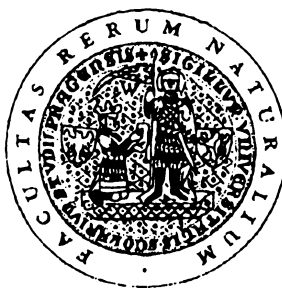


Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie rostlin



**Reakce na abiotický stres u rostlin s velkou diverzitou
fotosyntetických produktů**

Lenka Šuťáková

Praha 2006

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

Diplomovou práci jsem vypracovala na Katedře fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty UK v letech 2003-2006.

Prohlašuji, že předkládanou diplomovou práci jsem vypracovala samostatně na základě svých experimentů a s použitím citované literatury. Souhlasím se zapůjčením své diplomové práce ke studijním účelům.

Lenka Šutáková

Lenka Šutáková

Poděkování:

Děkuji paní doktorce Heleně Lipavské za odborné vedení a trpělivý přístup. Dále děkuji kolektivu naší laboratoře včetně naší laborantky paní Olgy Činglové a dalším kolegům za případné rady a pomoc. Mé díky také patří laboratoři pana inženýra Zámečníka ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Ruzyni za ochotu kultivace tkáňových kultur celeru v chladových podmínkách. Velký dík patří také mému manželovi a rodičům, kteří mi byli velkou oporou během celého studia.

Tato práce byla podporována grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy č.: 113100003

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A6PR	aldóza-6-fosfátreduktáza
ABA	kyselina abscisová
GAS	'general alarm' syndrom
GGT	galaktan:galaktan galaktozyltransferáza
GS	galaktinolsyntáza
Imt	inositolmetyltransferáza
INO1	inositol-1-fosfátsyntáza
Ins-Pase	inositol-1-fosfátfosfatáza
LAS	'local adaptation' syndrom
Mt1D	manitol-1-fosfátdehydrogenáza
M6PR	manóza-6-fosfátreduktáza
MDH	manitoldehydrogenáza
RFO	sacharidy rafinózové řady
ROS	aktivní formy kyslíku
RS	rafinózasyntáza
SDH	sorbitoldehydrogenáza
SPS	sacharózafosfátsyntáza
STS	stachyózasyntáza
TPS	trehalóza-6-fosfátsyntáza
α -Gal	α -galaktozidáza

1. ABSTRACT	7
2. ÚVOD	8
3. LITERÁRNÍ ÚVOD	10
3.1 Problematika rostlinného stresu obecně	10
3.1.1 Typy stresových faktorů	10
3.1.2 Charakteristika stresových reakcí	10
3.1.3 Je stres pouze škodlivý?	11
3.2 Vodní deficit	12
3.2.1 Rezistence vůči vodnímu deficitu	12
3.2.2 Reakce rostlinného organismu na nedostatek vody	12
3.2.3 Kyselina abscisová (ABA) a jiné signální dráhy	14
3.2.4 LEA proteiny	15
3.2.5 Chladový stres	15
3.2.6 Zasolení a jeho toxicita	16
3.3 Kompatibilní soluty	18
3.3.1 Hlavní funkce kompatibilních solutů během osmotického stresu	18
3.3.2 Cukerné alkoholy	19
3.3.2.1 Acyklické cukerné alkoholy	20
3.3.2.1.1 Manitol	21
3.3.2.1.2 Sorbitol	27
3.3.2.2 Myo-inositol a jiné cyklické cukerné alkoholy (cyklitoly)	28
3.3.3 Neredukující sacharidy	29
3.3.3.1 Sacharóza	29
3.3.3.2 Trehalóza	31
3.3.3.3 Sacharidy rafinózové řady (RFO)	32
4. MATERIÁL A METODY	35
4.1 Rostlinný materiál	35
4.2 Kultivace rostlinného materiálu	35
4.2.1 Práce v aseptických podmínkách	35
4.2.2 Kultivační média	35
4.2.2.1 Růstové regulátory	38
4.2.2.2 Příprava 1 litru kultivačního média MS	39
4.2.3 Kultivační podmínky	39
4.3. Typy použitých kultur a jejich odvození	40
4.3.1 Tkáňové kultury celeru	40
4.3.2 Tkáňové kultury tabáku	41
4.3.3 Kultury oliv <i>in vitro</i>	41
4.4 Stanovení obsahu endogenních sacharidů pomocí HPLC	41
4.4.1 Příprava vzorků pro stanovení rozpustných nestrukturních sacharidů	42
4.4.2 Příprava vzorků pro stanovení škrobu	42
4.5 Stanovení růstových parametrů	44
4.6 Přehled experimentů	44
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
TKÁŇOVÉ KULTURY CELERU	47
5.1 Vliv exogenních sacharidů na růst tkáňových kultur celeru	47
5.2 Vliv exogenních sacharidů na obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru	49
5.3 Vliv nízkých teplot na obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru	51

5.4 Obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru vystavených 10°C a poté 4°C (chladová aklimace).....	53
5.5 Vliv zasolení a nízkého osmotického potenciálu média na růst a obsah endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru	54
KULTURY OLIV	58
5.6 Vliv exogenních sacharidů na růst a obsah endogenních sacharidů u kultur oliv	58
5.7 Vliv exogenního sacharidu na akumulaci škrobu u kultur oliv	62
5.8 Vliv nízkého osmotického potenciálu na obsah a složení endogenních sacharidů kultur oliv.....	63
TKÁŇOVÉ KULTURY TABÁKU	65
5.9 Vliv osmotického stresu na růst a obsah endogenních sacharidů tkáňových kultur tabáku kontrolních a transformovaných genem <i>Spcdc25</i>	65
6. DISKUSE	69
6.1 Proč je výhodné používat ke studiu stresových situací tkáňové kultury?.....	69
6.2 Jsou sacharóza a manitol schopny sloužit jako srovnatelný zdroj uhlíku a energie pro růst tkáňových kultur celeru?	69
6.2.1 Růstové charakteristiky tkáňových kultur celeru	70
6.2.2 Vliv exogenních sacharidů na obsah a složení rozpustných nestrukturních sacharidů tkáňových kultur celeru	71
6.3 Vliv nízké teploty (4°C) na obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru.....	73
6.4 Obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru vystavených 10°C a poté 4°C (chladová aklimace).....	74
6.5 Vliv zasolení a nízkého osmotického potenciálu média na růst a obsah endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru	75
6.5.1 Růstové charakteristiky tkáňových kultur celeru vystavených nízkému osmotickému potenciálu média nebo zasolení	75
6.5.2 Obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru vystavených nízkému osmotickému potenciálu média nebo zasolení.....	77
6.6 Vliv exogenního sacharidu na růst a obsah a složení endogenních sacharidů kultur oliv	79
6.6.1 Vliv exogenního sacharidu na obsah a složení rozpustných endogenních sacharidů	79
6.6.2 Vliv exogenního sacharidu na obsah škrobu.....	80
6.7 Vliv nízkého osmotického potenciálu média na obsah a složení endogenních sacharidů kultur oliv	80
6.8 Vliv osmotického stresu na růst a obsah endogenních sacharidů tkáňových kultur tabáku kontrolních a transformovaných genem <i>Spcdc25</i>	82
7. ZÁVĚRY	83
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	84

1. ABSTRACT

One important feature distinguishing plants from other complex multicellular organisms is that plants are sessile and thus environmental stresses such as drought, high salinity and temperature extremes pose danger for many of them and cause significant crop losses. Many of the environmental stresses cause osmotic stress. Upon exposure to this stress, plants exhibit a wide range of responses at the molecular, cellular and whole-plant levels. These include, for example, morphological and developmental changes (e.g. life cycle changes, shoot growth inhibition etc.), adjustment in ion transport and metabolic changes, e.g. in carbon metabolism, and synthesis of compatible solutes. These metabolites include nitrogen-containing compounds (e.g. proline, other amino acids) and polyhydroxyl compounds (sucrose, sugar alcohols, cyclitols and oligosaccharides) with potential to protect proteins, membranes and metabolic machinery against damage. One of the most important compounds is sucrose, which is transported by plants for a long distance and accumulated under stress conditions. Sucrose is ubiquitous in the plant kingdom. The ability of sucrose to protect membranes and macromolecules is well documented. Certain plants produce beside sucrose also other important carbohydrates which are involved in stress protection - sugar alcohols or raffinose family oligosaccharides (RFO). Contribution of the particular saccharides in stress response and their cooperation or protection specificity under stress in plants with high diversity of photosynthetic products, however, is still far from being elucidated. The present study is focused on stress response in plants producing beside sucrose also sugar alcohol mannitol (*Apium graveolens*) or mannitol along with RFO (*Olea europaea*). In vitro cultivation of tissue cultures derived from celery or plants derived from apical or nodal segment in olive was used as an experimental system. It enables to apply exogenous carbohydrates, thus disconnect the stress response at the level of carbohydrate accumulation and other stress affected physiological processes (mainly photosynthesis) changing plant carbohydrate status. Using this technique we found that mannitol is accumulated in celery under osmotic stress probably as the result of strict down regulation of its degradation. The olive amasses mannitol under osmotic stress as well, but the down regulation of its degradation is lesser as mannitol is partly used as C and energy source even under severe stress. Accumulation of RFO in olive proved to be specific to low temperature stress. The results obtained with in vitro cultivated plants were compared to those gained using tissue cultures. The possibility to make use of organised and unorganised in vitro plant cultures for abiotic stress response evaluation is discussed. The tissue cultures were derived from lamina and petiole of celery and the influence of the type of primary explant to stress response was studied.

2. ÚVOD

Rostliny jsou během svého života vystaveny nejrůznějším nepříznivým podmínkám okolního prostředí, jako je např. sucho, zasolení a extrémní teploty, které dramaticky omezují jejich růst a tím i zemědělské výnosy. Jelikož jsou rostliny organismy přisedlé, mají vyvinutou pestrou škálu obranných mechanismů vůči abiotickým respektive biotickým stresům. Během stresových situací dochází např. ke změnám morfologickým, vývojovým (např. změny v buněčném cyklu, inhibice růstu stonku a stimulace růstu kořene), přizpůsobení v transport iontů a ke změnám metabolickým, které se týkají např. metabolismu uhlíku a syntézy tzv. kompatibilních solutů. Kompatibilní soluty jsou osmoticky aktivní látky, které se hromadí v buňkách do vysokých koncentrací a jsou inertní pro buněčný metabolismus. Mezi tyto sloučeniny patří neredukující sacharidy (sacharóza, sacharidy rafinózové řady...), cukerné alkoholy (manitol, sorbitol, inositol,...), aminokyseliny, kvartérní amoniové sloučeniny a další. Hlavním úkolem těchto sloučenin je mimo jiné osmotické přizpůsobení, to znamená, že snižují osmotický potenciál, a tak udržují turgor během podmínek vyvolávajících v rostlinných buňkách nedostatek vody.

Různé abiotické stresy vyvolávají v rostlinných buňkách různé změny v hladinách kompatibilních solutů. Naše laboratoř se specializuje na cukerný metabolismus, proto tato diplomová práce pojednává o vlivu různých osmotických stresů na obsah a složení endogenních sacharidů. Jako pokusný rostlinný materiál byly použity tkáňové kultury celeru a stonkové segmenty oliv. Rostliny celeru (*Apium graveolens* L.) patří mezi nejlepší producenty manitolu a nejspíš i halofyty respektive vůči zasolení tolerantní glykofyty (Everard et al., 1994), proto byly tkáňové kultury od něj odvozené použity jako modelový organismus pro studium metabolismu manitolu a ostatních sacharidů během stresových podmínek. Tkáňové kultury byly odvozeny a studovány za účelem zjistit, zda reagují na stejný podnět podobně jako celistvé rostliny celeru *in vitro*. Oliva (*Olea europaea* L.) produkuje navíc sacharidy rafinózové řady, které se specificky podílejí na ochranných reakcích vůči abiotickému stresu, zvláště stresu nízkých teplot. Oliva je taktéž druhem tolerantním, a to k suchu a nízkým teplotám.

Cílem této diplomové práce je přispět k poznání role změn cukerného metabolismu při odpovědi rostlin na abiotický stres s využitím rostlin s velkou diversitou fotosyntetických produktů (*Apium graveolens* a *Olea europaea*).

Hypotéza 1: Změny v růstu a utilizaci/akumulaci sacharidů vyvolané změnou v zásobení exogenními sacharidy mají u tkáňových kultur celeru obdobný charakter jako změny zjištěné v předchozí studii u mateřských rostlin pěstovaných *in vitro*.

- Odvodit tkáňové kultury celeru a stanovit nejvhodnější typ média pro jejich kultivaci.
- Sledovat a porovnat růst a obsah a složení endogenních sacharidů u tkáňových kultur celeru při různém zásobení exogenními sacharidy (sacharózou nebo manitolem), což bylo v naší laboratoři také sledováno u celistvých rostlin celeru *in vitro*.

Hypotéza 2: Během abiotického stresu se mění obsah a spektrum endogenních sacharidů u tkáňových kultur celeru i kultur oliv v závislosti na typu stresového faktoru a rostlinném materiálu.

- Studovat vliv nízkých teplot, zasolení a nízkého osmotického potenciálu média na obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru.
- Studovat vliv zasolení a nízkého osmotického potenciálu média na obsah a složení endogenních sacharidů kultur oliv.
- Zjistit zda reakce tkáňových kultur celeru odvozených z řapíku a čepele jsou srovnatelné.

Hypotéza 3: Aklimace tkáňových kultur celeru při teplotě 10°C působí změny v obsahu a spektru sacharidů, které mohou vést k větší odolnosti vůči následnému chladovému působení.

- Stanovit změny v obsahu a složení endogenních sacharidů mezi tkáňovými kulturami celeru vystavenými 4°C a kulturami aklimatizovanými při teplotě 10°C a poté vystavenými 4°C.

Hypotéza 4: Rafinóza je u oliv transportní forma, a je tedy srovnatelným zdrojem uhlíku a energie jako sacharóza nebo manitol.

- Porovnat růst kultur oliv rostoucích na rozdílných koncentracích sacharózy, manitolu respektive rafinózy.
- Stanovit hladiny endogenních sacharidů u kultur oliv pěstovaných na zvyšující se koncentraci exogenního sacharidu (sacharózy, manitolu či rafinózy).
- Stanovit obsah škrobu u kultur oliv rostoucích na 3 % exogenním sacharidu (sacharóza, manitol nebo rafinóza).

Hypotéza 5: Tkáňové kultury tabáku transformované genem *cdc25* ze *S. pombe*, které mají pozměněné rozdělování sacharidů, jsou tolerantnější k osmotickému stresu oproti kulturám kontrolním.

- Stanovit růstové parametry a obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur tabáku transformovaných genem *cdc25* po vystavení osmotickému stresu.

3. LITERÁRNÍ ÚVOD

3.1 Problematika rostlinného stresu obecně

3.1.1 Typy stresových faktorů

Rostliny jsou v průběhu svého života často vystaveny nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí, které jsou označovány jako stresové faktory (stresory). Ty mohou zpomalovat růst a vývoj rostlin, snížit jejich produktivitu a v extrémních případech způsobit i jejich smrt. Termín stres představuje celkový stav rostliny vystavené abiotickému či biotickému stresoru (Lichtenthaler, 1996).

Hlavní stresové faktory působící na rostliny se dělí na:

1. Abiotické stresory

- nedostatek/nadbytek vody a minerálních živin
- extrémní teploty (horko, chlad, mráz)
- zasolení
- vysoká/nízká ozářenost
- přítomnost těžkých kovů, herbicidů a pesticidů v půdě
- znečištění ovzduší...

2. Biotické stresory

- původci chorob (víry, bakterie, houby, prvoci, bezobratlí...)
- herbivoři (spásání, poranění)
- vzájemné ovlivňování rostlin (alelopatie, parazitismus)

Problematika stresu u rostlin je komplikovanější než ve fyziologii živočichů. Je to dáno zejména přisedlým způsobem života, který neumožňuje únik před působením stresorů a také tím, že u rostlin je velká mezidruhová variabilita i heterogenita vnitřního prostředí (buněk, pletiv) (Procházka et al., 1998).

3.1.2 Charakteristika stresových reakcí

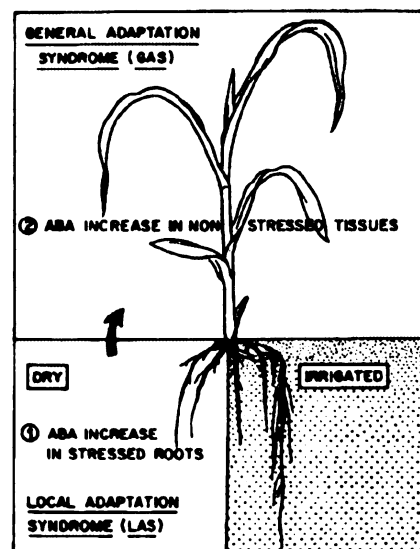
Termín stres poprvé použil více než před polovinou století kanadský endokrinolog Selye. Zjistil, že u organismů včetně rostlin vystavených abiotickému stresu se objevuje specifický syndrom, tzv. GAS = general alarm syndrome (Selye, 1936.).

Tento syndrom je složen ze tří fází:

1. Poplachová fáze. Nastává bezprostředně po začátku působení stresového faktoru a vede k narušení buněčných struktur a funkcí. Pokud je stresor velmi silný (např. extrémní teplota nebo zasolení) může následovat smrt.
2. Stav rezistence (Aklimace). Při pokračující expozici ke stresoru se začínají mobilizovat ochranné mechanismy, které zvyšují odolnost rostliny vůči působícím faktorům.
3. Stav vyčerpání a zhroucení. Následkem dlouhodobého vystavení stresoru dochází k vyčerpání adaptační schopnosti. Znovu se objevují znaky poplachové fáze, exponovaná část rostliny stárne a umírá.

V pletivech přímo ovlivněných stresem se na místě prvotního působení stresoru vyvíjí tzv. LAS = local adaptation syndrome. LAS a GAS jsou propojeny a pletivy přímo ovlivněnými stresem jsou vysílány chemické poplašné signály, které indukují syntézu adaptivních hormonů, enzymů a osmoregulatorů v rámci celé rostliny.

Typický příklad LAS reakce vedoucí ke GAS v rostlinách byl zaznamenán v experimentu, kdy byla část rostliny vystavena vodnímu stresu (Davies et al., 1990). Kořeny rostliny byly rozděleny na dvě poloviny, jedna byla vystavena vodnímu stresu, zatímco ta druhá byla adekvátně zavodněná. Na počátku stresu docházelo v částech kořene vystavených suchu k produkci kyseliny abscisové (ABA), která indukuje rezistenci vůči nedostatku vody. Po určité době došlo ke zvýšení endogenní koncentrace kyseliny abscisové v celém těle rostliny, i v pletivech, která stresem zasažená nebyla.



Obr. 3.1: GAS.

Převzato od McKersie a Leshem (1994).

3.1.3 Je stres pouze škodlivý?

Stres nemá na rostliny jenom negativní dopad. Naopak v rostlinné říši, hlavně u zemědělských plodin, je přítomnost stresu často nejenom prospěšná, ale i přímo esenciální (McKersie et al., 1994). Vystavení nízkým teplotám je u některých rostlin nutnou podmínkou pro přechod z vegetativní do reprodukční fáze. Typickým příkladem jsou zástupci čeledi *Rosaceae*. Ovocné stromy z této čeledi vyžadují pro

tvorbu plodů pravidelné vystavení chladu. Pokud rostou v oblastech s chladnou zimou nemají v tomto ohledu problém. Avšak je-li tato rostlina pěstovaná celoročně v teplých podmínkách, dochází k nedostatečnému vývoji, případně až k zastavení tvorby plodů.

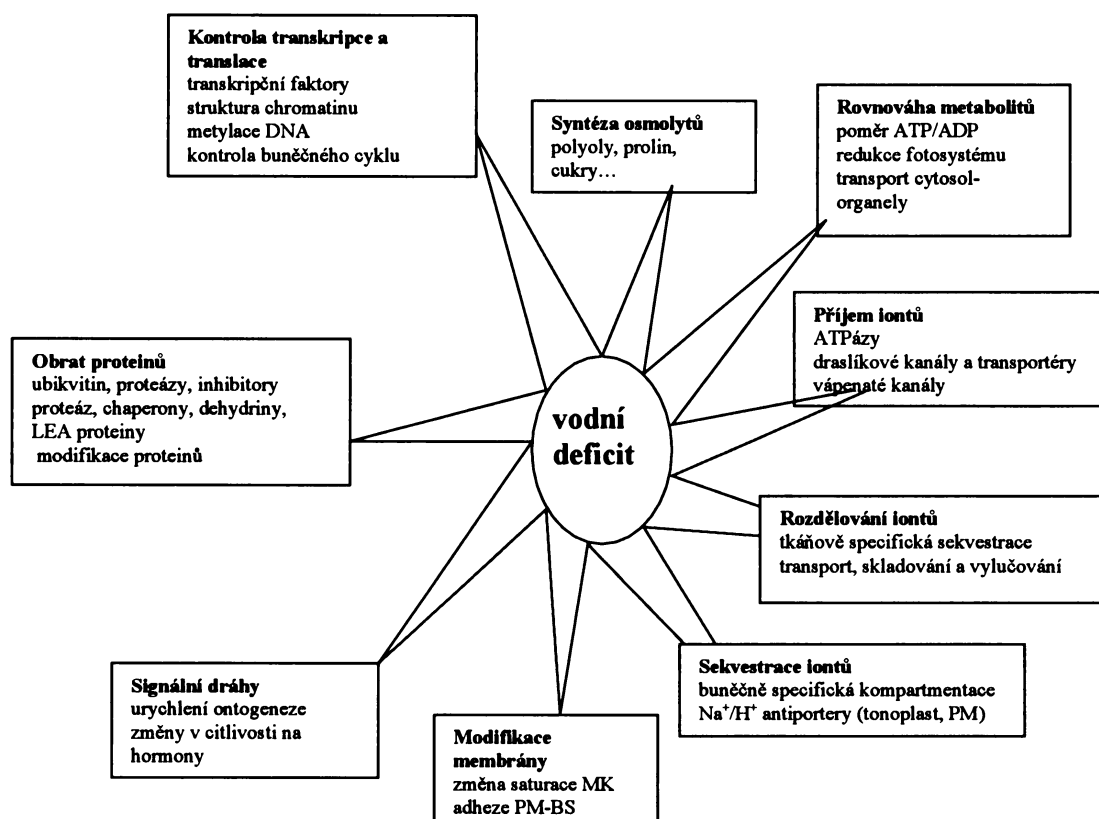
3.2 Vodní deficit

3.2.1 Rezistence vůči vodnímu deficitu

Sucho, zasolení a extrémní teploty vyvolávající u rostlin osmotický stres jsou vážnou hrozbou pro zemědělství a vedou ke zhoršení životního prostředí. Osmotické a jiné abiotické stresy, např. chemická toxicita a oxidativní stres, vedou k nižším výtěžkům mnoha hlavních kulturních plodin, často dochází k redukci výnosů až o 50 %. Sucho a vysoká koncentrace solí v půdě jsou obzvláště rozšířené a předpokládá se, že do roku 2050 by až polovina orné půdy mohla být zasažena zasolením (Wang et al., 2003). Rezistence vůči vodnímu deficitu se vyskytuje u rostlin schopných odolávat tomuto stresu dvěma způsoby, a to mechanismy tolerance či avoidance (vyhnutí). To v jaké míře bude docházet k obranným reakcím během stresu závisí na genotypu, stáří a vývojové fázi rostliny; typu buňky či pletiva; subcelulární lokalizaci, délce a intenzitě vodního stresu. Příkladem mechanismu avoidance na buněčné úrovni je osmotické přizpůsobení, kdy dochází k syntéze kompatibilních solutů a k jejich následné akumulaci v cytosolu. To má za následek snížení osmotického potenciálu buňky, což vede k příjmu vody a tím udržení turgoru (Bray, 1997).

3.2.2 Reakce rostlinného organismu na nedostatek vody

Voda je základní komponentou všech buněk, kde působí jako rozpouštědlo, transportní médium, donor elektronů v řadě biochemických reakcí a účastní se taktéž ochlazování rostliny prostřednictvím evaporace (Holmström, 1997). V rostlinných buňkách je přítomností vody vyvoláván turgor, který je řídicí silou buněčné expanze. U rostlin vystavených osmotickému stresu dochází k významným změnám ve vodních potenciálech, což vede k narušení normálních buněčných aktivit nebo může dokonce dojít k úhynu rostliny. Rostliny reagují na stresovou zátěž na úrovni molekulární, buněčné i celorostlinné. Patří sem například změny morfologické a vývojové (např. změny v buněčném cyklu, inhibice růstu stonku, stimulace růstu kořene, zavírání průduchů), přizpůsobení v transportu iontů (příjem, vylučování a sekvestrace iontů), změny metabolické (např. snížená rychlost fotosyntézy, syntéza kompatibilních solutů) a modulace genové exprese (Xiong a Zhu, 2003).



Obr.3.2: Reakce organismu na nedostatek vody. PM – plazmatická membrána, BS – buněčná stěna, MK – masné kyseliny. Upraveno dle Bohnert et al. (1995) a Bray (1993).

Produkty genů indukovaných stresem nedostatku vody lze rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny patří proteiny chránící buňky před dehydratací jako jsou např. enzymy nutné k syntéze osmoprotektantů, LEA proteiny, 'antifreeze' proteiny, chaperony a detoxikační enzymy. Druhá skupina zahrnuje transkripční faktory, proteinkinázy a enzymy účastnící se fosfatidylinositolového metabolismu (Seki et al., 2003). Reakce na nedostatek vody se objevují během několika sekund jako je např. fosforylace a defosforylace proteinů, ale také jsou to hodiny až dny, např. změny genové exprese, růst kořenů a nadzemích částí (Munns, 2002).

Sucho, zasolení, extrémní teploty a oxidativní stres jsou často propojeny a mohou indukovat podobné poškození buněk. Například sucho a/nebo zasolení mají za následek narušení homeostáze a distribuci iontů v buňce. Oxidativní stres, který často doprovází vysoké teploty, zasolení nebo sucho, způsobuje denaturaci funkčních a strukturních proteinů (Wang et al., 2003).

Některé z odpovědí na osmotický stres mohou být spouštěny signály primárními, jiné vznikají v důsledku signálů sekundárního stresu, jejichž vznik je odvozen od stresu

primárního. Mezi sekundární signály patří fytohormony (např. ABA, etylen), aktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species) a vnitrobuněční druzí poslové (např. fosfolipidy, vápenaté ionty). Vodní deficit není jenom stresovou situací, ale vyskytuje se i u normálních vývojových procesů jako je například vývoj semen běžný pro většinu vyšších rostlin (Bray, 1997; Xiong a Zhu, 2003).

3.2.3 Kyselina abscisová (ABA) a jiné signální dráhy

Jedním z hlavních signálů působících při nedostatku vody je ABA, která se účastní i jiných abiotických či biotických stresů (tabulka 3.1). ABA je syntetizována v kořenech rostlin, poté transportována xylémem do nadzemních částí, kde působí jako signál pro uzavírání průduchů a reguluje expresi určitých genů.

Tabulka 3.1: Přítomnost vodního deficitu a ABA v odpovědích rostlin na nepříznivé podmínky životního prostředí. Upraveno dle Bray (1997).

typ stresu	vodní deficit?	ABA?
Sucho	ano	ano
Zasolení	ano	ano
Chlad	ano	ano
Mráz	ano	ano
Horko	ne	ne
Poranění	ne	ano
Hypoxie	ne	ano
Nadměrné ozáření	ne	ano
Patogeny	někdy	někdy

Vyšší koncentrace ABA také inhibuje růst rostlin během osmotického stresu indukcí exprese genu pro inhibitor cyklin-dependentní proteinkinázy (ICK1), což vede k inhibici buněčného dělení (Xiong a Zhu, 2002). ABA také vyvolává změny vnitrobuněčného pH a depolarizaci membrány, čímž reguluje různé typy iontových kanálů (Leung et al., 1998). Jedna z nejranějších reakcí na zvýšenou hladinu ABA je uvolnění Ca^{2+} z endoplazmatického retikula a apoplastu do cytosolu, což vede ke spuštění kaskád fosforylací proteinů. Cílové fosforylované proteiny jsou zahrnuté

v buněčné ochraně nebo jsou to transkripční faktory kontrolující sady stresem regulovaných proteinů (Campalans et al., 1999; Xiong et al., 2003).

