCl	27,26	38,97	38,35	2,79	0,00	1,32	80,63
	2% manitol	20,79	19,33	18,63	4,64	45,48	0,78	60,59
Idared	K	11,65	10,37	42,15	1,89	0,00	2,26	55,06
	50mM NaCl	14,17	35,38	39,49	2,19	0,00	0,93	77,62
	100mM NaCl	8,61	13,33	40,22	1,35	0,29	2,26	53,22
	2% manitol	14,69	10,62	29,33	2,55	39,89	1,03	64,58

Tabulka 4.10: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 6I (3. opakování).

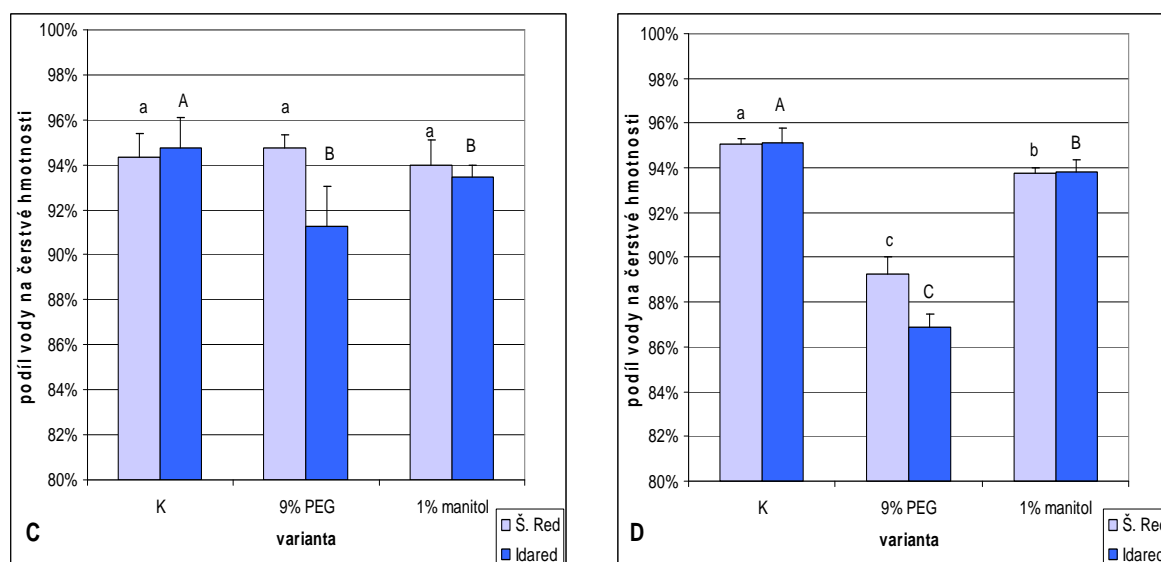
4.4.1 Vliv penetrujícího a nepenetrujícího osmotika na růst tkáňových kultur jabloně

V tomto experimentu bylo sledováno ovlivnění růstu tkáňových kultur jabloně kultivarů Šampion Red a Idared osmotickým stresem. Tkáňové kultury byly vysazeny na standardní médium s přidavkem 9 % PEGu (nepenetrující osmotikum), nebo 1 % manitolu (penetrující osmotikum). Samotné standardní médium bylo použito jako kontrolní varianta. Obě látky v daných koncentracích vyvolávají pokles osmotického potenciálu média o přibližně stejnou hodnotu (-0,44 MPa pro manitol, -0,43 MPa pro PEG). Růst tkáňových kultur byl vyjádřen pomocí růstového koeficientu. Experiment byl proveden ve dvou opakováních (**graf 7A, B**). U prvního opakování (**graf 7A**) byl zaznamenán lepší růst kultur na médiu s 1% manitolu ve srovnání s médiem s přidavkem 9 % PEGu, tento rozdíl byl statisticky průkazný pouze u kultivaru Šampion Red. V růstu kultur obou kultivarů u jednotlivých variant nebyly zjištěny průkazné rozdíly.

Dále byl u kultur stanoven obsah vody (**graf 7C, D**). U kultivaru Idared byl obsah vody na médiu s 9 % PEGu nižší než u kultivaru Šampion Red v obou opakováních. Tento rozdíl byl statisticky průkazný pouze u prvního opakování. Na médiu s 1 % manitolu byl obsah vody nižší než u kontroly. Tento rozdíl byl průkazný pouze u druhého opakování, pro kultivar Idared i v prvním opakování.



Graf 7A-B: Růst tkáňových kultur jabloně vystavených osmotickému stresu. **A** – 1. opakování, **B** – 2. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).



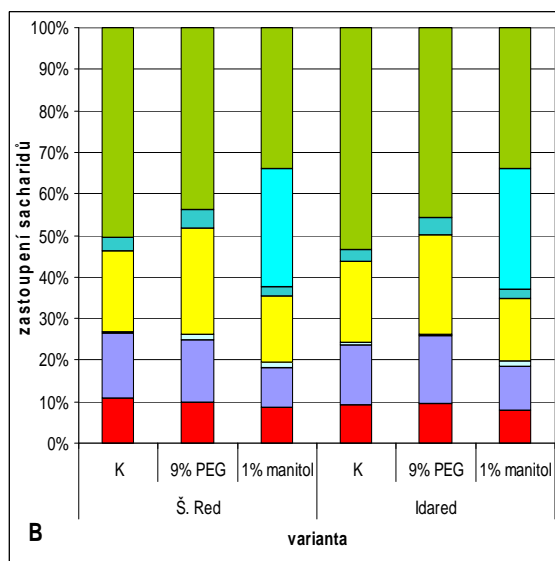
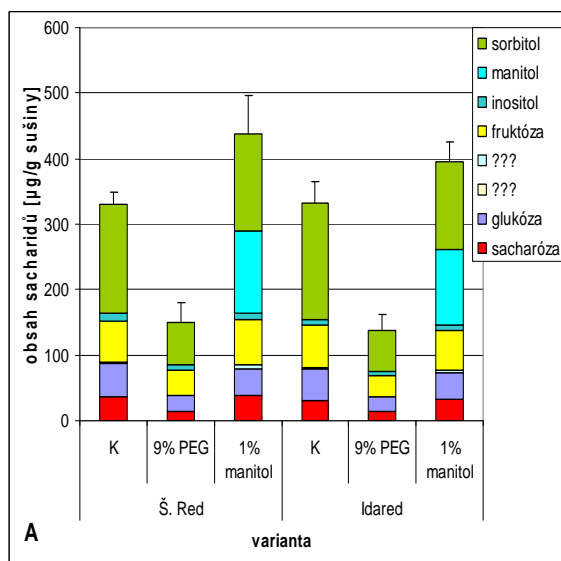
Graf 7C, D: Obsah vody u tkáňových kultur jabloně vystavených osmotickému stresu. **C** – 1. opakování, **D** – 2. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).

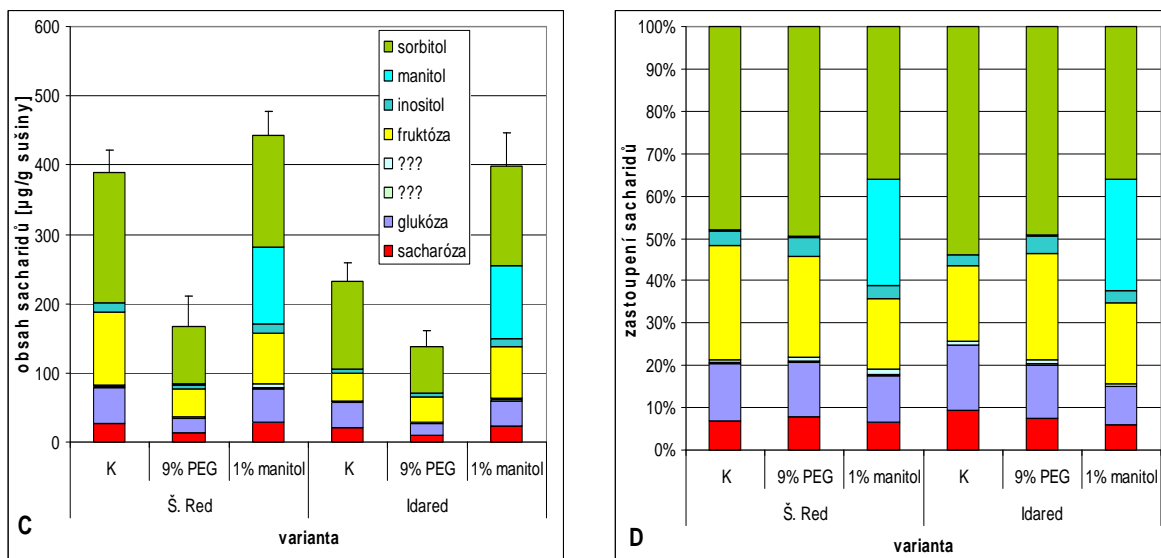
4.4.2 Vliv osmotického stresu na obsah endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně

U kultur vystavených osmotickému stresu byly sledovány změny obsahu a spektra endogenních sacharidů. Celkový obsah sacharidů byl nejvyšší v případě média s přídavkem 1 % manitolu u obou kultivarů. Naopak nejnižší obsah sacharidů byl zaznamenán u kultur

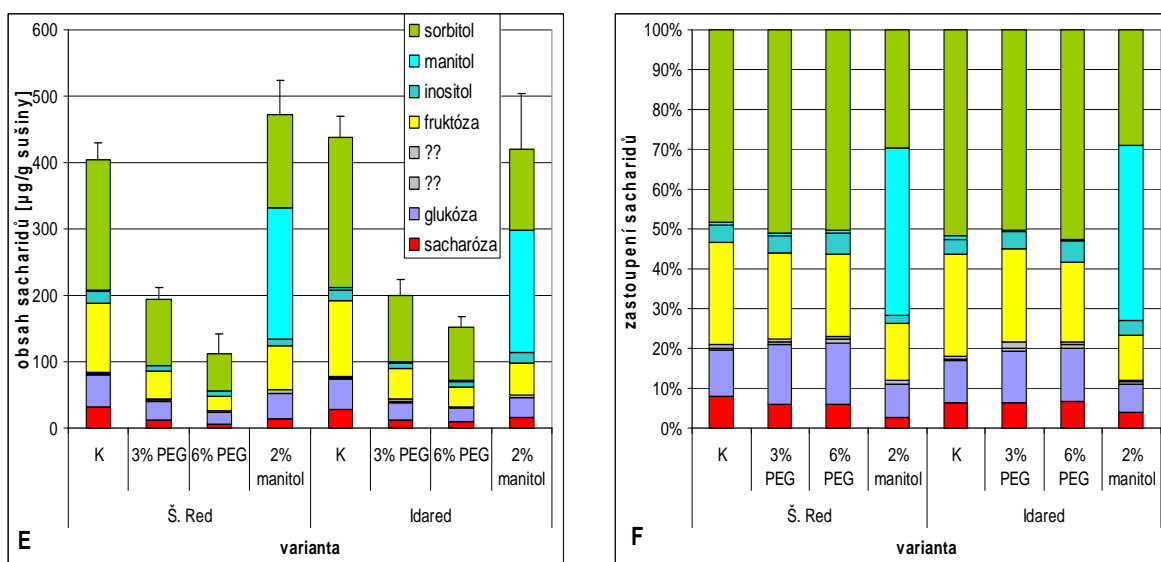
s 9 % PEGu v médiu. V prvním opakování (**graf 8B**) byl zjištěn nárůst podílu hexóz u kultur na médiu s 9 % PEGu u obou kultivarů. U druhého opakování (**graf 8D**) se však tento nárůst neprojevil. U kultur na médiu s 1 % manitolu došlo k akumulaci manitolu přijatého z média na úkor sorbitolu a hexóz. Mezi oběma kultivary zde nebyly zjištěny žádné rozdíly.

Následně byly kultury vystaveny PEGu v 3% a 6% koncentraci nebo v 2% koncentraci (**graf 8E, F**). V případě PEGu se celkový obsah sacharidů snižoval s rostoucí osmotickou zátěží vyvolané nepenetrujícím osmotikem u obou kultivarů. V případě varianty pěstované na médiu s přidavkem manitolu byl obsah celkových sacharidů srovnatelný s kontrolní variantou. Převážnou část obsahu rozpustných sacharidů přesahující 40 % u této varianty tvořil manitol přijatý z média. Manitol se v těchto kulturách akumuloval na úkor ostatních sacharidů. Nejvýrazněji byl ovlivněn obsah sorbitolu, jehož podíl na celkovém obsahu sacharidů byl v tomto případě nejnižší u obou kultivarů. Také zde nebyly zaznamenány žádné rozdíly mezi kultivary.





Graf 8A-D: Obsah a složení endogenních sacharidů u tkáňových kultur jableň vystavených osmotickému stresu. **A, B** – 1. opakování; **C, D** – 2. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulce 4.11 a 4.12.



Graf 8E, F: Obsah a složení endogenních sacharidů u tkáňových kultur jableň vystavených osmotickému stresu. **E, F** – 1. opakování; doba kultivace: 14 dní; n=12; úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulce 4.13.

		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	8,98	5,78	8,02	2,15	0,00	10,91	19,85
	9% PEG	4,18	5,90	7,29	1,23	0,00	13,68	29,42
	1% manitol	10,58	5,16	11,38	1,51	22,57	24,65	60,65
Idared	K	4,92	7,53	15,16	2,55	0,00	19,76	32,27
	9% PEG	4,01	4,90	6,08	1,16	0,00	10,51	24,51
	1% manitol	7,26	4,73	9,51	2,14	9,17	11,01	30,44

Tabulka 4.11: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 8A.

		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	7,45	8,02	9,00	2,99	0,44	19,31	32,61
	9% PEG	6,50	6,23	9,41	1,65	0,55	23,60	45,58
	1% manitol	4,92	7,96	23,41	2,27	11,40	17,19	34,86
Idared	K	4,62	7,46	10,61	1,04	0,00	13,05	27,73
	9% PEG	1,51	5,86	8,08	1,58	0,19	10,62	22,89
	1% manitol	5,97	6,54	9,41	2,67	13,19	18,37	47,78

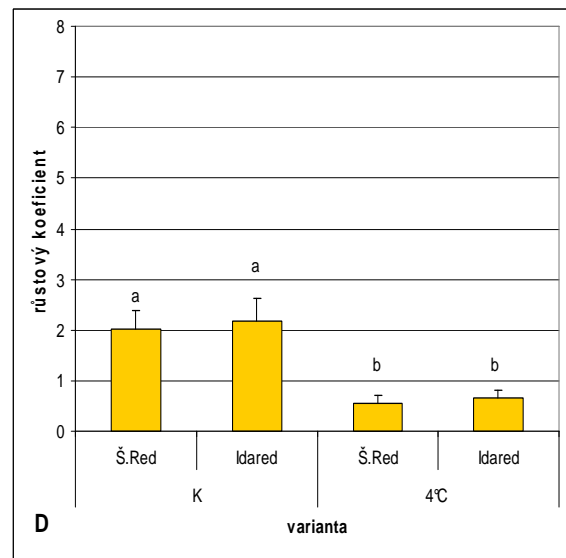
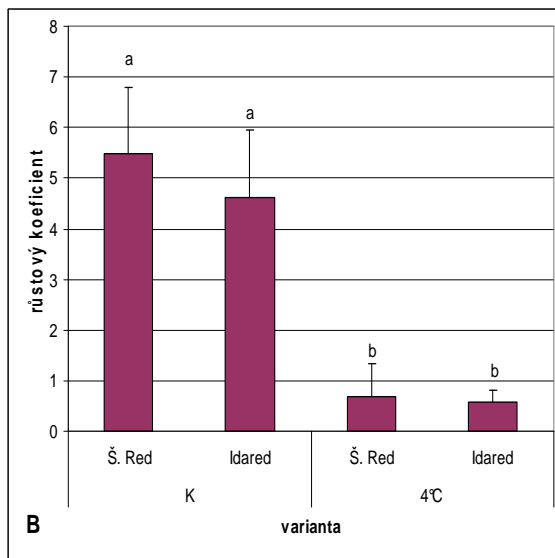
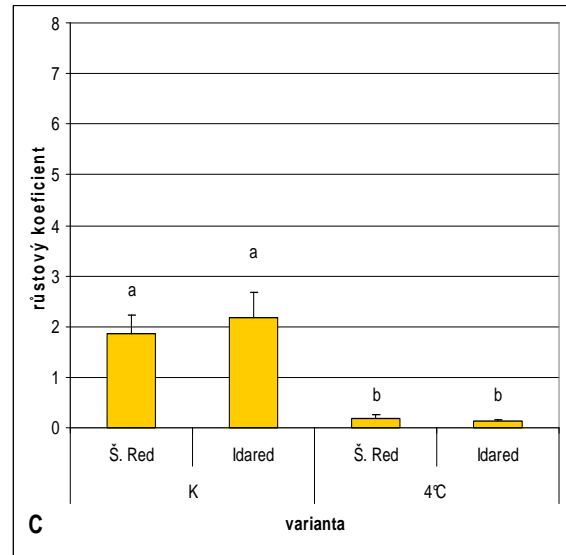
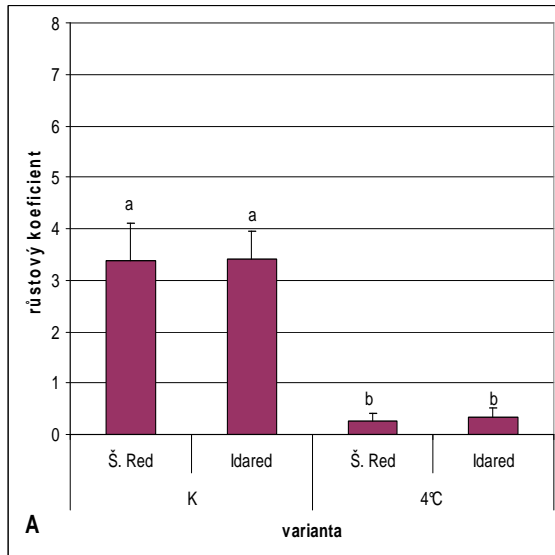
Tabulka 4.12: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 8C.