Během vodního deficitu dochází také ke zvýšené syntéze fosfolipázy C (štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na dva druhé posly inositoltrifosfát a diacylglycerol), proteinkináz závislých na vápenatých iontech a MAP kináz (mitogen activated protein kinases) (Bray, 1997). MAPK dráhy jsou signální kaskády přítomné u všech eukaryot a účastníci se široké škály procesů, např. růst/zastavení růstu buněk, diferenciaci buněk, regulace buněčného cyklu, apoptóza a signalizace abiotických a biotických stresů (Wrzaczek a Hirt, 2001).

3.2.4 LEA proteiny

LEA (late embryogenesis abundant) proteiny byly nalezeny ve zrajících semenech a vegetativních pletivech rostlin vystavených abiotickému stresu. Geny kódující tyto proteiny byly nalezeny u mnoha druhů rostlin a jsou regulovány osmotickým stresem, který je vyvolán suchem, zasolením a chladem. Rostliny rýže nadexprimující geny pro LEA proteiny vykazují zvýšenou toleranci k zasolení a chladu. Funkce těchto proteinů je zatím neznámá, existují pouze spekulace, že by mohly hrát roli chaperonů, a tak zabránit denaturaci proteinů či vytvoření jejich nesprávné konformace (Xiong a Zhu, 2003). Mezi další jejich předpokládané funkce patří díky jejich hydrofilítě sekvence iontů, vázání vody a stabilizace membrán (Bray, 1993).

3.2.5 Chladový stres

Chlad je limitujícím faktorem pro růst a vývoj rostlin a jejich geografickou distribuci. Některé rostliny jsou schopné přežít za drsných nepříznivých podmínek, kdežto jiné jsou citlivé k chladu a mrazu. Účinek chladu na rostliny není určen jenom stupněm poklesu teploty, ale také závisí na ročním období, vývojovém stádiu rostliny a na délce trvání chladového působení (Alberdi a Corcuera, 1991). Chladový stres je definován jako teplota v rozmezí 0°C-15°C, jelikož při poklesu pod bod mrazu dochází k tvorbě nukleačních center pro tvorbu ledu, jedná se už o stres mrazový (McKersie a Leshem, 1994). Občasné poklesy teploty během jara či léta v oblastech s mírným klimatem představují pro rostliny mnohem větší nebezpečí než pravidelné chladové působení. Je to dáno tím, že se rostliny v tomto období právě nacházejí ve stavu aktivního růstu, kdy mají jen velmi malou odolnost vůči chladu a nejsou schopny ji adekvátně zlepšit.

Kdežto během sezónního pravidelného ochlazování mají rostliny dost času postupně se adaptovat na tento typ stresového faktoru (Alberdi a Corcuera, 1991).

Většina kulturních plodin je citlivá k teplotám pod 10°C, proto dochází v zemědělství k významným poklesům ve výnosech vlivem náhlého mrazu na podzim nebo nízkých teplot v zimě. Tolerantní jednoleté a dvouleté rostliny získaly toleranci k chladu a/nebo mrazu procesem zvaným chladová aklimace (CA). V přirozených podmínkách se tato chladová aklimace vyskytuje na podzim, když se ještě teploty pohybují nad bodem mrazu (Ouellet, F., 2002) a je možno ji definovat jako získanou modifikaci struktur a funkcí, v důsledku vystavení chladu, která minimalizuje poškození a zlepšuje fitness individuální rostliny (Alberdi a Corcuera, 1991).

U listů rostlin, které byly poškozeny chladovým působením byla objevena inhibice fotosyntézy, pomalejší transport sacharidů, nižší rychlost respirace, inhibice syntézy proteinů a zvýšená degradace existujících proteinů. Všechny tyto negativní odpovědi jsou výsledkem ztráty funkčnosti membrán. Např. inhibice fotosyntézy a respirace souvisí s poškozením chloroplastových a mitochondriálních membrán. Rostlinná plazmatická membrána je složena z fosfolipidové dvojvrstvy, ve které jsou zakotveny mimo jiné steroly a proteiny. Fyzikální vlastnosti lipidů ovlivňují aktivity integrálních membránových proteinů jako jsou H⁺-ATPázy, transportéry a iontové kanály. Lipidová dvojvrstva rostlin sensitivních k chladovému působení má vysoké procento satureovaných mastných kyselin, proto se plazmatická membrána stává rigidnější a její komponenty nemohou nadále fungovat normálně. Naopak membrány rostlin odolných vůči chladu obsahují větší procento mastných kyselin nesatureovaných, které snižují teplotu, při které membrána přechází ze stavu tekutého krystalu do semikrystalického gelu (Teiz a Zeiger, 2002).

3.2.6 Zasolení a jeho toxicita

Více než 800 miliónů hektarů světové půdy je ovlivněno zvýšenou koncentrací solí, buďto salinitou (397 miliónů ha) a nebo sodicitou (434 miliónů ha). Je to přes 6 % z celkové plochy pevniny na Zemi. Zasolené půdy mají vysokou koncentraci rozpustných solí a elektrická konduktivita je rovna nebo vyšší 4 dSm⁻¹, zatímco půdy trpící sodicitou mají nízkou koncentraci rozpustných solí, ale vysoké procento vyměnitelných Na⁺, a to 15 % a více. Salinita inhibuje růst kořenů a stonků rostlin osmoticky a toxicky působením nepříznivých iontů, kdežto půdy s vyšším množstvím Na⁺ inhibují růst rostlin zhoršením kvality půdy (Munns, 2005).

Vysoká koncentrace solí vyvolává u rostlin hyperosmolaritu a iontovou nerovnováhu (Zhu, 2001). Sůl v půdě inhibuje růst rostlin dvěma způsoby. Za prvé redukuje schopnost rostliny přijímat vodu, což vede k pomalejšímu růstu rostliny. V tomto případě se jedná o osmotický vliv salinity. Za druhé sůl může vstoupit do transpiračního proudu a eventuelně poškodit buňky v transpirujících listech, což má za následek ještě větší inhibici růstu a jedná se o vliv nadbytku iontů, zejména Na^+ (Munns, 2005). Během zasolení dochází ke sníženému příjmu K^+ a naopak se zvyšuje příjem Na^+ . Na^+ jsou schopné kompetovat s K^+ o vazebná místa na proteinech. Je známo více než 50 enzymů aktivovaných pouze K^+ , které nemůžou být v tomto případě nahrazeny Na^+ . To znamená, že vysoké koncentrace Na^+ vedou k poškození funkcí enzymů v cytoplasmě. Navíc k syntéze proteinů je nutná přítomnost vysoké koncentrace K^+ , které jsou důležité pro navázání tRNA k ribozomu (Tester a Davenport, 2003). Sodné ionty jsou u vyšších rostlin vylučovány z buněk kořenů nebo kompartmentovány do vakuol mezofylových buněk za účasti Na^+/H^+ antiporterů. Tyto transportéry využívají pH gradientu vytvořeného P-typem H^+ -ATPázy (pro antiportery lokalizované na plazmatické membráně) nebo V-typem H^+ -ATPázy a H^+ -pyrofosfatázy (pro antiportery na tonoplastu). Nadexprese genu *AtNHX1* kódujícího tonoplastový Na^+/H^+ antiporter uděluje transgenní *Arabidopsis thaliana* toleranci k zasolení (Zhu, 2001). To znamená, že nízká aktivita tonoplastového Na^+/H^+ antiporteru může souviset s omezenou kapacitou glykofytů kompartmentovat sodné ionty (Apse et al., 1999).

Existují různé mechanismy, jimiž se rostliny brání vůči zasolení:

1. Kontrola příjmu solí
 - selektivní transportéry a iontové kanály
 - zředění koncentrace solí v rostlině zvýšeným příjmem vody
2. Mechanismy, jimiž rostlina redukuje poškození působená nadbytkem iontů
 - lokalizace solí do starých listů z důvodu ochrany mladých a aktivně transpirujících listů
 - kompartmentace iontů v listech do vakuol
 - vyloučení nadbytečných iontů prostřednictvím specializovaných struktur
3. Osmotické přizpůsobení
 - syntéza kompatibilních solutů
 - kompartmentace iontů solí do vakuoly (Singh a Chatrath).

3.3 Kompatibilní soluty

Kompatibilní soluty jsou osmoticky aktivní látky, které se mohou akumulovat v buňkách ve vysokých koncentracích aniž by narušovaly jejich metabolismus. Tyto nenabitě nízkomolekulární sloučeniny eventuálně obojetné ionty (zwitterionty) jsou vysoce rozpustné ve vodě, relativně netoxické a hromadí se v buňkách jako důsledek vystavení osmotickému stresu (McCue a Hanson, 1990; Williamson et al., 2002). Hlavními osmolyty v rostlinách jsou neredukující sacharidy (sacharóza, trehalóza, RFO), cukerné alkoholy (manitol, sorbitol, glycerol), aminokyseliny (prolin), kvartérní amoniové sloučeniny (glycinbetain, β -alaninbetain, prolinbetain), terciární sulfoniové sloučeniny (β -dimethylsulfopropionát) a polyaminy. Změny v syntéze a akumulaci těchto sloučenin hrají významnou roli při navození stresové tolerance u mnoha rostlin a jejich typ spojený s osmoregulací se liší u různých druhů rostlin. Kompatibilní soluty se nevyskytují pouze u rostlin, ale také u mikroorganismů, hub a živočichů (Bohnert et al., 1995; Yancey et al., 1982).

3.3.1 Hlavní funkce kompatibilních solutů během osmotického stresu

1. Osmotické přizpůsobení

Při vystavení rostlin osmotickému stresu dochází ke snížení osmotického potenciálu vnějšího prostředí pod hodnotu osmotického potenciálu buněk, což způsobuje únik vody z buněk do okolního prostředí. Akumulací kompatibilních solutů a iontů (především K^+) v cytoplazmě buněk je snížen osmotický potenciál a tím je umožněn příjem vody nebo alespoň nedochází ke ztrátám (Bray, 1993; Xiong a Zhu, 2002; Yancey et al., 1982). Na udržení turgoru během osmotického stresu se také podílejí anorganické ionty způsobující zasolení jako Na^+ a Cl^- , které jsou sekvestrovány do vakuoly, čímž dochází k vyrovnání tlaků mezi vakuolární šťávou a cytoplazmou (Hasegawa et al., 2000).

2. Stabilizace proteinů, proteinových komplexů a membrán

Některé kompatibilní soluty jsou vysoce hydroxylované molekuly (např. manitol, sorbitol, sacharóza,...), které mají schopnost hydroxylovými skupinami nahradit hydratační obal makromolekul (Bohnert et al., 1995; Stoop et al., 1996). Kompatibilní soluty také zamezují disociaci komplexu vyvíjejícího kyslík fotosystému II (Bohnert a Shen, 1999), zvyšují tepelnou stabilitu enzymů a redukují inhibiční efekty iontů na

jejich aktivitu, a to stabilizací hydratačního stavu proteinů, čímž zachovávají jejich správnou konformaci (Solomon et al., 1994; Xiong a Zhu, 2002; Yancey et al., 1982).

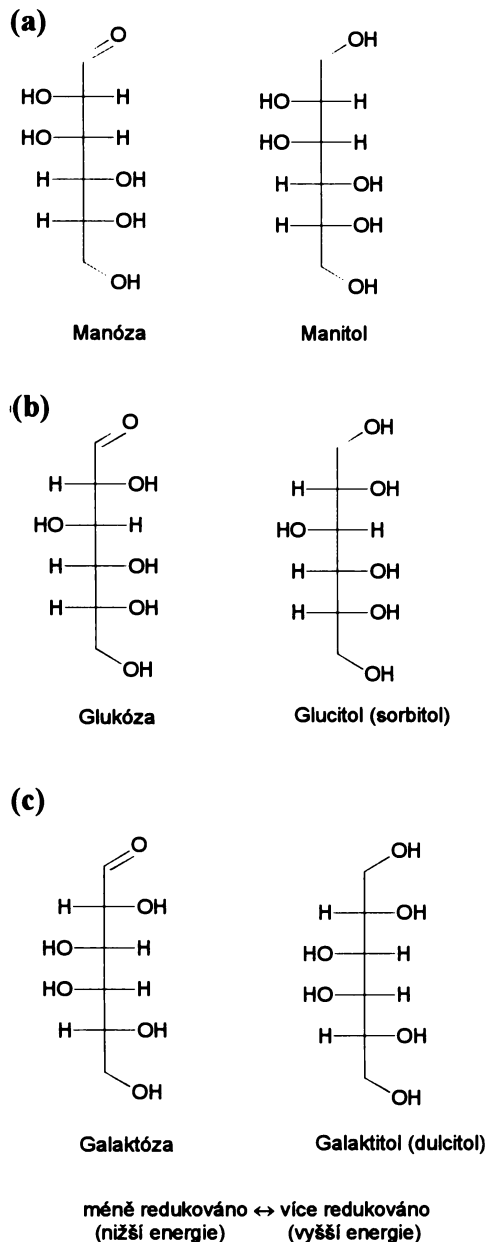
3. Zhášení aktivních forem kyslíku

Aktivní formy kyslíku (reactive oxygen species – ROS) vznikají částečnou redukcí atmosferického molekulárního kyslíku (O_2). Tvoří se při excitaci O_2 na singletový kyslík (O_2^1) nebo při přenosu jednoho až tří elektronů na O_2 , přičemž vzniká superoxidový radikál, hydroxylový radikál nebo peroxid vodíku. ROS pocházejí jak z reakcí zahrnutých v primárním metabolismu, jako je fotosyntéza a respirace, tak i z reakcí indukovaných abiotickým či biotickým stresem. Akumulace ROS má za následek oxidativní procesy, jako je peroxidace membránových lipidů, inhibice enzymů a poškození DNA a RNA (Mittler, 2002). Bylo zjištěno, že ROS mají také signální a ochrannou funkci, účastní se programované buněčné smrti a obrany rostlin vůči patogenům (Dat et al., 2000). Za normálních podmínek je produkce ROS v buňce nízká, kdežto během mnoha stresů, které narušují buněčnou homeostázi, se produkce ROS několikanásobně zvýší (Mittler, 2002). Buňky disponují určitými obrannými mechanismy vůči oxidativnímu poškození, obsahují řadu antioxidantů a enzymů, které jsou schopné neutralizovat volné radikály (Smirnoff, 1993). Mezi schopné zhášeče aktivních forem kyslíku patří právě některé kompatibilní soluty. Účinnost těchto sloučenin neutralizovat volné radikály závisí na rychlostní konstantě reakce s hydroxylovými radikály. Buxton et al. (1988) zjistili, že rychlostní konstanta pro manitol je čtyřikrát vyšší než pro prolin, tudíž manitol je efektivnějším zhášečem ROS.

3.3.2 Cukerné alkoholy

Cukerné alkoholy neboli polyoly jsou redukované formy aldóz nebo ketóz. Uhlíkatý řetězec těchto sloučenin může být buďto lineární (acyklické polyoly, alditoly) nebo uspořádaný v kruhu (cyklické polyoly, cyklitoly). Polyoly představují sloučeniny se třemi a více uhlíky, přičemž všechny eventuálně téměř všechny nesou hydroxylovou skupinu (Noiraud et al., 2001). Cukerné alkoholy jsou narození od většiny ostatních kompatibilních solutů primárními produkty fotosyntézy a jsou transportované floémem s jinými sacharidy (sacharóza, RFO, ...) ze zdrojových listů do sinkových pletiv, kde slouží jako rezerva redukovaného uhlíku (Stoop et al., 1996; Zimmermann a Ziegler, 1975). K nejběžnějším cukerným alkoholům patří manitol odvozený od manózy, sorbitol (glucitol) od glukózy a galaktitol (dulcitol) od galaktózy. Polyoly se vyskytují u

mnoha organismů od prokaryot až po vyšší eukaryota. Alditoly (glycerol, arabitol, erythritol, manitol) jsou produkovány několika houbami, které způsobují lidské infekce nebo nemoci rostlin (Davis et al., 2000). Manitol byl také objeven v hnědých řasách (Reed et al., 1985). Naopak červené řasy rodu *Bostrychia* syntetizují galaktitol a sorbitol (Bielecki, 1982). Bielecki (1982) odhadnul, že polyoly tvoří přibližně 30 % roční světové primární produkce fixovaného uhlíku.



3.3.2.1 Acyklické cukerné alkoholy

Mnoho acyklických polyolů má jak triviální tak i systematické chemické názvosloví, jsou pojmenovány podle jejich původního zdroje a podle cukru z něhož byly odvozeny, např. sorbitol byl poprvé získán z jeřábu (*Sorbus*), ale je nazýván také glucitolem, protože vzniká redukcí glukózy. U krytosemenných rostlin bylo izolováno alespoň 13 různých acyklických polyolů, z nichž je nejvíce rozšířen manitol, který byl nalezen ve více než 70 čeledích vyšších rostlin. Ostatní polyoly jsou rozšířeny méně a jsou typické pro určité čeledi či druhy. Například přítomnost galaktitolu (dulcitolu) je charakteristická pro *Celestraceae* (jehličnany), kdežto sorbitol se v největší míře vyskytuje u čeledi *Rosaceae* (jabloň, hrušeň, broskvoň a slivoň) a u *Plantaginaceae* (Loescher, 1987; Noiraud et al., 2001).

Obr 3.3: Chemické struktury několika šestiuhlíkatých cukerných alkoholů a jim odpovídajících cukrů. Znázorněné cukerné alkoholy tvoří významný podíl na transportovaných sacharidech u určitých druhů rostlin: a) manitol (odpovídající sacharid manóza) – celer (*Apium*), b) sorbitol (odpovídající sacharid glukóza) – jabloň (*Malus*), c) galaktitol (odpovídající sacharid galaktóza) - meloun (*Cucumis melo*).

Chemicky redukováne sloučeniny (např. NADH) obsahují větší množství energie než jim odpovídající oxidované formy (např. NAD⁺). Cukerné alkoholy tedy představují sloučeniny, které jsou lepší zásobárnou energie než jim odpovídající sacharidy. Upraveno podle Stoop et al. (1996).

3.3.2.1.1 Manitol

Výskyt

Manitol je nejvíce rozšířeným cukerným alkoholem v přírodě. Tento šestiuhlíkatý polyol byl objeven u více než sta druhů cévnatých rostlin včetně hospodářských plodin. Manitol tvoří významný podíl na rozpustných sacharidech u čeledí *Oleaceae* (oliva, ptačí zob), *Apiaceae* (celer, mrkev, petržel), *Rubiaceae* (kávovník), *Brassicaceae* (kapusta), *Cucurbitaceae* (tykev), *Fabaceae* (fazol, hrách) a u dalších (Stoop et al., 1996).

Metabolismus manitolu

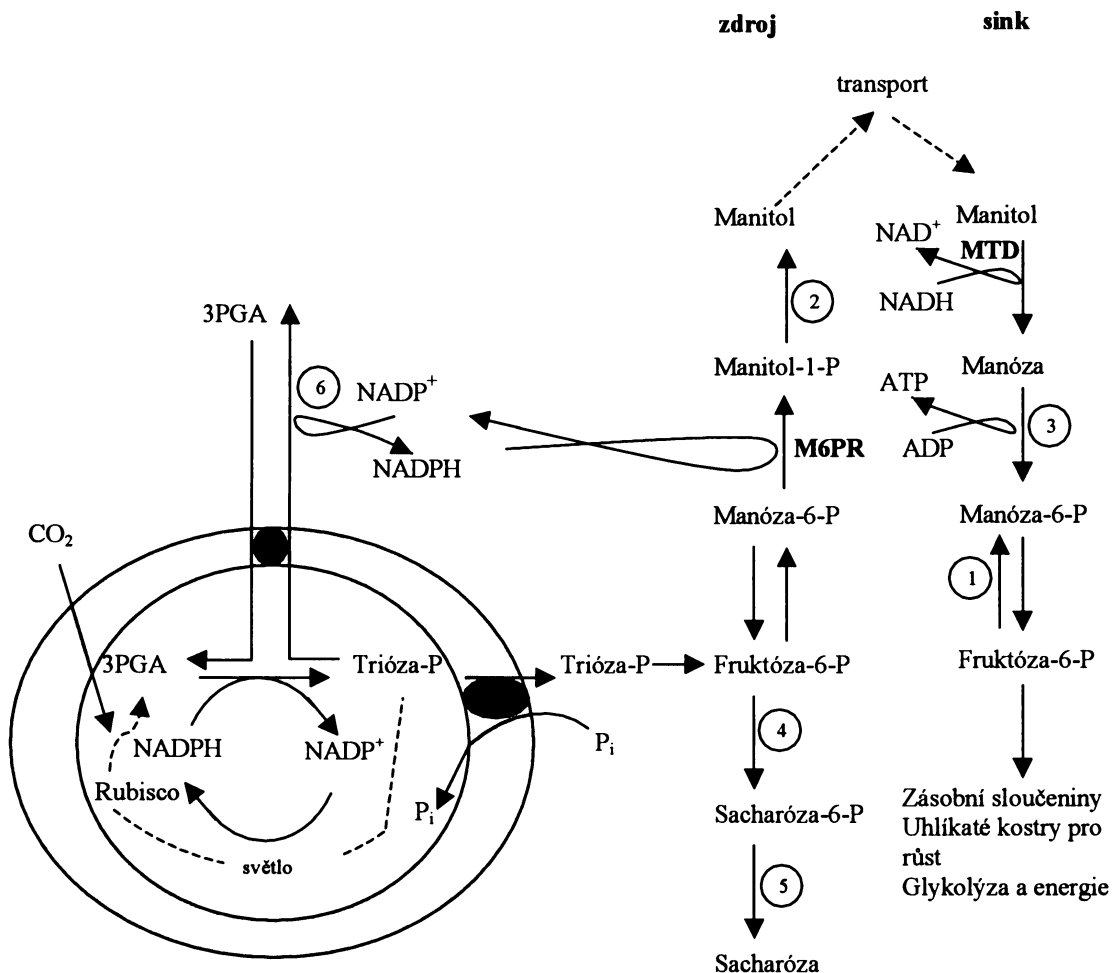
V cytosolu probíhá syntéza manitolu simultánně se syntézou sacharózy z triázafosfátů transportovaných z chloroplastů. Připojením jedné a více galaktozylových podjednotek k sacharóze vznikají sacharidy rafinózové řady (RFO), které mohou být také transportovány na dlouhé vzdálenosti, např. u olivy. Rozdělování fotosynteticky fixovaného CO₂ mezi tyto fotoasimiláty závisí na rostlinném druhu, stádiu vývoje listů a na faktorech okolního prostředí, např. zasolení (Davis et al., 1988; Everard et al., 1994 a Flora a Madore, 1993).

Celer jako vhodný model pro studium metabolismu manitolu

Pro studium metabolismu manitolu je vhodným modelem celer, jelikož přibližně polovina fixovaného CO₂ je přeměněna na manitol, který je společně se sacharózou transportován floémem a využíván k růstu nefotosyntetizujících pletiv. Manitol je lokalizován jak ve vakuole (80 %), tak i v cytosolu celeru (20 %). Za předpokladu, že vakuola zaujímá 93 % objemu protoplastu, bude cytosolická koncentrace manitolu nápadně vyšší (320 mM) než ve vakuole (102mM) (Stoop et al., 1996).

U cévnatých rostlin jsou výchozí sloučeniny pro syntézu manitolu triázafosfáty (obr. 3.4), jejichž interakcí vzniká fruktóza-6-fosfát, který je izomerací přeměněn na manóza-6-fosfát. Manóza-6-fosfát je za katalýzy NADPH-dependentní manóza-6-fosfátreduktázy (M6PR) přeměněn na manitol-1-fosfát, který je defosforylován fosfatázou na manitol (Loescher et al., 1992). U celeru probíhá syntéza manitolu zejména v dospělých listech fungujících jako zdroj, kde M6PR je lokalizována v cytosolu houbového či palisádového parenchymu nebo buněk pochev cévních svazků (Everard et al., 1993). Aktivita M6PR, a tím i syntéza manitolu, je regulována vývojově a světlem. Vysoká aktivita byla pozorována v dospělých listech a naopak detekována

nebyla v některých sinkových pletivech (kořeny a mladé listy nevystavené stresu) (Everard et al., 1993, 1997; Stoop et al., 1994). Everard et al. (1993) naklonovali cDNA pro M6PR z listu celeru a pomocí sekvenční analýzy poukázali na vysokou podobnost s cDNA klíčového enzymu syntézy sorbitolu u jabloně aldóza-6-fosfátreduktázou.



Obr. 3.4: Syntéza, transport a katabolismus manitolu v rostlinách.

1 – fosfomanózaizomeráza, 2 – manóza-1-fosfátfosfatáza, 3 – hexokináza, 4 – sacharóza-6-fosfátsyntáza, 5 – sacharóza-6-fosfátfosfatáza, 6 – nereversibilní trióza-fosfátdehydrogenáza. Zvýšená exprese MTD: napadení patogenem, kyselina salicylová, vysoká koncentrace P_i , nízká koncentrace sacharidů. Snížená exprese MTD: zasolení, osmotický stres, nízká koncentrace P_i , vysoká koncentrace sacharidů. Upraveno dle Stoop et al. (1997).

Syntéza manitolu.

Poslední rozhodující části schématu syntézy manitolu charakterizovali Gao a Loescher (2000), kteří purifikovali, charakterizovali a naklonovali cDNA kódující cytosolickou nereversibilní glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu. Tento enzym katalyzuje oxidaci glyceraldehyd-3-fosfátu na 3-fosfoglycerát a tím zajišťuje energii ve formě NADPH nutnou pro syntézu manitolu v listech celeru.

U celeru, který má typickou C₃ anatomii, byla pozorována vysoká fotosyntetická rychlost obdobná jako u C₄ rostlin. Je to způsobeno redukcí manóza-6-fosfátu na manitol-1-fosfát, při které je spotřebováván fotochemicky produkovaný NADPH (Stoop et al., 1996).

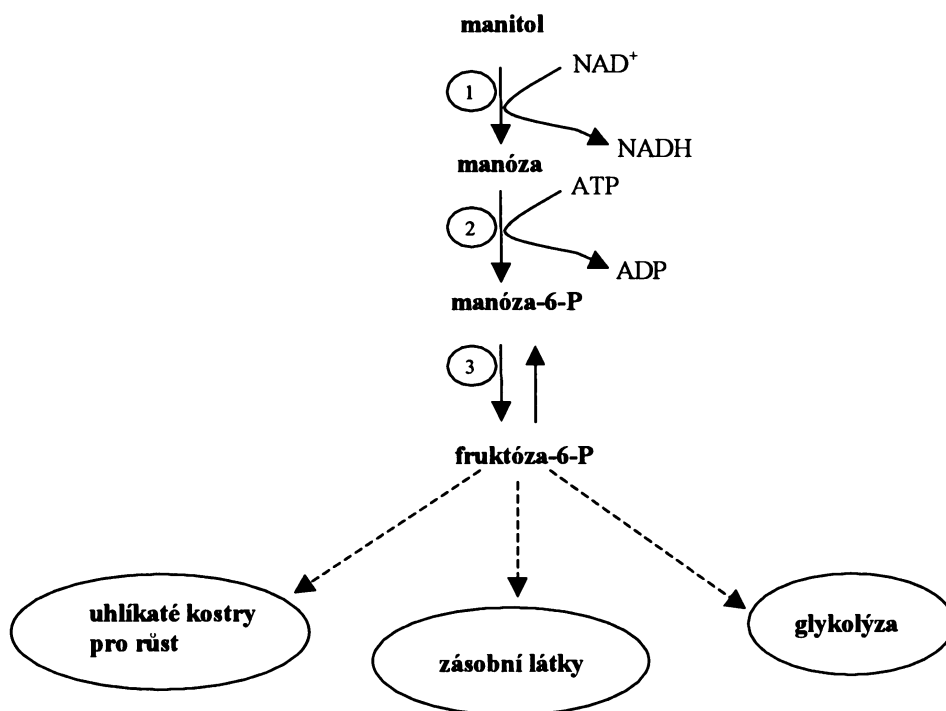
Transport a katabolismus manitolu

Katabolismus manitolu (obr. 3.5) je prostorově oddělen od jeho syntézy. U celeru je manitol syntetizovaný v autotrofních listech transportován spolu se sacharózou floémem do heterotrofních pletiv, kde se ukládá do zásoby nebo slouží k okamžité produkci energie a uhlikatých skeletů pro stavbu buněčných komponent (Pharr et al., 1995). Manitol je u celeru do floému zřejmě nakládán symportem s protonem, který je zprostředkován transportérem specifickým pro manitol AgMaT1 (Apium graveolens mannitol transporter 1) lokalizovaným na plazmatické membráně floémových buněk (Daie, 1986 a Noiraud et al., 2001). Mechanismus vykládání manitolu v zásobních parenchymatických buňkách je zatím nejasný. Množství manitolu v zásobních parenchymatických buňkách řapíku celeru je až 20 mg/ml buněčné šťávy, glukózy a fruktózy je kolem 10-15 mg, koncentrace sacharózy je velmi nízká (~ 3 mg) a škrob nebyl detekován vůbec. Koncentrace sacharózy je tak nízká proto, že je hydrolyzována na glukózu a fruktózu a ty se teprve ukládají do zásoby (Keller, 1989). Další zajímavou vlastností manitolu, ale i jiných polyolů, je schopnost tvořit komplexy s borem. Tento esenciální mikroprvek je relativně nepohyblivý, ale ve spojení s polyoly transportovanými floémem se stává mobilním (Hu et al., 1997). Například v celeru je bor transportován jako komplex manitol:bor:manitol (Williamson et al., 2002).

Manitol je využíván v sinkových pletivech za působení enzymu NAD-dependentní manitoldehydrogenázy (MTD, 1-oxidoreduktázy), která katalyzuje oxidaci manitolu na manózu (oxidace uhlíku v poloze 1). Tento enzym se liší od mikrobiální MTD, která je 2-oxidoreduktázou, což znamená že přeměňuje manitol nebo manitol-1-fosfát na fruktózu nebo fruktóza-6-fosfát (oxidace uhlíku v poloze 2). MTD se vyskytuje v aktivně rostoucích sinkových pletivech, kde je vyšší hladina manitolu než ostatních sacharidů. Vysoká aktivita MTD byla detekována např. v kořenových špičkách, mladých listech a řapících, ale pozoruhodné je, že byla pozorována i ve vodivých pletivech (floém, průvodní buňky), kde je koncentrace ostatních sacharidů vysoká. Manóza, která vzniká oxidací manitolu za katalýzy NAD-dependentní MTD, je v sinkových pletivech fosforylována na manóza-6-fosfát, který je přeměněn izomerací na fruktóza-6-fosfát.

Tato reakce je katalyzována fosfomanózaizomerázou (PMI). Fruktóza-6-fosfát je centrální metabolit, který může být využit k tvorbě mnoha důležitých sloučenin pro růst a k produkci energie v procesech respirace (Pharr et al., 1995).

Expres MTD je potlačena jak přítomností hexózu tak i zasolením (Prata et al., 1997; Stoop et al., 1996). Represe MTD zprostředkovaná sacharidy vede k ukládání velkého množství manitolu, který může sloužit jako zásobní sacharid a osmoprotektant. Za normálních růstových podmínek rostliny přednostně využívají cukry k udržení základního metabolismu. Nicméně v případě vysokých nároků na energii a uhlík (např. v meristémích) dochází k vyčerpání poolů cukrů a k následné derepresi MTD, která zpřístupňuje zásobní manitol jako zdroj uhlíku a energie pro další růst (Zamski et al., 2001).



Obr. 3.5: Asimilace manitolu v nefotosyntetizujících sinkových pletivech začínající oxidací manitolu na manózu. 1 – MTD, 2 – hexokináza, 3 – fosfomanózaizomeráza. Upraveno dle Stoop et al. (1995).

Protektivní funkce manitolu během zasolení

U rostlin vystavených stresu zasolení a/nebo osmotickému stresu simultánně probíhající represe MTD jak sacharidy tak solemi mají za následek ještě vyšší akumulaci manitolu (Zamski et al., 2001). Manitol slouží jako důležitý osmolyt a kompatibilní solut zajišťující navození tolerance k zasolení u vyšších i nižších rostlin. Stoop et al. (1995) prokázali, že celer pěstovaný v hydroponickém živném roztoku ekvivalentní 30 % mořské vodě vykazoval stejnou váhu sušiny jako rostliny pěstované za normální dostupnosti minerálních živin. To dokazuje, že celková asimilační schopnost není ovlivněna zvýšenou koncentrací solí v živném roztoku, ale v důsledku zasolení došlo ke snížení obsahu vody a zvýšení hladiny manitolu. Stoop et al. (1996) provedli experiment, ve kterém testovali rezistenci buněk celeru vůči NaCl. Buňky byly pěstovány na médiu se sacharózou nebo manitolem jako jediným zdrojem uhlíku. Stoop et al. zjistili, že na manitolu rostoucí buňky obsahují velké množství tohoto sacharidu, což vede k tomu, že jsou dvakrát odolnější vůči inhibici růstu NaCl oproti těm rostoucím na sacharóze. Manitol nemá pouze protektivní funkce, ale slouží také jako alternativní zdroj uhlíku a energie, přičemž degradace manitolu či některých jiných cukerných alkoholů je mnohem účinnější ve srovnání se sacharózou, NADH produkované v počátečním kroku katabolismu manitolu může být oxidováno v mitochondriích za vzniku 3 molekul ATP (Pharr et al., 1995).

Manitol jako efektivní zhášec ROS, zejména hydroxylových radikálů

Manitol dále slouží jako efektivní zhášec hydroxylových radikálů v chloroplastech transgenního tabáku. Vnesená syntéza manitolu má za následek zvýšenou schopnost neutralizace hydroxylových radikálů a zvýšenou odolnost vůči oxidativnímu poškození (Shen, et al., 1997). Hydroxylové radikály vznikají interakcí H_2O_2 a superoxidu nebo přímo z H_2O_2 v přítomnosti přechodných kovů, jako je Fe^{2+} nebo Cu^{2+} (Fentonova reakce) (Haliwell et al., 1990). ROS ovlivňují mimo jiné elektrontransportní řetězec a enzymy Calvinova cyklu.

Manitol, manitoldehydrogenáza a interakce rostlina – patogen

Napadení patogenem spouští v rostlině složitou síť reakcí aktivních forem kyslíku (Alvarez et al., 1998). Jednou z nejranějších reakcí zahrnutých v interakci patogen – rostlina je aktivace enzymu lokalizovaného na plazmatické membráně, a to NADPH oxidázy, která katalyzuje masivní produkci ROS (např. superoxidu, H_2O_2). ROS vzniklé

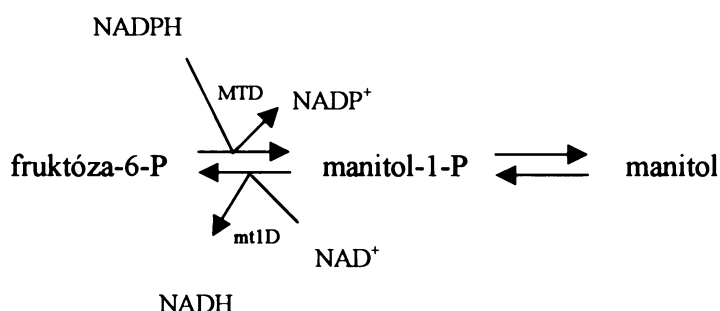
tímto způsobem mají několik důležitých funkcí. Za prvé, lokalizace vysoké koncentrace ROS v místě infekce má přímé antimikrobiální účinky. Za druhé je to funkce signální, a to zejména u H_2O_2 . Vysoké koncentrace tohoto ROS pravděpodobně spouští programovanou buněčnou smrt v místě infekce, čímž zamezují jejímu šíření. Jedná se o takzvanou hypersenzitivní reakci. V místech vzdálenějších od infekce indukuje nižší koncentrace H_2O_2 produkci endogenní kyseliny salicylové (Sharma et al., 1996), která stimuluje velkou skupinu obranných genů spojených s patogenezi (pathogenesis-related genes, PR genes). Manitol tvoří kolem 50 % (přibližně $60 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmotnosti) fotosynteticky asimilovaných rozpustných sacharidů v dospělých listech celeru (Loescher et al., 1992; Stoop a Pharr, 1994). Taková množství manitolu, který je považován za potencionální antioxidant, by působila jako efektivní zhášec ROS a tím by odstranila obranné mechanismy zprostředkované H_2O_2 . Proto dochází k jeho odstranění indukci MTD či k inaktivaci katalázy kyselinou salicylivou, což vede k navození obranných mechanismů (Jennings et al., 1998).

Naopak 'úspěšné' patogeny jsou schopné potlačit komplex obranných mechanismů rostliny zprostředkovaný ROS, tím že je zhásejí enzymaticky (katalázy, superoxididismutázy) nebo neenzymaticky (manitol), čímž je přeměňují na méně reaktivní (Smimoff et al., 1998). MTD katalyzuje přeměnu manitolu na manózu, což znamená že je klíčovým regulátorem manitolového poolu u celeru (Stoop et al., 1995). Překvapivě byl tento katabolický enzym manitolu nalezen v aktivní formě i u tabáku, který manitol neprodukuje. Předpokládá se, že patogenem indukovaná exprese MTD zajišťuje mechanismy, kterými se rostlina brání vůči potlačení obranných reakcí manitolem produkovaným patogenem, tím že přeměňuje tento zhášec ROS na manózu (Jennings et al., 1998).

Transformace tabáku genem pro mt1D z *E. coli*

Tarczynski et al. (1992) se pokusili objasnit roli manitolu ve vyšších rostlinách vnesením bakteriálního genu pro mt1D do tabáku (*Nicotiana tabacum*). Tento gen kóduje manitol-1-fosfátdehydrogenázu a její exprese v *E. coli* vede k odbourávání manitolu. Tarczynski et al. objasnili, že tento enzym funguje u transgenního tabáku opačně a má za následek produkci a akumulaci manitolu. Tento cukerný alkohol nebyl detekován u netransformované rostliny. Bylo prokázáno, že transformovaný tabák vykazuje vyšší toleranci k zasolení než rostlina netransformovaná. Manitol přispívá ke změně osmotického potenciálu v transgenní rostlině pouze o 30 - 40 % (Karkas et al.,

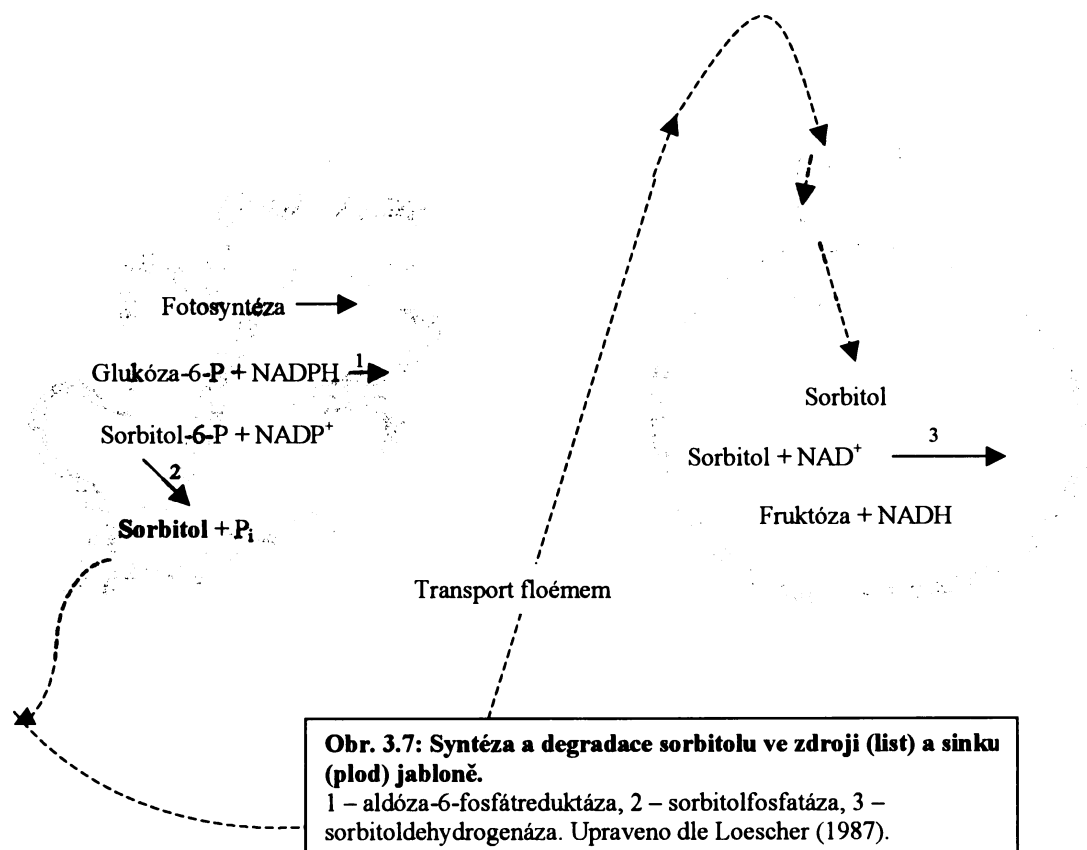
1997), ale hlavně chrání před oxidativním poškozením hydroxylovými radikály (Shen et al., 1997).



Obr.3.6: Metabolismus manitolu u *E. coli* a transformovaného tabáku. → cesta v transformovaném tabáku, ← cesta u *E. coli*. Upraveno dle Tarczynski et al. (1992).

3.3.2.1.2 Sorbitol

V roce 1872 Boussingault poprvé izoloval sorbitol z plodu *Sorbus aucuparia*. O tomto šestiuhlíkatém cukerném alkoholu je známo mnohem méně informací než o manitolu. Sorbitol byl nalezen v kokosu, kukuřici a mnoha zástupcích čeledi *Rosaceae* jako je meruňka, třešeň, slivoň, hrušeň a jabloň (Wallaart, 1980; Loescher, 1987)). Sorbitol se také akumuluje u některých druhů *Plantago*, které jsou tolerantních k vyšším koncentracím solí (Briens a Larher, 1983).



Metabolismus sorbitolu

Sorbitol tvoří 60-80 % rozpustných sacharidů jabloně se stejně jako manitol hromadí v dospělých listech a je transportován floémem do sinkových pletiv (mladé listy a plody) (Bielecki, 1969). Prekurzorem pro syntézu sorbitolu je, stejně jako pro sacharózu, glukóza-6-fosfát ze které za katalýzy NADPH-dependentní A6PR v dospělých listech vzniká sorbitol-6-fosfát. Ten je poté defosforylován fosfatázou na sorbitol (Williamson et al., 2002). K degradaci sorbitolu dochází v sinkových pletivech za působení NAD-dependentní sorbitoldehydrogenázy (SDH), která oxiduje sorbitol na fruktózu (Loescher, 1987) (viz. obr. 3.7).

Rozdělování uhlíku z glukózy mezi sorbitol a sacharózu

Hlavními produkty fotosyntézy a floémem transportovanými sacharidy jsou u jabloně sacharóza a sorbitol, který je v nadbytku. Wang et al. (1996) provedli experiment, ve kterém se snažili objasnit princip rozdělování uhlíku pocházejícího z [¹⁴C] glukózy mezi [¹⁴C] sacharózu a [¹⁴C] sorbitol u rostlin vystavených vodnímu deficitu. U rostlin pěstovaných za normální dostupnosti vody docházelo k vyšší syntéze sacharózy, a to v poměru sorbitol/sacharóza = 0,8. Zatímco po vyvolání vodního deficitu se poměr změnil ve prospěch sorbitolu (sorbitol/sacharóza = 1,7). K podobné reakci dochází také u celeru během zasolení, kde funkci sorbitolu přebírá manitol (Everard et al., 1994). Wang et al. (1996) předpokládají, že vodní deficit má za následek zvýšení aktivity aldóza-6-fosfátreduktázy (A6PR) a inhibici sacharózafosfátsyntázy (SPS), což vede k přednostnímu rozdělování uhlíku z glukózy pro syntézu sorbitolu.

3.3.2.2 Myo-inositol a jiné cyklické cukerné alkoholy (cyklitoly)

Inositol je nejjednodušší cyklohexanový hexitol, který vzniká cyklizací glukózy a je všudypřítomnou složkou buněk mnoha organismů. Inositol a jiné od něho odvozené sloučeniny tzv. cyklitoly, zejména D-ononitol a D-pinitol, byly identifikovány v *Mesembryanthemum crystallinum*, v tropických luštěninách (*Cajanus cajan*), v přímořských borovicích (*Pinus pinaster*), ve jmelí, smrku, ale také v mangrovových ekosystémech (*Aerostichum auerum* L.) (Noiraud, 2001).

Myo-inositol a jeho deriváty se účastní buněčné signalizace, biogeneze membrán, ale jsou také zapojeny v obranných mechanismech během osmotických stresů. Reakcí myo-inositolu a UDP-galaktózy vzniká galaktinol, který je základním substrátem pro syntézu

sacharidů rafinóзовé řady (Noiraud, 2001). Syntéza metylovaných cyklitolů snižuje syntézu RFO a naopak (Pattanagul et al., 1999).

Syntéza myo-inositolu

Výchozím substrátem pro syntézu inositolu je glukóza-6-fosfát, která je za katalýzy inositol-1-fosfátsyntázy (INO1) přeměněna na inositol-1-fosfát. Tento produkt je poté defosforylován inositol-1-fosfátfosfatázou (Ins-Pase) na inositol (viz. obr. 3.8). Inositol a inositol-1-fosfát mimo výše zmíněných funkcí také podporují produkci komponent plazmatické membrány, které souvisejí s tolerancí k osmotickému stresu, např. gummy, sacharidy lokalizované v oblasti buněčné stěny, glykoproteiny a sliz (Bohnert et al., 1995).

Metabolismus myo-inositolu během abiotického stresu

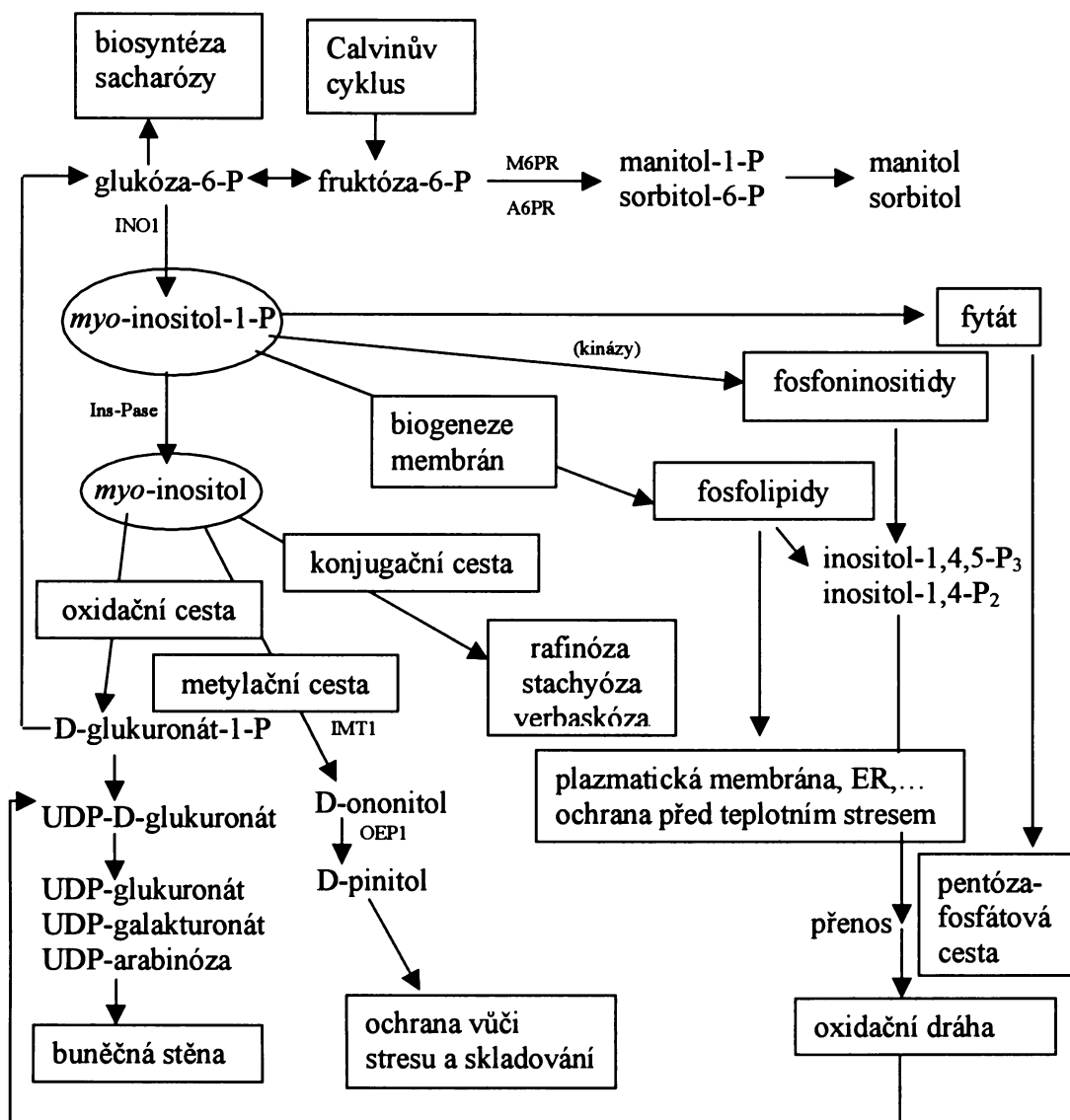
Inositol může být během abiotického stresu metylován na deriváty zajišťující mimo jiné osmotické přizpůsobení (viz. obr. 3.8). Gen kódující inositolmetyltransferázu (Imt) je transkripčně indukován pouze zasolením a nízkou teplotou. Tento enzym katalyzuje metylaci inositolu za vzniku ononitolu, který je později epimerizován na pinitol. Produkty přenosů metylových skupin jsou také kvartérní amoniové sloučeniny jako je glycinbetain, terciární sulfoniové sloučeniny (dimethylsulfoniopropionát) a polyaminy (Bohnert et al., 1995).

3.3.3 Neredukující sacharidy

3.3.3.1 Sacharóza

Výskyt a funkce sacharózy (α -D-glukopyranosyl- β -D-fruktofuranosid)

Syntéza sacharózy je omezena pouze na rostlinnou říši a fotosyntetizující prokaryota. Tento disacharid je hlavním produktem fotosyntézy exportovaným z listů do zbývajících částí rostliny za účelem zásobení uhlíkem a energií. U mnoha druhů rostlin je sacharóza transportována paralelně s jinými druhy sacharidů (rafinóza, manitol, sorbitol) (Noiraud et al., 2000). Sacharóza je také rezervní látkou některých rostlin, např. stonky cukrové třtiny, kořeny cukrové řepy a plody mnoha druhů rostlin. Rostlinné buňky často akumulují sacharózu během chladu či sucha, protože stabilizuje membrány a proteiny a je zásobní formou energie, která je využita po zlepšení nepříznivých okolních podmínek.



Obr. 3.8: Polyoly a jejich metabolismus. *Myo*-inositol je syntetizován z glukóza-6-fosfátu (glukóza-6-P) za katalýzy inositol-1-fosfátsyntázy (INO1) a inositol-1-fosfátfosfatázy (Ins-Pase). Manitol vzniká z fruktóza-6-fosfátu za přítomnosti klíčového enzymu manóza-6-fosfátreduktázy (M6PR) a prekurzorem pro sorbitol je glukóza-6-fosfát a enzym nutný k jeho syntéze je aldóza-6-fosfátreduktáza (A6PR). *Myo*-inositol může být dále fosforylován na fytáty (inositol- P_6) jakožto zásobní zdroj fosfátu v semenech, který vstupuje během klíčení do pentóza-fosfátového cyklu. Inositol-1-fosfát může být také využit k syntéze membránových fosfoinositidů fosfatidylinositolu (PI), fosfatidylinositolumonofosfátu (PIP) a fosfatidylinositolubisfosfátu (PIP₂), které jsou zapojeny do přenosu signálu jako zdroje druhých posílů inositol-1,4,5-trifosfátu a inositol-4,5-bisfosfátu. Inositol-1-fosfát se také uplatňuje při biogenezi membrán. Inositol interagující s galaktózou tvoří galaktinol, který slouží jako zdroj galaktozylových zbytků pro sacharidy rafinózy a galaktinoly. Inositol může být také metylován na D-ononitol za přítomnosti inositol-O-metyltransferázy (IMT1) a poté přeměněn na D-pinitol ononitolepimerázou (OEP1). Tyto metylované inositoly slouží jako ochranné osmolyty a jsou jen pomalu metabolizovány. Inositol může být také oxidován na D-glukuronát a pak na UDP-D-glukuronát, který tvoří necelulózní komponenty buněčné stěny jako jsou gemy, slizy, glykoproteiny. Upraveno dle Bohnert et al. (1995).

Sacharóza je také signální molekulou, která reguluje expresi genů kódujících enzymy, transportéry, zásobní proteiny a proteiny zahrnuté v dělení a diferenciaci buněk. Dále je zahrnuta v mnoha vývojových procesech, jako je indukce kvetení, diferenciacce vodivých pletiv, vývoj semen a akumulace zásobních látek (Lunn a MacRae, 2003).

Syntéza sacharózy

Sacharóza je syntetizována v cytosolu z triózafosfátů transportovaných z chloroplastů, kde vznikly jako produkty Calvinova cyklu. Prekurzory pro syntézu sacharózy jsou hexózy, a to UDP-glukóza a fruktóza-6-fosfát, které jsou enzymaticky propojeny sacharózafosfátsyntázou (SPS). Vytvořený sacharóza-6-fosfát je hydrolyzován za katalýzy sacharózafosfátfosfatázy na sacharózu (Salerno a Curatti, 2003). SPS, jakožto klíčový enzym syntézy sacharózy, je regulována vývojově a faktory vnějšího prostředí (světlo, osmotický stres). Dále je tento enzym aktivován alostericky glukóza-6-fosfátem a inhibován anorganickým fosfátem (Lunn a MacRae, 2003).

3.3.3.2 Trehalóza

Výskyt a metabolismus trehalózy (α -D-glukopyranosyl- α -D-glukopyranosid)

Biosyntéza trehalózy se na rozdíl od sacharózy vyskytuje u široké škály organismů (savci, hmyz, řasy, houby, bakterie i rostliny). Trehalóza byla v rámci rostlinné říše prvně izolována z *Selaginella lepidophylla* a následně byla objevena i u jiných kaprad'orostů např. *Botrychium lunaria*, ve zralých plodech cévnatých rostlin (někteří zástupci *Apiaceae*) a v listech vůči desikaci odolné krytosemenné rostliny *Myrothamnus flabellifolius* (Goddijn a van Dun, 1999).

Syntéza trehalózy je v mnoha krocích podobná syntéze sacharózy, ale je pravděpodobně evolučně starší, neboť byla objevena ve všech říších. Stavebními jednotkami trehalózy jsou UDP-glukóza a glukóza-6-fosfát, které jsou enzymaticky propojeny trehalóza-6-fosfátsyntázou (TPS). Poté dochází k defosforylaci trehalózy-6-fosfátu na trehalózu za katalýzy trehalóza-6-fosfát fosfatázy (Goddijn a van Dun, 1999).

Trehalóza a osmotický stres

Nepříznivé podmínky, jako je horko, chlad či vodní deficit, vyvolávají u mikroorganismů akumulaci vysoké koncentrace trehalózy, která funguje jako osmoprotektant. Tento disacharid je totiž díky přítomnosti neredukujících konců vysoce rezistentní vůči extrémním hodnotám pH a teploty. U vyšších rostlin je hromadění

trehalózy během abiotických stresů vzácné (Müller et al., 1995). Předpokládá se totiž, že ochrannou funkci tohoto disacharidu přebírá během desikace sacharóza. Nicméně u několika vůči desikaci odolných krytosemenných rostlin byla trehalóza identifikována, např. již výše zmíněný *Myrothamnus flabellifolius* akumuluje ve 'standardních' podmínkách trehalózu až do 3 % jeho hmotnosti sušiny, ale během vystavení stresu dochází pouze k nepatrnému navýšení. Naopak hladina sacharózy se u této rostliny během desikace zvyšuje ze 3 na 6 % hmotnosti sušiny (Godijn a van Dun, 1999). Trehalóza daleko účinněji než jiné cukry stabilizuje dehydratované buněčné struktury, jako je fosfolipidová membrána a enzymy. Ke stabilizaci dochází na základě interakcí hydroxylových skupin trehalózy s fosfáty membránových fosfolipidů. Trehalóza se vkládá mezi hlavičky (hydrofilní části) fosfolipidů, čímž je zachováno původní prostorové uspořádání tzv. tekutého krystalu (Crowe et al., 1992).

Trehalóza jakožto signální molekula

Trehalóza má u rostlin pravděpodobně i funkci signální. Vogel et al. (1998) naznačili, že trehalóza a její deriváty fungují jako regulátory rostlinného růstu a vývoje. Zajímavé je, že u vyšších rostlin neprodukujících trehalózu byla objevena aktivita trehalázy, enzymu odbourávajícího tento disacharid. Předpokládá se, že tento enzym pravděpodobně hraje roli v obranných mechanismech vůči patogenům, které syntetizují trehalózu. Další funkcí trehalázy ve vyšších rostlinách je degradace trehalózy produkované mikroorganismy (např. *Rhizobium*) nebo houbami, které jsou s rostlinou v symbióze (Müller et al., 1995).