		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	4,36	3,71	11,48	3,11	0,74	17,39	25,87
	3% PEG	3,51	3,28	6,68	1,87	0,12	7,63	18,63
	6% PEG	3,04	3,93	6,42	1,88	0,15	16,80	30,33
	2% manitol	4,66	9,72	7,70	2,28	26,63	16,96	52,51
Idared	K	6,42	3,93	9,16	2,69	2,39	15,68	32,24
	3% PEG	3,20	5,55	8,29	1,32	0,28	9,12	22,36
	6% PEG	4,29	3,12	4,77	1,76	0,12	7,14	15,87
	2% manitol	3,95	7,87	20,93	15,00	35,21	24,15	83,12

Tabulka 4.13: Směrodatné odchylky prezentované v grafu 8E.

4.5.1 Ovlivnění růstu tkáňových kultur jabloně chladovým stresem

V tomto experimentu byly tkáňové kultury vystaveny působení 4°C po dobu 10 dnů. Bylo sledováno ovlivnění odolnosti kultur k nízkým teplotám v závislosti na druhu exogenního sacharidu, proto byly tkáňové kultury vysazeny na médium s 3 % sacharózy (**graf 9A, B**) nebo s 3 % rafinózy (**graf 9C, D**). Obě varianty experimentu byly provedeny ve dvou opakováních. Růst kultur byl vyjádřen pomocí růstového koeficientu. Jak na médiu se sacharózou, tak i na médiu s rafinózou došlo u kultur obou kultivarů vystavených nízké teplotě k výraznému zpomalení růstu a projevílo se hnědnutí kultur. V porovnání růstu obou kultivarů nebyly u kultur vystavených chladu zaznamenány průkazné rozdíly. Také při porovnání kultur pěstovaných na sacharóze nebo rafinóze vystavených stresu nebyly zjištěny průkazné rozdíly. Dále byl u kultur stanoven obsah vody. V případě kultur pěstovaných na médiu s 3 % sacharózy byl obsah vody u kultivaru Šampion Red vystaveného 4°C nižší než u kultivaru Idared (**graf 9E, F**). Tento rozdíl byl průkazný pouze v prvním opakování (**graf 9E**). U kultur pěstovaných na médiu s 3 % rafinózy nebyly zjištěny průkazné rozdíly mezi variantou vystavenou chladu a kontrolní kulturou, ani v porovnání obou kultivarů mezi sebou (**graf 9G, H**).



Graf 9A-B: Růst tkáňových kultur jabloně vystavených chladovému stresu.

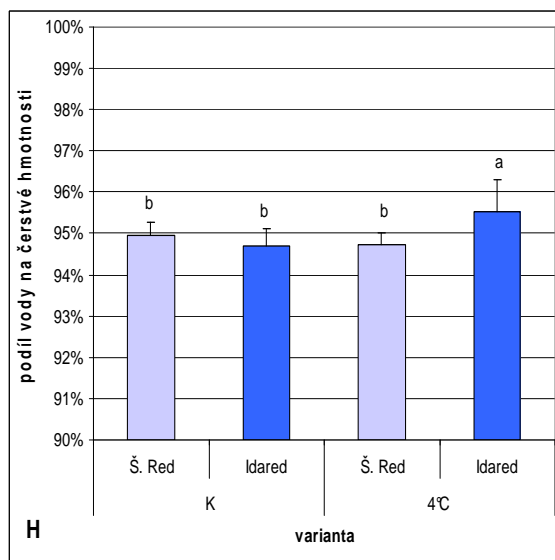
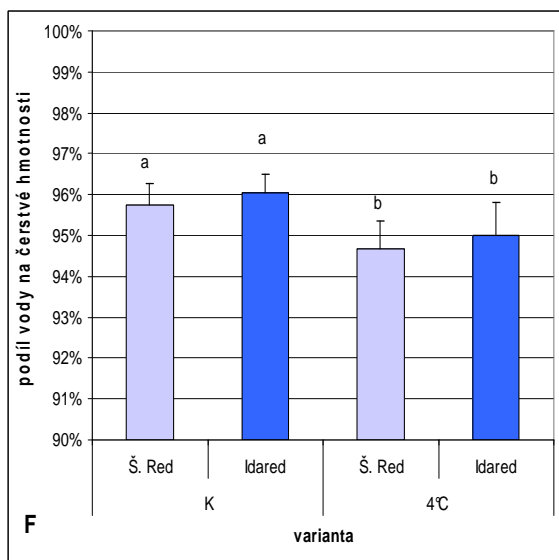
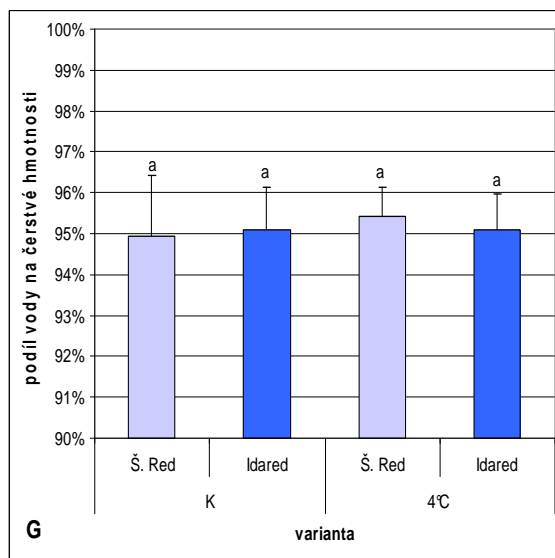
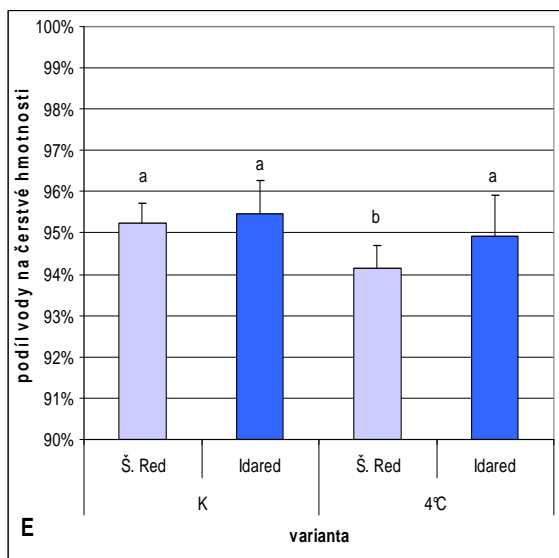
Médium s 3 % sacharózy.

A – 1. opakování, **B** – 2. opakování; doba kultivace: 10 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).

Graf 9C-D: Růst tkáňových kultur jabloně vystavených chladovému stresu.

Médium s 3 % rafinózy.

A – 1. opakování, **B** – 2. opakování; doba kultivace: 10 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).



Graf 9E-F: Podíl vody na čerstvé hmotnosti tkáňových kultur jabloně vystavených chladovému stresu.

Médium s 3% sacharózy.

E – 1. opakování, **F** – 2. opakování; doba kultivace: 10 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).

Graf 9G-H: Podíl vody na čerstvé hmotnosti tkáňových kultur jabloně vystavených chladovému stresu.

Médium s 3% rafinózy.

G – 1. opakování, **H** – 2. opakování; doba kultivace: 10 dní; n=12; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).

4.5.2 Obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně vystavených chladovému stresu

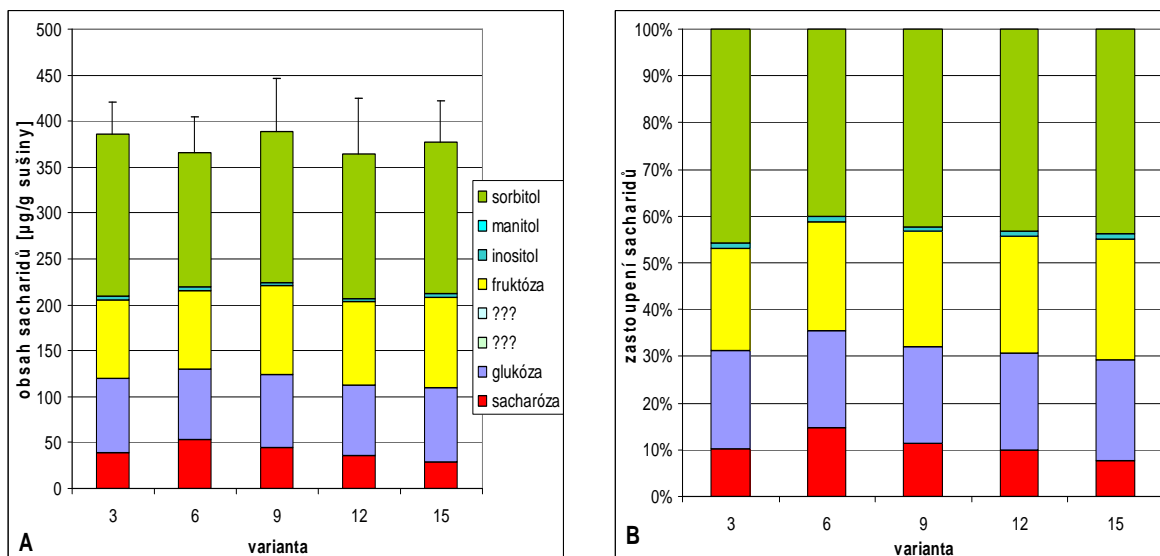
Následně byl u kultur sledován vliv chladového stresu na obsah a spektrum endogenních sacharidů. Experiment byl proveden ve dvou variantách, a to na médiu s 3 % sacharózy (**graf 10C, D**) a na médiu s 3 % rafinózy (**graf 10E-H**). Orientačně byl proveden experiment, ve kterém byly kultury vysazeny na médium se směsí 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu (**graf 10A, B**). U těchto kultur byly sledovány změny v obsahu rozpustných sacharidů v třídních intervalech pod dobu 15 dnů. V celkovém obsahu sacharidů zde nebyly zaznamenány průkazné rozdíly. Šestý den působení chladu byl zaznamenán nárůst obsahu sacharózy, který se dále s časem snižoval s nárůstem obsahu hexóz (**graf 10B**).

Tkáňové kultury s 3 % sacharózy v médiu

V prvním opakování (**graf 10C, D**) byl zaznamenán nárůst celkového obsahu sacharidů u obou kultivarů vystavených chladovému stresu. Tento rozdíl však nebyl statisticky průkazný. Sorbitol byl u všech variant minoritním sacharidem tvořícím ~ 1 % rozpustných sacharidů. Pouze u kultivaru Šampion Red vystaveného chladu byl zaznamenán mírný nárůst obsahu sorbitolu. U kultur obou kultivarů vystavených stresu byl zjištěn pokles obsahu sacharózy spojený s nárůstem obsahu hexóz, především glukózy.

Tkáňové kultury s 3 % rafinózy v médiu

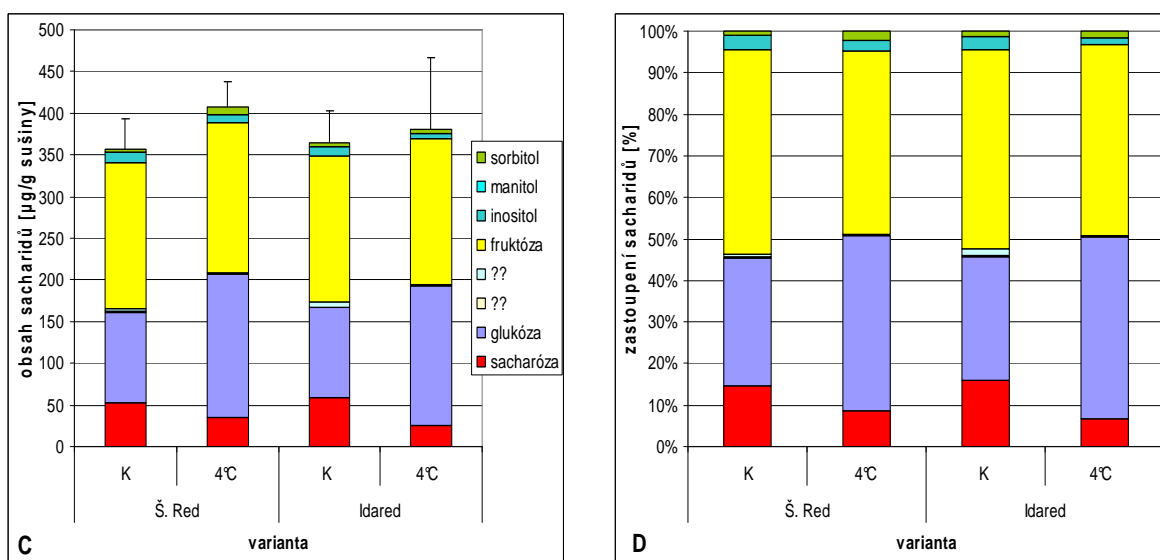
V případě této varianty byla použita kolona IEX Ca²⁺, která dobře dělí rafinózu od sacharózy, protože v tomto experimentu bylo podstatné především zjistit obsah rafinózy (viz kapitola 3.3.2). Na této koloně však nelze rozlišit sacharózu od melibiózy a fruktózu od inositolu, proto jsou v grafech uvedeny souhrnné obsahy pro obě dvojice sacharidů. U obou opakování (**graf 10E, G**) došlo ke zdatelnému nárůstu celkového obsahu sacharidů u obou kultivarů vystavených chladovému stresu, podobně jako v případě média se sacharózou. Za toto navýšení byla přednostně odpovědná rafinóza. Vlivem nízké teploty došlo k navýšení jejího obsahu z 2 % - 3 % u kontrolních kultur na 10 % - 15 % u kultur vystavených chladu (**graf 10F, H**). Také bylo v souvislosti s působením chladu zaznamenáno navýšení obsahu hexóz, nicméně přesný obsah fruktózy zde nebylo možné stanovit.



Graf 10A, B: Obsah a spektrum endogenních sacharidů u tkáňových kultur jabloně vystavených chladovému stresu.

Médium s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu.

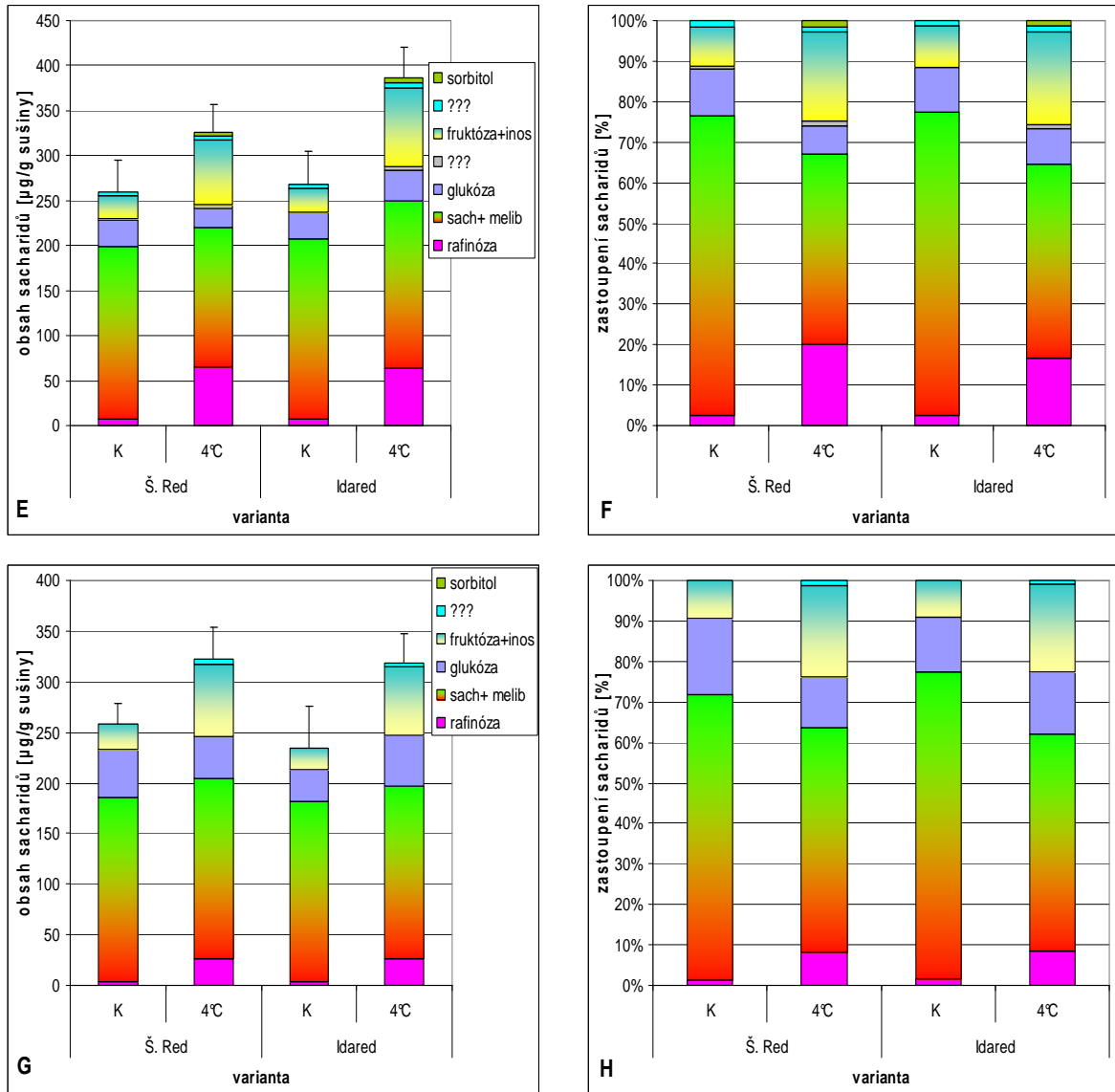
A, B - 1. opakování; doba kultivace: 15 dní; n=8; úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulce 4.14.



Graf 10C, D: Obsah a spektrum endogenních sacharidů u tkáňových kultur jabloně vystavených chladovému stresu.

Médium s 3 % sacharózy.

C, D - 1. opakování; doba kultivace: 10 dní; n=12; úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulce 4.15.



Graf 10E-H: Obsah a spektrum endogenních sacharidů u tkáňových kultur jabloně vystavených chladovému stresu.

Médium s 3 % rafinózy.

E, F - 1. opakování, **G, H** – 2. opakování; doba kultivace: 10 dní; n=12; úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulce 4.16 a 4.17.