3.3.3.3 Sacharidy rafinózové řady (RFO)

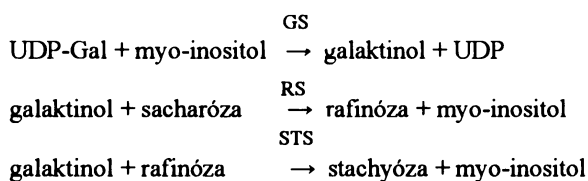
Výskyt a základní funkce RFO (α -1,6-galaktozyl_n-sacharóza; $1 \leq n < 8$)

RFO jsou hojně rozšířenými oligosacharidy v rostlinné říši. Byly nalezeny např. u *Cucurbitaceae*, *Lamiaceae*, *Oleaceae* a *Scrophulariaceae*. Stejně jako sacharóza tak i RFO jsou využívány jako sacharidy transportované floémem a jako zásobní forma uhlíku. RFO, zejména rafinóza a stachyóza, přenášené na dlouhé vzdálenosti se tvoří v průvodních buňkách, které obklopují sítkovice a spojují je symplasticky s mezofylem. Sacharidy rafinózové řady jsou příliš velké na to, aby difundovaly zpět do mezofylových buněk, ale mohou pronikat do floému (Turgeon, 1996; Noiraud et al., 2001). Zásobní pool RFO je lokalizovaný v mezofylových buňkách. Rostliny skladují RFO v rozmezí koncentrací 25-80 % jejich sušiny ve specializovaných zásobních

orgánech jako jsou hlízy (např. *Stachys sieboldii*), v semenech (např. sojové boby) a ve fotosyntetizujících listech (např. *Ajuga reptans*) (Keller et al., 1989; Sprenger a Keller, 2000). Mimo funkce zásobní a transportní má RFO i jiné poslání. Akumuluje se v semenech během desikace a u rostlin tolerantních k chladu (např. jehličnany) a zasolení (Bachmann et al., 1994; Bachmann a Keller, 1995).

Metabolismus RFO

Molekuly RFO jsou tvořeny lineárním řetězcem zbytků galaktózy v počtu 1 až 8, které jsou připojeny k sacharóze glykozidickou vazbou α -(1→6). V metabolismu RFO jsou zahrnuty tři typy galaktozylových donorů: UDP-galaktóza, galaktinol [O- α -D-galaktopyranozyl-(1→1)-L-myo-inositol] a RFO (Peterbauer a Richter, 2001). Galaktinol je výsledným produktem reakce UDP-galaktózy a myo-inositolu za katalýzy galaktinolsyntázy (GS), která je považována za klíčový enzym biosyntézy RFO. Rafinóza (stupeň polymerace = 3) respektive stachyóza (stupeň polymerace = 4) vznikají připojením galaktozylu k sacharóze respektive rafinóze. Tyto kroky jsou katalyzovány rafinózasyntázou (RS) a stachyózasyntázou (STS).



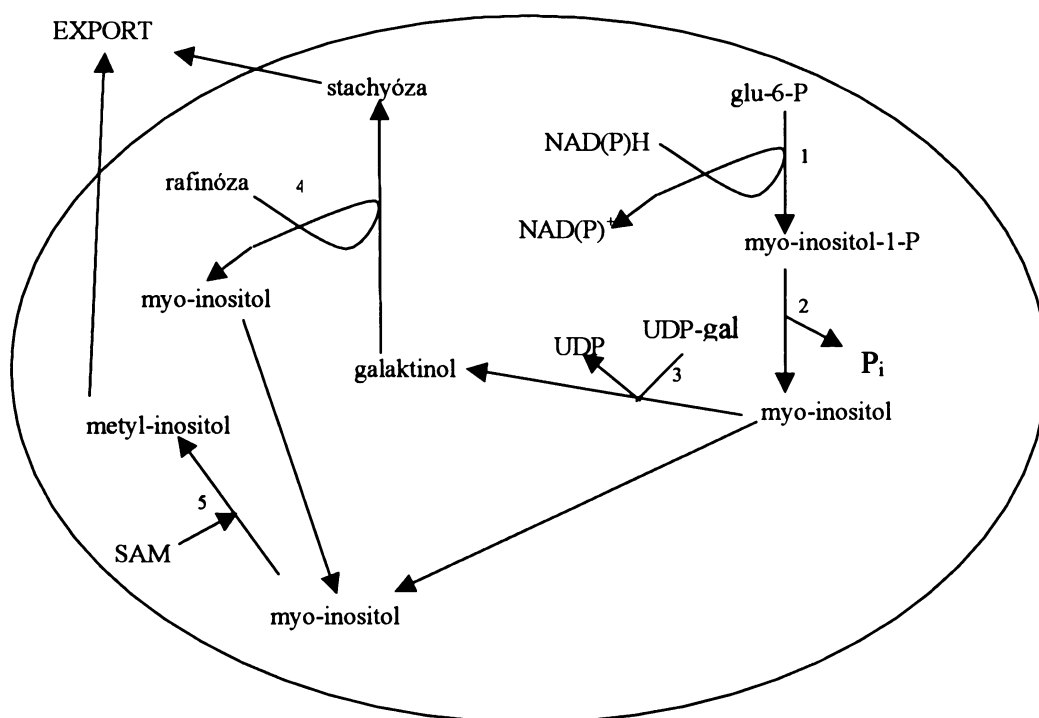
Obr. 3.9: Syntéza sacharidů rafinózové řady.

Syntéza vyšších homologů je katalyzována galaktan:galaktan galaktozyltransferázou (GGT), která využívá jako substráty zejména stachyózu a verbaskózu. GS je spolu s RS a STS lokalizována v cytosolu, kdežto následná na galaktinolu nezávislá elongace RFO řetězce probíhá ve vakuole za působení GGT. Katabolismus RFO je katalyzován α -galaktoxidázou (α -Gal) (Bachmann a Keller, 1995).

RFO a chlad

Tolerance k chladu a mrazu u rostlin mírného pásu je nezbytným předpokladem pro přežití během zimního období a pro následný růst a vývoj na jaře. Chladová aklimace vzniká postupným přizpůsobením k nízkým teplotám a nepochybně zahrnuje geneticky programované procesy jako je syntéza proteinů, enzymů, membrán a dalších komponent. Syntéza škrobu je velmi citlivá na chlad (Pollack et al., 1983) proto musí

alternativní formy zásobních sacharidů zajistit růst rostliny během chladnějších měsíců. RFO zajišťují metabolický sink pro fotosyntézu, ale poskytují i redukované formy uhlíku pro růst rostliny během chladu, kdy neprobíhá katabolismus škrobu (Bachmann et al 1994). RFO podporují vitrifikovaný stav cytosolu, čímž chrání strukturu makromolekul během desikace. Podle jiné hypotézy tyto oligosacharidy stabilizují membrány, tím že nahrazují molekuly vody mezi polárními hlavičkami fosfolipidů (Peterbauer a Richter, 2001). Naopak Pattanagul a Madore (1999) zjistili, že *Coelus* má během sucha sníženou syntézu RFO. Je to jednak dáno tím, že u stresované rostliny je nižší rychlost fotosyntézy než za normálních podmínek, ale také sníženou aktivitou GS. Dochází k syntéze metylovaných derivátů myo-inositolu, čímž je odkloněna syntéza RFO přes galaktinol.



Obr. 3.10: Rozdělování uhlíku mezi sacharidy rafinóзовé řady a metylované deriváty inositolu ve fotosyntetizujících listech *Coelus*.

1 – myo-inositol-1-fosfátsyntáza, 2 – myo-inositol-1-fosfátfosfatáza, 3 – galaktinolsyntáza, 4 – stachyózasyntáza, 5 – myo-inositol-6-O-metyltransferáza, glu-6-P – glukóza-6-fosfát, SAM – S-adenozylmethionin (donor metylové skupiny). Upraveno dle Pattanagul a Madore (1999).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Rostlinný materiál

- Kultury oliv (*Olea europaea* L.) cv. Picual množené nodálními řízky
- Tkáňové kultury celeru (*Apium graveolens* L.) cv. Dulce odvozené ze segmentů listových čepelí a řapíků
- Tkáňové kultury tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Samsun odvozené z internodálních segmentů

Všechny experimenty byly prováděny v podmínkách *in vitro*.

4.2 Kultivace rostlinného materiálu

Kultivace rostlinného materiálu byla prováděna na Katedře fyziologie rostlin Univerzity Karlovy a ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby (Ruzyně).

4.2.1 Práce v aseptických podmínkách

Přesazování kultur bylo prováděno v aseptickém prostředí laminárního flow boxu typu Heraeus LaminAir TL 2448. Nástroje a Petriho misky potřebné pro práci s kulturami byly sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru při 150°C po dobu 3 hodin a během práce ponořením do 70 % ethanolu a opálením v plameni.

4.2.2 Kultivační média

Jako kultivační média byla použita MS média pro výsev semen a růst rostlin celeru (Murashige a Skoog, 1962), obohacená MS média pro indukci tkáňových kultur celeru, obohacená poloviční MS média pro růst kultur oliv a V₄ média (Opatrný, 1971) k indukci růstu tkáňových kultur tabáku. Všechna zmíněná média byla zpevněna přidáním agaru. Zásobní láhve s roztoky A – C pro přípravu MS média byly skladovány v lednici při 4°C, roztok D kvůli jeho příliš časté kontaminaci při –20°C. Roztok C byl připravován speciálním způsobem. Obě složky tohoto zásobního roztoku byly navázeny zvlášť, doplněny na zhruba stejný objem, vytemperovány na stejnou teplotu cca 80°C a roztok Na₂EDTA.2H₂O byl vlit do roztoku FeSO₄.7H₂O. Objem byl doplněn na 500 ml a roztok byl promícháván dokud nezchladnul na pokojovou teplotu. Veškeré zásobní roztoky pro kultivační médium V₄ byly skladovány v lednici při 4°C. Přesné složení zásobních roztoků pro média MS a V₄ je uvedeno v tabulkách 4.1 a 4.2. Další složky přidávané do médií pro jednotlivé kultury jsou uvedeny v tabulkách 4.1A-C a 4.2 A.

Tabulka 4.1: Složení zásobních roztoků kultivačního média MS.

zásobní roztok	složení	koncentrace v zásobním roztoku [g/0,5 l]	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 cheláty	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,78	5
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3,73	
D vitamíny	inozitol	10,0	5
	kys. nikotinová	0,05	
	pyridoxin - HCl	0,05	
	thyamin - HCl	0,5	
	glycin	0,2	

1. Tabulka 4.1A: Médium pro výsev semen celeru.

typ média: MS	hmotnost složky na 1 litr média
sacharóza	30 g
agar	8 g
pH	5,7-5,8

2. Tabulka 4.1B: Médium k indukci tkáňových kultur celeru (hmotnost složek upravena dle Shibli a Al-Juboory, 2002).

typ média: MS	hmotnost složky na 1 litr média
sacharóza	15 g
manitol	15 g
agar	8 g
PVP (polyvinylpyrolidon)	0,2 g
2,4-D	0,5 mg
kinetin	0,6 mg
pH	5,7-5,8

3. Tabulka 4.1C: Standardní udržovací médium pro kultury oliv (hmotnost složek upravena dle Rugini, 1986).

typ média: ½ MS*	hmotnost složky na 1 litr média
sacharóza	15 g
manitol	15 g
agar	7 g
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,6 g
glutamin	1,0 g
trans-zeatin	4 mg
kys. gibberelová	7 mg
pH	6,0

* ½ MS znamená poloviční objem roztoků A-D

4. Udržovací médium pro tkáňové kultury tabáku.

Tabulka 4.2: Složení zásobních roztoků kultivačního média V₄.

zásobní roztok	složení	koncentrace v zásobním roztoku [g/0,5 l]	objem zásobního roztoku [ml/l média]
A makroprvky	KCl	7,5	100
	NaNO ₃	6,0	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5	
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1,25	

B makroprvky	CaCl ₂	5,7	10
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,0	
C mikroprvky	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,075	1
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,03	
	H ₃ BO ₃	1,0	
	KJ	0,01	
	AlCl ₃	0,016	
	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,03	
	D cheláty	Na ₂ EDTA	
FeSO ₄ ·7H ₂ O		2,78	
E vitamíny	thiamin	0,050	10
	pyridoxin	0,050	
	kys. nikotinová	0,025	
	glycin	0,15	

Tabulka 4.2A: Další složky V₄ média.

typ média : V ₄	hmotnost složky na 1 litr média
sacharóza	30 g
agar	8 g
inositol	0,1 g
kasein	1,0 g
2,4-D	1 mg
NAA	1 mg
pH	5,8

4.2.2.1 Růstové regulátory

Růstové regulátory (kromě zeatinu) byly uchovávány ve vodných zásobních roztocích v lednici při 4°C. Zásobní roztok zeatinu byl uskladněn v mrazícím boxu při -20°C. Typy použitých příslušných rozpouštědel jsou uvedeny v tabulce 4.3.

Tabulka 4.3: Typy použitých rozpouštědel.

růstový regulátor	rozpuštědlo
2,4-D	96 % ethanol
kinetin	1 M NaOH
NAA	1 M NaOH
trans - zeatin	1 M NaOH
kyselina gibberelová	96% ethanol

4.2.2.2 Příprava 1 litru kultivačního média MS

1. Zásobní roztoky A-D (u V₄ ještě E) byly napipetovány podle tabulky 4.1 respektive tabulky 4.2.
2. Další složky (cukr, agar, ...kromě růstových regulátorů) byly přidány podle výše uvedených tabulek 4.1A-C respektive 4.2A. .
3. Vzniklý roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 litr.
4. Úprava pH na požadovanou hodnotu několika kapkami 1M NaOH dle výše uvedených tabulek 4.1A-C eventuálně 4.2A.
5. Médium bylo povařeno asi 10 minut.
6. Poté byly přidány růstové regulátory a roztok byl rozlit v objemech přibližně 30 ml do 100 ml Erlenmeyerových baněk, které byly zavičkovány dvojitou vrstvou alobalu.
7. Sterilizace byla provedena autoklávováním (20 minut, 121°C, 144 kPa).

4.2.3 Kultivační podmínky

Kultivace semenáčků rostlin celeru

- teplota: 23 ± 3 °C
- fotoperioda: 16 hodin
- ozáření: 250 μmol.m⁻².s⁻¹
- kultivační interval: 5 - 6 týdnů

Kultivace tkáňových kultur celeru

- teplota: 23 ± 3°C
- fotoperioda: 16 hodin
- ozáření: 250 μmol.m⁻².s⁻¹
- kultivační interval: 2-3 týdny

Kultivace oliv *in vitro*

- teplota: $26 \pm 2^\circ\text{C}$
- fotoperioda: 16 hodin
- ozáření: $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
- kultivační interval: 80 – 90 dní

Kultivace tkáňových kultur tabáku

- teplota: $25 \pm 2^\circ\text{C}$
- fotoperioda: 16 hodin
- ozáření: $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
- kultivační interval: 3 týdny

4.3. Typy použitých kultur a jejich odvození**4.3.1 Tkáňové kultury celeru****Sterilizace semen celeru**

1. Semena celeru byla nasypána do Erlenmeyerovy baňky, přelita destilovanou vodou, přikryta alobalem a třepána na třepáčce.

Body 2-7 byly prováděny v laminárním flow boxu.

2. Po 90-ti minutách byla odlita destilovaná voda, přidáno malé množství 70 % etanolu a semena ponechána ještě minutu na třepáčce.

3. Po 1 minutě byl odstraněn etanol a přidáno 25 % SAVO se dvěma kapkami detergentu (Jar).

4. Semena s desinfekčním roztokem byla přelita do varné baňky se zábrusem a vystavena sníženému tlaku připojením na vodní vývěvu.

5. Semena celeru byla opět protřepána na třepáčce.

6. Po 20 minutách byl odlit desinfekční prostředek a semena pětkrát promyta sterilní destilovanou vodou.

7. Takto vysterilizovaná semena byla připravena k výsevu na pevné MS médium.

Odvození tkáňových kultur celeru

Po šesti týdnech byly rostliny celeru nařezány na přibližně centimetrové segmenty čepele a řapíku a aplikovány na MS médium obohacené růstovými regulátory (viz tabulka 4.1 B). Po 3-4 týdnech byly odebrány vytvořené kalusy a přeneseny na čerstvé

médium o stejném složení. Přenesení jsem provedla ještě několikrát, do doby než jsem odstranila veškeré pletivo primárního explantátu.

4.3.2 Tkáňové kultury tabáku

Tkáňové kultury tabáku byly odvozeny Mgr. Petrou Maškovou z internodálních segmentů kontrolních a transformovaných rostlin tabáku. Jako udržovací médium bylo použito obohacené V₄ médium (viz tabulka 4.2 a 4.2A).

4.3.3 Kultury oliv *in vitro*

Kultury oliv *in vitro* byly odvozeny z extripovaných embryí Mgr. Alžbětou Rejškovou, od níž jsem tyto kultury množené nodálními řízkou obdržela. Kultury byly dále množeny ze stonkových segmentů o minimálně dvou listových patrech, které byly zasazeny do ½ MS média (viz tabulka 4.1C).

4.4 Stanovení obsahu endogenních sacharidů pomocí HPLC

Stanovení endogenních sacharidů bylo provedeno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Popis a parametry měřicího systému:

- teplota: 80°C
- předkolonky: Hema-Bio 1000 SB+Q
- kolona: Hi Plex Ca²⁺ (Polymer Laboratories) nebo Pb²⁺ (Watrex)
- isokratická pumpa Spectra Physics
- refraktometrická detekce (Shodex RI-71)
- počítačový program CSW 1.7 (DataApex Ltd.)
- eluent: Milli Q voda
- objem injikovaného vzorku: 10 µl
- standardy sacharidů: Sigma

4.4.1 Příprava vzorků pro stanovení rozpustných nestrukturních sacharidů

1. Předem zvážené mikrozkušavky byly naplněny vzorky, tak aby hmotnost sušiny byla v rozmezí 5 – 30 mg.
2. Vzorky byly zmrazeny v tekutém dusíku a lyofylizovány po dobu 16-18 hodin (Lyovac GT 2, FINN-AQUA).
3. Poté byla stanovena hmotnost sušiny.

4. Po přidání 1 ml 80 % metanolu byly vzorky inkubovány po dobu 10 minut v termobločku vytemperovaném na 75°C.
5. Vzorky byly poté odpařeny dosucha na vakuové odparce typu Speed Vac Plus SC110 A, Savant (3 hodiny).
6. Ke vzorkům byla přidána ultračistá voda (Milli Q Millipore), a to v objemu odpovídajícím hmotnosti sušiny podle tabulky 4.4.
7. Vzorky byly vloženy na 15 minut do ultrazvukové lázně (Julabo USR 05).
8. Centrifugace po dobu 10 minut při otáčkách 14000 za minutu (Eppendorf centrifuge 5415 C).
9. Supernatant byl přefiltrován do čisté mikrozkuřavky. Byly použity membránové filtry Millipore o průměru filtru 0,45 µm.
10. Vzorky byly analyzovány na HPLC s refraktometrickou detekcí.
11. Sedimenty byly uskladněny v mrazáku pro pozdější analýzu škrobů.

Tabulka 4.4: Množství redestilované vody přidávané ke vzorku podle hmotnosti sušiny.

sušina (mg)	ultračistá voda (ml)
5 – 10	0,3
10 - 20	0,5
20 - 30	1,0

4.4.2 Příprava vzorků pro stanovení škrobu

1. Jako vzorky byly použity pelety získané při přípravě vzorků na analýzu rozpustných sacharidů.
2. K sedimentům byl přidán 1 ml redestilované vody (Milli Q Millipore).
3. Po protřepání byly vzorky vystaveny ultrazvuku po dobu 15-ti minut.
4. Po opětovném protřepání byly vzorky centrifugovány po dobu 15-ti minut (14000 otáček za minutu).
5. Supernatant byl odsát stříkačkou. Kroky 2 - 5 byly 4-krát zopakovány.
6. K promytým sedimentům bylo přidáno 0,5 ml cca 0,1 M acetátového pufru (pH 4,5) a poté byly vystaveny teplotě 121°C a tlaku 144 kPa po dobu 20-ti minut.
7. Po vytemperování vzorků na 4°C bylo ke každému vzorku přidáno 200 µl enzymatického roztoku. Příprava enzymatického roztoku a acetátového pufru je uvedena níže.
8. Vzorky byly inkubovány v termobločku při 40°C přes noc (nejméně 6 hodin).

9. Ráno byly enzymy inaktivovány působením 95°C po dobu 5-ti minut.
10. Na vakuové odparce typu Speed Vac Plus SC110 A byly vzorky odpařeny dosucha (3 hodiny).
11. Potom byly cukry rozpuštěny v 0,5 ml redestilované vody, 15 minut vystaveny ultrazvuku a 10 minut centrifugovány při otáčkách 14000 za minutu.
12. Supernatant byl přečištěn filtrací přes membránové filtry Millipore o průměru 0,45 μm do nové mikrozkušavky.
14. Do doby měření na HPLC byly vzorky skladovány v -20°C .
Množství škrobu bylo stanovováno jako množství glukózy získané enzymatickým rozštěpením molekul škrobu.

Příprava Na-acetátového pufru (0,1 M; pH 4,5)

Roztoky A a B byly připravovány odděleně:

- Roztok A: 0,2 M octan sodný – 200 ml
- Roztok B: 0,2 M kyselina chlorovodíková – 200 ml

Do roztoku A byl umístěn pH-metr a přikapáván roztok B dokud nebylo dosaženo pH 4,5. Pufr bylo možno uchovávat v lednici při 4°C do dalšího použití (2-3 měsíce).

Příprava enzymatického roztoku (roztok α -amylázy a amyloglukozidázy)

Enzymatický roztok byl připravován vždy čerstvý.

1. V mikrozkušavce bylo smícháno 100 μl α -amylázy (Sigma) a 300 μl amyloglukozidázy.
2. Enzymatický roztok byl centrifugován 10 minut při otáčkách 14000 za minutu (Eppendorf centrifuge 5415 C).
3. Po odlití supernatantu byla sedlina roztřepána v 1 ml Na-acetátového pufru a roztok byl přepipetován do zkumavky.
4. Poté byla mikrozkušavka ještě 2-krát vymyta 1 ml pufru, do zkumavky přidány další 3 ml pufru, takže výsledné množství enzymatického roztoku bylo 6 ml.
5. Vzniklý roztok byl promíchán na vortexu.

4.5 Stanovení růstových parametrů

Tkáňové kultury celeru, u kterých byla zjištěna hmotnost, byly kultivovány na médiích s různým obsahem sacharidů. Jednalo se o sacharózu a/nebo manitol, a to v koncentracích 3, 5 a 7 % nebo oba sacharidy v koncentraci 1,5 %. Po přibližně dvou

týdnech byla zjištěna výsledná hmotnost. Získané hodnoty byly použity k výpočtu růstového koeficientu, který slouží k porovnání růstu jednotlivých variant. Růstový koeficient je roven přírůstku hmotnosti vztaženého na jednotku počáteční hmotnosti.

Vzorec pro růstový koeficient:

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

m_0 ...hmotnost kultury na počátku
 m_t ...hmotnost kultury po čase t

4.6 Přehled experimentů

1. Odvození tkáňových kultur celeru.

Rostliny celeru vypěstované *in vitro* byly nařezány na segmenty (čepelové a řapíkové), které byly přeneseny na obohacené MS médium uvedené v tabulce 4.1 B. Jelikož se růst tkáňových kultur nezdál optimální, byla testována další média se změněným obsahem růstových regulátorů (tabulka 4.5). Nicméně na základě sledování růstu a zbarvení kultur bylo jako nejlepší vyhodnoceno médium použité k indukcí tkáňových kultur (viz tabulka 4.1 B).

Tabulka 4.5: Typy médií testovaných k indukcí tvorby tkáňových kultur celeru.

typ média	2,4 – D [mg/l]	kinetin [mg/l]	NAA [mg/l]	PVP [g/l]
1	0,5	0,6	-	0,2
2	0,5	0,6	-	-
3	0,5	0,6	0,5	-
4	0,5	-	0,5	-

2. Stanovení růstových parametrů tkáňových kultur celeru.

Tkáňové kultury celeru byly kultivovány na MS médiích s různými koncentracemi sacharózy a/nebo manitolu. Byl sledován růst tkáňových kultur v závislosti na typu a množství sacharidu v médiu, který byl vyjádřen pomocí růstového koeficientu. U tohoto experimentu bylo také stanoveno spektrum endogenních sacharidů pomocí HPLC. Stanovení byla provedena ve třech opakováních.

3. Chladové působení na tkáňové kultury celeru.

Tkáňové kultury celeru byly vystaveny 4°C po celou dobu kultivace nebo po dobu 10-ti dnů 10°C a 4 dny 4°C ('chladová aklimace') a byl sledován obsah endogenních

sacharidů pomocí HPLC. Chladové ošetření bylo provedeno ve dvou opakováních. Kultivace při 4°C probíhala ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby (Ruzyně).

4. Vystavení tkáňových kultur celeru osmotickému stresu.

Tkáňové kultury celeru byly pěstovány na MS médiu s 50 mM NaCl nebo 2 % sorbitolem, čímž bylo vyvoláno snížení osmotického potenciálu o ~ 0,3 MPa. Jelikož celer manitol produkuje a metabolizuje, byl tento cukerný alkohol nahrazen jím podobným, a to sorbitolem, který jak předpokládám vyvolává velmi podobné snížení osmotického potenciálu jako manitol. Navážka sorbitolu byla odvozena z níže uvedené tabulky 4.6. Experiment byl proveden třikrát. Byl stanoven obsah endogenních sacharidů pomocí HPLC.

5. Expozice kultur oliv osmotickému stresu.

Kultury oliv byly vystaveny osmotickému stresu, který byl vyvolán buďto přidavkem sorbitolu anebo polyetylglykolu (PEGu) do standardního udržovacího média ½ MS. Koncentrace sorbitolu a PEGu byly odvozeny z níže uvedené tabulky 4.6 tak, aby zvýšení osmotického potenciálu odpovídalo ~ 0,3 MPa. Přídavek osmotika byl stanoven z rovnice regrese. Manitol byl v tomto experimentu zaměněn za sorbitol z důvodu akumulace manitolu olivou za kontrolních kultivačních podmínek. Snížení osmotického potenciálu o ~ 0,3 MPa odpovídají média s 12 % polyetylglykolem nebo s 2 % sorbitolem.

Tabulka 4.6: Osmotické potenciály kultivačních médií (převzato od Mgr. Aleny Bartoníčkové).

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

6. Vliv exogenního sacharidu na spektrum endogenních sacharidů u kultur oliv.

Byl sledován růst kultur oliv *in vitro* v závislosti na různé koncentraci sacharidu (sacharóza, manitol nebo rafinóza) v médiu. Pomocí HPLC bylo opět stanoveno zastoupení endogenních sacharidů. Experiment byl proveden ve dvou opakováních.

7. Stanovení obsahu škrobu u kultur oliv *in vitro*.

U kultur oliv *in vitro* rostoucích na 3 % sacharóze, manitolu nebo rafinóze bylo stanoveno zastoupení škrobu, a to na základě určení obsahu glukózy po enzymatickém štěpení škrobu pomocí HPLC.

8. Stanovení růstových parametrů tkáňových kultur tabáku vystavených osmotickému stresu.

Byl sledován růst tkáňových kultur tabáku kontrolních a transformovaných genem *cdc25* ze *S. pombe* kultivovaných na základním V₄ médiu nebo médiu s přídatkem 2 % sorbitolu, a opět vyjádřen pomocí růstového koeficientu. U tohoto experimentu, který byl proveden ve dvou opakováních, byl taktéž stanoven obsah endogenních sacharidů pomocí HPLC.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Výsledky následujících experimentů jsou uvedeny ve formě sloupcových grafů. Jednotlivé sloupce vyjadřují průměrnou hodnotu sledovaného parametru pokusného rostlinného materiálu. Chybové úsečky jsou grafickým vyjádřením směrodatných odchylek a n vyjadřuje počet vzorků, ze kterých je vypočítán průměr.

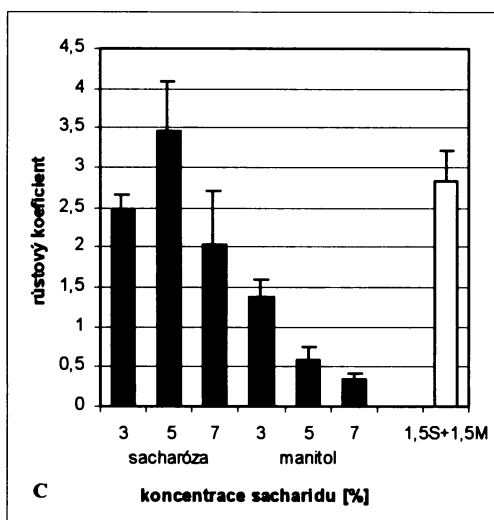
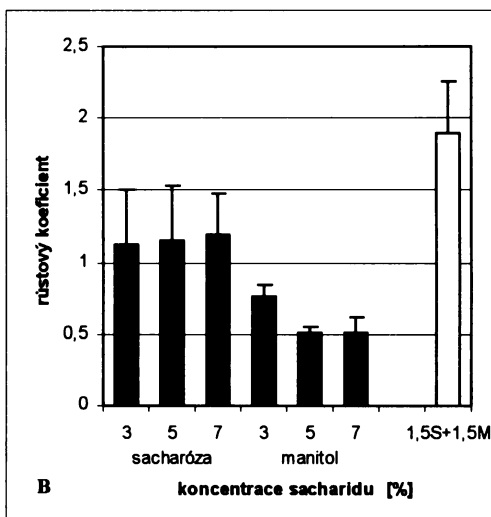
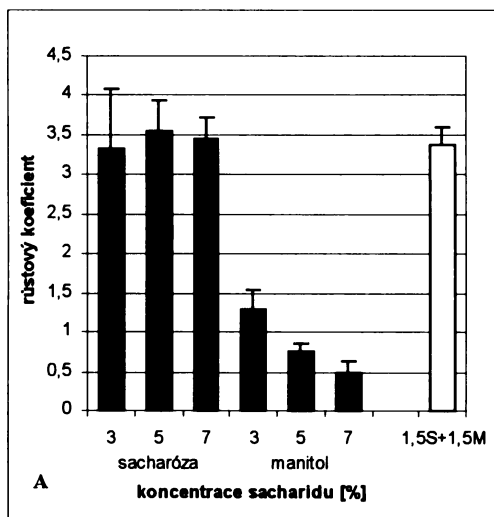
TKÁŇOVÉ KULTURY CELERU

5.1 Vliv exogenních sacharidů na růst tkáňových kultur celeru

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda manitol a sacharóza mohou sloužit jako srovnatelný zdroj uhlíku a energie. Tento experiment byl proveden ve třech opakováních a byly použity tkáňové kultury celeru odvozené z čepele. Testovala jsem vliv různé koncentrace exogenního sacharidu, sacharózy a/nebo manitolu, na růst tkáňových kultur celeru. Tkáňové kultury byly pěstovány na MS médiích s přidavkem 3, 5 a 7 % sacharózy nebo manitolu nebo na médiu, které obsahovalo jak manitol, tak i sacharózu, a to oba sacharidy v koncentraci 1,5 %. Poslední zmíněné médium sloužilo jako médium standardní udržovací respektive kontrolní. Růst tkáňových kultur celeru byl vyjádřen pomocí růstového koeficientu, což je hodnota přírůstku za určitou dobu vztahovaná na výchozí hmotnost rostlinného materiálu (viz kapitola 4.5).



Obr.5.1: Kultivace tkáňových kultur celeru odvozených z čepele na standardním udržovacím médiu.



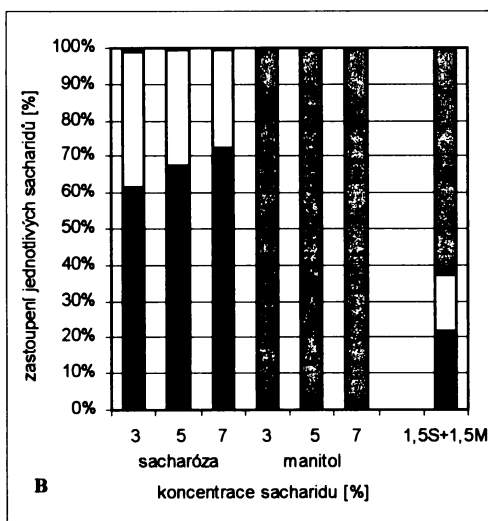
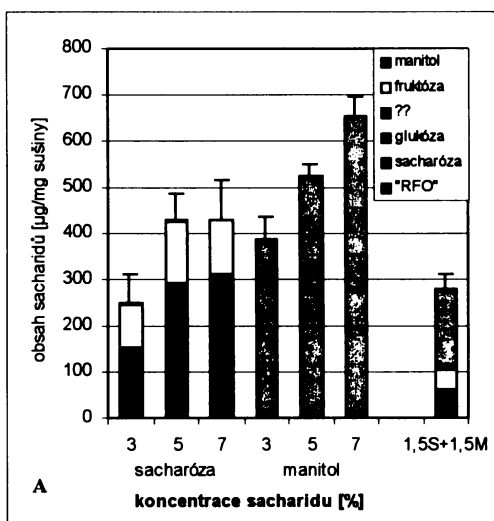
Grafy 1A-C: Růst tkáňových kultur celeru v závislosti na různé koncentraci a typu sacharidu v MS médiu. A – 1. opakování, doba kultivace: 14 dní, n = 7; B – 2. opakování, doba kultivace: 13 dní, n = 6; C – 3. opakování, doba kultivace: 14 dní, n = 6; M... manitol, S... sacharóza; úsečky znázorňují směrodatné odchylky; růstový koeficient... $c = (m_t - m_0)/m_0$, m_t ... hmotnost tkáňové kultury v čase t , m_0 ... výchozí hmotnost tkáňové kultury.

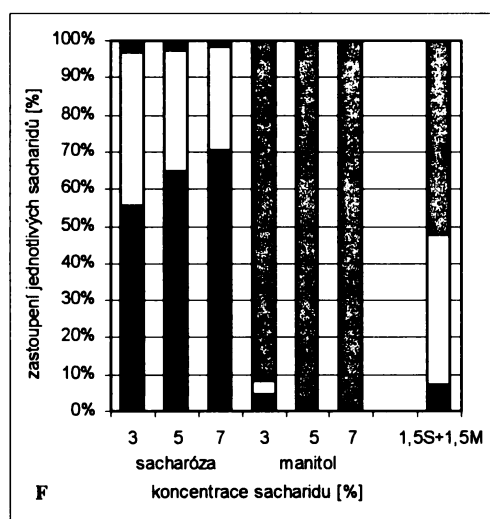
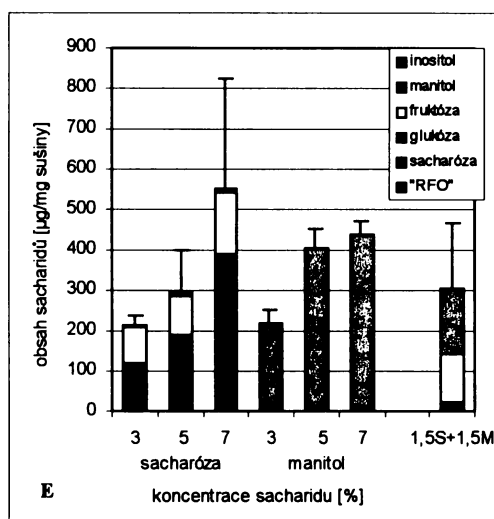
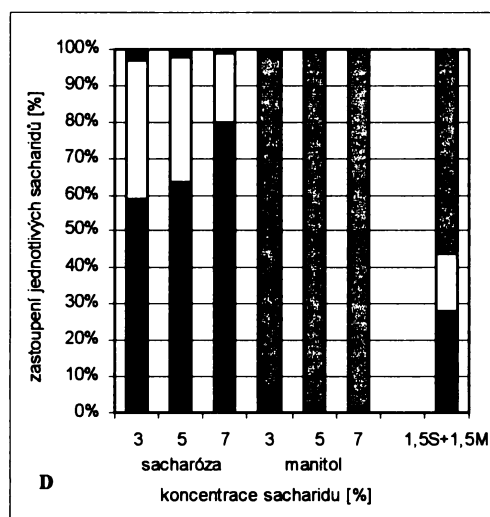
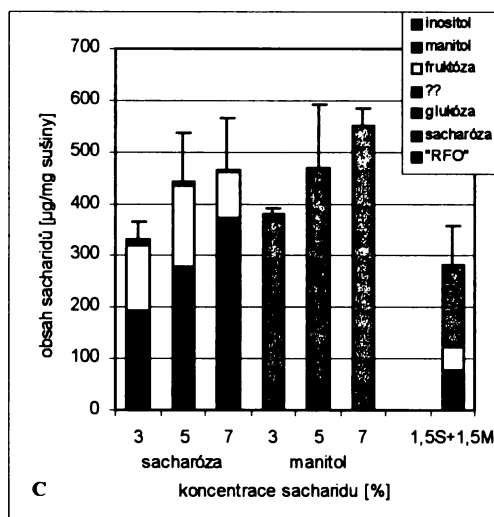
Ve všech třech opakováních lze pozorovat viditelně lepší růst tkáňových kultur na médiích se sacharózou oproti těm rostoucím na manitolu jako jediném zdroji uhlíku a energie (grafy 1A-C). U prvního i u druhého opakování byl růst na médiích s různými koncentracemi sacharózy velmi podobný a u třetího opakování byl nejlepší růst pozorován na médiu s přídavkem 5 % sacharózy. Rozdíly v růstu těchto tkáňových kultur nebyly průkazné. Dobrý růst byl také pozorován u kultur rostoucích na médiu s 1,5 % sacharózou a 1,5 % manitolem. Naopak s rostoucí koncentrací manitolu v médiu byl zaznamenán průkazný pokles v růstu tkáňových kultur celeru.

5.2 Vliv exogenních sacharidů na obsah a složení endogenních sacharidů

Tkáňové kultury použité k určení růstových charakteristik posloužily také ke stanovení obsahu rozpustných nestruturních sacharidů pomocí HPLC (viz kap. 4.4). Bylo

pozorováno mění se zastoupení jednotlivých sacharidů i celkový obsah sacharidů u tkáňových kultur celeru v závislosti na typu a koncentraci sacharidu v médiu. Experiment byl proveden ve třech opakováních. Výsledky jsou prezentovány pro přehlednost ve dvou typech sloupcových grafů, které vyjadřují obsah celkových sacharidů ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny) a zastoupení jednotlivých sacharidů (%). Chybové úsečky vyjadřují směrodatné odchylky hodnot celkových obsahů sacharidů a směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulkách (tab. 5.1, 5.2 a 5.3). Se zvyšující se koncentrací sacharidu v médiu, jak sacharózy, tak i manitolu, se zvyšovalo zastoupení tohoto příslušného cukru ve spektru endogenních sacharidů i obsah celkových sacharidů. U tkáňových kultur pěstovaných na médiích s přidavkem sacharózy jsem pozorovala hromadění sacharidu komigrujícího v systému HPLC se sacharidy rafinóзовé řady. V grafech 2A-F jsou tyto sacharidy vidět pouze nepatrně, jelikož jejich množství bylo na hranici detekce. U téměř všech variant byl ve spektru endogenních sacharidů zaznamenán další neznámý sacharid a u třetího opakování dokonce další neznámé sacharidy dva. Oba tyto sacharidy jsou ovšem minoritní složkou sacharidového spektra, proto v grafech 2E-F nejsou zaznačeny vůbec. U variant rostoucích na zvyšující se koncentraci manitolu v médiu se snižovalo zastoupení sacharózy na celkovém obsahu sacharidů na úkor vysokého zastoupení manitolu (95 % – 97 %), který se naopak nevyskytoval vůbec nebo jen nepatrně u kultur pěstovaných na médiích se sacharózou (grafy 2A-F). Ve spektru sacharidů kultur pěstovaných na médiu s manitolem nebyly téměř detekovány hexózy. Tkáňové kultury rostoucí na médiu s přidavkem sacharózy i manitolu akumulovaly vyšší podíl manitolu (~ 50 %) než sacharózy.

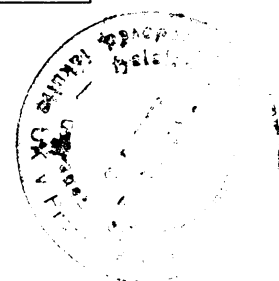




Grafy 2A-F: Obsah a složení endogenních sacharidů u tkáňových kultur celeru v závislosti na různé koncentraci a typu sacharidu v MS médiu. A, B – 1. opakování, doba kultivace: 14 dní, n = 15; C, D – 2. opakování, doba kultivace: 13 dní, n = 7; E, F – 3. opakování, doba kultivace: 14 dní, n = 7; úsečky znázorňují směrodatné odchylky hodnot celkových sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulkách 5.1, 5.2 a 5.3.

Tabulka 5.1: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 2A (1. opakování).

	“RFO“	sacharóza	glukóza	??	fruktóza	manitol
3S	0,00	26,81	20,91	2,49	28,09	1,30
5S	0,92	36,97	15,18	1,78	14,78	0,70
7S	0,64	66,06	26,62	3,19	26,65	3,34
3M	0,00	10,11	6,21	5,55	8,20	30,37
5M	0,00	3,26	0,30	0,93	3,81	27,55
7M	0,00	3,76	0,11	0,14	0,32	44,93
1,5S+1,5M	0,00	4,42	0,00	0,00	0,00	37,43



Tabulka 5.2: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 2C (2. opakování).

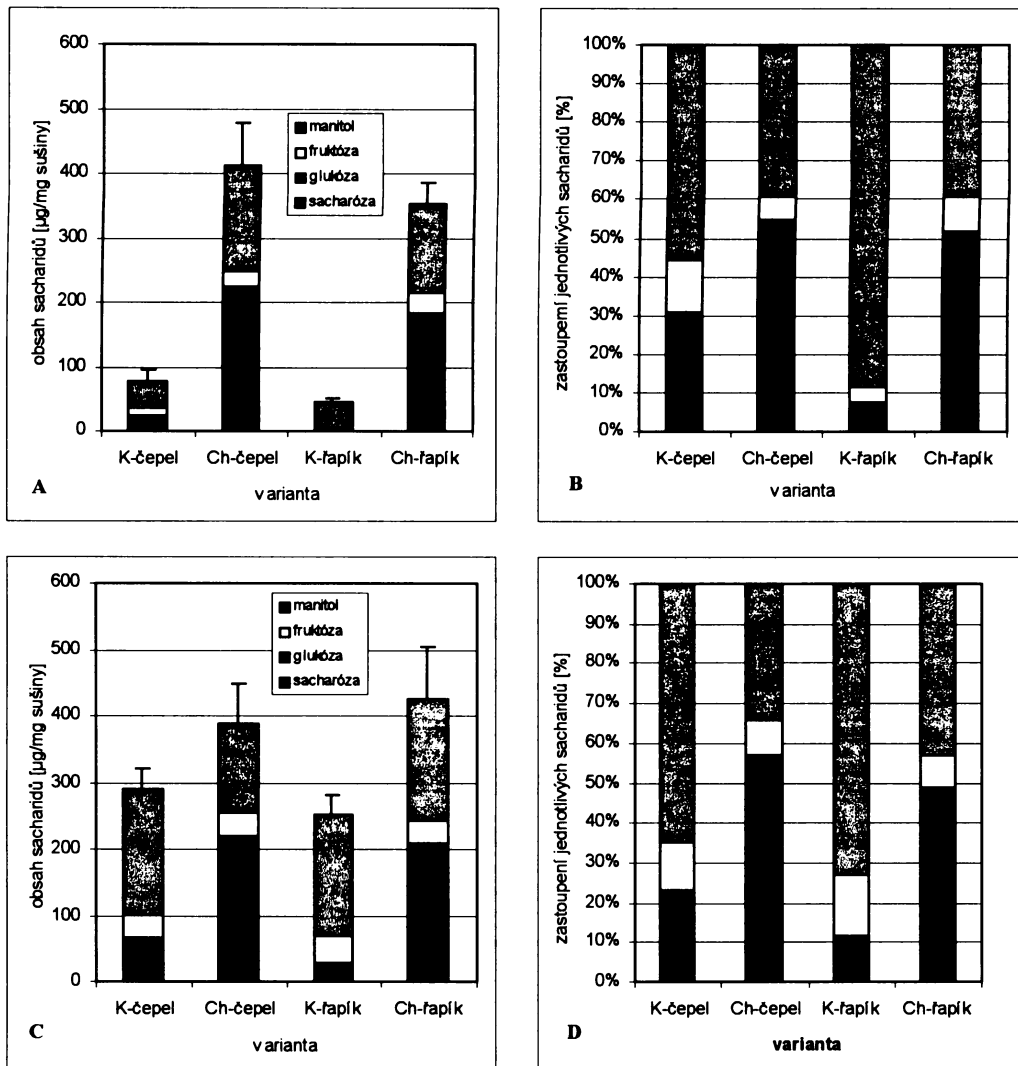
	“RFO“	sacharóza	glukóza	??	fruktóza	manitol	inositol
3S	0,00	18,12	10,25	1,71	12,42	0,00	1,37
5S	0,00	38,05	29,78	2,27	28,28	0,00	2,33
7S	1,08	61,99	21,69	10,56	17,52	0,00	0,89
3M	0,00	2,83	1,15	0,89	1,26	12,42	0,00
5M	0,00	1,52	0,66	0,23	0,71	120,58	0,00
7M	0,00	1,70	0,00	0,00	0,79	33,42	0,00
1,5S+1,5M	0,00	13,91	8,19	6,56	13,54	40,78	0,00

Tabulka 5.3: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 2E (3. opakování).

	“RFO“	sacharóza	glukóza	fruktóza	manitol	inositol
3S	0,11	16,33	7,94	9,65	1,74	1,91
5S	0,52	60,00	19,12	40,22	1,71	1,25
7S	1,20	183,9	50,96	60,08	2,94	2,26
3M	0,00	3,78	0,36	2,24	30,55	0,00
5M	0,00	0,96	0,38	0,90	48,29	0,00
7M	0,00	0,86	0,27	0,35	34,65	0,00
1,5S+1,5M	0,00	2,65	0,85	156,21	24,61	0,00

5.3 Vliv nízkých teplot na obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru

Tkáňové kultury celeru odvozené z čepele i z řapíku byly po dobu 14-ti dnů vystaveny teplotě 4°C z důvodu sledování změn v obsahu a složení endogenních sacharidů vyvolaných chladovým stresem. Kultury byly pěstovány na standardním udržovacím MS médiu, které obsahovalo jak sacharózu, tak i manitol, oba sacharidy v 1,5 % koncentraci (viz kap. 4.2.2). Tento experiment byl proveden ve dvou opakováních. U obou opakování jsem pozorovala navýšení obsahu celkových sacharidů, a to u kultur odvozených jak z čepele, tak i z řapíku. Dále u obou typů tkáňových kultur docházelo k navýšení obsahu sacharózy na úkor manitolu a částečně i fruktózy eventuálně glukózy. (grafy 3 A-D). Toto pozorování neplatí pro tkáňové kultury odvozené z řapíku u prvního opakování (grafy 3A-B), kde jsem zaznamenala nárůst hexózy po chladovém působení. Tkáňové kultury odvozené z řapíku akumulovaly za kontrolních podmínek více manitolu na úkor sacharózy a hexózy oproti kulturám odvozeným z čepele. Kultury odvozené z čepele reagovaly na chladové působení vyšším zastoupením sacharózy na celkových sacharidech ve srovnání s kulturami odvozenými z řapíku.



Grafy 3A-D: Obsah a složení endogenních sacharidů u tkáňových kultur celeru vystavených chladu. A, B – 1. opakování, doba kultivace: 14 dní, n = 7; C, D – 2. opakování, doba kultivace: 14 dní, n = 7; K-čepel... kontrola tkáňové kultury odvozené z čepel, Ch-čepel... tkáňové kultury odvozené z čepel vystavené 4°C, K-řapík... kontrola tkáňové kultury odvozené z řapíku, Ch-řapík... tkáňové kultury odvozené z řapíku vystavené 4°C; úsečky znázorňují směrodatné odchylky hodnot celkových sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulkách 5.4 a 5.5.

Tabulka 5.4: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 3A (1. opakování).

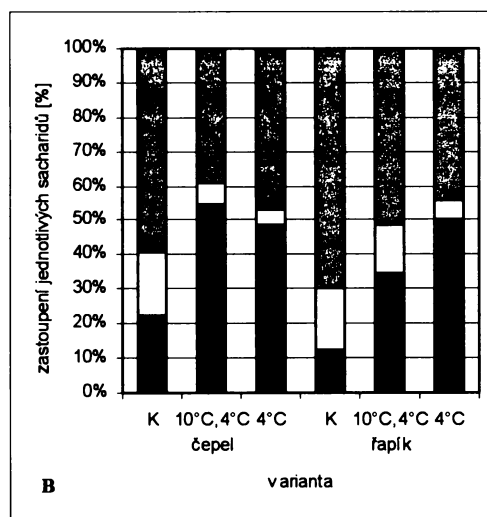
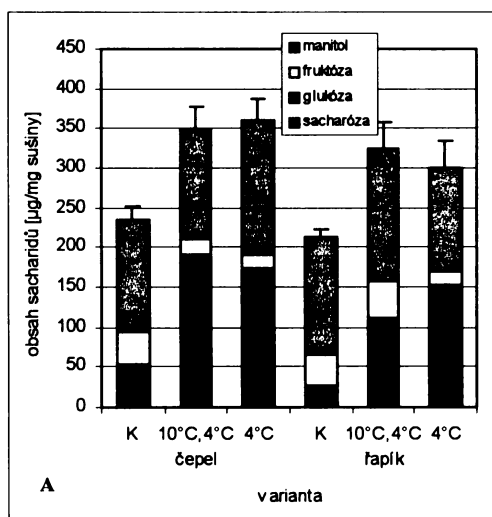
	sacharóza	glukóza	fruktóza	manitol
K-čepel	2,50	0,64	3,67	16,56
Ch-čepel	25,49	5,47	7,67	52,68
K-řapík	2,37	0,63	0,94	4,61
Ch-řapík	43,91	13,14	12,56	29,19

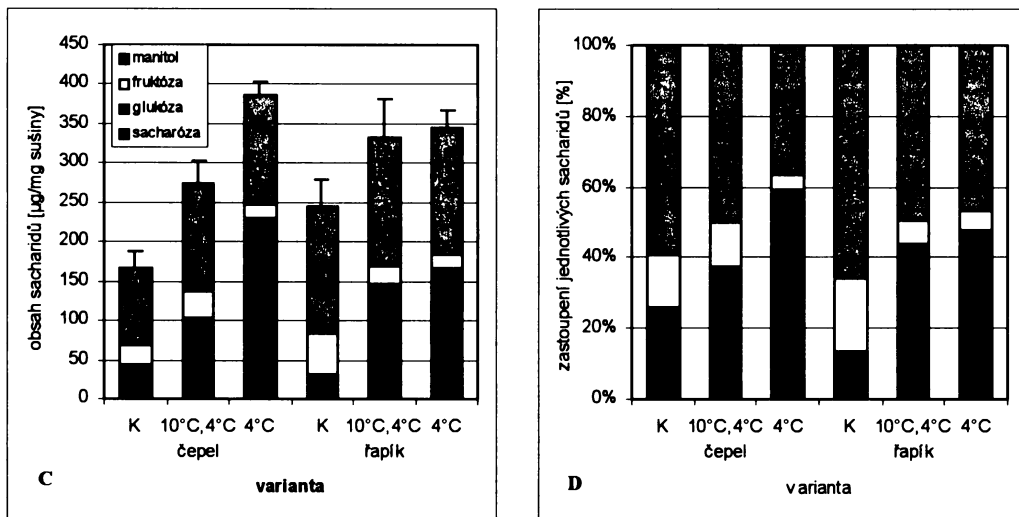
Tabulka 5.5: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 3C (2. opakování).

	sacharóza	glukóza	fruktóza	manitol
K-čepel	5,50	2,66	14,98	25,24
Ch-čepel	36,48	3,20	4,74	27,14
K-řapík	3,38	9,06	16,00	19,83
Ch-řapík	30,65	8,88	9,78	46,44

5.4 Obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru vystavených 10°C a poté 4°C (chladová aklimace)

Tento experiment byl proveden také ve dvou opakováních. Část kultur byla nejprve po dobu 10-ti dnů kultivována při 10°C a poté přenesena do kultivační místnosti se 4°C, kde byla uložena po dobu 4 dnů. Pro přehlednost budu tyto kultury nazývat 'aklimatizované'. Další varianty byly tkáňové kultury kultivované po celou dobu experimentu ve 4°C a kultury kontrolní, kultivované za normálních podmínek, to znamená při teplotě 25°C ± 2°C. Tento experiment byl proveden ve tmě. Cílem tohoto experimentu bylo sledovat, jak se mění obsah a spektrum endogenních sacharidů u tkáňových kultur celeru vystavených chladové aklimaci. Obsah celkových sacharidů byl nejvyšší u tkáňových kultur vystavených 4°C nebo byl srovnatelný s obsahem sacharidů kultur 'aklimatizovaných' (grafy 4A-D). S rostoucím chladovým působením stoupalo zastoupení sacharózy na celkových sacharidech u obou typů tkáňových kultur. Výjimku tvoří pouze tkáňové kultury odvozené z čepelů u prvního opakování, kde je hladina sacharózy o něco nižší než u kultur 'aklimatizovaných' (grafy 4A-B).





Grafy 4A-D: Obsah a složení endogenních sacharidů u tkáňových kultur celeru vystavených různým chladovým podmínkám. A, B – 1. opakování, doba kultivace: 14 dní, n = 7; C, D – 2. opakování, doba kultivace: 14 dní, n = 7; K... kontrola tkáňové kultury (čepel nebo řapík), 10°C, 4°C... tkáňové kultury (čepel nebo řapík) vystavené po dobu 10-ti dnů 10°C a po dobu 4 dnů 4°C, 4°C... tkáňové kultury (čepel nebo řapík) vystavené po dobu 14-ti dnů 4°C; úsečky znázorňují směrodatné odchylky hodnot celkových sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulkách 5.6 a 5.7.