	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
3	7,68	7,67	5,63	1,42	0,00	17,87	34,48
6	6,15	12,40	9,11	0,90	0,00	20,30	39,15
9	13,61	18,55	13,20	0,65	0,00	20,29	58,15
12	9,45	12,84	15,36	0,71	0,00	28,73	60,68
15	6,83	10,24	13,74	0,63	0,00	18,37	43,96

Tabulka 4.14: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 10A

		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	8,86	18,01	17,63	2,53	0,00	2,27	35,99
	4°C	23,23	12,34	23,05	3,16	0,00	0,87	29,56
Idared	K	6,53	19,78	17,34	1,96	0,00	2,18	39,58
	4°C	27,63	27,29	28,57	4,31	0,00	2,29	84,77

Tabulka 4.15: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 10C

		rafinóza	sach + melib	glukóza	fruktóza+inos	inositol	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	5,31	27,47	5,96	9,11	0,00	0,00	35,81
	4°C	20,19	34,99	9,74	9,63	0,00	0,80	30,22
Idared	K	3,75	26,21	8,32	6,73	0,00	0,00	36,72
	4°C	23,54	23,27	6,44	14,19	0,00	1,44	34,34

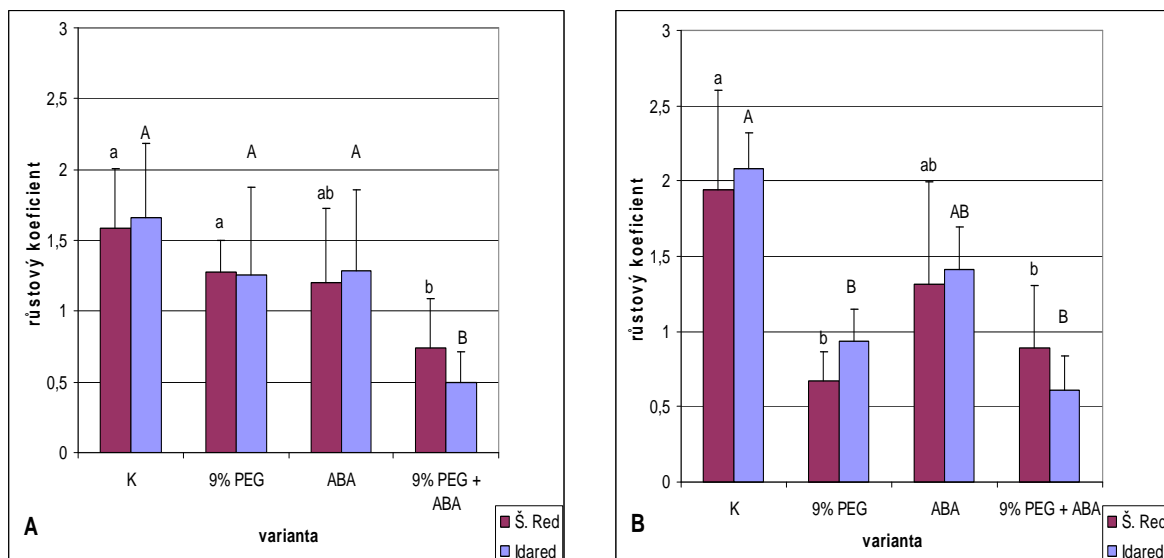
Tabulka 4.16: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 10E

		rafinóza	sach + melib	glukóza	fruktóza+inos	inositol	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	1,74	15,52	5,84	6,02	0,00	0,00	20,23
	4°C	7,64	21,34	11,01	10,38	0,00	0,00	31,71
Idared	K	1,58	33,73	19,83	6,68	0,00	0,00	41,62
	4°C	5,76	11,45	7,75	11,93	0,00	0,00	28,52

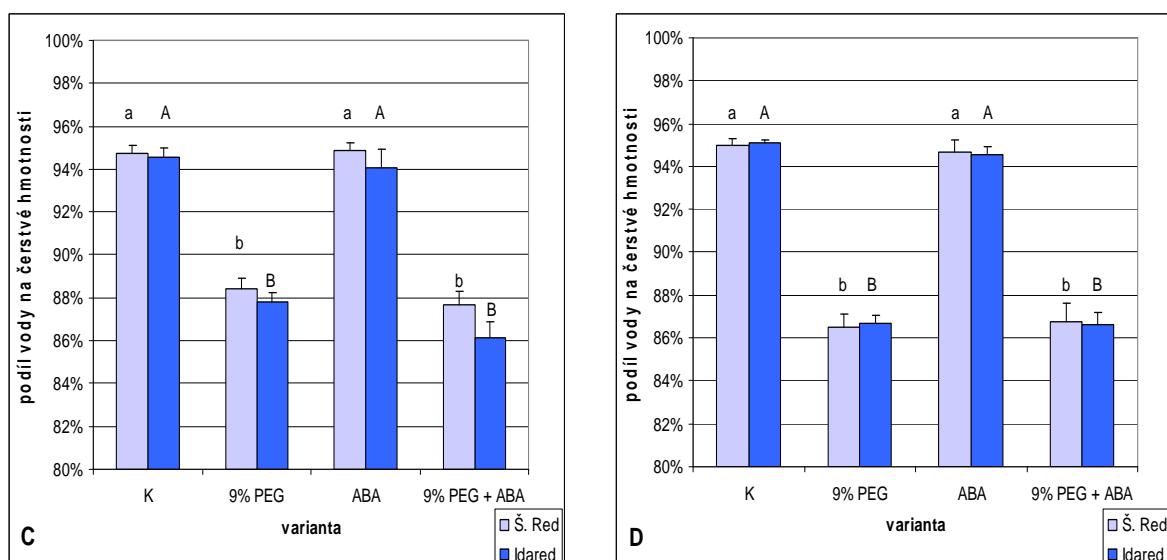
Tabulka 4.17: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 10G

4.6.1 Ovlivnění růstu tkáňových kultur jabloně osmotickým stresem a simulace stresu aplikací kyseliny abscisové

V tomto experimentu byly tkáňové kultury jabloně obou kultivarů vysazeny na standardní médium s přidavkem 9 % PEGu, $25\mu\text{mol.l}^{-1}$ kys. abscisové, nebo kombinaci 9 % PEGu a $25\mu\text{mol.l}^{-1}$ kys. abscisové. Experiment byl proveden ve dvou opakováních. U obou opakování byl růst tkáňových kultur značně heterogenní (**graf 11A, B**). V prvním opakování (**graf 11A**) byl nejhorší růst zaznamenán na médiu s kombinací 9 % PEGu a $25\mu\text{mol.l}^{-1}$ ABA. Ve druhém opakování kultury na této variantě rostly srovnatelně jako na médiu s 9 % PEGu bez ABA (**graf 11B**). V porovnání obou kultivarů se výraznější rozdíl projevil pouze u kultur na médiu s 9 % PEGu a $25\mu\text{mol.l}^{-1}$ ABA. Kultivar Idared rostl na této variantě hůře v obou opakováních, rozdíl byl však neprůkazný. Obsah vody vykazoval podobný trend u obou kultivarů (**graf 11C, D**). Pouze v prvním opakování byl zaznamenán nižší obsah vody u kultivaru Idared na médiu s 9 % PEGu a $25\mu\text{mol.l}^{-1}$ ABA, tento rozdíl ale nebyl statisticky průkazný. Obsah vody u varianty na médiu s 9 % PEGu a 9 % PEGu v kombinaci s $25\mu\text{mol.l}^{-1}$ ABA byl srovnatelný. V případě varianty ošetřené samotnou ABA byl obsah vody srovnatelný s kontrolní variantou.



Graf 11A, B: Růst tkáňových kultur jabloně vystavených osmotickému stresu a po ošetření kys. abscisovou. **A** – 1. opakování, **B** – 2. opakování; doba kultivace: 7 dní; n=9; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).

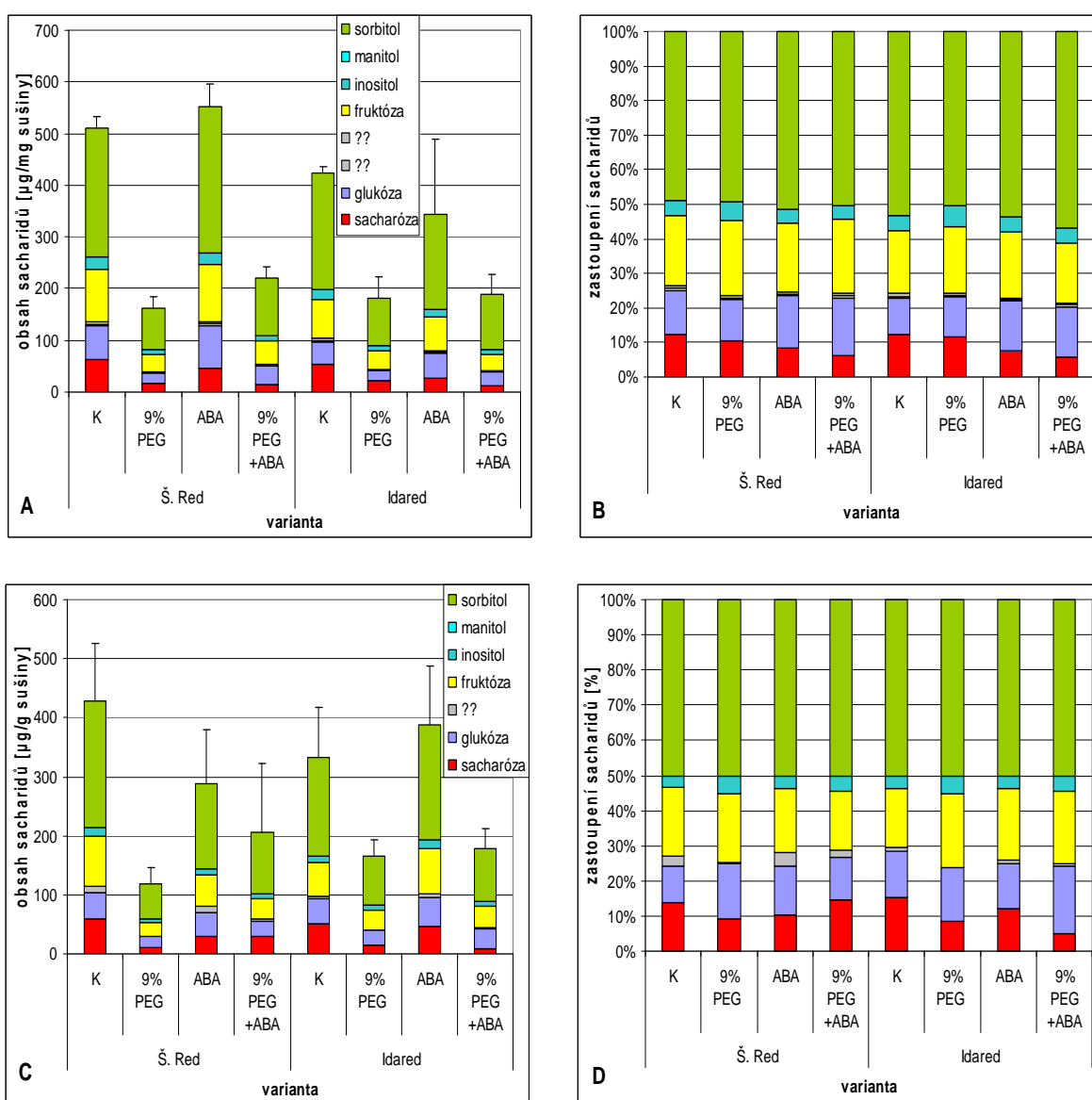


Graf 11C, D: Podíl vody na čerstvé hmotnosti kultur jabloně vystavených osmotickému stresu a po ošetření kys. abscisovou. **C** – 1. opakování, **D** – 2. opakování; doba kultivace: 7 dní; n=9; (úsečky znázorňují směrodatné odchylky; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$).

4.6.2 Obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně při osmotickém stresu a simulaci stresu aplikací kyseliny abscisové

Kultury, u kterých bylo sledováno ovlivnění růstu osmotickým stresem a simulací stresu aplikací kys. abscisové, byly dále charakterizovány na úrovni obsahu endogenních sacharidů. U obou opakování byl obsah celkových sacharidů nižší u kontrolní varianty kultivaru Idared, než u kultivaru Šampion Red (graf 12A, C). Nejnižší obsah celkových

sacharidů vykazovala varianta pěstovaná na médiu s přidavkem 9 % PEGu, a to u obou kultivarů. U varianty ošetřené ABA byl celkový obsah sacharidů srovnatelný s kontrolou u obou opakování. Zastoupení jednotlivých sacharidů v rámci sacharidového spektra bylo u obou kultivarů srovnatelné. Nejvíce zastoupeným sacharidem ve všech variantách byl sorbitol tvořící ~ 50 % rozpustných sacharidů (**graf 12B, D**). Jeho obsah se v rámci jednotlivých variant téměř nezměnil. Ke změnám docházelo pouze v poměru sacharózy a glukózy. U prvního opakování bylo zastoupení sacharózy v rámci sacharidového spektra nejnižší u varianty pěstované na médiu s kombinací PEGu a kys. abscisové. Obsah glukózy byl u této varianty nejvyšší.



Graf 12A-D: Obsah a spektrum endogenních sacharidů u tkáňových kultur jabloně vystavených osmotickému stresu a po ošetření kys. abscisovou. **A, B** – 1. opakování, **C, D** – 2. opakování; doba kultivace: 7 dní; n=9; úsečky znázorňují směrodatné odchylky celkových obsahů sacharidů. Směrodatné odchylky jednotlivých hodnot jsou uvedeny v tabulce 4.18 a 4.19.

		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	8,05	10,57	13,80	2,78	21,61	21,06
	9% PEG	2,83	4,74	6,48	1,34	11,56	23,45
	ABA	12,47	21,06	15,66	2,78	27,59	44,11
	9% PEG + ABA	6,46	5,05	6,27	1,61	13,20	21,39
Idared	K	14,16	7,25	10,26	2,28	14,57	13,20
	9% PEG	8,03	7,08	9,34	2,35	24,42	42,09
	ABA	18,03	20,49	26,62	5,94	81,88	145,77
	9% PEG + ABA	3,08	8,71	8,36	1,78	25,14	37,10

Tabulka 4.18: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 12A.

		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	sorbitol	celkové sacharidy
Š. Red	K	11,84	11,11	11,68	1,95	49,05	98,10
	9% PEG	2,99	4,09	6,18	1,00	14,56	29,12
	ABA	14,18	5,79	12,49	1,75	45,59	91,18
	9% PEG + ABA	25,80	6,91	13,68	4,01	58,54	117,07
Idared	K	15,51	9,53	11,56	2,28	42,23	84,47
	9% PEG	2,26	3,63	5,74	1,21	12,84	25,68
	ABA	20,69	7,91	8,88	2,54	49,80	99,61
	9% PEG + ABA	3,18	4,14	3,67	2,19	17,32	34,64

Tabulka 4.19: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 12C.

5. Diskuse

V experimentech byly použity tkáňové kultury kultivarů Šampion Red a Idared odvozené pro účely této práce z listových segmentů kultur stonkových segmentů *in vitro*. Kultivary byly vybrány na základě jejich odlišné odolnosti ke stresu. Kultivar Šampion Red je v porovnání s kultivarem Idared více odolný k nízkým teplotám a některým houbovým chorobám (padlí, strupovitost).

5.1 Vliv exogenních sacharidů na růst tkáňových kultur jabloně *in vitro*

Heterotrofní tkáňové kultury pěstované v podmínkách *in vitro* jsou zcela závislé na přísunu uhlíku a energie z média. Za nejvhodnější sacharidy přidávané do kultivačních médií jsou považovány ty, které rostlina sama využívá jako transportní sacharidy a vlastní enzymatický aparát pro jejich metabolismus (Leifert et al., 1995). Nejvíce používaným sacharidem pro výživu rostlinných kultur *in vitro* je proto sacharóza rozšířená univerzálně v celé rostlinné říši. Některé rostliny však vedle sacharózy využívají i další sacharidy.

Jabloň (*Malus domestica*), které je tato diplomová práce věnována transportuje ve floémové šťávě, podobně jako ostatní zástupci dřevin z čeledi *Rosaceae*, vedle sacharózy zejména sorbitol a sacharidy rafinózové řady (RFO) (Kollar a Seemüller, 1990). Cílem prvního experimentu bylo objasnit, zda jsou tyto sacharidy pro tkáňové kultury jabloně srovnatelným zdrojem uhlíku a energie, a zda se jejich utilizace liší mezi kultivary s různou odolností ke stresu. Kromě těchto tří sacharidů byl testován další cukerný alkohol, manitol, který by vzhledem ke své strukturní podobnosti s molekulou sorbitolu mohl sloužit jako substrát sorbitoldehydrogenázy (SDH). Podle nepublikovaných výsledků RNDr. Hany Konrádové, PhD. by mohl manitol sloužit jako zdroj uhlíku a energie pro stonkové segmenty jabloně *in vitro* díky nižší specifitě SDH (ústní sdělení). Výše uvedené sacharidy byly použity v 3% koncentraci, jako kontrolní varianta byla použita směs 1,5% sacharózy a 1,5% sorbitolu.

Výsledky ukazují, že sacharóza, sorbitol i rafinóza mohou sloužit jako zdroj uhlíku a energie pro růst tkáňových kultur jabloně. Je patrné, že nejvíce je růst podporován na médiu se sacharózou, přestože cukerné alkoholy jsou oproti sacharóze výhodnějším zdrojem energie (graf 1A, C, D). Cukerné alkoholy jsou více redukováné formy sacharidů než sacharóza, jejich degradace tedy poskytuje buňce více energie. Při degradaci manitolu se

uvolňuje NADH, který může být v mitochondriích oxidován za vzniku 3 molekul ATP (Pharr et al., 1995). Důvodem horšího růstu na médiu se sorbitolem by mohla být větší osmotická zátěž. Sorbitol vyvolává zhruba dvojnásobné snížení osmotického potenciálu než sacharóza ve stejné koncentraci. Obdobné výsledky byly zjištěny u tkáňových kultur celeru, kde byl také zaznamenán lepší růst u kultur zásobených sacharózou v porovnání s kulturami na manitolu (Šuťáková, 2006). Také u *Syzigium cuminii*, kde byl testován vliv různých typů sacharidů na tvorbu a růst nových prýtů u stonkových segmentů *in vitro*, byl zaznamenán lepší růst na médiu se sacharózou, v porovnání s cukernými alkoholy (Jain a Babbar, 2003). V případě listových segmentů jabloně byla zaznamenána vyšší tvorba druhotných prýtů a jejich lepší růst na médiu se sorbitolem než se sacharózou (Pawlicki a Welander, 1994). Podobně ovlivňuje sorbitol zakládání a růst adventivních prýtů u hrušně (*Pyrus pyrifolia* N.) na stonkových segmentech *in vitro*, zatímco na médiu se sacharózou byl naopak lépe podporován růst kořenů (Kadota a Niimi, 2004). Pozitivní vliv sorbitolu jako výhradního sacharidu v médiu na růst byl také prokázán u *Prunus armeniaca*. Prorůstající nové prýty rostly mnohem lépe na médiu se sorbitolem než tomu bylo u sacharózy, kde se také častěji projevila vitifikace explantátů (Marino et al., 1993). V posledních zmiňovaných případech se však jednalo o celistvou část rostliny, nebo části orgánů a osmotická zátěž vyvolaná médiem se sorbitolem zde zřejmě nemá tak výrazný dopad, jako u neorganizovaných tkáňových kultur. U tkáňových kultur jsou zřejmě výhody utilizace sorbitolu vyváženy právě negativním dopadem osmotického stresu.