Tabulka 5.6: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 4A (1. opakování).

	sacharóza	glukóza	fruktóza	manitol
K-čepel	7,04	3,42	12,65	5,93
10°C,4°C-čepel	41,61	4,40	5,38	17,24
4°C-čepel	17,51	1,84	6,98	19,22
K-řapík	2,22	2,72	1,97	11,15
10°C,4°C-řapík	37,5	11,64	11,62	27,97
4°C-řapík	9,03	2,86	5,49	19,15

Tabulka 5.7: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 4C (2. opakování).

	sacharóza	glukóza	fruktóza	??	manitol
K-čepel	9,27	2,71	8,67	0,44	13,51
10°C,4°C-čepel	11,90	1,05	1,57	0,36	11,12
4°C-čepel	7,82	4,17	4,98	0,28	36,16
K-řapík	12,62	6,46	7,49	0,52	7,75
10°C,4°C-řapík	2,72	6,47	9,53	0,90	18,81
4°C-řapík	20,59	2,58	4,03	0,57	13,74

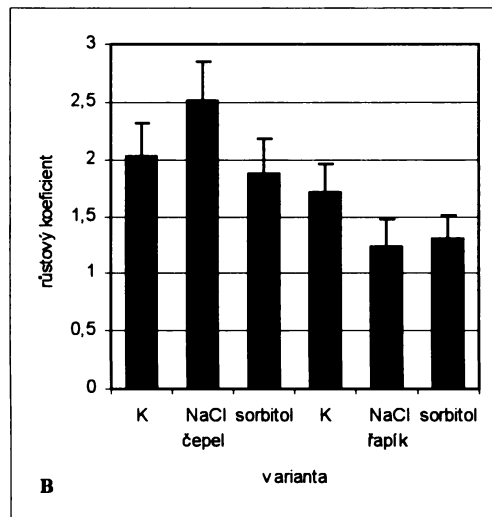
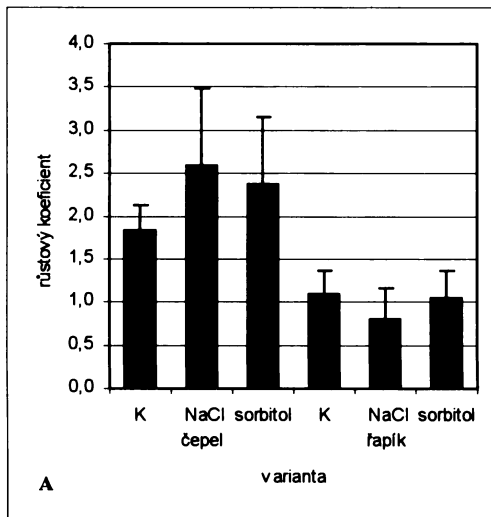
5.5 Vliv zasolení a nízkého osmotického potenciálu média na růst a obsah endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru

V tomto experimentu, který byl proveden ve třech opakováních, jsem testovala vliv zasolení a nízkého osmotického potenciálu na růst a obsah a složení endogenních sacharidů. Zasolení bylo vyvoláno přidavkem NaCl, a to v 50 mM koncentraci a nízký

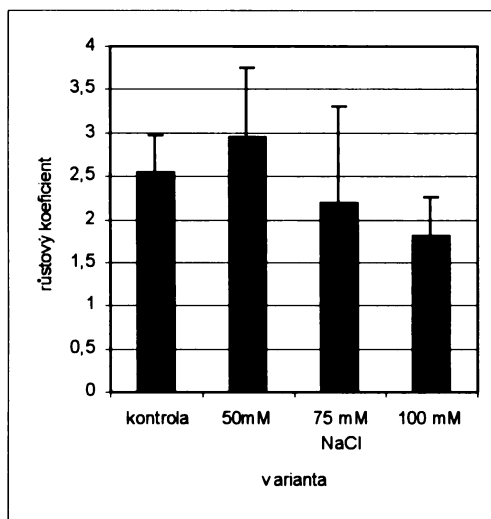
osmotický potenciál média byl indukován aplikací sorbitolu, a to v 2 % koncentraci. Obě tyto sloučeniny ve výše zmíněných koncentracích vyvolávají snížení osmotického potenciálu o $\sim 0,3$ MPa. Jako kontrolní tkáňové kultury sloužily kultury kultivované na médiích s 1,5 % sacharózy a 1,5 % manitolu. Stejně množství těchto sacharidů bylo jako zdroj uhlíku a energie přidáno samozřejmě i do kultur vystavených stresovým podmínkám. U druhého a třetího opakování tohoto experimentu jsem stanovila i růstové charakteristiky obdobně jako v kapitole 5.1. Zajímavé je, že nejlepší růst tkáňových kultur celeru odvozených z čepele jsem zaznamenala v podmínkách zasolení (grafy 5A-B). Co se týká tkáňových kultur odvozených z řapíku, ty rostly nejlépe na médiu kontrolním (graf 5B) u třetího opakování a u druhého opakování nebyly průkazné rozdíly v růstu kultur na médiu udržovacím a na médiu se sorbitolem (grafy 5A-B). Růst těchto kultur na médiu s NaCl byl buďto nejhorší (graf 5A) nebo byl srovnatelný s růstem na médiu se sorbitolem (graf 5B). Orientačně byl kvůli předchozím výsledkům proveden experiment, ve kterém byly tkáňové kultury celeru odvozené z čepele vystaveny různým koncentracím soli, a to 0, 50, 75 a 100 mM NaCl z důvodu sledování růstových charakteristik. Z grafu 6 je možné vidět nejlepší růst kultur na médiu s přísadkou 50 mM NaCl. S dalším zvýšením koncentrace NaCl v médiu docházelo k úměrnému omezení růstu tkáňových kultur.

Tkáňové kultury celeru odvozené z čepele. Nejvyšší zastoupení celkových sacharidů jsem pozorovala u kultur vystavených osmotickému stresu aplikací sorbitolu. U těchto kultur se ve spektru sacharidů vyskytoval sorbitol přijímaný z média, a to ve velkém množství ~ 40 - 45 % podílu na celkových sacharidech na úkor manitolu, hexózu a sacharózy (grafy 7A-F).

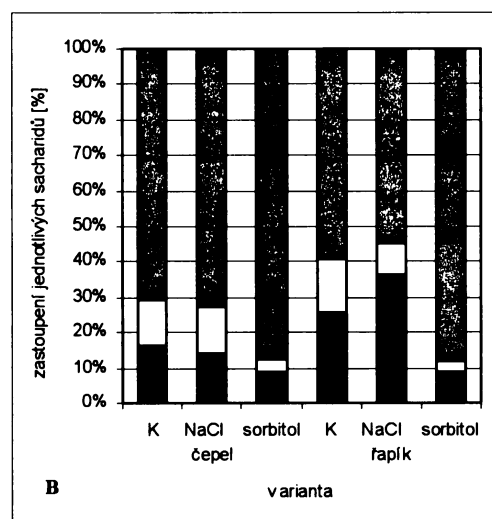
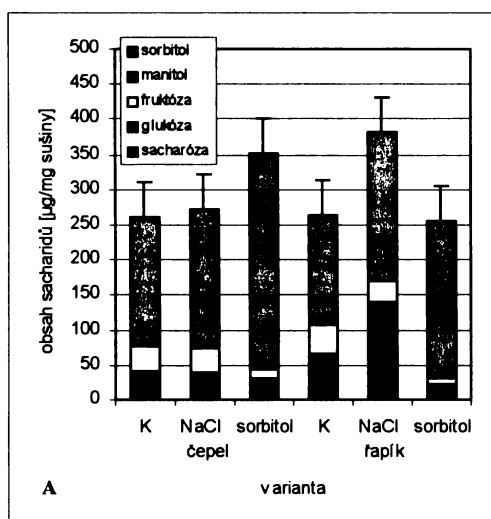
Tkáňové kultury celeru odvozené z řapíku. Chování těchto kultur bylo značně heterogenní. U prvního opakování bylo nejvyšší zastoupení celkových sacharidů u kultur vystavených zasolení, u druhého opakování u kultur kontrolních respektive rostoucích na sorbitolu a u třetího opakování u kultur pěstovaných na médiu s přísadkou sorbitolu. Ale co se týká profilu sacharidů byl velmi podobný profilu tkáňových kultur celeru odvozených z čepele. Taktéž u kultur vystavených sorbitolu docházelo ke snížení obsahu hexózu, sacharózy a manitolu na úkor akumulace sorbitolu (grafy 7A-F).

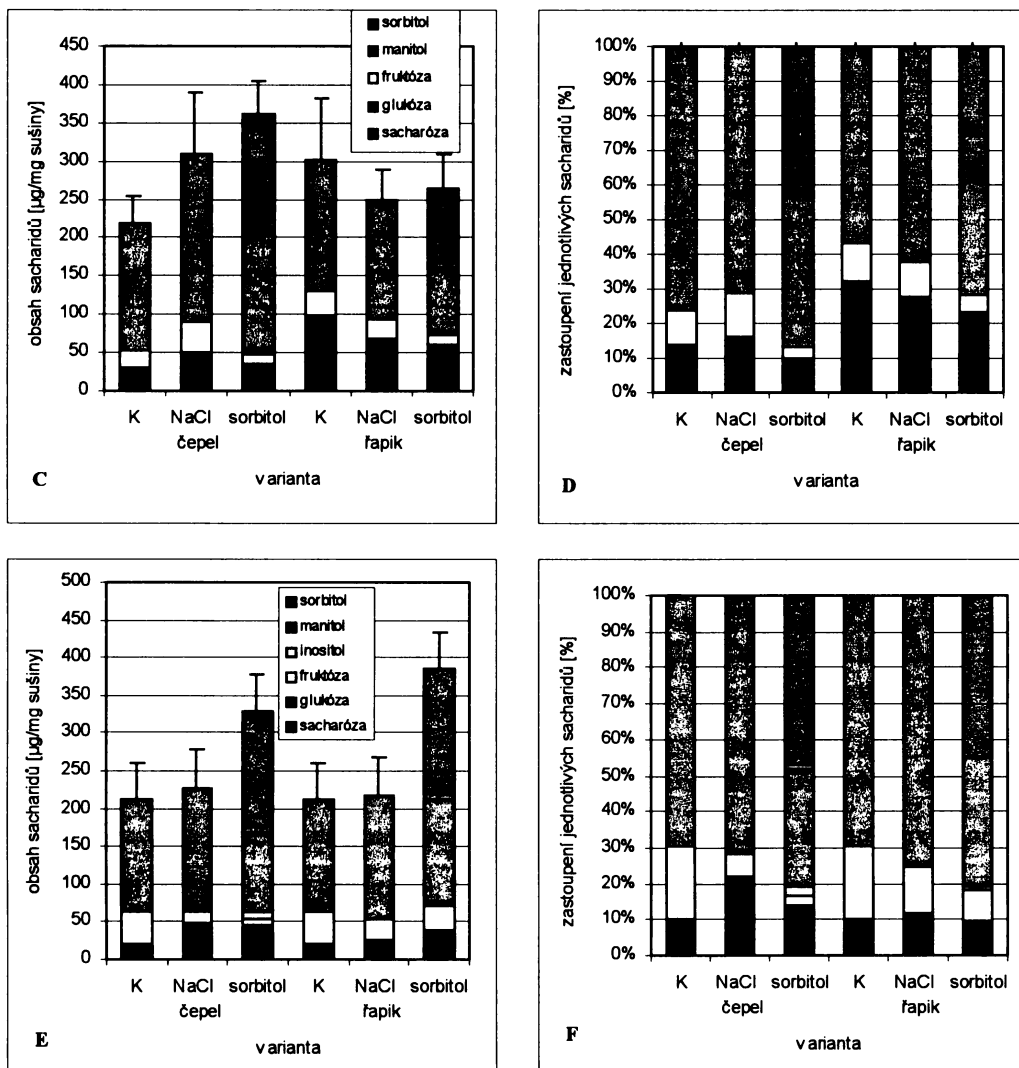


Grafy 5A-B: Růst tkáňových kultur celeru vystavených zasolení a nízkému osmotickému potenciálu média. A - 2. opakování; B - 3. opakování. Doba kultivace: 13 dní, n = 7, úsečky znázorňují směrodatné odchylky.



Graf 6: Růst tkáňových kultur celeru odvozených z čepel v závislosti na různé koncentraci NaCl. Doba kultivace: 14 dní, n = 7, úsečky znázorňují směrodatné odchylky.





Grafy 7A-F: Obsah a složení endogenních sacharidů u tkáňových kultur celeru vystavených zasolení a nízkému osmotickému potenciálu média. A, B – 1. opakování, doba kultivace: 14 dní, n = 7; C, D – 2. opakování, doba kultivace: 13 dní, n = 7; E, F – 3. opakování, doba kultivace: 13 dní, n = 7; K...kontrola tkáňové kultury (čepel nebo řapík), NaCl... tkáňová kultura (čepel nebo řapík) vystavená 50 mM NaCl, sorbitol... tkáňová kultura (čepel nebo řapík) vytavená nízkému osmotickému potenciálu vyvolaného přidavkem sorbitolu do média; úsečky znázorňují směrodatné odchylky hodnot celkových sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulkách 5.8, 5.9 a 5.10.

Tabulka 5.8: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 7A (1. opakování)

	sacharóza	glukóza	fruktóza	manitol	sorbitol
K-čepel	5,51	5,72	15,27	32,69	0,00
NaCl-čepel	7,45	3,57	17,27	30,11	0,00
sorbitol-čepel	9,12	1,14	5,78	29,87	22,36
K-řapík	3,10	45,05	12,93	26,44	0,00
NaCl-řapík	8,78	3,56	4,54	16,80	0,00
sorbitol-řapík	4,30	2,05	2,00	10,39	23,32

Tabulka 5.9: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 7C (2. opakování).

	sacharóza	glukóza	fruktóza	manitol	sorbitol
K-čepel	1,46	2,28	7,79	30,03	0,00
NaCl-čepel	12,11	6,64	16,48	47,16	0,00
sorbitol-čepel	11,59	1,24	5,61	13,57	34,60
K-řapík	19,25	11,12	12,56	49,22	0,00
NaCl-řapík	24,43	8,85	8,09	27,94	0,00
sorbitol-řapík	9,00	3,52	3,31	12,77	21,56

Tabulka 5.10: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 7E (3. opakování).

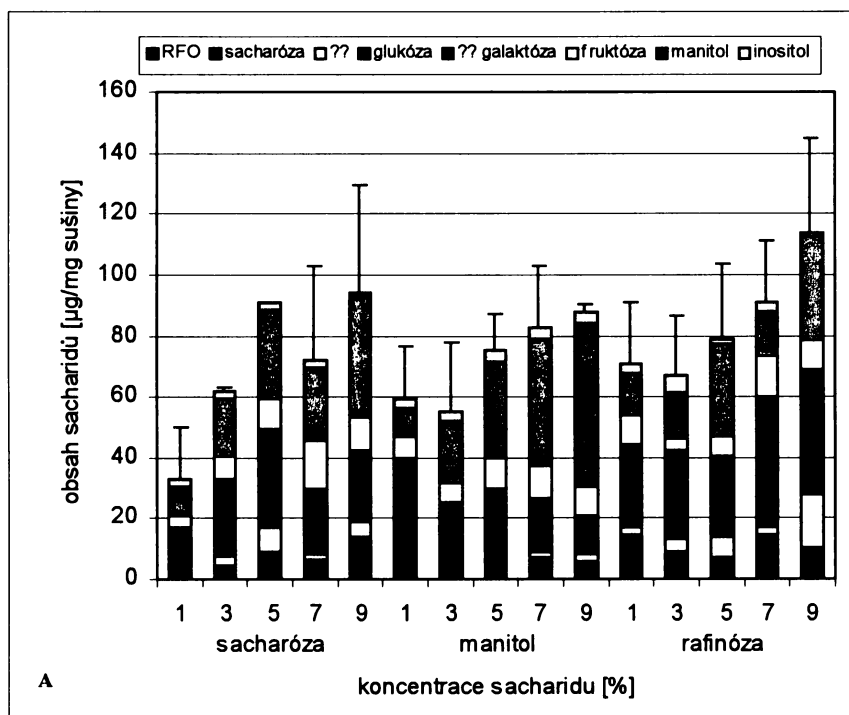
	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	manitol	sorbitol
K-čepel	1,49	4,01	10,71	0,57	35,63	0,00
NaCl-čepel	14,40	1,33	3,83	1,89	14,84	0,00
sorbitol-čepel	19,13	2,94	3,79	9,14	58,56	10,47
K-řapík	1,49	4,01	10,71	0,57	35,63	0,00
NaCl-řapík	2,32	8,83	7,39	1,31	21,91	0,00
sorbitol-řapík	6,72	7,86	9,04	2,11	6,20	13,28

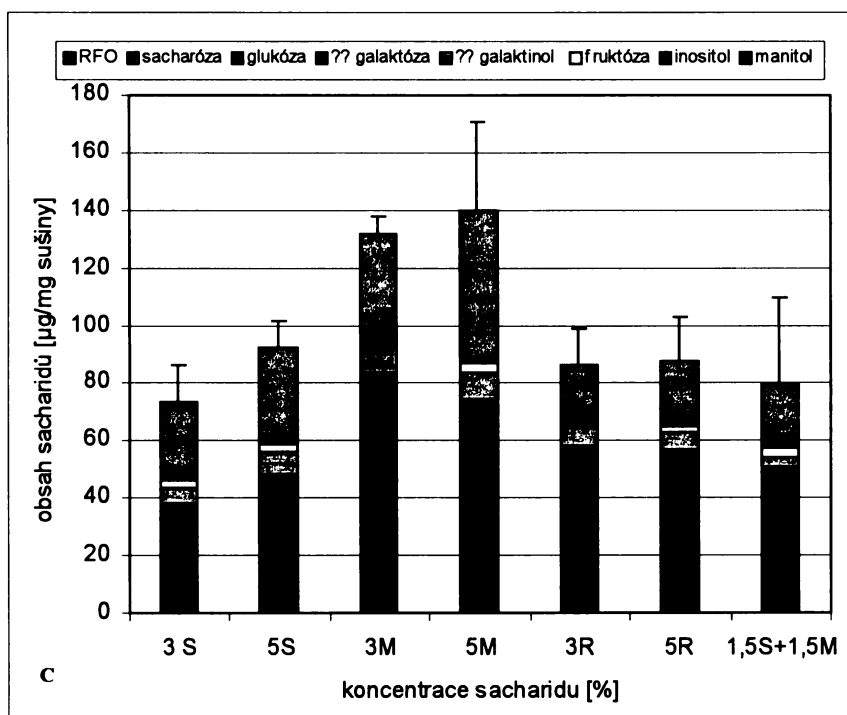
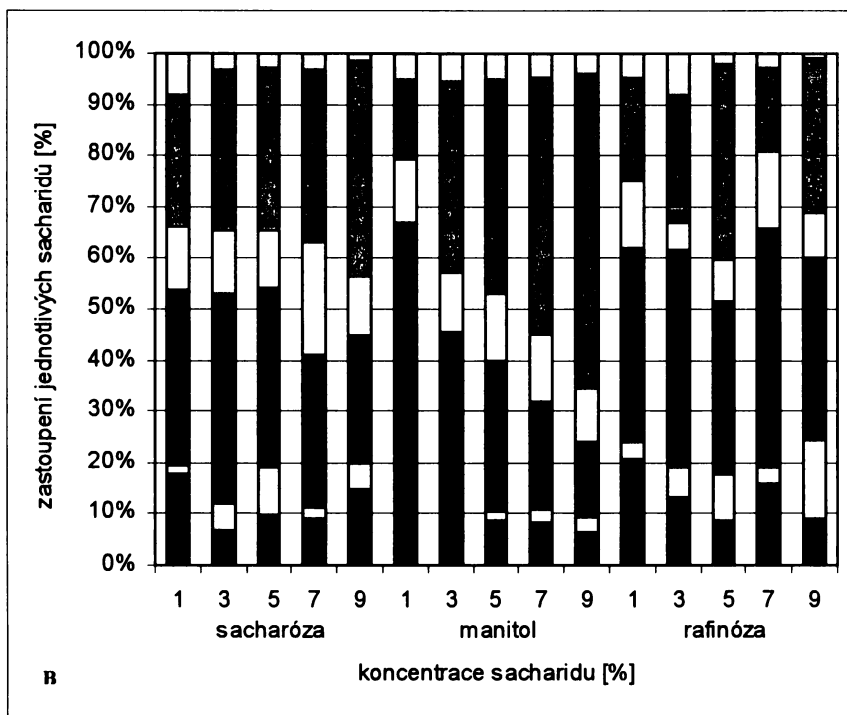
KULTURY OLIV

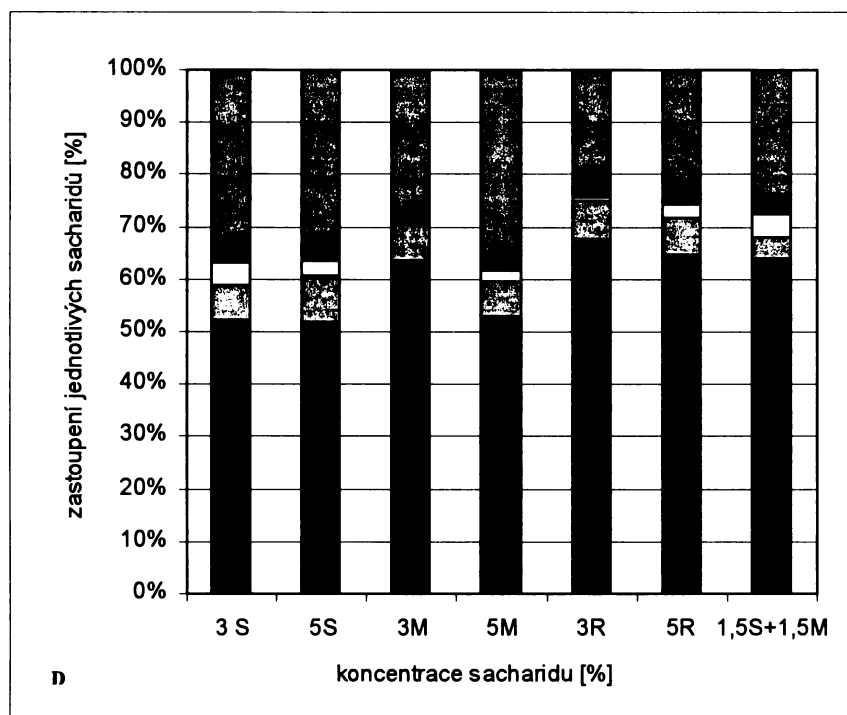
5.6 Vliv exogenních sacharidů na růst a obsah endogenních sacharidů u kultur oliv

Testovala jsem vliv různé koncentrace sacharidu v médiu na růst kultur oliv a obsah a složení jejich endogenních sacharidů. V prvním opakování byly kultury oliv vystaveny 1, 3, 5, 7 a 9 % koncentraci exogenního sacharidu, a to sacharózy, manitolu nebo rafinózy po dobu přibližně tří měsíců. Jako médium standardní udržovací jsem použila médium s 3 % sacharózou. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda rafinóza může být vhodným zdrojem uhlíku a energie pro růst kultur oliv *in vitro*. V grafu 8A chybí směrodatná odchylka pro variantu pěstovanou na 5 % sacharóze z důvodu její téměř úplné kontaminace a sloupec tudíž není průměrná hodnota několika vzorků, ale jedná se pouze o vzorek jeden. Ve druhém opakování tohoto experimentu byly stonkové segmenty oliv vystaveny pouze dvěma různými koncentracím exogenního sacharidu, a to 3 a 5 % sacharóze, manitolu nebo rafinóze a jako standardní udržovací médium jsem použila médium s 1,5 % sacharózou a 1,5 % manitolem. Důvodem použití pouze dvou koncentrací sacharidů byl špatný růst kultur oliv na příliš vysokých (nízký osmotický potenciál) či příliš nízkých (nedostatečný zdroj uhlíku a energie) koncentracích sacharidů a také nedostatek rostlinného materiálu. U prvního opakování jsem ve většině případů zaznamenala nárůst obsahu celkových sacharidů se zvyšující se koncentrací sacharidu v médiu, sacharózy, manitolu i rafinózy. U druhého opakování došlo k nárůstu celkových sacharidů pouze u kultur oliv pěstovaných na médiu s rostoucí

koncentrací sacharózy. Rozdíly mezi obsahy celkových sacharidů kultur oliv rostoucích na médiu s přídavkem manitolu či rafinózy nebyly průkazné. S rostoucí koncentrací sacharózy a manitolu v médiu se u prvního opakování zvyšovalo zastoupení manitolu na celkových sacharidech. Nejvíce manitolu se akumulovalo u kultur kultivovaných na médiu s přídavkem manitolu, nejvíce to byl ~ 75 % podíl na celkových sacharidech u kultur pěstovaných na médiu s 9 % manitolem. Zastoupení manitolu u kultur pěstovaných na médiu s rafinózou bylo největší při 5 % koncentraci tohoto sacharidu a u kultur pěstovaných na sacharóze při 9 % koncentraci tohoto sacharidu. Směrodatné odchylky u tohoto opakování jsou tak výrazné proto, že kultury oliv se vyznačovaly značným heterogenním růstem (grafy 8A-B). U druhého opakování se nejvíce manitolu akumulovalo také u kultur pěstovaných na médiu s přídavkem manitolu, a to ~ 48 % podíl na celkových sacharidech u kultur rostoucích na médiu s přídavkem 5 % manitolu. U prvního opakování jsem ve spektru endogenních sacharidů zaznamenala dva neznámé sacharidy, ale v grafech je zaznačen pouze jeden, jelikož druhý, který byl nalezen pouze u kultur pěstovaných na médiu s 3 % rafinózou, byl na hranici detekce. Ve spektru endogenních sacharidů jsem dále zaznamenala sacharidy, které komigrují v systému HPLC s galaktózou respektive galaktinolem.







Grafy 8A-D: Obsah a složení endogenních sacharidů u kultur oliv v závislosti na typu a koncentraci exogenního sacharidu. A, B – 1. opakování, doba kultivace: 97 dní, n = 6; C, D – 2. opakování, doba kultivace: 85 dní, n = 7; S...sacharóza, M...manitol, R...rafinóza, úsečky znázorňují směrodatné odchylky hodnot celkových sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulkách 5.11 a 5.12.

Tabulka 5.11: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 8A (1. opakování). S – sacharóza, M – manitol, R – rafinóza, RFO – sacharidy rafinózové řady, ??galaktóza – sacharid komigrující v systému HPLC s galaktózou.

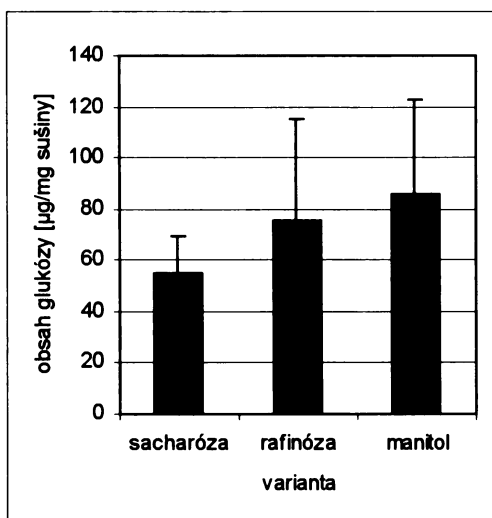
	RFO	sacharóza	??	glukóza	??galaktóza	fruktóza	manitol	inositol
1S	1,69	2,96	0,49	1,55	1,11	3,39	5,77	1,47
3S	0,00	0,40	0,45	0,99	4,15	6,47	7,19	0,28
5S	-	-	-	-	-	-	-	-
7S	0,16	0,81	1,43	7,71	2,36	5,63	12,70	1,93
9S	0,53	6,07	2,58	5,56	4,20	3,52	17,23	0,41
1M	1,31	1,24	0,40	13,19	1,63	1,70	2,06	0,60
3M	1,77	3,27	0,52	8,45	3,85	5,62	5,09	1,09
5M	0,80	2,02	0,43	1,86	0,81	0,74	5,65	1,46
7M	0,40	1,91	0,77	3,19	2,80	1,95	13,48	1,11
9M	0,65	2,07	0,55	0,36	1,54	1,24	3,99	0,18
1R	2,06	1,77	2,18	9,84	1,48	4,05	5,05	0,66
3R	0,91	1,14	2,54	7,37	9,81	2,86	0,67	1,94
5R	1,78	2,53	4,90	9,62	7,46	3,48	7,88	0,47
7R	2,04	2,44	3,32	16,43	3,50	7,93	4,16	0,19
9R	2,10	1,45	6,40	5,35	4,88	3,88	10,67	0,72

Tabulka 5.12: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 8C (2. opakování). S – sacharóza, M – manitol, R – rafinóza, RFO – sacharidy rafinózové řady, sachar – sacharóza, glu – glukóza, ??galak – sacharid komigrující v systému HPLC s galaktózou, ??galol – sacharid komigrující v systému HPLC s galaktinolem, fru – fruktóza, inos – inositol a manit – manitol.

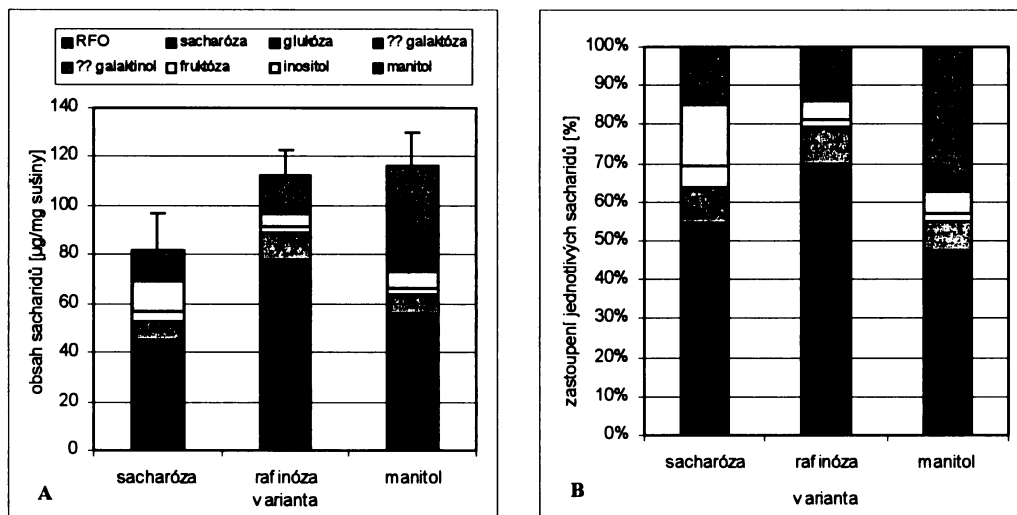
	RFO	sachar	glu	?? galak	?? galol	fru	inos	manit
3S	1,05	3,88	15,59	0,85	2,47	0,82	0,43	9,25
5S	1,75	4,61	10,42	2,20	5,94	1,85	1,13	3,13
3M	1,89	1,44	5,76	0,42	1,77	0,66	1,06	0,88
5M	1,12	0,93	22,62	4,01	4,31	3,24	1,72	4,81
3R	3,52	2,85	11,33	1,31	1,25	0,52	0,74	6,15
5R	1,15	1,34	12,01	1,97	2,06	1,27	1,46	5,22
1,5S+1,5M	1,77	2,29	23,74	3,95	1,37	0,80	1,31	2,27

5.7 Vliv exogenního sacharidu na akumulaci škrobu u kultur oliv

Kultury oliv byly po dobu 42 dnů pěstovány na médiích s různými sacharidy. Testovala jsem vliv 3 % exogenního sacharidu, a to sacharózy, manitolu respektive rafinózy, na obsah škrobu a rozpustných sacharidů. Kultury oliv rostoucí na médiu s přidavkem manitolu respektive rafinózy vykazovaly srovnatelnou akumulaci škrobu, která byla vyšší než u kultur pěstovaných na médiu s přidavkem sacharózy (graf 9). Nejvyšší obsah rozpustných sacharidů jsem stanovila u kultur oliv rostoucích na médiu s přidavkem manitolu i rafinózy (grafy 10A-B), naopak k nejnižší akumulaci sacharidů došlo u kultur oliv pěstovaných na médiu s přidavkem sacharózy. U kultur oliv rostoucích na médiu s přidavkem manitolu jsem zaznamenala také nejnižší zastoupení sacharózy, glukózy a fruktózy na celkových rozpustných sacharidech.



Graf 9: Obsah škrobu u kultur oliv v závislosti na typu exogenního sacharidu. Doba kultivace: 42 dnů; n = 12.



Grafy 10A-B: Obsah a složení endogenních sacharidů u kultur oliv v závislosti na typu exogenního sacharidu. Doba kultivace: 42 dní, n = 12, ?? galaktóza respektive ?? galaktinol... sacharidy komigrují v systému HPLC s galaktózou respektive galaktinolem, úsečky znázorňují směrodatné odchylky. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulce 5.13.

Tabulka 5.13: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 10A (1. opakování). S – sacharóza, R – rafinóza, M - manitol, RFO – sacharidy rafinózové řady, sachar – sacharóza, glu – glukóza, fru – fruktóza, inosit – inositol, manit – manitol a ??galak a ??galol vysvětleno v grafu 10A-B.

	RFO	sachar	glu	??galak	??galol	fru	inosit	manit
S	0,75	2,37	12,08	1,54	3,07	1,02	1,76	2,67
R	0,94	0,86	8,97	2,35	1,90	3,17	4,07	2,03
M	0,78	0,88	13,89	1,40	1,78	1,49	2,29	4,02

5.8 Vliv nízkého osmotického potenciálu na obsah a složení endogenních sacharidů kultur oliv

Kultury oliv byly po dobu přibližně tří měsíců vystaveny nízkému osmotickému potenciálu, který byl vyvolán buďto polyetylglykolem (PEG) anebo sorbitolem přidaným do média. Obě tyto sloučeniny byly aplikovány v takové koncentraci, která vyvolávala snížení osmotického potenciálu o ~ 0,3 MPa (viz kapitola 4.6). Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda kultury oliv reagují odlišně na osmotický stres vyvolaný penetrujícím osmotikem oproti nepenetrujícímu. Tento experiment byl proveden ve dvou opakováních, která byla částečně pozměněna, a to tak, že zpevňující složka média, agar, použitá u prvního opakování byla u druhého opakování nahrazena fytagelem. Důvodem této modifikace byla špatná pevnost prvního média, což vedlo k tomu, že olivy nemohly být v médiu upevněny tak, jak by měly. Jako největší stres se pro kultury oliv jevil polyetylglykol, v jehož přítomnosti byly nejvíce zhnědlé a nejmenší.

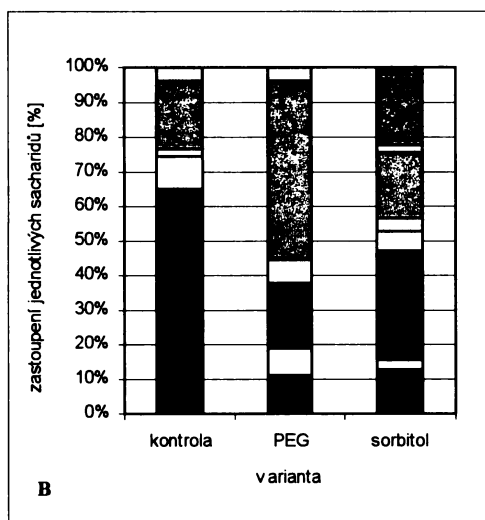
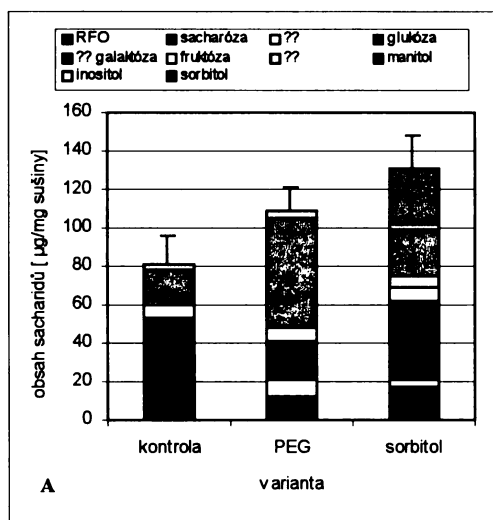


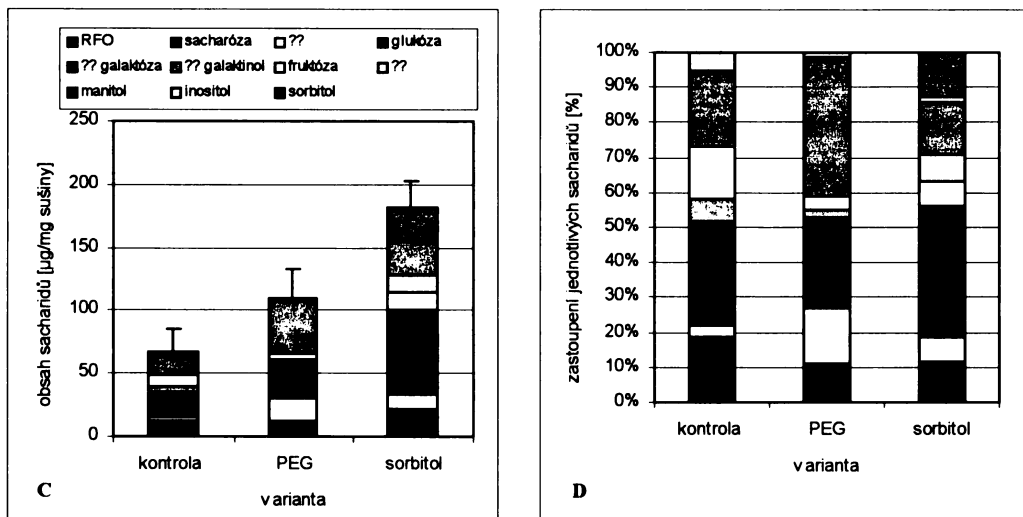
Obr. 5.2: Kultury oliv *in vitro* vystavené PEGu.



Obr. 5.3: Kultury oliv *in vitro* vystavené sorbitolu.

Nejvyšší zastoupení celkových sacharidů jsem pozorovala u stonkových segmentů oliv rostoucích na médiu s přidavkem sorbitolu. U těchto kultur se ve spektru endogenních sacharidů objevovalo značné množství sorbitolu, který byl přijímán z média. Nejvyšší zastoupení manitolu na celkových sacharidech jsem stanovila u kultur pěstovaných na médiu s přidavkem polyetylenglykolu, kde se hromadil na úkor sacharózy a hexózu. U obou variant vystavených osmotickému stresu jsem zaznamenala pokles v zastoupení RFO (grafy 11A-D). Ve spektru endogenních sacharidů byly dále detekovány dva neznámé sacharidy a sacharidy komigrující v systému HPLC s galaktózou respektive galaktinolem.





Grafy 11A-D: Obsah a složení endogenních sacharidů u kultur oliv vystavených nízkému osmotickému potenciálu média. A, B – 1. opakování, doba kultivace: 97 dní, $n_{kontrola} = 15$, $n_{sorbitol} = 15$, $n_{PEG} = 6$; C, D – 2. opakování, doba kultivace: 93 dní, $n = 8$; kontrola... kultury oliv na standardním udržovacím médiu, PEG... kultury oliv vystavené polyetylenglykolu, sorbitol... kultury oliv vystavené sorbitolu; ?? galaktóza respektive ?? galaktinol... sacharidy komigrující v systému HPLC s galaktózou respektive galaktinolem, úsečky znázorňují směrodatné odchylky hodnot celkových sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulkách 5.14 a 5.15.

Tabulka 5.14: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 11A (1. opakování). K – kontrolní kultury oliv, PEG – kultury oliv vystavené polyetylenglykolu, sorbitol – kultury oliv vystavené sorbitolu; RFO – sacharidy rafinóзовé řady, ??galak – sacharidy komigrující v systému HPLC s galaktózou, manit – manitol, inosit – inositol, sorb – sorbitol.

	RFO	sacharóza	??	glukóza	??galak	fruktóza	??	manit	inosit	sorb
K	1,20	1,63	0,50	10,89	1,98	2,03	0,55	5,87	0,74	0,00
PEG	1,26	1,23	6,23	4,62	2,88	4,16	1,09	4,08	1,83	0,00
sorb	2,02	2,29	3,29	6,05	7,29	2,47	2,14	3,74	0,86	11,13

Tabulka 5.15: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 11C (2. opakování)., K – kontrola, RFO – sacharidy rafinóзовé řady, sachar – sacharóza, glu – glukóza, fru – fruktóza, manit – manitol, inosit – inositol, sorb - sorbitol a ??galak a ??galol vysvětleno v grafu 11A-D.

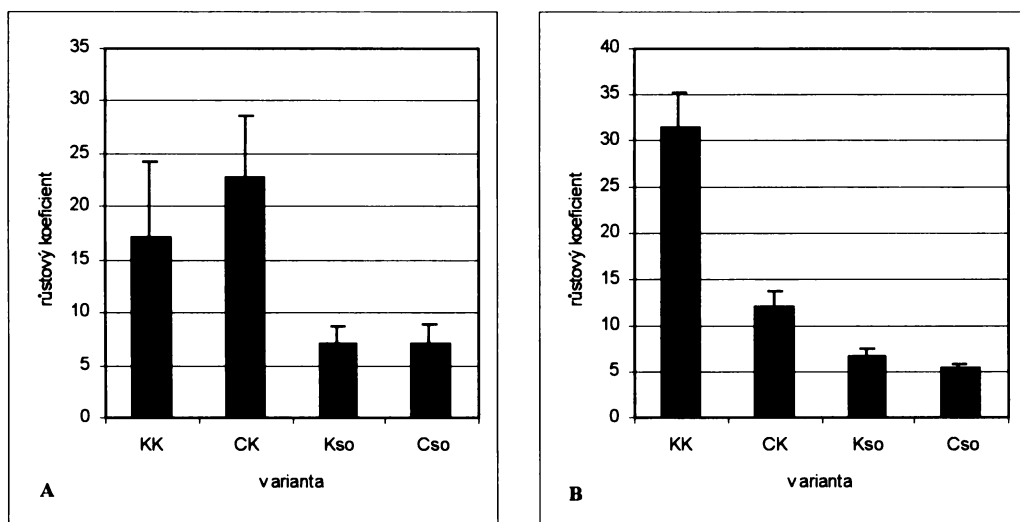
	RFO	sacha	??	glu	??galak	??	fru	??galol	manit	inosit	sorb
K	1,36	2,85	4,66	3,81	4,41	5,04	3,62	0,20	11,13	1,36	0,00
PEG	1,74	0,88	2,71	4,67	4,05	1,63	1,37	0,27	10,34	0,40	0,00
sorb	2,13	2,93	3,35	10,05	9,92	0,00	2,75	4,69	7,74	0,58	14,28

TKÁŇOVÉ KULTURY TABÁKU

5.9 Vliv osmotického stresu na růst a obsah endogenních sacharidů tkáňových kultur tabáku kontrolních a transformovaných genem *Spcdc25*

Z experimentů Mgr. Petry Maškové vyplývá, že tkáňové kultury tabáku transformované genem *cdc25* ze *S. pombe* vykazují určité změny v rozdělení rozpustných sacharidů. A

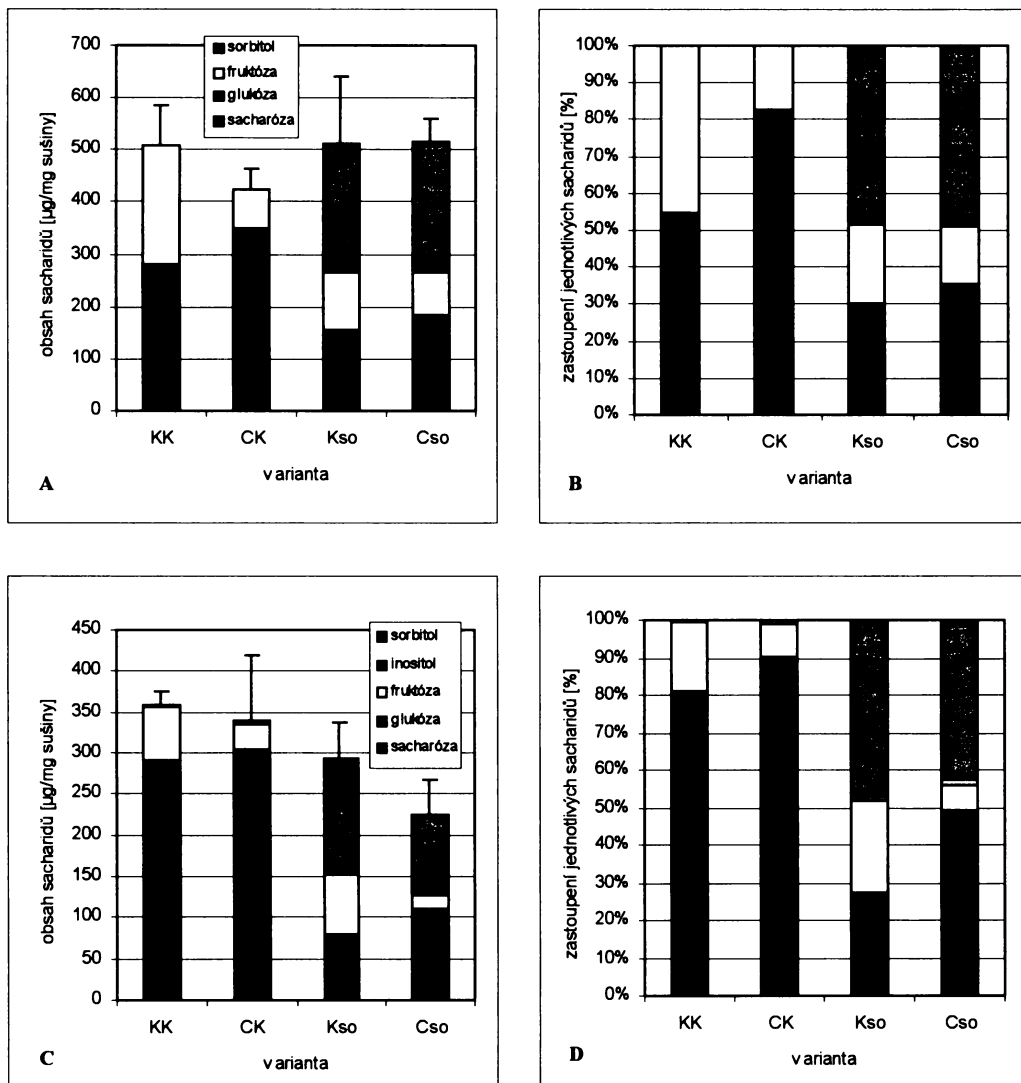
právě tyto změny by mohly mít pozitivní vliv na překonání osmotického stresu. Proto byly kontrolní a transformované tkáňové kultury tabáku vystaveny osmotickému stresu aplikací 2 % sorbitolu do udržovacího média. Po 21 dnech jsem sledovala růstové charakteristiky (obdobně jako u tkáňových kultur celeru) a obsah a složení endogenních sacharidů. Nejlepší růst byl u prvního opakování zaznamenán u kultur transformovaných pěstovaných na udržovacím médiu a u druhého opakování u kultur kontrolních pěstovaných taktéž na médiu udržovacím. Co se týká kultur kontrolních a transformovaných vystavených osmotickému stresu, jejich přírůstky se příliš nelišily a byly vůči kulturám kontrolním značně zredukované. Dá se říci, že u prvního opakování byly téměř stejné a u druhého opakování se dařilo o něco lépe kulturám kontrolním (grafy 12A-B).



Graf 12 A-B: Růst tkáňových kultur tabáku kontrolních a transformovaných genem *Spdc25* vystavených osmotickému stresu aplikací sorbitolu. A – 1. opakování; B – 2. opakování. KK respektive CK – kontrolní respektive transformované tkáňové kultury pěstované na udržovacím médiu, Kso respektive Cso – kontrolní respektive transformované tkáňové kultury pěstované na udržovacím médiu s přidavkem sorbitolu. Doba kultivace: 21 dní, n = 10, úsečky znázorňují směrodatné odchylky.

Přestože růst variant (K a C) na kontrolním médiu a na médiu vyvolávajícím osmotický stres byl velmi rozdílný, tak obsahy celkových sacharidů jsou si překvapivě dosti podobné. U prvního opakování lze v grafu 13A vidět téměř shodný obsah celkových sacharidů u kultur kontrolních a transformovaných rostoucích na udržovacím médiu a kultur transformovaných vystavených osmotickému stresu. Co se týká opakování druhého, zde byl nejvyšší obsah celkových sacharidů stanoven u kultur kontrolních a transformovaných pěstovaných na médiu udržovacím. Kultury vystavené osmotickému stresu měly nižší obsah celkových sacharidů a úplně nejnižší obsah byl zaznamenán u kultur transformovaných (graf 13C).

Transformované kultury akumulovaly za normálních kultivačních podmínek více sacharózy oproti kulturám kontrolním, co se týká prvního opakování bylo to téměř dvojnásobné množství sacharózy ve srovnání s kulturami kontrolními. Sacharóza se hromadila na úkor glukózy a fruktózy. Tkáňové kultury vystavené osmotickému stresu akumulovaly pravděpodobně sorbitol přijímaný z média, a to ve vysokém procentuelním podílu ~ 45-50 %. Sorbitol zaujímal tak velkou část spektra sacharidů na úkor hexóz a sacharózy. Tkáňové kultury transformované akumulují i během osmotického stresu větší množství sacharózy než kultury kontrolní. U druhého opakování lze vidět v profilu sacharidů cyklický cukerný alkohol inositol, který nebyl u prvního opakování detekován (grafy 13B a 13D).



Grafy 13 A-D: Obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur tabáku kontrolních a transformovaných genem *Spcdc25* vystavených osmotickému stresu. Doba kultivace: 21 dní, n = 7, úsečky znázorňují směrodatné odchylky hodnot celkových sacharidů. Směrodatné odchylky hodnot jednotlivých sacharidů jsou uvedeny v tabulkách 5.16 a 5.17. Značení vysvětleno v grafech 12 A-B.

Tabulka 5.16: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 13A (1. opakování). Značení odpovídá značení v grafech 12 A-B.

	sacharóza	glukóza	fruktóza	sorbitol
KK	62,07	31,80	61,99	0,00
CK	41,43	17,02	36,65	0,00
Kso	37,25	19,56	29,31	61,01
Cso	39,34	7,89	12,66	18,29

Tabulka 5.17: Směrodatné odchylky hodnot prezentovaných v grafu 13C (2. opakování). Značení odpovídá značení v grafech 12 A-B.

	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	sorbitol
KK	24,47	8,17	12,74	0,46	0,00
CK	44,07	4,81	13,43	0,48	0,00
Kso	7,18	10,82	25,32	1,94	37,74
Cso	16,92	1,89	5,54	1,79	16,85

6. DISKUSE

6.1 Proč je výhodné používat ke studiu stresových situací tkáňové kultury?

Předkládaná diplomová práce se mimo jiné zabývá studiem tkáňových kultur během různých situací, zejména stresových. Sledovala jsem reakce tkáňových kultur na zásobení různými exogenními sacharidy, na snížený osmotický potenciál, na zasolení a chlad. Některé z těchto reakcí byly v naší laboratoři již sledovány, ale to u celistvých rostlin celeru *in vitro* (Vítová 1999; Stodůlková 1997). Tkáňové kultury celeru jsem odvodila a sledovala proto, že jsou vhodným modelem pro studium stresových situací z důvodu lepší možnosti posoudit životaschopnost buněk než je tomu u rostlin celistvých. Komplikace hodnocení u celistvých rostlin vyplývají z faktu, že diferencované orgány obsahují buňky různého typu a stáří, které vykazují různou až protikladnou citlivost ke stresové situaci (Lutts et al., 2004). Lutts et al. (2004) a Niknam et al. (2004) uvádějí následující výhody pro využití tkáňových kultur ke studiu rostlinného stresu:

- 1.) kontrola homogenity stresového faktoru, 2.) charakterizace chování buněk nezávisle na morfologii a fyziologii rostliny, 3.) stanovení stupně přežití buněk např. pomocí kvantifikace enzymové aktivity, 4.) využití metod šlechtitelství k vytvoření plodin rezistentních např. k zasolení.

Tkáňové kultury, které nefotosyntetizují, se využívají pro studium změn hladin endogenních sacharidů během různých situací. Fotosyntéza totiž významně ovlivňuje spektrum i hladinu endogenních sacharidů. Nefotosyntetizující tkáňové kultury vyžadují pro svůj zdárný růst a vývoj různé zdroje uhlíku a energie, které se přidávají do médií. Jako exogenní zdroje uhlíku a energie se používají sacharidy, které vznikají jako primární produkty fotosyntézy a jsou transportovány na dlouhé vzdálenosti (Leifert et al., 1995). Nejčastěji se jako exogenního sacharidu využívá sacharóza, i když díky její rychlé metabolizaci může způsobit hypoxii a akumulaci ethylenu v buňkách (Neto a Otoni, 2003). Jako jiné zdroje uhlíku a energie mohou být využity např. manitol, sorbitol, rafinóza a další u rostlin, které tyto sacharidy produkují.

6.2 Jsou sacharóza a manitol schopny sloužit jako srovnatelný zdroj uhlíku a energie pro růst tkáňových kultur celeru?

Rostliny celeru *in vitro* produkují a transportují na dlouhé vzdálenosti sacharózu a manitol, které tvoří většinu jejich spektra endogenních sacharidů. Proto jsem se snažila

u tkáňových kultur celeru objasnit, zda jsou oba tyto sacharidy srovnatelným zdrojem uhlíku a energie. Předpokládala jsem, že růst tkáňových kultur na médiu s manitolem by mohl být lepší, jelikož degradace manitolu je energeticky výhodnější oproti degradaci sacharózy (Stoop a Pharr, 1993). Schopnost sacharózy a manitolu sloužit jako srovnatelný zdroj uhlíku a energie jsem testovala tak, že jsem sledovala vliv různé koncentrace exogenního sacharidu (sacharózy nebo manitolu) na růst tkáňových kultur celeru. Tkáňové kultury jsem pěstovala na médiích s přídavkem 3, 5 a 7 % sacharózy nebo manitolu nebo na médiu obsahujícím jak sacharózu, tak i manitol, oba sacharidy v koncentraci 1,5 %. Tento experiment vedl ke zjištění růstových charakteristik a spektra endogenních rozpustných sacharidů.

6.2.1 Růstové charakteristiky tkáňových kultur celeru

Tkáňovým kulturám celeru se překvapivě mnohem lépe dařilo na médiích s přídavkem sacharózy než na médiích s manitolem (grafy 1A-C). Růst tkáňových kultur na médiích s rostoucí koncentrací exogenní sacharózy byl velmi podobný (graf 1A) nebo lepší na médiu s 5 % sacharózou (graf 1C). Naproti tomu s rostoucí koncentrací manitolu v médiu byl zaznamenán pokles v růstu tkáňových kultur. Manitol o stejné koncentraci jako sacharóza působí přibližně dvojnásobné snížení osmotického potenciálu, proto by bylo možné, zejména při vyšších koncentracích manitolu, přičítat pokles v růstu kultur vysoké osmotické zátěži. Nicméně při srovnání růstových charakteristik kultur na 3% manitolu a 7 % sacharóze toto vysvětlení neobstojí. Rostliny celeru pravděpodobně během osmotického stresu, který 3 % a vyšší obsah manitolu v médiu představuje, manitol neutilizují a 'chrání' jej jako osmoprotektant, a tedy nemají dostatek metabolizovatelného zdroje uhlíku a energie. Naproti tomu za srovnatelných stresových podmínek kultury celeru sacharózu využívají. Z těchto výsledků plyne závěr, že manitol a sacharóza neposkytují tkáňovým kulturám celeru srovnatelný zdroj uhlíku a energie.

Výsledky byly porovnány s předešlými výsledky, které byly získány v obdobných experimentech s celistvými rostlinami celeru *in vitro* (Vítová, 1999). Vítová zjistila, že celer je schopen využívat manitol jako zdroj uhlíku a energie ve srovnatelné míře se sacharózou jen při koncentracích 1 a 3 %, při vyšších koncentracích sacharidu v médiu manitol nepodporuje v takové míře nárůst biomasy jako sacharóza. Co se týká tkáňových kultur celeru rostoucích na médiu s manitolem, u nich jsem zjistila značně zredukovaný růst oproti kulturám rostoucích na sacharóze již při nejnižší koncentraci manitolu v médiu, a to 3 %. Je tedy možné vyvodit, že manitol, v koncentraci 5 % a

více, není vhodný zdroj uhlíku a energie pro růst celistvých rostlin celeru *in vitro* (Vítová, 1999) a pro růst tkáňových kultur celeru odvozených z čepele není vhodný v koncentraci 3 % a více.

6.2.2 Vliv exogenních sacharidů na obsah a složení rozpustných nestrukturních sacharidů tkáňových kultur celeru

U tkáňových kultur celeru pěstovaných na různých typech a koncentracích sacharidů v médiu jsem pozorovala měnící se zastoupení jednotlivých sacharidů i celkový obsah sacharidů. S rostoucí koncentrací sacharidu v médiu, jak sacharózy, tak i manitolu, se zvyšovalo zastoupení tohoto sacharidu ve spektru endogenních sacharidů. Obsah celkových sacharidů stoupal se stoupající koncentrací sacharidu v médiu a u kultur rostoucích na stejných koncentracích sacharidu (sacharózy respektive manitolu) v médiu byl vyšší u kultur pěstovaných na médiu s přidavkem manitolu. Stejný trend zjistila také Vítová (1999) u rostlin celeru *in vitro*. Větší celkový obsah rozpustných nestrukturních sacharidů u rostlin podporovaných manitolem může být zapříčiněn tím, že manitol není využíván nebo je více přijímán (Vítová, 1999). V experimentu, kdy byly listové terčíky celeru inkubovány s [¹⁴C] manitolem nebo [¹⁴C] sacharózou, byl příjem značeného manitolu vyšší než příjem sacharózy na světle u všech listů celeru. Nicméně utilizace manitolu byla omezena pouze na mladé listy, kdežto sacharóza byla metabolizována ve všech listech (Fellman a Loescher, 1987). Zastoupení manitolu u tkáňových kultur pěstovaných na médiích s přidavkem sacharózy bylo velmi malé (graf 2A a 2C) nebo vůbec žádné (graf 2B). Jiným způsobem se chovaly celistvé rostliny celeru *in vitro*, u kterých s rostoucí koncentrací nejenom manitolu ale i sacharózy v médiu docházelo k nárůstu obsahu celkových sacharidů a obsahu manitolu (Vítová, 1999). U tkáňových kultur celeru rostoucích na médiu s přidavkem manitolu jsem zaznamenala jeho značné zastoupení na celkových sacharidech, a to více než ~ 95 %. Tento trend zjistila také Vítová (1999) u celistvých rostlin celeru *in vitro*, které také akumulovaly ve všech svých částech významný podíl manitolu. Řapíky a čepele rostlin celeru *in vitro* pěstovaného na médiu se sacharózou akumulují mnohem větší množství manitolu než tkáňové kultury kultivované za stejných podmínek. Důvodem by mohla být syntéza manitolu částečně fotosyntetizujícími rostlinami celeru *in vitro*.