U obou případů tkáňových kultur jabloně a celeru by se dalo usuzovat, že kultury pěstované na médiu s cukerným alkoholem, tedy vystavené větší osmotické zátěži, daný cukerný alkohol neutilizují, ale chrání jej jako osmoprotektant. Protože je sorbitol, popřípadě pro tyto kultury jediným zdrojem uhlíku a energie, není dostatek energie pro růst. Tomu by napovídala také horší růst varianty pěstované na směsi 1,5% sacharózy a 1,5% sorbitolu. Také z obsahu vody (graf 1E-H), který byl u kultur stanoven lze vyčíst, že kultury na médiu se sorbitolem, nebo směsí sorbitolu a sacharózy jsou vystaveny větší osmotické zátěži, vzhledem k nižšímu obsahu vody než v případě sacharózy. Nicméně srovnatelný růstový koeficient jako u kultur pěstovaných na sorbitolu vykazovaly i kultury pěstované na rafinóze, která vyvolává (neuvažujeme-li její štěpení) přibližně pouze třetinové snížení osmotického potenciálu. Na druhou stranu byl u těchto kultur zaznamenán významný podíl melibiózy. Za předpokladu, že tato melibióza je produktem působení apoplastické invertázy hydrolyzující rafinózu za vzniku melibiózy a fruktózy, tedy směsi disacharidu a monosacharidu, dochází k významnému snížení osmotického potenciálu média. Výsledná

směs disacharidu a monosacharidu by se tak svým osmotickým potenciálem přibližovala osmotické zátěži vyvolané sorbitolem, nebo manitolem.

Ze zjištěných výsledků tedy vyplývá, že sacharóza, sorbitol a rafinóza nejsou srovnatelným zdrojem energie pro tkáňové kultury jabloně. Preference různých typů sacharidů se však zřejmě u různých druhů rostlin z čeledi *Rosaceae* významně liší. Například výrazně odlišné výsledky byly získány u prýtů prorůstajících z axilárních pupenů *in vitro* u *Prunus mume* - byl zjištěn nejlepší růst na médiu s glukózou, zatímco u kultur zásobených sacharózou, sorbitolem, nebo fruktózou byl růst horší. Na médiu se sacharózou dokonce docházelo ke chloróze listů a postupnému zpomalení růstu (Harada a Murai, 1996). Zjištěné výsledky u tkáňových kultur jabloně tak spíše než z osmotickým potenciálem média mohou souviset se samotnou preferencí sacharidů explantátem.

Velmi malý přírůstek hmotnosti byl zaznamenán u kultur pěstovaných na médiu s manitolem. Za tento nárůst hmotnosti je, spíše než růst kultur, zodpovědná akumulace manitolu přijatého z média, který nejsou kultury schopny využít. U růstových charakteristik nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi oběma kultivary, přestože odvození tkáňových kultur bylo u kultivaru Idared problematictější než v případě kultivaru Šampion Red. Růst kalusu na počátku odvození byl u kultivaru Idared znatelně horší v porovnání s kultivarem Šampion Red, proto byla použita dvojnásobná koncentrace kinetinu (0,4 mg/l). Po odvození tkáňové kultury již bylo pro oba dva kultivary použito identické kultivační médium a v růstu obou kultivarů nebyly zaznamenány žádné rozdíly.

5.2 Vliv exogenních sacharidů na obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně *in vitro*

U kultur zásobených různým exogenním sacharidem bylo dále sledováno ovlivnění obsahu a spektra endogenních sacharidů a jejich případné rozdíly mezi kultivary Šampion Red (graf 2A-D) a Idared (graf 2E-H). V porovnání celkového obsahu sacharidů byl zaznamenán vyšší obsah nestrukturních sacharidů u kultur pěstovaných na médiu se sorbitolem, než tomu bylo u kultur na sacharóze (graf 2A, C, E, G). Podobná závislost byla zjištěna u rostlin celeru *in vitro* pěstovaných na médiu se sacharózou, nebo manitolem jako výhradním sacharidem (Vítová et al., 2002). Toto navýšení může být způsobeno větším osmotickým stresem, který médium se sorbitolem vyvolává. Z tohoto důvodu může být utilizace sorbitolu u jabloně, popřípadě manitolu u celeru omezena a tyto cukerné alkoholy

jsou chráněny jako osmoprotektanty. Tomu by napovídala obsah sacharidů u kultur na médiu se směsí 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu, který se pohyboval v rozmezí hodnot mezi kulturami pěstovanými na 3 % sacharózy a 3 % sorbitolu (graf 2E, G). Také obsah sacharidů v případě kultur pěstovaných na rafinóze, který byl srovnatelný s kulturami na sacharóze by nahrával tomuto vysvětlení. Podobná závislost byla zaznamenána u tkáňových kultur celeru, který je významným producentem manitolu, kde byl zjištěn vyšší celkový obsah sacharidů u kultur pěstovaných na médiu s 3 % manitolu než tomu bylo v případě sacharózy (Šuťáková, 2006). Vyšší obsah sacharidů může být také způsoben i vyšším příjmem cukerného alkoholu z média v porovnání se sacharózou (Vítová, 1999).

Významné změny byly zjištěny ve spektru endogenních sacharidů. U kultur pěstovaných na sacharóze zaujímaly převážnou část sacharidového spektra ~ 80 % hexózy. Sorbitol zde byl přítomen pouze ve velmi malém množství. Konverze přijaté sacharózy na sorbitol je tak zřejmě u kultur výrazně omezena. Zcela odlišná byla situace u kultur pěstovaných na sorbitolu, kde tento cukerný alkohol zaujímal více než 80 % z celkového obsahu sacharidů. Zbývajících necelých 20 % tvořily hexózy, sacharóza a malé množství inositolu (graf 2B, D, F, H). Karhu (1997) také u stonkových segmentů jabloně *in vitro* zaznamenal nízký obsah sorbitolu u kultur na médiu se sacharózou a jeho výraznou akumulaci na médiu se sorbitolem. Podobné výsledky byly zjištěny u tkáňových kultur celeru, kde u kultur pěstovaných na médiu se 3 % manitolu zaujímal manitol téměř 90 % obsahu sacharidů, zatímco u kultur na sacharóze byl manitol přítomen v zanedbatelném množství (Šuťáková, 2006). Rozdílem mezi těmito dvěma kulturami byl přibližně třikrát vyšší podíl sacharózy na celkových sacharidech u celeru v porovnání s tkáňovými kulturami jabloně. U tkáňových kultur celeru na médiu s 3 % manitolu také nebyly téměř vůbec přítomny hexózy, které u tkáňových kultur jabloně na médiu se sorbitolem zaujímaly přibližně 20 % rozpustných sacharidů (graf 2B, D, F, H). V tomto ohledu se zjištěné výsledky více podobají obsahu sacharózy u stonkových segmentů oliv na médiu se sacharózou, kde také sacharóza zaujímal necelých 10 % celkového obsahu sacharidů. Oliva je podobně jako celer producentem manitolu. Ten byl v sacharidovém spektru přítomen ve větším množství i u kultur pěstovaných na sacharóze (Rejšková et al., 2007). Podobně u celistvých rostlin celeru *in vitro* zásobených sacharózou bylo v sacharidovém spektru přítomno významné množství manitolu (Vítová, 1999). Jelikož se v obou případech jedná o částečně fotosyntetizující rostliny a explantáty, akumulovaný manitol může pocházet z primární fotosyntetické produkce. Dalším společným rysem tkáňových kultur jabloně a stonkových segmentů olivy je přítomnost významného podílu hexóz u kultur pěstovaných na sorbitolu

v případě jabloně a manitolu v případě olivy. U jabloně tvořila glukóza s fruktózou rovnocenně ~ 15 % obsahu sacharidů, zatímco u olivy tvořily oba sacharidy přibližně 40 % s výraznou převahou glukózy. U tkáňových kultur celeru pěstovaných na manitolu byly hexózy přítomny v zanedbatelném množství (Šuťáková, 2006). Velmi nízký obsah hexóz byl zjištěn také u suspenzních kultur celeru pěstovaných na médiu s manitolem (Stoop a Pharr, 1993). Je zřejmé, že mezi jednotlivými rostlinami jsou rozdíly ve využívání příslušného cukerného alkoholu. Zatímco u celeru je utilizace manitolu výrazně omezena a akumulovaný manitol je zřejmě využíván jako osmoprotektant, v případě jabloně a olivy lze vzhledem k přítomnosti hexóz usuzovat, že omezení utilizace příslušného cukerného alkoholu není tak striktní a obě rostliny jej využívají také jako zdroj energie i za podmínek osmotického stresu. Tyto rozdíly mohou pramenit z odlišných regulací cukerného metabolismu u bylin v případě celeru a dřevin v případě jabloně a olivy.

U varianty pěstované na rafinóze byla zaznamenána významná akumulace melibiózy. Melibióza je spolu s fruktózou produktem hydrolýzy rafinózy vznikajícím činností kyselých invertáz. Kyselé invertázy jsou lokalizovány buď v apoplastu a nebo ve vakuole, a tedy lze rychlé štěpení rafinózy, výsledkem kterého je melibióza, přičíst pravděpodobně apoplastické invertáze působící před vstupem rafinózy do buňky. Melibióza může být následně transportována do buněk a rozštěpena α -galaktosidázou na molekulu glukózy a galaktózy a produkty její degradace využity jako zdroje uhlíku a energie (Keller a Pharr, 1996).

U kultur, kterým byl poskytnut manitol jako jediný sacharid v médiu byl zaznamenán nejvyšší obsah celkových sacharidů ze všech zkoumaných variant. Za tento nárůst byl odpovědný manitol přijatý z média, který zde tvořil přibližně 95 % z celkového obsahu sacharidů, zbytek zaujímaly hexózy se zanedbatelným množstvím inositolu. Vzhledem k hromadění manitolu a velmi omezeným přírůstkům hmotnosti u těchto kultur lze soudit, že kultury nejsou schopny manitol využít a předpokládaná nižší specifita SDH se tedy nepotvrdila. Sorbitoldehydrogenáza má zřejmě vyšší substrátovou specifitu než manitoldehydrogenáza. Manitoldehydrogenáza katalyzuje přeměnu manitolu na manózu za vzniku NADH. U extraktu z listů celeru byl po přidání sorbitolu, který není považován za substrát manitoldehydrogenázy, naměřen vznik NADH. Není však zřejmé, zda je za rozklad sorbitolu u celeru zodpovědná manitoldehydrogenáza, nebo nějaký jiný enzym (ústní sdělení RNDr. Hany Konrádové, PhD.). Také u stonkových segmentů oliv *in vitro* pěstovaných na sorbitolu jako jediném sacharidu v médiu se nepodařilo jednoznačně

prokázat, že by byly schopny využívat sorbitol jako zdroj uhlíku a energie (Rejšková, 2003).

5.3 Ovlivnění růstu a obsahu endogenních sacharidů různou koncentrací exogenního sacharidu

V navazujícím experimentu byl porovnáván růst a případné změny v obsahu endogenních sacharidů u tkáňových kultur pěstovaných na dvou různých koncentracích (3 % a 5 %) sacharózy, nebo sorbitolu. Jako kontrola byla použita směs 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu. Jak v případě varianty se sacharózou, tak i se sorbitolem byla zjištěna redukce růstu u kultur pěstovaných na vyšší koncentraci příslušného sacharidu (graf 3A, B). Tuto reakci lze přisuzovat vyššímu osmotickému stresu působícímu na kultury. Překvapivě vyšší koncentrace sacharózy a sorbitolu vyvolala srovnatelný pokles růstového koeficientu, přestože sorbitol v médiu vyvolává přibližně dvojnásobné snížení osmotického potenciálu než sacharóza. Činností apoplastických invertáz však může docházet k hydrolýze sacharózy v médiu na glukózu a fruktózu. Je tak třeba vzít v úvahu, že s postupujícím časem kultivace tak dochází k hromadění těchto monosacharidů v médiu na úkor obsahu sacharózy, což vede k významnému snížení osmotického potenciálu média (Slesak et al., 2004). Maurel et al., (2004) popsali, že u *Prunus persica* jsou do prorůstajících vegetativních pupenů přednostně transportovány hexózy, zatímco transport sorbitolu je značně omezen. Bylo zjištěno, že inhibice transportu sorbitolu je zde závislá na hexokinázové signální dráze. Přestože přesný mechanismus této inhibice není znám, dalo by se předpokládat, že zvýšený tok hexóz hexokinázovou reakcí může vést například k omezení syntézy transportérů pro sorbitol. V případě tkáňových kultur jabloně nebylo zaznamenáno, že by docházelo k omezení příjmu sorbitolu u kontrolních kultur na směsi 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu. U tkáňových kultur celeru došlo ke zhoršení růstu pouze u kultur pěstovaných na vyšší koncentraci manitolu, nikoliv v případě sacharózy. Omezení růstu na vyšší koncentraci manitolu zde bylo také mnohem výraznější než v případě jabloně (Šuťáková, 2006). Podobný experiment provedla Vítová et al., (2002) u celistvých rostlin celeru *in vitro*. V tomto případě byl zaznamenán nárůst hmotnosti sušiny se zvyšující se koncentrací obou sacharidů v médiu (Vítová et al., 2002). Tento rozdíl je možné vysvětlit tím, že jablonoň využívá sorbitol jako zdroj uhlíku a energie i za podmínek osmotického stresu, zatímco u celeru je utilizace manitolu silně omezena. U stonkových segmentů jabloně (*Malus*

domestica cv. Jork 9) *in vitro*, u kterých byla sledována regenerace kořenů na médiu s různou koncentrací sacharózy bylo zjištěno, že sacharóza podporuje zakládání i růst kořenů v poměrně širokém rozsahu koncentrace od 1 % do 9 %. Pouze na médiu bez sacharózy a na médiu s 11 % sacharózy bylo zjištěno výrazné potlačení zakládání kořenů. Pravděpodobným vysvětlením je nedostatek uhlíku a energie na médiu bez sacharózy a příliš nízký osmotický potenciál na médiu s 11 % sacharózy (Calamar a Klerk, 2001). Růst stonkových segmentů olivy také vykazoval výraznější omezení růstu na médiu s manitolem, nebo sacharózou až při 9% koncentraci příslušného sacharidu v médiu. Tento rozdíl může být způsoben tím, že v případě olivy i stonkových segmentů jabloně se jednalo o celistvou část rostliny, kde je v přímém styku s médiem pouze malá oblast a dopad osmotického stresu na explantát není tak silný jako v případě tkáňové kultury bez přirozených bariér.

Změny v závislosti na koncentraci exogenního sacharidu byly zaznamenány také na úrovni obsahu nestrukturních sacharidů. Jak v případě kultur pěstovaných na sacharóze, tak i manitolu došlo ke zvýšení celkového obsahu sacharidů s vyšší koncentrací příslušného sacharidu. Za tento nárůst však byly, v případě kultur na sacharóze, zodpovědné hexózy, tedy redukující sacharidy, které podléhají neenzymatickým reakcím s aminoskupinami proteinů, a nejsou tedy kompatibilními soluty, přesto se mohou podílet na osmotickém přizpůsobení. U tkáňových kultur celeru, kde také došlo ke zvýšení celkového obsahu sacharidů byl za toto zvýšení odpovědný nárůst obsahu sacharózy (Šuťáková, 2006). V případě kultur pěstovaných na sorbitolu nebyly ve spektru endogenních sacharidů zaznamenány žádné změny, podobně jako v u celeru.

5.4 Vliv zasolení a osmotického stresu na růst tkáňových kultur jabloně

U tkáňových kultur jabloně kultivaru Šampion Red a Idared bylo dále sledováno ovlivnění růstu salinitou a osmotickým stresem. Pro srovnání byl použit manitol jako penetrující osmotikum v takové koncentraci, aby vyvolal stejné snížení osmotického potenciálu média jako 50 mM NaCl, tedy o ~ 0,3 MPa. Experiment byl proveden ve dvou variantách a to na médiu s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu (graf 5A, B), nebo 3 % sacharózy (graf 5C-E) pro zachycení případných rozdílů v utilizaci příslušného sacharidu kulturami v podmínkách stresu. U kultur, které byly pěstovány na směsi sacharózy a sorbitolu, bylo zaznamenáno zhoršení růstu již při 50 mM koncentraci NaCl, které se na médiu se 100 mM NaCl ještě více prohloubilo. To je v souladu s předpokladem, že jabloň je citlivá na přítomnost NaCl v

prostředí. Přestože tolerance ovocných dřevin k zasolení není příliš prostudována, obecně se předpokládá, že jsou velmi citlivé na přítomnost NaCl (Bernstein, 1974). Odlišné výsledky byly zaznamenány u tkáňových kultur celeru odvozených z čepele, které vykazovaly nejlepší růst při mírném stresu zasolení vyvolaném 50 mM NaCl v médiu, při silnějším stresu se růst zhoršoval (Šuťáková, 2006). Podobná závislost byla zjištěna také u celistvých rostlin celeru. Celer se proto obvykle považuje za halofyt, nebo glykofyt tolerantní k zasolení (Everard et al., 1994). Zvýšená tolerance k zasolení byla zaznamenána i u *Populus euphratica*, jako zástupce dřevin. Tkáňové kultury *Populus euphratica* dosahovaly nejlepšího růstu na médiu s přídavkem 50 mM NaCl (Zhang et al., 2004).

V případě varianty pěstované na médiu se směsí sacharózy a sorbitolu byl zaznamenán horší růst kultivaru Idared než u kultivaru Šampion Red, a to u obou koncentrací NaCl. To je v souladu s předpokladem nižší odolnosti kultivaru Idared ke stresu. Zajímavé je, že u kultur, které byly pěstovány na médiu se 3 % sacharózy tento rozdíl nebyl zaznamenán a růst obou kultivarů byl v tomto případě rovnocenný. U zjištěných podílů vody na čerstvé hmotnosti (graf 5F-J) nebyly zaznamenány žádné rozdíly mezi oběma kultivary. U kultivaru Šampion Red i Idared byl zaznamenán pokles obsahu vody se zvyšujícím se stresem zasolení. Podobné výsledky byly zjištěny také u celistvých rostlin jabloně *in vitro* ošetřených NaCl. Také zde byl zaznamenán nižší obsah vody a horší růst než u kultur vystavených pouze osmotickému stresu (Molassiotis et al., 2006). Ze zjištěných výsledků růstových koeficientů by se dalo usuzovat, že odolnější kultivar Šampion Red je schopný využívat sorbitol přijatý z média jako zdroj uhlíku a energie pro růst i ve stresových podmínkách, zatímco méně odolný kultivar Idared sorbitol neutilizuje, ale akumuluje jej pouze jako osmoprotektant. Nicméně ze sacharidových spekter žádné rozdíly v obsahu sorbitolu mezi oběma kultivary nejsou patrné. V případě kultur na médiu se 2 % manitolu byl růst srovnatelný s kulturami na 50 mM NaCl, a to jak v případě kultur zásobených 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu, tak i 3 % sacharózy. U této varianty se rozdíl mezi kultivary nepotvrdil. Zaznamenané zhoršení růstu u varianty na 50 mM NaCl a 2 % manitolu odpovídá srovnatelnému snížení osmotického potenciálu média. V případě NaCl je však třeba vzít v úvahu, že kromě osmotického stresu se zde projevuje také toxický vliv iontů Na^+ a Cl^- (Gangopadhyay et al., 1997). Také Molassiotis et al., (2006) usuzují na významný vliv iontů při stresu zasolení u celistvých rostlin jabloně *in vitro*. Zaznamenali prokazatelně nižší obsah chlorofylu a vyšší aktivitu peroxidázy a superoxiddismutázy, enzymů účastnících se zhášení volných radikálů u kultur ošetřených NaCl v porovnání s kulturami vystavenými pouze osmotickému stresu vyvolaného manitolem (Molassiotis et al., 2006).

Dalo by se předpokládat, že růst kultur na médiu s NaCl by měl být horší než u kultur s manitolem o stejném osmotickém potenciálu, nicméně v případě tkáňových kultur jabloně se tento předpoklad nepotvrdil. Důvodem by mohlo být, že ionty Na^+ a Cl^- zde ještě nejsou v takové koncentraci, která by již byla pro buňku výrazně poškozující a jejich efekt je tak především osmotický.

5.5 Vliv zasolení a osmotického stresu na obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur jabloně *in vitro*

Dále bylo sledováno ovlivnění obsahu a spekter endogenních sacharidů salinitou a osmotickým stresem.

Kultury s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu v médiu.

U kultivaru Šampion Red bylo zaznamenáno navýšení celkového obsahu sacharidů při mírném stresu zasolení vyvolaném 50 mM NaCl (graf 6A, C). Při silnějším stresu na médiu se 100 mM NaCl došlo k poklesu obsahu sacharidů. Naproti tomu u kultivaru Idared byl zjištěn pokles obsahu sacharidů již při mírném stresu zasolení, který při silnějším stresu stagnoval. Podobné výsledky jako u kultivaru Šampion Red byly zaznamenány u tkáňových kultur celeru odvozených z listové čepele, kde také došlo k navýšení celkového obsahu sacharidů (Šuťáková, 2006). Celer je však k zasolení mnohem více tolerantní než jabloň. Navýšení obsahu sacharidů u odolnějšího kultivaru lze vysvětlit snížením utilizace sacharidů kulturami a jejich využití k osmotickému přizpůsobení. Zastoupení jednotlivých sacharidů v rámci sacharidového spektra bylo značně heterogenní a nebylo zjištěno, že by za nárůst celkového obsahu sacharidů u kultivaru Šampion Red byl přednostně odpovědný některý ze sacharidů sacharidového spektra (graf 6B, D). Wang et al., (1996) zaznamenali navýšení obsahu sorbitolu při nedostatku vody u mladých i dospělých listů a stonků jabloně. Naproti tomu byl u dospělých listů a stonků zaznamenán pokles obsahu sacharózy a její nárůst u mladých listů a kořenů. U odříznutých stonků ponořených do roztoku se značenou [^{14}C] glukózou a [^{14}C] sorbitolem bylo zjištěno, že za podmínek dobrého zásobení vodou je 24 % glukózy konvertováno na sacharózu, 21 % na fruktózu a 17 % na sorbitol. U stonků vystavených nedostatku vody bylo zaznamenáno navýšení poměru sorbitolu na úkor sacharózy z 0,8 na 1,7. V případě podání [^{14}C] sorbitolu bylo pouze méně než 10 % konvertováno na jiný sacharid. Zjištěná akumulace sorbitolu při nedostatku vody je tak zřejmě způsobena přednostní konverzí glukózy na sorbitol (Wang et al., 1996). Tyto

výsledky jsou do jisté míry v souladu se zjištěními u tkáňových kultur, přestože výše popsané změny v obsahu sacharidů zde nejsou příliš výrazné. U jitrocele *Plantago major*, dalšího producenta sorbitolu bylo v souvislosti se zasolením zaznamenáno zvýšení exprese genů kódujících transportéry pro sorbitol (PmPLT1 a PmPLT2) ve floému. Kromě toho zde dochází ke snížení exprese SDH, tedy omezení utilizace ve zdrojových listech, mající za následek akumulaci sorbitolu a zvýšení jeho transportu floémem. Zároveň dochází ke snížení exprese transportéru pro sacharózu PmSUC2. Do floému je tak přednostně nakládán sorbitol a zvyšuje se tak poměr sorbitolu a sacharózy ve floémové šťávě z 20 % u kontrolních rostlin na 40 % u rostlin vystavených stresu zasolení (Pommerrenig et al., 2007). U tkáňových kultur celeru bylo zaznamenáno zvýšení obsahu sacharidů spojeno se zvýšením obsahu manitolu (Šuťáková, 2006). V případě stonkových segmentů olivy byla situace odlišná. Zde byl naopak zaznamenán pokles celkového obsahu sacharidů ovšem spojený s výrazným navýšením obsahu manitolu v poměru k ostatním sacharidům. Nahromaděný manitol se zde zřejmě uplatňuje především jako osmoprotektant (Rejšková et al., 2007). U tkáňových kultur jabloně vystavených osmotickému stresu vyvolanému manitolem byl celkový obsah sacharidů ze všech testovaných variant nejvyšší. Za tento nárůst byl odpovědný manitol přijatý z média, který není metabolizován, a tak se u kultur akumuluje na úkor ostatních sacharidů. Také v případě tkáňových kultur celeru, u kterých byl osmotický stres vyvolán analogicky 2% sorbitolem, bylo dosaženo podobných výsledků. Také zde došlo ke zvýšení celkového obsahu sacharidů a významné akumulaci manitolu na úkor ostatních sacharidů (Šuťáková, 2006).

Kultury s 3 % sacharózy

U kultur pěstovaných na médiu s 3 % sacharózy (graf 6E-J) byl u kultivaru Šampion Red zjištěn nárůst celkového obsahu sacharidů se zvyšující se koncentrací NaCl. Naproti tomu u kultivaru Idared tato závislost zaznamenána nebyla. Kultivar Šampion Red je více odolný ke stresu než Idared, zaznamenané navýšení celkového obsahu sacharidů by tak mohlo být dáno lepším osmotickým přizpůsobením, a tedy vyšší odolností tohoto kultivaru. U kultivaru Idared byl celkový obsah sacharidů při mírném stresu zasolení (50 mM NaCl) srovnatelný s kontrolní variantou. Při silnějším stresu salinity (100 mM NaCl) celkový obsah sacharidů klesl (graf 6E, G, I). Navýšení obsahu sacharidů spolu s prolinem v souvislosti se zasolením bylo zaznamenáno také v listech stonkových segmentů jabloně (*Malus domestica*) *in vitro* vystavených 100 a 200 mM NaCl (Sotiropoulos, 2007). Za akumulaci sacharidů u kultivaru šampion Red byl překvapivě zodpovědný nárůst obsahu hexózy (graf 6F, H), na úkor obsahu sacharózy. U kultivaru Idared podíl sacharózy na

celkovém obsahu sacharidů v případě varianty vystavené 50 mM NaCl mírně vzrostl, při silnějším stresu klesl na úroveň srovnatelnou s kontrolní variantou. Obsah sorbitolu byl u všech variant na velmi nízké úrovni a ke změnám jeho obsahu v souvislosti se stresem nedocházelo. K podobným výsledkům dospěli Wang a Stutte (1992) u dvouletých rostlin jabloně (*Malus domestica* Borkh. cv. Jonathan) vystavených vodnímu stresu. Také v tomto případě byl zaznamenán nárůst obsahu hexóz a pokles obsahu sacharózy u rostlin vystavených stresu. Kromě toho byl zjištěn i nárůst obsahu sorbitolu, který v případě tkáňových kultur nebyl zjištěn. Na médiu s manitolem došlo u tkáňových kultur jabloně k navýšení celkového obsahu sacharidů, podobně jako v předchozím případě kultur na směsi sorbitolu a sacharózy. Také v tomto případě se manitol v kulturách akumuloval na úkor obsahu ostatních sacharidů.

Přestože glukóza a fruktóza jsou redukující sacharidy, a nejedná se tedy o kompatibilní soluty, protože podléhají neenzymatickým reakcím s aminosloučeninami (aminokyseliny, proteiny), byla u některých rostlin popsána jejich role v osmotickém přizpůsobení buněk. Rascio et al., (1994) popsali akumulaci hexóz při nedostatku vody u pšenice. Kerepesi et al., (1998) zjistili, že při vystavení rostlin pšenice nedostatku vody a zasolení, dochází u kultivarů odolných k tomuto stresu k navýšení obsahu glukózy a fruktózy. Redukující sacharidy se také podílejí na osmotickém přizpůsobení u různých druhů jetele a slunečnice (Rascio et al., 1994; Iannucci et al., 2002). Přestože se do nedávné doby předpokládalo, že hexózy nejsou transportovány floémem a jejich přítomnost ve floémové šťávě byla považována za artefakt, bylo zjištěno, že se jedná o majoritní transportní sacharidy u zástupců čeledi *Papaveraceae* a *Ranunculaceae* (Bel a Hess, 2008). Transport hexóz zřejmě není nic neobvyklého ani v případě čeledi *Rosaceae*. U *Prunus avium* byla vedle sorbitolu a sacharózy zaznamenána významná přítomnost hexóz v xylému. Hexózy z mobilizovaných zásob jsou xylémem transportovány do sinkových orgánů. Bylo zjištěno, že množství hexóz v xylému výrazně stoupá během kvetení (Loescher et al., 1990). Ze zjištěných výsledků lze usuzovat na významný podíl hexóz na osmotickém přizpůsobení u jabloně při stresu zasolení.

5.6 Ovlivnění růstu, obsahu a spektra endogenních sacharidů penetrujícím a nepenetrujícím osmotikem

U kultur bylo dále sledováno, jak se budou měnit růstové charakteristiky a obsah a složení endogenních sacharidů v závislosti na osmotickém stresu vyvolaném nepenetrujícím a penetrujícím neiontovým osmotikem. Jako nepenetrující osmotikum zde byl použit polyetylglykol (PEG, $M_r = 4000$) v 9% koncentraci a manitol v 1% koncentraci jako penetrující osmotikum. Obě látky vyvolávají v dané koncentraci snížení osmotického potenciálu média o přibližně 0,15 MPa. U kultur vystavených působení penetrujícího i nepenetrujícího osmotika bylo zaznamenáno zhoršení růstu bez patrného rozdílu mezi kultivary, nicméně růstové koeficienty i podíl vody na čerstvé hmotnosti jsou v tomto případě velmi variabilní, takže nelze vyvodit jednoznačné závěry (graf 7A-D). Varianta ošetřená 9 % PEGu vykazovala překvapivě nejnižší celkový obsah sacharidů. Šuťáková (2006) zaznamenala u orgánových kultur oliv naopak zvýšení celkového obsahu sacharidů a zvýšení podílu manitolu na obsahu celkových sacharidů na úkor hexóz. Manitol se v tomto případě účastní osmotického přizpůsobení buněk. U jabloně byla reakce zcela opačná, došlo zde naopak ke snížení podílu sorbitolu a navýšení obsahu hexóz (graf 8B). V případě jabloně se však jedná o tkáňové kultury, působení osmotického stresu tak může mít větší dopad než u stonkových segmentů olivy, přestože byla použita nižší koncentrace osmotika. U celistvých rostlin jabloně byl zjištěn nárůst obsahu sorbitolu při nedostatku vody. Při poklesu vodního potenciálu listů v rozpětí od -1 do -2,5 MPa byl zaznamenán nárůst obsahu sorbitolu v listech a stoncích s prohlubujícím se vodním deficitem. Při dalším snižování vodního potenciálu v rozmezí -2,5-(-3,2) MPa obsah sorbitolu zpočátku stagnoval s vyšším vodním deficitem klesal (Wang et al., 1995). Meng et al., (2008) zaznamenali akumulaci sorbitolu v dospělých listech i kořenech celistvých rostlin jabloně, které byly vystaveny působení 20% PEGu. Nejvyšší obsah sorbitolu zaznamenali již po prvním dni po ošetření. V pozdější fázi obsah sorbitolu prudce klesal. Z uvedených výsledků by se dalo usuzovat, že sorbitol se účastní osmotického přizpůsobení buněk pouze v časně fázi stresové reakce. V pozdější fázi stresu se možná osmotického přizpůsobení účastní jiné osmotikum, jako např. prolin a sorbitol je spolu s ostatními sacharidy využíván jako zdroj uhlíku a energie pro jeho syntézu. Této hypotéze by nahrával pokles celkového obsahu sacharidů a nárůst obsahu hexóz u tkáňových kultur. V případě varianty ošetřené manitolem byl celkový obsah sacharidů nejvyšší (graf 8A, C). V tomto případě se jedná o penetrující osmotikum, které po průniku do buněk může fungovat jako osmotikum. Manitol se u tkáňových kultur akumuloval na úkor obsahu sorbitolu a hexóz, jejichž obsah byl u této varianty nejnižší (graf 8D, F). Také u stonkových segmentů olivy byla zaznamenána

podobná závislost, kde byl jako osmotikum použit sorbitol. Také zde byl celkový obsah sacharidů nejvyšší a sorbitol se akumuloval na úkor obsahu manitolu (Štuřáková, 2006).

Dále byl orientačně proveden experiment, kde byly kultury vystaveny působení PEGu v 3% a 6% koncentraci. Zde bylo zjištěno snižování celkového obsahu sacharidů s vyšší osmotickou zátěží (graf 8E, F). Žádné výrazné změny ve spektru endogenních sacharidů v porovnání s předchozím experimentem zde zjištěny nebyly.

5.7 Vliv chladového stresu na růst, obsah a složení endogenních sacharidů

V tomto experimentu byl sledován vliv nízkých teplot na tkáňové kultury jabloně obou kultivarů. Kultury byly vystaveny 4°C po dobu 10 dní. Experiment byl proveden ve dvou variantách, a to na médiu se sacharózou, nebo rafinózou. Oba tyto sacharidy se akumulují v pletivech u různých rostlin během chladové aklimace a chrání buňky jak před samotnými negativními dopady nízkých teplot, tak i před sekundárními důsledky osmotického stresu vyvolaného nízkou teplotou a zvýšenou tvorbou ROS (Bachmann et al., 1994; Flinn a Ashworth, 1995; Palonen, 2000).

U kultur vystavených chladu došlo k výraznému zhoršení růstu u obou kultivarů jak na médiu se 3 % sacharózy (graf 9A, B), tak i na médiu s 3 % rafinózy (graf 9C, D). Kultivar Idared se vyznačuje vyšší citlivostí k nízkým teplotám než odolnější kultivar Šampion Red, dalo by se tedy předpokládat, že se tento rozdíl projeví v růstu tkáňových kultur, nicméně tento předpoklad se nepotvrdil. Mezi oběma kultivary nebyl zaznamenán rozdíl na médiu se sacharózou ani na médiu s rafinózou. Podobně jako v prvním experimentu, kde byl srovnáván růst kultur zásobených různým exogenním sacharidem, byl zaznamenán lepší růst kontrolních variant na sacharóze v porovnání s rafinózou (graf 1A-D). U kultur na sacharóze a rafinóze byly zjištěny rozdíly v podílu vody na čerstvé hmotnosti. Zatímco v případě sacharózy byl zaznamenán nižší obsah vody u kultur pod stresem než u kontroly, u kultur na rafinóze tento rozdíl nebyl zaznamenán (graf 9E-H). Důvodem může být nižší osmotický potenciál média s disacharidem (sacharóza) než v případě média se stejnou koncentrací trisacharidu (rafinóza). Vyšší osmotická zátěž vyvolaná samotným médiem ve spojení s chladovým stresem může vést k zaznamenané redukci podílu vody na čerstvé hmotnosti kultur. Druhým možným vysvětlením je vyšší transport sacharózy do buněk a její akumulace v podmínkách chladového stresu. Nicméně podíl sacharózy na celkovém obsahu sacharidů byl u kultur vystavených chladu nižší než u kontroly, takže tato hypotéza se nepotvrdila.

U kultur byl dále stanoven obsah a spektrum endogenních sacharidů. Nejprve byl orientačně proveden experiment, ve kterém byly tkáňové kultury vysazené na médium s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu vystaveny chladu po dobu 15 dní a vzorky pro stanovení endogenních sacharidů byly odebírány v tří denních intervalech. Cílem bylo zjistit, zda dochází ke změnám v obsahu endogenních sacharidů v tomto časovém intervalu. V hladinách jednotlivých sacharidů však nebyly zaznamenány výraznější změny. Pouze v 6. dnu chladového působení byl zaznamenán mírný nárůst obsahu sacharózy na úkor sorbitolu (graf 10B). V 9. dnu působení chladu již bylo zaznamenáno opětovné snížení obsahu sacharózy, které se nadále prohlubovalo. To může být způsobeno postupným spotřebováním sacharózy kulturami a následným snížením jejího obsahu v médiu.

U kultur pěstovaných na sacharóze (graf 10C, D) byl zaznamenán nárůst celkového obsahu sacharidů u obou kultivarů, za který byl, podobně jako v případě stresu salinity způsoben nárůstem obsahu hexóz (graf 6F, H). Štuřáková (2006) zjistila u tkáňových kultur celeru odvozených z listu nárůst celkového obsahu sacharidů u kultur vystavených chladu, spektrum endogenních sacharidů však bylo v porovnání s kulturami jabloně velmi rozdílné. U celeru byl nárůst celkového obsahu sacharidů zapříčiněn především navýšením obsahu sacharózy na úkor manitolu a fruktózy (Štuřáková, 2006). Navýšení obsahu hexóz může být součástí osmotického přizpůsobení kultur. Druhým možným vysvětlením je snížení metabolických požadavků na sacharidy vedoucí k jejich akumulaci. Také u rostlin *Populus tremuloides* vystavených chladu byl zaznamenán nárůst obsahu glukózy a fruktózy v listech (Renaut et al., 2004). Nárůst obsahu hexóz tak může být součástí osmotického přizpůsobení při chladovém stresu u jabloně, podobně jako bylo zaznamenáno při stresu zasolení.

V případě kultur na médiu s rafinózou (graf 10E-H) byla použita pro měření obsahu endogenních sacharidů jiná kolona (IEX Ca^{2+}) než u ostatních experimentů. Zde bylo podstatné především zachytit obsah rafinózy, kterou by jinak nebylo možné odlišit od sacharózy na koloně IEX Pb^{2+} (viz kapitola 3.3.2). Kolona IEX Ca^{2+} naopak špatně dělí sacharózu od melibiózy a fruktózu od inositolu, proto je v grafech uveden souhrnný obsah obou dvojic sacharidů. U obou opakování bylo zaznamenáno významné navýšení celkového obsahu sacharidů, podobně jako v případě varianty na sacharóze. Zde však bylo za nárůst celkového sacharidů odpovědné významné navýšení obsahu rafinózy z přibližně 3 % obsahu celkových sacharidů u kontrolní varianty na 10 % - 20 % u varianty vystavené nízkým teplotám (graf 10F, H). K navýšení obsahu rafinózy došlo u obou kultivarů ve stejné míře. Akumulace rafinózy hraje důležitou roli při chladové aklimaci u některých bylin i dřevin. U *Ajuga reptans*, který je významným producentem sacharidů rafinózové

řady (RFO), byly zaznamenány výrazné změny obsahu RFO během roku. Zatímco v letních měsících tvořil obsah RFO 75 mg/g čerstvé hmotnosti, s příchodem nízkých teplot v období podzimu obsah RFO vzrostl až na 200 mg/g čerstvé hmotnosti. Podobně u rostlin kultivovaných 14 dní při 10°C ve dne a 3°C v noci byl zaznamenán nárůst obsahu RFO. Akumulace RFO je v tomto případě způsobena především aktivací galaktinolsyntázy (Bachmann et al., 1994). U *Rubus idaeus*, zástupce dřevin, bylo v případě semenáčků *in vitro* i celistvých rostlin pěstovaných v kontejnerech, které byly vystaveny chladové aklimaci po 14 dní při 15°C následovaných 18 dny při 2°C, zjištěn nárůst obsahu rafinózy po snížení teploty na 2°C, který se postupně s časem zvyšoval. U takto ošetřených rostlin byl zaznamenán výrazný nárůst obsahu sacharózy na úkor hexózu (Palonen et al., 2000). Podobně u stonkových segmentů oliv *in vitro* vystavených 4°C po dobu 10 a 30 dní byl zjištěn nárůst obsahu RFO (Rejšková et al., 2007). Rafinóza vedle samotné osmotické a osmoprotektivní funkce zabraňuje krystalizaci sacharózy, která je sama o sobě významným osmoprotektantem. Sacharidy rafinózové řady tak podporují vitrifikovaný stav cytoplasmy, ve kterém je chráněna struktura makromolekul a buněčných membrán (Liu et al., 1998; Peterbauer a Richter, 2001). Protože není v tomto případě možné stanovit obsah sacharózy, nelze určit, zda také došlo ke změně obsahu sacharózy po vystavení chladu. Nicméně podle předchozího experimentu s kulturami na sacharóze bylo zaznamenáno spíše snížení jejího obsahu. Zjištěná akumulace rafinózy by tak mohla být zapříčiněna potlačením aktivity α -galaktosidázy, enzymu zajišťujícího první krok degradace rafinózy jejím štěpením na molekulu sacharózy a galaktózy. Rafinóza přijatá z média tak není využívána jako zdroj uhlíku a energie, ale dochází k její akumulaci jako osmotika a kryoprotektantu. Z výsledků získaných u tkáňových kultur jabloně lze usuzovat, že rafinóza hraje důležitou úlohu při chladové aklimaci.

5.8 Vliv simulace stresu aplikací kyseliny abscisové na obsah a spektrum endogenních sacharidů

Kyselina abscisová (ABA) je rostlinným fytohormonem s důležitou rolí ve stresové signalizaci. Zvýšená hladina ABA ovlivňuje expresi mnoha genů, jejichž produkty se účastní stresových reakcí, zejména při nedostatku vody, chladovém stresu a zasolení. Signální drahou kys. abscisové je také ovlivňováno zavírání průduchů zabraňující nadměrným ztrátám vody, aktivita iontových kanálů, ale jsou jí řízeny i vývojové procesy,

např. růst kořenů, rozmístění průduchů u vyvíjejících se listů nebo listová morfologie vedoucí k adaptaci rostliny na nepříznivé podmínky (Xiong, 2007).

Cílem experimentu bylo zjistit, zda ošetření ABA vyvolá u tkáňových kultur stresovou reakci, která se nějakým způsobem promítne v zastoupení jednotlivých sacharidů nebo celkového obsahu rozpustných sacharidů. Další otázkou bylo, zda se reakce na simulaci stresu bude lišit mezi oběma kultivary s různou odolností ke stresu. Tkáňové kultury kultivarů Šampion Red a Idared na standardním médiu s 1,5 % sacharózy a 1,5 % sorbitolu byly po dobu 7 dní vystaveny působení $25\mu\text{mol.l}^{-1}$ ABA, 9% PEGu, nebo kombinovaného ošetření $25\mu\text{mol.l}^{-1}$ ABA a 9% PEGu. Růst kultur byl u tohoto experimentu značně heterogenní (graf 11A, B). Tato heterogenita může být způsobena přenesením kultur na dobu experimentu do tmavého kultivačního boxu vzhledem k nestabilitě ABA na světle. Vzhledem k tomu, že veškerá kultivace včetně ostatních experimentů byla od počátku odvozování kultur prováděna na světle, může přenesení kultur do tmy znamenat zásah, který naruší stabilitu kultur. Přestože jsou tkáňové kultury heterotrofní a zcela závislé na přísunu exogenních sacharidů z média, mohou reagovat na změnu světelných podmínek díky signalizaci zprostředkované kryptochromy. Kryptochromy jsou fotoreceptory citlivé na modré světlo, které přenáší signál do jádra a ovlivňují expresi celé řady genů. Bylo prokázáno, že u dvouděložných rostlin s hypogeickým klíčením signál zprostředkovaný kryptochromy inhibuje růst hypokotylu na světle a spouští expanzi a deetiolaci děloh (Arnim a Deng, 1996). Z tohoto důvodu nelze vyvozovat jednoznačné závěry o chování kultur u jednotlivých variant, nicméně u kultur ošetřených ABA bylo zaznamenáno zhoršení růstu oproti kontrole, přestože tento rozdíl nebyl průkazný (graf 11A, B). Nejhorší růst byl zaznamenán u varianty s kombinovaným ošetřením ABA a PEGu, kde je efekt samotného osmotického stresu posílen aplikací tohoto fytohormonu. Z grafů obsahu vody (graf 11C, D) je patrné, že podíl vody na čerstvé hmotnosti u kultur vystavených 9 % PEGu a kombinovaného ošetření PEGu s ABA je srovnatelný. Dalo by se očekávat, že v případě kombinovaného ošetření by se přítomnost ABA mohla projevit vyšším podílem vody z důvodu lepšího udržení vodní bilance, nicméně tento předpoklad se nepotvrdil. Podíl vody na čerstvé hmotnosti u varianty ošetřené samotnou ABA se nelišil od kontroly. Mezi oběma kultivary nebyly zjištěny žádné rozdíly. Podobně jako v případě růstových koeficientů, byl celkový obsah sacharidů u jednotlivých variant značně heterogenní. Lze však říci, že v případě kombinovaného ošetření ABA a PEGu došlo u obou kultivarů k mírnému navýšení obsahu celkových sacharidů oproti variantě ošetřené pouze PEGem, které by bylo možné přičíst indukci stresové odpovědi kys. abscisovou (graf 12A, C).

U varianty ošetřené ABA bylo zjištěno mírné navýšení obsahu sorbitolu na úkor obsahu sacharózy, avšak pouze v prvním opakování (graf 12B). U varianty ošetřené kombinací ABA a PEGu byl zaznamenán mírný nárůst obsahu sorbitolu překvapivě pouze u kultivaru Idared, který je méně odolný ke stresu. Kobashi et al. (2000) popsali navýšení obsahu sorbitolu, sacharózy i celkového obsahu sacharidů u plodů (*Prunus persica* L.) při nedostatku vody. Za toto navýšení obsahu sacharidů v plodech rostlin vystavených nedostatku vody byla nejspíše zodpovědná aktivace signální dráhy ABA, jejíž obsah se také zvýšil (Kobashi et al., 2000). Také u vakuol izolovaných z nezralých plodů jabloně (*Malus pumila*) dochází ke zvýšení příjmu sorbitolu z média po ošetření ABA (Yamaki a Asakura, 1991). Kanayama et al., (2006) popsali vliv ABA na zvýšení exprese genu pro S6PDH, enzymu biosyntetické dráhy sorbitolu. Akumulovaný sorbitol se ve výše uvedených případech pravděpodobně uplatňuje jako osmotikum a osmoprotektant. Z výsledků prvního opakování by se dalo usuzovat, že tkáňové kultury jabloně ošetřené ABA využívají přednostně jako zdroj uhlíku a energie sacharózu, zatímco sorbitol je chráněn před degradací jako osmoprotektant a osmotikum (graf 12B). Ve druhém opakování se díky heterogenitě obsahu sacharidů tento závěr nepodařilo potvrdit. Tato heterogenita může být, jak už bylo zmíněno výše, způsobena přenesením kultur na dobu experimentu do tmavého kultivačního boxu vzhledem k nestabilitě ABA na světle. U stonkových segmentů jabloně (*Malus hupehensis*) ošetřených $25\mu\text{mol.l}^{-1}$ ABA, nebo kombinaci 20% PEGu a ABA došlo k akumulaci sorbitolu v listech. Byl také zjištěn nárůst obsahu enzymů biosyntézy sorbitolu S6PDH a S6PP v listech celistvých rostlin. Zatímco za nárůst obsahu sorbitolu v listech po ošetření ABA je tedy odpovědné především posílení jeho syntézy, u kořenů byl zaznamenán pokles aktivity SDH, enzymu účastnícího se utilizace sorbitolu (Meng et al., 2008). Z toho můžeme usuzovat, že akumulace sorbitolu u celistvých rostlin jabloně je dána souhrnem posílení syntézy tohoto cukerného alkoholu ve zdrojových listech a omezení jeho utilizace v kořenech. U tkáňových kultur ošetřených ABA bylo zjištěno, že navýšení podílu sorbitolu na celkových sacharidech je spojeno se snížením obsahu sacharózy (graf 12B). Tuto závislost je možné vysvětlit omezením utilizace sorbitolu a jeho přednostního využití jako osmotika a osmoprotektantu, zatímco sacharóza je využívána jako zdroj energie. Podobné snížení podílu sacharózy na celkových sacharidech bylo zaznamenáno i v případě varianty s 9 % PEGu v médiu, které však nebylo spojeno se zvýšením obsahu sorbitolu. Ze zjištěných výsledků se nepodařilo prokázat, že ošetření ABA vyvolá u tkáňových kultur jabloně reakci srovnatelnou s působením některého ze stresových faktorů sledovaných v této diplomové práci.

U tkáňových kultur jabloně *in vitro* se prokázalo, že působení sledovaných stresových faktorů je spojeno se změnami obsahu sacharidů, které jsou ovšem zejména výsledkem změn v utilizaci a akumulaci jednotlivých typů sacharidů. Dále bylo prokázáno, že změny se týkají jak sorbitolu, předpokládaného hlavního osmoprotektantu daného rostlinného druhu, tak i ve srovnatelné míře dalších sacharidů, tedy sacharózy, hexózy i rafinózy. V některých ohledech se reakce tkáňových kultur jabloně na stres podobala reakcím zjištěným u stonkových segmentů olivy, v jiných byla specifická pro tento rostlinný druh. Přestože se v obou případech jedná o dřeviny s podobnými fotosyntetickými produkty, využití jednotlivých sacharidů ve stresových reakcích je u jabloně i olivy odlišné.

5.9 Je syntéza cukerných alkoholů obecným mechanismem stresových reakcí?

Jak již bylo rozebráno v kapitole 2.6.4.2, syntéza lineárních cukerných alkoholů jako primárních fotosyntetických produktů je omezena na poměrně úzký okruh rostlin, do kterého však patří i některé zemědělsky významné plodiny. V posledních letech se však problematika cukerných alkoholů dostává do popředí zájmu díky četným důkazům o jejich přítomnosti, byť ve velmi malé koncentraci v rostlinách, které tyto sacharidy nesyntetizují jako produkty fotosyntézy. U mnoha rostlin byla prokázána přítomnost enzymů nutných pro biosyntézu a degradaci sorbitolu (Karuna et al., 2000; Ohta et al., 2005; Kanayama, 2009). Kromě samotné přítomnosti sorbitolu bylo zjištěno, že obsah sorbitolu, nebo enzymů účastnících se jeho biosyntézy se zvyšuje v souvislosti s působením stresových faktorů (Karuna et al., 2000). Přítomnost SDH, enzymu účastnícího se degradace sorbitolu, je možné vysvětlit její schopností využít jako substrát arabitol, který využívají některé patogenní houby jako osmotikum po napadení rostliny, nicméně přítomnost enzymů biosyntetické dráhy sorbitolu a sorbitolu samotného zůstává velkým otazníkem (Ohta et al., 2005). Jistě stojí za povšimnutí, že syntéza sorbitolu a jeho využití k osmotickému přizpůsobení není pouze rostlinným specifikem. Zatímco syntéza manitolu jako osmotika je vedle rostlin typická především pro houby a bakterie, sorbitol se účastní osmotického přizpůsobení také u živočichů člověka nevyjímaje. Bylo zjištěno, že sorbitol syntetizovaný pomocí A6PR se účastní osmoregulace v buňkách ledvinové dřeně u savců. V těchto buňkách, které jsou vystaveny vysoké koncentraci NaCl je syntéza A6PR regulována osmotickým potenciálem prostředí. Nacházejí-li se buňky ledvinové dřeně v hypertonickém prostředí, dochází u nich ke zvýšení syntézy A6PR vedoucí k akumulaci sorbitolu (Moriyama et al., 1989). Aldóza-6-fosfátoreduktáza je u člověka přítomna i v dalších

orgánech a její aktivita je spojena se zdravotními komplikacemi při diabetu. Ve zdravém organismu tvoří syntéza sorbitolu pouze minoritní cestu metabolismu glukózy. Při hyperglykémii však dochází k významné akumulaci sorbitolu uvnitř buněk vlivem nízké aktivity SDH a následnému hyperosmotickému stresu. Zvýšená koncentrace sorbitolu ve tkáních při diabetu je spojována se vznikem šedého zákalu, neuropatií a poškozením ledvin (Jeffery a Jörnvall, 1983).

U rostlin, které sorbitol nevyužívají jako primární fotosyntetický produkt, ale přesto byl jeho obsah v pletivech zaznamenán však vzhledem k velmi nízké koncentraci není možné vysvětlit jeho úlohou v osmotickém přizpůsobení. Nabízí se možnost jeho role ve zhášení ROS. Tomu by nasvědčovalo zvýšení odolnosti ke stresovým faktorům zaznamenané u některých rostlin transformovaných geny pro syntézu cukerných alkoholů, kde není možné vzhledem k příliš nízkému obsahu připisovat tento efekt osmotickému přizpůsobení (Chiang et al., 2005). Vedle toho je možné usuzovat na případnou signální úlohu polyolů, podobně jako bylo nedávno zjištěno v případě trehalózy (Schluepmann et al., 2003). To ovšem vyvolává otázku do jaké míry jsou tyto role důležité také u rostlin, které sorbitol produkují ve významné míře jako primární produkt fotosyntézy a využívají jej pro transport uhlíku na dlouhou vzdálenost. Výzkum na tomto poli je však teprve v počátcích a pro pochopení přesné funkce sorbitolu, ale i dalších cukerných alkoholů, při stresových reakcích u rostlin je třeba dalšího zkoumání.

6. Závěry

Studium růstových charakteristik a obsahů a spekter nestrukturních sacharidů u dvou tkáňových kultur jabloně (*Malus domestica*) cv. Šampion Red a Idared *in vitro*, za podmínek stresu salinity, osmotického stresu a stresu nízké teploty, vedlo k následujícím poznatkům:

- **Sacharóza, sorbitol a rafinóza (v koncentraci 3 %) nejsou srovnatelným zdrojem uhlíku a energie pro růst tkáňových kultur jabloně v podmínkách *in vitro*. S vyšší koncentrací sacharózy, nebo sorbitolu (5%) bylo zaznamenáno zhoršení růstu a navýšení celkového obsahu sacharidů, zastoupení příslušného sacharidu v sacharidovém spektru se s koncentrací neměnilo.**
- **Tkáňové kultury jabloně jsou schopny přijímat manitol z média a akumulovat tento cukerný alkohol, zřejmě ho však nemohou využít jako zdroj uhlíku a energie.**
- **Zasolení způsobuje výraznější zhoršení růstu u méně odolného kultivaru Idared v porovnání s odolnějším kultivarem Šampion Red. Se zvyšující se koncentrací NaCl se na médiu s 3 % sacharózy zvyšuje celkový obsah sacharidů u kultivaru Šampion Red, nikoliv u kultivaru Idared. Za navýšení obsahu sacharidů jsou přednostně odpovědné hexózy. Na médiu se směsí sorbitolu a sacharózy způsobuje mírná salinita navýšení celkového obsahu sacharidů u kultivaru Šampion Red spojené s navýšením podílu sacharózy a sorbitolu na celkových sacharidech. Zvýšení stresové zátěže vede k poklesu celkového obsahu sacharidů.**
- **Osmotický stres vyvolaný nepenetrujícím osmotikem působí významné omezení růstu doprovázené snížením celkového obsahu sacharidů u obou kultivarů a snížením podílu sorbitolu na celkovém obsahu sacharidů. Manitol jako penetrující osmotikum vyvolává navýšení celkového obsahu sacharidů způsobené manitolem přijatým z média.**
- **Chladový stres vyvolává shodné zhoršení růstu u obou dvou kultivarů na médiu se sacharózou, nebo rafinózou. Na médiu s rafinózou indukuje významné navýšení podílu rafinózy na celkových sacharidech, a to u obou kultivarů.**
- **Ošetření kys. abscisovou v kombinaci s osmotickým stresem vyvolává navýšení celkového obsahu sacharidů. Samotné ošetření kys. abscisovou nevyvolává reakci srovnatelnou s některým z testovaných stresových faktorů.**
- ❖ **Rozdíly mezi oběma kultivary, které se *in vivo* liší odolností vůči stresu, se za daných experimentálních podmínek projeví při působení stresu zasolení, a to jak na úrovni růstu kultur, tak na úrovni akumulace sacharidů. Rozdílné chování při stresu nízkých teplot nebylo prokázáno.**

7. Seznam použité literatury

- Abebe, T., Guenzi, A.C., Martin, B., Cushman, J.C.:** Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology* 131: 1748–1755, (2003).
- Agarie, S., Kawaguchi, A., Kodera, A., Sunagawa, H., Kojima, H., Nose, A., Nakahara, T.:** Potential of the Common Ice Plant, *Mesembryanthemum crystallinum* as a New High-Functional Food as Evaluated by Polyol Accumulation. *Plant Production Science* 12(1): 37-46, (2009).
- Allen, D.J., Ort, D.R.:** Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* 6(1): 36-42, (2001).
- Almeida, A.M., Villalobos, E., Araujo, S.S., Leyman, B., Van Dijck, P., Alfaro-Cardoso, L., Fevereiro, P.S., Torne, J.M., Santos, D.M.:** Transformation of tobacco with an *Arabidopsis thaliana* gene involved in trehalose biosynthesis increases tolerance to several abiotic stresses. *Euphytica* 146(1-2): 165-176, (2005).
- Archbold, D.D., Nosarzewski, M., Clements, A.M., Downie, A.B.:** Early apple fruit development and sorbitol dehydrogenase. *Acta Horticulturae* 636: 443-446, (2004).
- Arndt, S.K., Livesley, S.J., Merchant, A., Bleby, T.M., Grierson, P.F.:** Quercitol and osmotic adaptation of field-grown *Eucalyptus* under seasonal drought stress. *Plant Cell and Environment* 31(7): 915-924, (2008).
- Arnim, A., Deng, X-W.:** Light control of seedling development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 215–243, (1996).
- Bachmann, M., Keller, F.:** Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. – intercellular and intracellular compartmentation. *Plant Physiology* 109(3): 991-998, (1995).
- Bachmann, M., Matile, P., Keller, F.:** Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. – Cold acclimation, translocation, and sink to source transition – Discovery of chain elongation enzyme. *Plant Physiology* 105(4): 1335-1345, (1994).
- Bajji, M., Kinet, JM, Lutts, S.:** Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Science* 137(2): 131-142, 1998.
- Bartels, D., Nelson, D.:** Approaches to improve stress tolerance using molecular-genetics. *Plant Cell and Environment* 17(5): 659-667, (1994).
- Bartels, D., Sunkar, R.:** Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24(1): 23-58, (2005).
- Bartoníčková, A.:** Vliv osmotického stresu na růst rostlin celeru řapíkatého (*Apium graveolens* L.) v podmínkách *in vitro*. Diplomová práce. Praha, 1999.
- Beck, E.H., Heim, R., Hansen, J.:** Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *Journal of Biosciences* 29(4): 449-459, (2004).
- Bel, A.J.E., Hess, P.H.:** Hexoses as phloem transport sugars: the end of a dogma? *Journal of Experimental Botany* 59(2): 261-271, (2008).
- Bernstein, L.:** Salinity in irrigation and water resources, kapitola Salt tolerance of fruit crops: 54-56, (1981).
- Bianchi, G., Gamba, A., Limiroli, R., Pozzi, N., Elester, R., Salamini, F., Bartels, D.:** The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Physiologia Plantarum* 87(2): 223-226, (1993).

- Bianchi, G., Gamba, A., Murelli, C., Salamini, F., Bartels, D.:** Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Journal* 1(3): 355-359, (1991).
- Bialeski, R.L.:** Sugar Alcohols. *Encyklopedia of Plant Physiology, New Series* (Loewus, F., Tanner, W., eds) 13A: 158-192, Springer-Verlag, Berlin, (1982).
- Blumwald, E., Aharon, G.S. and Apse, M.P.:** Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 140-151, (2000).
- Bota, J., Stasyk, O., Flexas, J., Medrano, H.:** Effect of water stress on partitioning of C-14-labelled photosynthates in *Vitis vinifera*. *Functional Plant Biology* 31(7): 697-708, (2004).
- Braun, R., Keller, F.:** Vacuolar chain elongation of raffinose oligosaccharides in *Ajuga reptans*. *Australian Journal of Plant Physiology* 27(8-9): 743-746, (2000).
- Bray, E.A., Baily-Serres, J., Weretilnyk, E.:** Responses to abiotic stresses. *Kapitola Buchanan, B., Guissem, W., Jones, R.: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists:* 1158-1203.
- Calamar, A., Klerk, G.J.:** Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 207–212, (2002).
- Clark, A.J., Blissett, K.J., Oliver, R.P.:** Investigating the role of polyols in *Cladosporium fulvum* during growth under hyper-osmotic stress and in planta. *Planta* 216: 614– 619, (2003).
- Conde, C., Silva, P., Agasse, A., Lemoine, R., Delrot, S., Tavares, R., Geros, H.:** Utilization and transport of mannitol in *Olea europaea* and implications for salt stress tolerance. *Plant and Cell Physiology* 48(1): 42-53, (2007).
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., Amrani, A.E.:** Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 57(3): 449–459, (2006).
- Cox, S.E., Stushnoff, C.:** Temperature-related shifts in soluble carbohydrate content during dormancy and cold acclimation in *Populus tremuloides*. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne de recherche forestiere* 31(4): 730-737, (2001).
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M., Anchooguy, T.J.:** Are freezing and dehydration similar stress vectors – A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27(3): 219-231, (1990).
- Cuin, T.A., Shabala, S.:** Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell and Environment* 30: 875–885, (2007).
- Dajic, Z.:** Salt stress, *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants* 41-99, (2006).
- Deguchi, M., Bennett, A.B., Yamaki, S., Yamada, K., Kanahama, K., Kanayama, Y.:** An engineered sorbitol cycle alters sugar composition, not growth, in transformed tobacco. *Plant Cell and Environment* 29(10): 1980-1988, (2006).
- Deguchi, M., Koshita, Y., Gao, M., Tao, R., Tetsumur, T., Yamaki, S., Kanayama, Y.:** Engineered sorbitol accumulation induces dwarfism in Japanese persimmon. *Journal of Plant Physiology* 161(10): 1177–84, (2004).
- Drennan, P.M., Smith, M.T., Goldsworthy, D., Vanstaden, J.:** The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. *Journal of Plant Physiology* 142(4): 493-496, (1993).
- Du, Y.C., Nose, A.:** Effects of chilling temperature on the activity of enzymes of sucrose synthesis and the accumulation of saccharides in leaves of three sugarcane cultivars differing in cold sensitivity. *Photosynthetica* 40(3): 389-395, (2002).
- Echeverria, E.:** Vesicle-mediated solute transport between the vacuole and the plasma membrane. *Plant Physiology* 123: 1217-1226, (2000).

- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D.:** New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13(4): 17R-27R, (2003).
- Everard, J.D., Gucii, R., Kann, S.C., Flore, J.A., Loescher, W.H.:** Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiology* 106(1): 281-292, (1994).
- Flinn, C.L., Ashworth, E.N.:** The relationship between carbohydrates and flower bud hardiness among 3 *Forsythia* taxa. *Journal of The American Society for Horticultural Science* 120(4): 607-613, (1995).
- Fougere, F., Lerudulier, D., Streeter, J.G.:** Effects of salt stress on amino-acid, organic-acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* 96(4): 1228-1236, (1991).
- Gamalei, Y.:** (1989) Citováno podle Nadwodnik, J., Lohaus, G.: Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* 227(5): 1079-1089, (2008).
- Gangopadhyay, G., Basu, S., Mukherjee, B.B., Gupta, S.:** Effects of salt and osmotic shocks on unadapted and adapted callus lines of tobacco. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49(1): 45-52, (1997).
- Gao, M., Tao, R., Miura, K., Dandekar, A.M., Sugiura, A.:** Transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Science* 160(5): 837-845, (2001).
- Gao, Z.F., Maurousset, L., Lemoine, R., Yoo, S.D., van Nocker, S., Loescher, W.:** Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiology* 131(4): 1566-1575, (2003).
- Gao, Z.F., Schaffer, A.A.:** A novel alkaline alpha-galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. *Plant Physiology* 119(3): 979-987, (1999).
- Garcia, A.B., Engler, J.D., Iyer, S., Gerats, T., VanMontagu, M., Caplan, A.B.:** Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiology* 115(1): 159-169, (1997).
- Garg, A.K., Kim, J.K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Do Choi, Y., Kochian, L.V., Wu, R.J.:** Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(25): 15898-15903, (2002).
- Gilbert, G.A., Wilson, C., Madore, M.A.:** Root-zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in *Coleus*. *Plant Physiology* 115(3): 1267-1276, (1997).
- Gimeno, J., Gadea, J., Forment, J., Perez-Valle, J., Santiago, J., Martinez-Godoy, M.A., Yenush, L., Belles, J.M., Brumos, J., Colmenero-Flores, J.M., Talon, M., Serrano, R.:** Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. *Plant Molecular Biology* 70(4): 403-420, (2009).
- Goddijn, O., Smeekens, S.:** Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant Journal* 14(2): 143-146, (1998).
- Goddijn, O.J.M., Verwoerd, T.C., Voogd, E., Krutwagen, P.W.H.H., deGraaf, P.T.H.M., Poels, J., vanDun K., Ponstein, A.S., Damm, B., Pen, J.:** Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiology* 113(1): 181-190, (1997).
- Gray, G.R., Chauvin, L.P., Sarhan, F., Huner, N.P.A.:** Cold acclimation and freezing tolerance - A complex interaction of light and temperature. *Plant Physiology* 114(2): 467-474, (1997).

- Gucci, R., Moing, A., Gravano, E., Gaudillere, J.P.:** Partitioning of photosynthetic carbohydrates in leaves of salt-stressed olive plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 25(5): 571-579, (1998).
- Haab, C.I., Keller, F.:** Purification and characterization of the raffinose oligosaccharide chain elongation enzyme, galactan: galactan galactosyltransferase (GGT), from *Ajuga reptans* leaves. *Physiologia Plantarum* 114(3): 361-371, (2002).
- Handley, L.W., Pharr, D.M., McFeeters, R.F.:** Relationship between galactinol synthase activity and sugar composition of leaves and seeds of several crop species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108(4): 600-605, (1983).
- Harada, H., Murai, Y.:** Micropropagation of *Prunus mume*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46(3): 265-267, (1996).
- Haritatos, E., Keller, F., Turgeon, R.:** Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo* L. leaves: Implications for phloem loading. *Planta* 198(4): 614-622, (1996).
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J.:** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annua Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499, (2000).
- Hinesley, L.E., Pharr, D.M., Snelling, L.K., Funderburk, S.R.:** Foliar raffinose and sucrose in 4 conifer species – relationship to seasonal temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117(5): 852-855, (1992).
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J.:** Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6(9): 431-438, (2001).
- Chiang, Y., Stushnoff, C., McSay, A.E., Jones, M.L., Bohnert, H.J.:** Overexpression of mannitol-1-phosphate dehydrogenase increases mannitol accumulation and adds protection against chilling injury in petunia. *Journal of The American Society for Horticultural Science* 130: 605–610, (2005).
- Iannucci, A., Russo, M., Arena, L., Di Fonzo, N., Martiniello, P.:** Water deficit effects on osmotic adjustment and solute accumulation in leaves of annual clovers. *European Journal of Agronomy* 16(2): 111-122, (2002).
- Iordachescu, M., Imai, R.:** Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology* 50(10): 1223-1229, (2008).
- Jain, N., Babbar, S.B.:** Effect of carbon source on the shoot proliferation potential of epicotyl explants of *Syzygium cuminii*. *Biologia Plantarum* 47(1): 133-136, (2003).
- Jang, I.C., Oh, S.J., Seo, J.S., Choi, W.B., Song, S.I., Kim, C.H., Kim, Y.S., Seo, H.S., Do Choi, Y., Nahm, B.H., Kim, J.K.:** Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiology* 131(2): 516-524, (2003).
- Jeffery, J., Jörnvall, H.:** Enzyme relationships in a sorbitol pathway that bypasses glycolysis and pentose phosphates in glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 901-905, (1983).
- Jenkins, C.L.D., Snow, A.J., Simpson, R.J., Higgins, T.J., Jacques, N.A., Pritchard, J., Gibson, J., Larkin, P.J.:** Fructan formation in transgenic white clover expressing a fructosyltransferase from *Streptococcus salivarius*. *Functional Plant Biology* 29(11): 1287-1298, (2002).
- Jennings, D.B., Daub, M.E., Pharr, D.M., Williamson, J.D.:** Constitutive expression of a celery mannitol dehydrogenase in tobacco enhances resistance to the mannitol-secreting fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Plant Journal* 32: 41–49, (2002).

- Kadota, M., Niimi, Y.:** Influences of carbon sources and their concentrations on shoot proliferation and rooting of 'Hosui' Japanese pear. *Hortscience* 39(7): 1681-1683, (2004).
- Kanayama, Y., Watanabe, M., Moriguchi, R., Deguchi, M., Kanahama, K., Yamaki, S.:** Effects of low temperature and abscisic acid on the expression of the sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene in apple leaves. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 75(1): 20-25, (2006).
- Kanayama, Y.:** Physiological roles of polyols in horticultural crops. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 78(2): 158-168, (2009).
- Kandler, O., Hopf, H.:** Oligosaccharides based on sucrose (sucrosyl oligosaccharides). In: Loewus, F.A., Tanner, W., (Eds.): *Plant Carbohydrates, I. Intracellular carbohydrates*. *Encyklopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 13A*: 348-383, Springer-Verlag Berlin, (1982).
- Karhu, S.T.:** Sugar use in relation to shoot induction by sorbitol and cytokinin in apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122(4): 476-480, (1997).
- Karuna, B.S., Rajendrakumar, C.S.V., Reddy, A.R.:** Aldose reductase in rice (*Oryza sativa* L.): stress response and developmental specificity. *Plant Science* 160: 149-157, (2000).
- Kawakami, A., Sato, Y., Yoshida, M.:** Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *Journal of Experimental Botany* 59(4): 793-802, (2008).
- Keller, F., Pharr, D.M.:** (1996). Citováno podle Sprenger, N., Keller, F.: Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: The roles of two distinct galactinol synthases. *Plant Journal* 21(3): 249-258, (2000).
- Kerepesi, I., Galiba, G., Banyai, E.:** Osmotic and salt stresses induced differential alteration in water soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(12): 5347-5354, (1998).
- Kerstiens, G., Tych, W., Robinson, M.F., Mansfield, T.A.:** Sodium-related partial stomatal closure and salt tolerance of *Aster tripolium*. *New Phytologist* 153(3): 509-515, (2002).
- Khelil, A., Menu, T., Ricard, B.:** Adaptive response to salt involving carbohydrate metabolism in leaves of a salt-sensitive tomato cultivar. *Plant Physiology and Biochemistry* 45(8): 551-559, (2007).
- Kishitani, S., Watanabe, K., Yasuda, S., Arakawa, K., Takabe, T.:** Accumulation of glycinebetaine during cold-acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. *Plant Cell and Environment* 17(1): 89-95, (1994).
- Klages, K., Donnison, H., Wunsche, J., Boldingh, H.:** Diurnal changes in non-structural carbohydrates in leaves, phloem exudate and fruit in 'Braeburn' apple. *Australian Journal of Plant Physiology* 28(2): 131-139, (2001).
- Klepek, Y.S., Geiger, D., Stadler, R., Klebl, F., Landouar-Arsivaud, L., Lemoine, R., Hedrich, R., Sauer, N.:** *Arabidopsis* POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺ symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *Plant Cell* 17(1): 204-218, (2005).
- Knight, H., Knight, M.R.:** Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* 6: 262-267, (2001).
- Kobashi, K., Gemma, H., Iwahori, S.:** Abscisic acid content and sugar metabolism of peaches grown under water stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125(4): 425-428, (2000).

- Kollar, A., Seemüller, E.:** Chemical composition of phloem exudated of *Mycoplasma* infected apple trees. *Journal of Phytopatology – Phytopatologische Zeitschrift* 128(2): 99-111, (1990).
- Larcher, W.:** *Physiological Plant Ecology* (3rd edition). Berlin: Springer, (1995).
- Lawlor, D.W., Cornic, G.:** Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment* 25(2): 275-294, (2002).
- Lee, S.B., Kwon, H.B., Kwon, S.J., Park, S.C., Jeong, M.J., Han, S.E., Byun, M.O., Daniell, H.:** Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Molecular Breeding* 11(1): 1-13, (2003).
- Leifert, C., Murphy, K.P., Lumsden, P.J.:** Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Science* 14: 83-109, (1995).
- Link, T., Lohaus, G., Heiser, I., Mendgen, K., Hahn, M., Voegele, R.T.:** Characterization of a novel NADP⁺ dependent D-arabitol dehydrogenase from the plant pathogen *Uromyces fabae*. *Biochemical Journal* 389: 289–295, (2005).
- Liu, J.J.J., Krenz, D.C., Galvez, A.F., de Lumen, B.O.:** Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. *Plant Science* 134(1): 11-20, (1998).
- Lo Bianco, R., Rieger, M., Sung, S.S.:** Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach. *Physiologia Plantarum* 108: 71–78, (2000).
- Loescher, W. H., Everard, J. D. (1996):** citováno podle McQueen, J.C., Minchin, P.E.H., Brief look at sorbitol in 1-year-old shoots of apple (*Malus domestica*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 33: 81–87, (2005).
- Loescher, W.H., Marlow, G.C., Kennedy, R.A.:** Sorbitol metabolism and sink-source interconversions in developing apple leaves. *Plant Physiology* 70(2): 335-339, (1982).
- Loescher, W.H., McCamant, T., Keller, J.D.:** Carbohydrate Reserves, Translocation, and Storage in Woody Plant Roots. *Hortscience* 25: 274 – 281, (1990).
- Loescher, W.H.:** Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiologia Plantarum* 70: 553-557, (1987).
- Loescher, W.H.:** Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiologia Plantarum* 70(3): 553-557, (1987).
- Loewus, F.A., Murthy, P.P.N.:** Myo-inositol metabolism in plants. *Plant Science* 150(1): 1-19, (2000).
- Lunn, J.E., Ashton, A.R., Hatch, M.D., Heldt, H.W.:** Purification, molecular cloning, and sequence analysis of sucrose-6(F)-phosphate phosphohydrolase from plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(23): 12914-12919, (2000).
- Lunn, J.E., MacRae, E.:** New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology* 6(3): 208-214, (2003).
- Lutts, S., Almansouri, M., Kinet, J.M.:** Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. *Plant Science* 167: 9-18, (2004).
- Marino, G., Bertazza, G., Magnanini, E., Altan, A.D.:** Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 34(3): 235-244, (1993).
- Maurel, K., Sakr, S., Gerbe, F., Guilliot, A., Bonhomme, M., Rageau, R., Petel, G.:** Sorbitol uptake is regulated by glucose through the hexokinase pathway in vegetative peach-tree buds. *Journal of Experimental Botany* 55(398): 879-888, (2004).

- McQueen, J.C., Minchin, P.E.H.:** Brief look at sorbitol in 1-year-old shoots of apple (*Malus domestica*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 33: 81–87, (2005).
- Meng, Y.L., Xu, X.F., Khanizadeh, S., Zhang, M.J., Wang, Q., Han, Z.H.:** Contribution of abscisic acid to sorbitol accumulation in drought-stressed *Malus hupehensis*. *Journal of Food Agriculture and Environment* 6(2): 319-326, (2008).
- Merchant, A., Tausz, M., Arndt, S.K., Adams, M.A.:** Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 *Eucalyptus* species suggest contrasting physiological responses to water deficit. *Plant Cell and Environment* 29(11): 2017-2029, (2006).
- Merlo, R., Passera, C.:** Changes in carbohydrate and enzyme levels during development of leaves of *Prunus persica*, a sorbitol synthesizing species. *Physiologia Plantarum* 83(4): 621-626, (1991).
- Mittler, R.:** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410, (2002).
- Moffatt, B., Ewart, V., Eastman, A.:** Cold comfort: plant antifreeze proteins. *Physiologia Plantarum* 126(1): 5-16, (2006).
- Moing, A., Carbonne, F., Zipperlin, B., Svanella, L., Gaudillere, J.P.:** Phloem loading in peach: Symplastic or apoplastic? *Physiologia Plantarum* 101 (3): 489-496, (1997).
- Molassiotis, A.N., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Kofidis, G., Diamantidis, G., Therios, I.:** Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. *Biologia Plantarum* 50(3): 331-338, (2006).
- Moore, J.P., Hearshaw, M., Ravenscroft, N., Lindsey, G.G., Farrant, J.M., Brandt, W.F.:** Desiccation-induced ultrastructural and biochemical changes in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Australian Journal of Botany* 55(4): 482-491, (2007).
- Moriyama, T., Garciapereza, A., Burg, M.B.:** Osmotic regulation of aldose reductase protein synthesis in renal medullary cells. *Journal of Biological Chemistry* 264(28): 16810-16814, (1989).
- Müller, J., Aeschbacher, R.A., Wingler, A., Boller, T., Wiemken, A.:** Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 125(2): 1086-1093, (2001).
- Müller, J., Sprenger, N., Bortlik, K., Boller, T., Wiemken, A.:** Desiccation increases sucrose levels in *Ramonda* and *Haberlea*, two genera of resurrection plants in the *Gesneriaceae*. *Physiologia Plantarum* 100(1): 153-158, (1997).
- Munns, R., Tester, M.:** Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681, 2008.
- Munns, R.:** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment* 25: 239-250, 2002.
- Munns, R.:** Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell and Environment* 16: 15-24, (1993).
- Murata, N., Los, D.A.:** Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiology* 115(3): 875-879, (1997).
- Nadwodnik, J., Lohaus, G.:** Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* 227(5): 1079-1089, (2008).
- Negm, F.B., Loescher, W.H., Smith, O.E.:** Detection and characterization of sorbitol dehydrogenases from apple seeds, seedlings, leaves, and fruits. *Plant physiology* 63(5): 10-10, (1979).

- Negm, F.B., Loescher, W.H.:** Characterization and partial purification of aldose-6-phosphate reductase (alditol-6-phosphate NADP 1-oxidoreductase) from apple leaves. *Plant Physiology* 67(1): 139-142, (1981).
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Shigeoka, S.:** Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* 147(3): 1251-1263, (2008).
- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., Hanson, A.D.:** Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 2(2): 128-134, (1999).
- Ohta, K., Moriguchi, R., Kanahama, K., Yamaki, S., Kanayama, Y.:** Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-*Rosaceae* plant. *Phytochemistry* 66(4): 2822-2828, (2005).
- Palonen, P., Buszard, D., Donnelly, D.:** Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown in vitro and in vivo. *Physiologia Plantarum* 110(3): 393-401, (2000).
- Panikulangara, T.J., Eggers-Schumacher, G., Wunderlich, M., Stransky, H., Schöfl, F.:** Galactinol synthase1: a novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 3148-3158, (2004).
- Pattanagul, W., Madore, M.A.:** Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in coleus. *Plant Physiology* 121(3): 987-993, (1999).
- Paul, M.J., Cockburn, W.:** Pinitol, a compatible solute in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Journal of Experimental Botany* 40(219): 1093-1098, (1989).
- Pawlicki, N., Welander, M.:** Adventitious shoot regeneration from leaf segments of *in vitro* cultured shoots of the apple rootstock Jork-9. *Journal of Horticultural Science* 69(4): 687-696, (1994).
- Pennycooke, J.C., Jones, M.L., Stushnoff, C.:** Down-regulating alpha-galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia. *Plant Physiology* 133(2): 901-909, (2003).
- Pessaraki, M., Szabolcs, I.:** Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. *Handbook of Plant and Crop Stress*, (1999).
- Peterbauer, T., Richter, A.:** Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11: 185-197, (2001).
- Peters, S., Mundree, S.G., Thomson, J.A., Farrant, J.M., Keller, F.:** Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *Journal of Experimental Botany* 58(8): 1947-1956, (2007).
- Pharr, D.M., Stoop, J.M.H., Williamson, J.D., Feusi, M.E.S., Nassel, M.O., Conkling, M.A.:** The dual role of mannitol as osmoprotectant and photoassimilate in celery. *HortScience* 30(6): 1182-1188, (1995).
- Pilon-Smits, E.A.H., Terry, N., Sears, T., Kim, H., Zayed, A., Hwang, S.B., van Dun, K., Voogd, E., Verwoerd, T.C., Krutwagen, R.W.H.H., Goddijn, O.J.M.:** Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *Journal of Plant Physiology* 152(4-5): 525-532, (1998).
- Pilon-Smits, E.A.H., Terry, N., Sears, T., van Dun, K.:** Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry* 37(4): 313-317, (1999).
- Pommerrenig, B., Papini-Terzi, F.S., Sauer, N.:** Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant Physiology* 144(2): 1029-1038, (2007).

- Procházka** a kolektiv: Fyziologie rostlin. Academia Praha, (1998).
- Ramanjulu, S., Bartels, D.:** Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell and Environment* 25(2): 141-152, (2002).
- Rascio, A., Platani, C., Scalfati, G., Tonti, A., Difonzo, N.:** The accumulation of solutes and water binding strenght in durum wheat. *Physiologia Plantarum* 90(4): 715-721, (1994).
- Reidel, E.J., Rennie, E.A., Amiard, V., Cheng, L., Turgeon, R.:** Phloem loading Strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiology* 139(3): 1601-1608, (2009).
- Rejšková, A., Patková, L., Stodůlková, E., Lipavská, H.:** The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *Journal of Plant Physiology* 164(2): 174-184, (2007).
- Rekarte-Cowie, I., Ebshish, O.S., Mohamed, K.S., Pearce, R.S.:** Sucrose helps regulate cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 59(15): 4205-4217, (2008).
- Renaut, J., Lutts, S., Hoffmann, L., Hausman, J.F.:** Responses of poplar to chilling temperatures: Proteomic and physiological aspects. *Plant Biology* 6(1): 81-90, (2004).
- Reyes-Diaz, M., Ulloa, N., Zuniga-Feest, A., Gutierrez, A., Gidekel, M., Alberdi, M., Corcuera, L.J., Bravo, L.A.:** *Arabidopsis thaliana* avoids freezing by supercooling. *Journal of Experimental Botany* 57(14): 3687-3696, (2008).
- Rhoades, J.D., Loveday, J. (1990).** Citováno podle Zhu, J.K., Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6(2): 66-71, 2001.
- Rhodes, D., Hanson, A.D.:** Quarternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 357-384, (1993).
- Robert, S., Simier, P., Fer, A.:** Purification and characterization of mannose 6-phosphate reductase, a potential target for control of *Striga hermontica* and *Orobanche ramosa*. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 233-237, (1999).
- Roessner-Tunali, U., Bjorn, H., Lytovchenko, A., Carrari, F., Bruediagam, C., Granot, D., Fernie, A.R.:** Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpression hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiology* 133: 84-99, (2003).
- Sarda, X., Tusch, D., Ferrare, K., Cellier, F., Alcon, C., Dupuis, J.M., Casse, F., Lamaze, T.:** Characterization of closely related delta-TIP genes encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air. *Plant Molecular Biology* 40(1): 179-191, (1999).
- Sasaki, H., Ichimura, K., Imada, S., Yamaki, S.:** Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation in cabbage seedlings. *Journal of Plant Physiology* 158(7): 847-852, (2001).
- Sengupta, S., Patra, B., Ray, S., Majumder, A.L.:** Inositol methyl tranferase from a halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Roxb. (Tateoka): regulation of pinitol synthesis under abiotic stress. *Plant Cell and Environment* 31(10): 1442-1459, (2008).
- Sheveleva, E., Chmara, W., Bohnert, H.J., Jensen, R.G.:** Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology* 115(3): 1211-1219, (1997).
- Sheveleva, E.V., Marquez, S., Chmara, W., Zegeer, A., Jensen, R.G., Bohnert, H.J.:** Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco - High amounts of sorbitol lead to necrotic lesions. *Plant Physiology* 117(3): 831-839, (1998).

- Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S., Paul, M.:** Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 6849–6854, (2003).
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M., Smeekens, S.:** Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. Plant Physiology 135(2): 879-890, (2004).
- Simier, P., Robert, S., Fer, A.:** Mannitol metabolism in darkness in the leaves of the semiparasitic angiosperm, *Thesium humile*. Plant Physiological Biochemistry 36(3): 237-245, (1998).
- Slesak, H., Skoczowski, A., Przywara, L.:** Exogenous carbohydrate utilisation by explants of *Brassica napus* cultured in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture 79(1): 45-51, (2004).
- Sotiropoulos, T.E.:** Effect of NaCl and CaCl₂ on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M 4 cultured *in vitro*. Biologia Plantarum 57(1): 177-180, (2007).
- Spollen, W.G., Nelson, C.J.:** Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. Plant Physiology 106(1): 329-336, (1994).
- Sprenger, N., Keller, F.:** Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases. Plant Journal 21(3): 249-258, (2000).
- Stitt, M., Hurry, V.:** A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. Current Opinion in Plant Biology 5(3): 199-206, (2002).
- Stoop, J.M.H., Pharr, D.M.:** Effect of different carbon sources on relative growth rate, internal carbohydrates, and mannitol 1-oxidoreductase activity in celery suspension cultures. Plant Physiology 103(3): 1001-1008, (1993).
- Stoop, J.M.H., Pharr, D.M.:** Mannitol metabolism in celery stressed by excess macronutrients. Plant Physiol 106: 503-511, (1994).
- Stoop, J.M.H., Williamson, J.D., Pharr, D.M.:** Mannitol metabolism in plants: A method for coping with stress. Trends in Plant Science 1(5): 139-144, (1996).
- Strand, A., Foyer, C.H., Gustafsson, P., Gardestrom, P., Hurry, V.:** Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. Plant Cell and Environment 26(4): 523-535, (2003).
- Strand, A., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardestrom, P., Stitt, M.:** Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. Plant Physiology 119(4): 1387-1397, (1999).
- Strimbeck, G.R., Kjellsen, T.D., Schaberg, P.G., Murakami, P.F.:** Cold in the common garden: comparative low-temperature tolerance of boreal and temperate conifer foliage. Trees-structure and Function 21(5): 557-567, (2007).
- Strogonov, B.P. (1964).** Citováno podle Dajic, Z., Salt stress, Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants 41-99, 2006.
- Sung, D.Y., Kaplan, F., Lee, K.J., Guy, C.L.:** Acquired tolerance to temperature extremes. Trends in Plant Science 8(4), (2003).
- Šircelj, H., Tausz, M., Grill, D., Batic, F.:** Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. Journal of Plant Physiology 162(12): 1308-1318, (2005).

- Šut'áková, L.:** Reakce na abiotický stres u rostlin s velkou diverzitou fotosyntetických produktů. Diplomová práce. Praha, (2006).
- Tabaei-Aghdaei, S.R., Pearce, R.S., Harrison, P.:** Sugars regulate cold-induced gene expression and freezing-tolerance in barley cell cultures. *Journal of Experimental Botany* 54(387): 1565-1575, (2003).
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.:** Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 29(4): 417-426, (2002).
- Tester, M., Davenport, D.:** Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503-527, (2003).
- Turgeon, R. (1996):** Citováno podle Noiraud, N., Maurousset, L., Lemoine, R.: Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 39(9): 717-728, (2001).
- Vernon, D.M., Bohnert, H.J.:** Osmoprotection in a facultative halophyte – transcriptional induction of an inositol O-methyl transferase involved in adaptation to salt stress. *Photosynthesis Research* 34(1): 217-217, (1992).
- Vítová, L., Stodůlková, A., Bartoníčková, A., Lipavská, H.:** Mannitol utilisation by celery (*Apium graveolens*) plants grown under different conditions in vitro. *Plant Science* 163: 907-916, (2002).
- Vítová, L.:** Vliv exogenních sacharidů, manitolu a sacharózy, na rostliny celeru řapíkatého (*Apium graveolens* var. dulce) v podmínkách in vitro. Diplomová práce. Praha, 1999.
- Wang, W.X., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A.:** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9(5): 244-252, (2004).
- Wang, X.L., Xu, Y.H., Peng, C.C., Fan, R.C., Gao, X.Q.:** Ubiquitous distribution and different subcellular localization of sorbitol dehydrogenase in fruit and leaf of apple. *Journal of Experimental Botany* 60(3): 1025-1034, (2009).
- Wang, Z., Quebedeaux, B., Stutte, G.W.:** Osmotic adjustment - effect of water stress on carbohydrates in leaves, stems and roots of apple. *Australian Journal of Plant Physiology* 22(5): 747-754, (1995).
- Wang, Z., Quebedeaux, B., Stutte, G.W.:** Partitioning of [¹⁴C]glucose into sorbitol and other carbohydrates in apple under water stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 23(3): 245-251, (1996).
- Wang, Z.C., Stutte, G.W.:** The role of carbohydrates in active osmotic adjustment in apple under water stress. *Journal of The American Society for Horticultural Science* 117(5): 816-823, (1992).
- Watari, J., Kobae, Y., Yamaki, S., Yamada, K., Toyofuku, K., Tabuchi, T., Shiratake, K.:** Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves. *Plant and Cell Physiology* 45(8): 1032-1041, (2004).
- Welling, A., Kaikuranta, P., Rinne, P.:** Photoperiodic induction of dormancy and freezing tolerance in *Betula pubescens*. Involvement of ABA and dehydrins. *Physiologia Plantarum* 100(1): 119-125, (1997).
- Xiong, L.:** Abscisic acid in plant response and adaptation to drought and salt stress. *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*: 193-221, (2007).
- Yamaki, S., Asakura, T.:** Stimulation of the uptake of sorbitol into vacuoles from apple fruit flesh by abscisic acid and into protoplasts by indoleacetic acid. *Plant and Cell Physiology* 32(2): 315-318, (1991).

- Yamaki, S.:** A sorbitol oxidase that converts sorbitol to glucose in apple leaf. *Plant and Cell Physiology* 21(4): 591-599, (1980).
- Yoshida, S., Hotsubo, K., Kawamura, Y., Murai, M., Arakawa, K., Takezawa, D.:** Alterations of intracellular pH in response to low temperature stresses. *Journal of Plant Research* 112(1106): 225-236, (1999).
- Zhang, F., Yang, Y.L., He, W.L., Zhao, X., Zhang, L.X.:** Effects of salinity on growth and compatible solutes of callus induced from *Populus euphratica*. *In Vitro Cellular And Developmental Biology – Plant* 40(5): 491-494, (2004).
- Zhou, R., Cheng, L.L., Dandekar, A.M.:** Down-regulation of sorbitol dehydrogenase and up-regulation of sucrose synthase in shoot tips of the transgenic apple trees with decreased sorbitol synthesis. *Journal of Experimental Botany* 57(14): 3647-3657, (2006).
- Zhou, R., Cheng, L.L., Wayne, R.:** Purification and characterization of sorbitol-6-phosphate phosphatase from apple leaves. *Plant Science* 165(1): 227-232, (2003).
- Zhou, R., Cheng, L.L.:** Competitive inhibition of phosphoglucose isomerase of apple leaves by sorbitol-6-phosphate. *Journal of Plant Physiology* 165(9): 903-910, (2008).
- Zhou, R., Sicher, R.C., Cheng, L.L., Quebedeaux, B.:** Regulation of apple leaf aldose-6-phosphate reductase activity by inorganic phosphate and divalent cations. *Functional Plant Biology* 30(10): 1037-1043, (2003).