Obdobný experiment provedli Stoop a Pharr (1993), kteří sledovali růst suspenzních kultur celeru (*Apium graveolens* L. var *dulce*) na médiích buďto se sacharózou (90 mM ~3,08%) anebo s manitolem (180 mM ~ 3,3 %) jako jediným zdrojem uhlíku. Buněčné

kultury se nelišily v růstových parametrech, ale hladiny jejich endogenních sacharidů byly velmi odlišné. Naopak tkáňové kultury celeru, které jsem pěstovala na médiu s 3 % sacharózou nebo 3 % manitolem, vykazovaly významné rozdíly v růstových parametrech. Obsah a složení endogenních sacharidů buněk celeru je výrazně závislé na zdroji uhlíku přidávaného do média (Stoop a Pharr, 1993). Buněčné suspenze (Stoop a Pharr, 1993) rostoucí na médiu s přídavkem manitolu obsahovaly vysokou koncentraci manitolu a extrémně nízké koncentrace sacharózy, manózy a hexózy, zatímco kultury pěstované na médiu se sacharózou akumulovaly vysokou koncentraci sacharózy a později hexózový pool (Stoop a Pharr, 1993). Spektrum endogenních sacharidů, které jsem stanovila u kultur rostoucích na médiu s 3 % sacharózou nebo 3 % manitolem bylo podobné suspenzním kulturám celeru.

Médium s přídavkem manitolu má nižší osmotický potenciál ve srovnání s médiem s ekvivalentní koncentrací sacharózy. Pro tkáňovou kulturu představuje médium s manitolem větší osmotický stres než médium s odpovídající koncentrací sacharózy. Během osmotického stresu vyvolaného přídavkem manitolu do média je růst rostlin celeru inhibován, což je způsobeno omezením utilizace manitolu a tím snížením dostupnosti uhlíku a energie (Vítová et al., 2002). Stejným způsobem se chovaly i tkáňové kultury celeru rostoucí na médiu s přídavkem manitolu, ale jejich růst byl vůči kulturám rostoucích na médiu s přídavkem sacharózy značně zredukován i při nižších koncentracích. Rostliny produkující manitol jej totiž během osmotického stresu chrání jako sloučeninu důležitou pro navození tolerance ke stresu a tudíž jej nemetabolizují (Vítová et al., 2002). Změny v rozdělování uhlíku mezi manitol a sacharózu ve prospěch manitolu je pravděpodobně výsledkem omezené aktivity NAD-dependentní MDH, která katalyzuje jeho degradaci (Zamski et al., 2001). Zda může být manitol akumulovaný za osmotického stresu využíván, zjišťovali Vítová et al. (2002), tak že sledovali změny v obsahu a složení endogenních sacharidů u rostlin celeru kultivovaných na médiích se 7 % sacharózou (osmotický potenciál: -0,82 MPa) nebo 7 % manitolem (osmotický potenciál: -1,34 MPa) po přenosu na média bez sacharidu (osmotický potenciál: -0,28 MPa). Bez ohledu na typ primárního exogenního sacharidu se obsah akumulovaného manitolu po přenosu na médium bez sacharidu snižoval. U rostlin prekultivovaných na médiu s manitolem se postupně zvyšovalo zastoupení sacharózy, glukózy a fruktózy na celkovém obsahu sacharidů (Vítová et al., 2002). Výsledky odpovídají předpokládané strategii využití manitolu v podmínkách stresu. Rostliny celeru 'chrání' manitol během osmotického stresu regulací aktivity MDH. Přítomností cukrů je aktivita MDH

potlačena, což má za následek uskladnění manitolu do zásoby a přednostní metabolizaci cukrů (Zamski et al., 2001). Tento typ regulace, který vede ke zvýšené akumulaci manitolu jako osmoprotektantu, může být důležitý pro toleranci ke stresu u celeru (Stoop et al., 1996).

6.3 Vliv nízké teploty (4°C) na obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru

Působení chladu vede kromě jiného k osmotickému stresu, proto vyvstává otázka, zda a jak se i při tomto typu stresu bude měnit obsah a spektrum endogenních sacharidů. Další otázkou je, zda akumulace manitolu, který funguje jako osmoprotektant během osmotického stresu, bude také tak vysoká jako u stresu vyvolaného nízkým osmotickým potenciálem přidavkem manitolu do média. Také jsem sledovala, jestli charakter reakcí na chladové působení bude obdobný u tkáňových kultur odvozených z čepele a řapíku a jestli je tedy možné rostliny celeru *in vitro* v tomto experimentu nahradit tkáňovými kulturami bez ohledu na typ primárního explantátu, ze kterého je kultura odvozena.

Sledovala jsem obsah a složení endogenních sacharidů u tkáňových kultur celeru, které byly po dobu 14-ti dní vystaveny chladovému působení 4°C. Zjistila jsem vyšší obsah celkových sacharidů a vyšší zastoupení sacharózy na úkor manitolu a fruktózy oproti kulturám kontrolním. Ale není tomu tak u všech rostlin produkujících manitol jako jeden z hlavních produktů fotosyntézy. V naší laboratoři se také zabýváme studiem oliv během různých abiotických stresů. Rejšková (2003) u kultur oliv zjistila, že při stresu nízkých teplot dochází k mírnému navýšení podílu manitolu a ve spektru endogenních sacharidů se objevuje RFO, které chrání rostliny během chladového působení. Jedna z jejich funkcí je bránit krystalizaci sacharózy během chladu (Liu et al., 1998). Nicméně obsah celkových sacharidů u kultur oliv se po chladovém působení navýšil stejně jako u tkáňových kultur celeru. Jelikož srovnávání tkáňových kultur celeru s nezakořeněnými rostlinami olivy není nejvhodnější, pokusila jsem se odvodit tkáňové kultury oliv. Pro odvození tkáňových kultur jsem použila MS média modifikována různými koncentracemi růstových regulátorů (2,4-D, kinetin) respektive WPM s thiodiazuronem, NAA, GA a zeatinem. Bohužel tkáňové kultury v kvalitě, která by dovozovala provedení chladových experimentů, se nepodařilo získat. Olivy totiž neochotně tvoří dobře rostoucí tkáňové kultury, a nadto tato schopnost se velmi liší mezi jednotlivými odrůdami (Katerina Grigoriadou, osobní sdělení).

Z experimentů na tkáňových kulturách celeru jasně vyplývá, že sacharóza hraje velmi důležitou roli během působení nízkých teplot. I když je manitol významným osmoprotektantem, tak v tomto případě buňka neřeší primárně osmotický stres, ale stres nízkých teplot, při kterém má větší význam sacharóza. Guy et al. (1992) uvádějí, že sacharóza slouží v případě stresu nízkých teplot pravděpodobně zejména jako zásobní sacharid, který je v případě metabolické potřeby rychle mobilizován. Buďto je transportována floémem do sinkových pletiv nebo využívána jako zdroj energie pro procesy respirace. Ale v mých experimentech byly požitý buňky, nikoliv celistvé rostliny, takže situace bude poněkud jiná. Ale i na buněčné úrovni je významnou funkcí sacharózy během chladového působení protekce membrán a proteinů (Caffrey et al., 1988). Zvýšenou akumulaci sacharózy pozorovali také Savitch et al. (1997) u listů jarní i zimní pšenice vystavené chladovému stresu. Naopak u těchto kultur došlo ke snížení obsahu škrobu a k malým změnám v akumulaci fruktózy a glukózy. Lunn a Furbank (1999) uvádějí, že u některých C₃ rostlin dochází po chladovém působení k navýšení obsahu sacharózy z důvodu její zvýšené rychlosti syntézy způsobené zvýšenou aktivitou sacharózafosfát syntázy (SPS). Další faktory přispívající k akumulaci sacharózy jsou její snížený 'turnover' a transport (Lunn a Furbank, 1999). Guy et al. (1992), kteří prováděli experimenty s listy špenátu, zjistili že pletiva listů aklimatizovaných k chladu vykazovala zvýšenou aktivitu SPS ve srovnání s rostlinami neaklimatizovanými. Guy et al. (1992) také uvádějí, že zvýšená akumulace rozpustných sacharidů souvisí s chladovou aklimací, která vede ke zvýšené syntéze sloučenin, které slouží jako kryoprotektivní látky a jsou esenciální pro udržení bazálního metabolismu během přezimování.

Oba typy tkáňových kultur, jak odvozené z čepele, tak i řapíku se za těchto chladových podmínek chovaly srovnatelně. Tkáňové kultury odvozené z řapíku mají jen za kontrolních podmínek vyšší zastoupení manitolu na úkor sacharózy ve srovnání s kulturami odvozenými z čepele celeru (grafy 3A-B).

6.4 Obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru vystavených 10°C a poté 4°C (chladová aklimace)

Testovala jsem do jaké míry se změní obsah a spektrum endogenních sacharidů tkáňových kultur, pokud budou nejprve přivykány na snížení teploty za příznivějších podmínek (10°C), a pak vystaveny náročnější nízké teplotě (4°C), oproti kulturám po celou dobu kultivovaných ve 4°C. Obsah celkových sacharidů byl nejvyšší u tkáňových

kultur vystavených po celou dobu experimentu 4°C nebo byl srovnatelný s obsahem celkových sacharidů kultur 'aklimatizovaných'. U kultur vystavených 4°C, kromě těch odvozených z čepele u prvního opakování, dominovala svým zastoupením na celkových sacharidech sacharóza (grafy 4 A-D). Tkáňové kultury 'aklimatizované' akumulují srovnatelné množství sacharidů nebo ještě méně než kultury vystavené pouze 4°C, u kterých je i vyšší podíl sacharózy. U kultur 'aklimatizovaných' tedy nedošlo na úrovni sacharidů ke změnám, o kterých by se dalo předpokládat, že povedou k vyšší odolnosti vůči náročnějšímu chladovému působení 4°C.

6.5 Vliv zasolení a nízkého osmotického potenciálu média na růst a obsah endogenních sacharidů tkáňových kultur celeru

Z experimentů uvedených v kapitole 6.2 vyplývá, že s rostoucí koncentrací manitolu v médiu, který způsobuje snížení osmotického potenciálu, je omezena utilizace manitolu. V dalších experimentech jsem sledovala vliv nízkého osmotického potenciálu média navozeného přidávkem nemetabolizovatelného sacharidu respektive zasolením, kde mimo osmotického stresu působí i toxicita iontů Na^+ a Cl^- , na růst a obsah a složení endogenních sacharidů. Jelikož manitol je tkáňovými kulturami celeru metabolizován, použila jsem jako osmotikum jemu strukturálně velmi podobný sorbitol. Zasolení bylo vyvoláno přidávkem NaCl, a to v 50 mM koncentraci a nízký osmotický potenciál byl indukován aplikací sorbitolu do média, a to v koncentraci 2 %. Aplikace jak NaCl, tak i sorbitolu vede ke snížení osmotického potenciálu média (v tomto případě o ~ 0,3 MPa), jinak řečeno dochází ke snížení gradientu vodního potenciálu na buněčné membráně, který je řídicí silou buněčné expanze a růstu buněk. Vlivem osmotika v médiu tudíž dochází k úniku vody z buněk do okolního prostředí (Bressan et al., 1982).

6.5.1 Růstové charakteristiky tkáňových kultur vystavených nízkému osmotickému potenciálu média nebo zasolení

Z vizuálního posouzení prvního opakování lze říci, že všechny varianty vypadaly podobně, proto v následujících dvou opakováních byly také vyhodnoceny růstové charakteristiky. Růstové charakteristiky tkáňových kultur celeru odvozených z čepele byly překvapivé, jelikož nejlepší růst byl pozorován u kultur rostoucích na médiu s NaCl. Tkáňové kultury odvozené z řapíku celeru vykazovaly všeobecně nižší rychlost růstu a rostly nejlépe na médiu kontrolním respektive srovnatelně na médiu s přidávkem sorbitolu. (grafy 5A-B). K podobným výsledkům, jako jsem zjistila u tkáňových kultur

odvozených z čepele, dospěli Everard et al. (1994), kteří vystavovali rostliny celeru *in vivo* různým koncentracím soli, a to 25 (slabý stres), 100 (mírný stres) a 300 mM NaCl (silný stres). Zjistili, že čerstvá hmotnost prýtů celeru se při 25 mM NaCl zvýšila přibližně o 25 % oproti rostlinám kontrolním, což může být způsobeno zvýšeným příjmem vody, aby došlo k tzv. 'naředění' soli a tím k omezení negativního vlivu NaCl na buněčný metabolismus. Při koncentracích NaCl 100 mM a 300 mM byla čerstvá hmotnost prýtů celeru zredukována o přibližně 30 a 70 %. Tyto výsledky vedou k závěru, že Na^+ a Cl^- se akumulují v prýtech celeru vystavených stresu zasolení (např. při 300 mM NaCl byl obsah Na^+ a Cl^- v listech 15 a 6 % z celkové sušiny), ale růst a vývoj těchto rostlin může pokračovat i při koncentraci vyvolávající silný stres, a to 300 mM NaCl. To znamená, že rostliny celeru jsou považovány za druh tolerantní vůči zasolení (Everard et al., 1994). Ovšem jestli je celer pravý halofyt nebo vůči zasolení tolerantní glykofyt zůstává nadále otázkou. To, že celer roste lépe na nízké koncentraci NaCl než na médiu bez soli by znamenalo, že je halofyt (Everard et al., 1994; Flowers et al., 1977). Obdobné výsledky prezentují také Zhang et al. (2004), kteří vystavují tkáňové kultury *Populus euphratica*, které jsou tolerantní vůči zasolení, vyšším koncentracím zasolení než je slabý eventuálně mírný stres. Zjistili, že tyto tkáňové kultury rostou nejlépe při 50 mM NaCl a s rostoucí koncentrací NaCl v médiu dochází k poklesu růstu.

Orientačně jsem provedla experiment, ve kterém jsem tkáňové kultury celeru odvozené z čepele vystavila různým koncentracím soli, a to 50, 75 a 100 mM NaCl, abych ověřila, že kultury rostou lépe na médiu s přídavkem soli než na médiu kontrolním (graf 6). Pozorovala jsem stejně jako Everard et al. (1994), že kultury vystavené 50 mM NaCl rostly očividně nejlépe, byly velké a světlezelené. Kdežto u ostatních koncentrací soli se objevovalo větší či menší množství zhnědlých tkáňových kultur a docházelo k redukci čerstvé hmotnosti. Z těchto výsledků je možné vyvodit, že 50 mM NaCl ještě působí jako slabý stres zasolení, a tak vede k nárůstu čerstvé hmotnosti.

Růst tkáňových kultur celeru na médiu s přídavkem sorbitolu se v průměru jevil jako dobrý. To by mohlo mít podobnou příčinu jako růst na NaCl. Tkáňové kultury v tomto případě také pravděpodobně přijímají zvýšený objem vody, což vede k nárůstu čerstvé hmotnosti. Další možnou příčinou nárůstu biomasy by mohla být možná metabolizace sorbitolu, jelikož MDH není pravděpodobně tak substrátově specifická jako SDH a může jako substrát využívat i sorbitol. Ale jedná se pouze o spekulace, zatím ničím nepodložené. Z literárních údajů je známo, že NaCl mnohem více omezuje růst

tkáňových kultur než sorbitol vyvolávající ekvivalentní osmotický stres (Eberhardt a Wegmann, 1989). Sorbitol je totiž neiontové osmotikum, kdežto NaCl je iontové osmotikum, což má za následek nejenom osmotický stres, ale také toxické působení iontů Na^+ a Cl^- (Gangopadhyay et al., 1997). V mých experimentech jsem podobné chování pozorovala pouze u kultur odvozených z řapíku, které vykazovaly mnohem nižší růst než kultury odvozené z listu. To by mohlo znamenat, že řapíky jsou citlivější ke stresu zasolení. Důvodem proč se toto omezení neobjevilo u tkáňových kultur odvozených z čepele, by mohlo být že tato koncentrace NaCl není ještě poškozující, ale naopak prospěšná pro růst.

6.5.2 Obsah a složení endogenních sacharidů tkáňových kultur vystavených nízkému osmotickému potenciálu média nebo zasolení

Tkáňové kultury z předchozího experimentu byly využity ke stanovení obsahu a složení endogenních rozpustných sacharidů. Tento experiment byl proveden ve třech opakováních.

Tkáňové kultury celeru odvozené z čepele. Nejvyšší obsah celkových sacharidů jsem pozorovala u kultur rostoucích na médiu s přídavkem sorbitolu. Důvodem byl příjem sorbitolu z média, který se akumuloval v buňkách kultur na úkor manitolu, hexózy a sacharózy, což vedlo k nárůstu celkových sacharidů oproti kulturám kontrolním i těm vystaveným zasolení (grafy 7A-F). Kultury vystavené zasolení vykazovaly vyšší obsah celkových sacharidů oproti kulturám kontrolním, což pravděpodobně souvisí s tím, že celer je halofyt nebo vůči zasolení tolerantní glykofyt, jak je již zmíněno výše. U kultur vystavených zasolení jsem většinou pozorovala mírné navýšení v obsahu manitolu ve srovnání s kulturami kontrolními. Je známo, že manitol se podílí na navození tolerance ke stresu zasolení (Stoop a Pharr, 1996).

Tkáňové kultury celeru odvozené z řapíku. Reakce těchto kultur na osmotický stres byla značně heterogenní. Nejvyšší obsah celkových sacharidů byl u prvního opakování u kultur vystavených zasolení, u druhého opakování u kultur kontrolních a u třetího opakování u kultur rostoucích na médiu s přídavkem sorbitolu. To znamená, že nelze vyvodit závěry obecné platnosti z takových výsledků (grafy 7A-F). Kultury kontrolní odvozené z řapíku akumulovaly menší množství manitolu než kultury odvozené z čepele, naopak jsem u nich zaznamenala vyšší procento glukózy a fruktózy. Během stresu zasolení došlo ve dvou opakováních k mírnému nárůstu hladiny manitolu. Kultury pěstované na médiu s přídavkem sorbitolu měly velmi podobný profil sacharidů

jako kultury odvozené z listu. Taktéž akumulovaly vysoké procento sorbitolu přijímaného z média na úkor manitolu, hexózu respektive sacharózy u prvního a druhého opakování. Podobné experimenty provedla Rejšková (2003) u kultur oliv, které byly vystaveny 100 mM NaCl. Salinita u kultur oliv *in vitro* způsobuje pokles obsahu celkových sacharidů a indukuje významné navýšení podílu manitolu na celkových sacharidech. Ve spektru endogenních sacharidů kultur oliv se navíc vyskytují RFO, jejichž podíl se pod vlivem zasolení zmenšuje oproti chladovému působení, kde stoupá. Z literárních údajů je známo (Everard et al., 1994), že u celeru *in vivo* vystaveného různým koncentracím soli dochází ke změnám v obsahu a složení endogenních sacharidů. Listy celeru vystavené 25 a 100 mM NaCl vykazují snížení v obsahu celkových sacharidů oproti kontrolním rostlinám, ale u listů vystavených nad 100 mM NaCl je již pozorován vyšší obsah endogenních sacharidů a s rostoucí koncentrací NaCl v médiu stoupá (při 300 mM NaCl je vyšší než u kontroly). Obsah manitolu je při 25 mM NaCl snížen oproti kontrole a s rostoucí koncentrací NaCl v médiu dochází k úměrnému zvyšování podílu manitolu na celkových sacharidech, kdežto zastoupení sacharózy a škrobu s rostoucí koncentrací NaCl klesá (Everard et al., 1994). K obdobným závěrům přišli Zhang et al. (2004), kteří aplikovali různé koncentrace NaCl (50, 150, 250) na tkáňové kultury *Populus euphratica*, které jsou rezistentní vůči zasolení. Zjistili, že s rostoucí koncentrací NaCl se zvyšuje obsah celkových sacharidů. Pokud tedy vezmu v úvahu výše zmíněné výsledky, mohla bych z mých pozorování vyvodit následující závěry. U kultur vystavených stresu zasolení došlo ve dvou opakováních k mírnému navýšení obsahu manitolu. Mohlo by to být tím, že to ještě není ta kritická poškozující koncentrace NaCl a kultura se teprve přizpůsobuje těmto nepříznivým podmínkám, které představují pouze slabý stres. Lze předpokládat, že při silnějším stresu zasolení, možná 100 mM NaCl nebo vyšší, by byly výsledky homogennější. Předpokládám, že by došlo k markantnějším nárůstu manitolu a celkových sacharidů. Jak je již výše zmíněno, Everard et al. (1994) pozorovali, že 25 mM NaCl způsobuje pokles v obsahu manitolu, kdežto s rostoucí koncentrací NaCl již dochází ke zvýšené akumulaci manitolu v pletivech celeru.

KULTURY OLIV

6.6 Vliv exogenního sacharidu na růst a obsah a složení endogenních sacharidů kultur oliv

Kultury rostlin *in vitro* nemohou být plně autotrofní, protože koncentrace CO₂ je v kultivačních nádobách nízká, proto je třeba do kultivačních médií přidávat sacharidy, které slouží jako zdroj uhlíku a energie místo fotosyntetických asimilátů (např. Lipavská a Vreugdenhil, 1996). Hromadění endogenních sacharidů je za těchto podmínek tedy prakticky nezávislé na fotosyntéze. Aplikace exogenních sacharidů nám umožňuje zkoumat chování kultur oliv v závislosti na typu použitého sacharidu.

6.6.1 Vliv exogenního sacharidu na obsah a složení rozpustných endogenních sacharidů

Kultury oliv byly zásobeny různými koncentracemi exogenních sacharidů (sacharóza, manitol nebo rafinóza), a to u prvního opakování v koncentracích 1, 3, 5, 7 a 9 % a u druhého opakování pouze v 3 a 5 % koncentracích. Sledovala jsem růst stonkových segmentů oliv v závislosti na typu a koncentraci sacharidu v médiu. Rejšková (2003) zjistila, že kultury oliv jsou schopny využívat manitol i sacharózu jako srovnatelný zdroj uhlíku a energie. Jelikož oliva produkuje a na dlouhé vzdálenosti transportuje také sacharidy rafinózové řady, mým úkolem bylo zjistit, zda rafinóza podporuje v podobné míře růst kultur oliv jako sacharóza a manitol. U tohoto experimentu bohužel chybí růstové charakteristiky z důvodu kontaminace velké části pokusného materiálu. Zbylý rostlinný materiál vykazoval značný heterogenní růst, proto nebylo možné žádným způsobem výsledky sjednotit. Pouze z vizuálního pozorování je možno říci, že kulturám oliv se na médiu s přidavkem rafinózy dařilo velmi dobře a růst byl srovnatelný, eventuelně v některých případech ještě lepší, než na médiích s přidavkem sacharózy respektive manitolu. Obecně se dá říci, že s rostoucí koncentrací sacharidu v médiu jsem většinou pozorovala nárůst v obsahu celkových sacharidů a profily celkových sacharidů mezi jednotlivými variantami byly velmi podobné. Z těchto výsledků vyvozují závěr, že rafinóza jako jediný sacharid v médiu je vhodným zdrojem uhlíku a energie pro růst stonkových segmentů oliv.

6.6.2 Vliv exogenního sacharidu na obsah škrobu

Testovala jsem, zda kultury oliv zásobené různými exogenními sacharidy (sacharóza, manitol nebo rafinóza) budou akumulovat přibližně stejné množství škrobu. Pokud by

tak tomu bylo, znamenalo by to další potvrzení toho, že sacharóza, manitol i rafinóza jsou srovnatelnými zdroji uhlíku a energie pro růst kultur oliv. Sledovala jsem vliv 3 % exogenního sacharidu na obsah a složení rozpustných nestrukturních sacharidů a škrobu u kultur oliv. Největší zastoupení škrobu jsem stanovila u kultur oliv rostoucích na médiu s přídavkem manitolu nebo rafinózy (graf 9). U kultur rostoucích na médiu s manitolem bylo naopak zaznamenáno nejnižší zastoupení sacharózy a glukózy na celkových sacharidech ze všech tří variant (grafy 10 A-B). Nejnižší zastoupení škrobu jsem stanovila u kultur oliv rostoucích na médiu s přídavkem sacharózy, čemuž také odpovídalo nejvyšší zastoupení fruktózy (grafy 10 a 11 A-B). Z literárních údajů je známo, že rozdělování uhlíku mezi sacharózu a škrob je jednak pod genetickou kontrolou, a jednak závisí na podmínkách okolního prostředí, jako je např. fotoperioda nebo výživa (Huber, 1983). Kulture oliv rostoucí na médiu s přídavkem manitolu akumulují značné množství škrobu pravděpodobně v souvislosti s tím, že obsah celkových sacharidů byl u nich největší. To by mohlo znamenat, že kulture disponovaly větším množstvím uhlíku než potřebovaly, a proto jej ukládaly do zásoby. Manitol je olivou dobře utilizovatelný (oproti situaci u celeru, který jej chrání jako osmoprotektant) a z energetického hlediska je výhodnější, což by mohlo znamenat lepší energetickou bilanci. To by mohly být důvody, proč je hladina škrobu vyšší u kultur oliv rostoucích na médiu s manitolem než na médiu se sacharózou. Mobilizace škrobu by také mohla souviset se stresovou situací, ale přímá souvislost se tu nenabízí.

6.7 Vliv nízkého osmotického potenciálu média na obsah a složení endogenních sacharidů rostlin oliv

Sledovala jsem, jak se bude měnit obsah a spektrum sacharidů u kultur oliv vystavených osmotickému stresu vyvolaného přídavkem polyetylglykolu (PEG, Mr = 4000) nebo sorbitolu do standardního udržovacího média. Koncentrace těchto sloučenin byla taková, aby vyvolala snížení osmotického potenciálu média o ~ 0,3 MPa. *Olea europaea* je subtropická dřevina, která obsahuje pestrou škálu endogenních sacharidů (sacharóza, manitol, fruktóza, glukóza, RFO...), jejichž zastoupení na celkových sacharidech se mění v závislosti na vnějších podmínkách. Abiotické stresy působí na fyziologické procesy probíhající v rostlině (např. fotosyntézu), které ovlivňují hromadění endogenních sacharidů. Proto je výhodnější zkoumat cukerný metabolismus u rostlin *in vitro*, kde je možno sacharid dodávat do média v přesném množství.

Sacharid je nutno dodávat i z důvodu nízké fotosyntézy *in vitro*, jak je již zmíněno v kapitole 6.6.

Vizuálně osmotický stres inhiboval růst kultur oliv a indukoval některé charakteristiky senescence. Stonkové segmenty vystavené osmotickému stresu měly snížený počet nodů, menší listové plochy a trpěly nekrózou oproti těm kontrolním. U listů vystavených stresu jsem pozorovala přechod barvy z tmavě na světle zelenou pravděpodobně v důsledku degradace chlorofylu. Grafy nejsou přiloženy kvůli značné kontaminaci pokusného materiálu a nemožnosti tak vyvodit závěry s obecnou platností. K podobným výsledkům dospěli i Brito et al. (2003), kteří vystavovali stonkové segmenty *Olea europaea* spp. *Maderensis* osmotickému stresu aplikací sorbitolu do média.

Experiment, ve kterém jsem sledovala hladiny a složení endogenních sacharidů kultur oliv, byl proveden ve dvou opakováních, které byly mírně modifikovány. Jako zpevňující složka média u prvního opakování byl použit agar, kdežto u druhého byl použit fytigel z důvodu značné tekutosti předchozího média. PEG a sorbitol použité k navození osmotického stresu, jsou inertní ve vodě rozpustné látky fungující jako neiontová osmotika. Polyetylglykol je navíc polymer, jehož molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 300-20000 a je tedy sloučeninou nepenetrující do buněk. Pro tento experiment jsem použila polyetylglykol s molekulovou hmotností 4000. Nejvyšší obsah rozpustných nestrukturních sacharidů jsem pozorovala u kultur oliv pěstovaných na médiu s přídavkem sorbitolu, což je pravděpodobně důsledek příjmu sorbitolu z média. Tyto rostliny obsahovaly srovnatelné množství manitolu (grafy 11A-B) nebo o něco nižší (grafy 11 C-D) než rostliny kontrolní, ale navíc se v jejich spektru sacharidů objevil sorbitol přijímaný z média a u druhého opakování i neznámý sacharid, který se nevyskytoval v žádné z dalších dvou variant, proto se asi jedná o produkt metabolismu sorbitolu. Kultury oliv pěstované na médiu s přídavkem polyetylglykolu akumulovaly ve svých pletivech větší množství manitolu na úkor hexózy oproti těm kultivovaným na médiu se sorbitolem. Souhrnně se dá říci, že během osmotického stresu vyvolaného jak PEGem, tak i sorbitolem došlo k poklesu RFO, glukózy a fruktózy.

Proč dochází během osmotického stresu vyvolaného přídavkem PEGu do média k vyšší akumulaci manitolu? Je to pravděpodobně způsobeno charakterem osmotika, jedná se totiž o vysokomolekulární nepenetrující osmotikum, což znamená, že vyvolává stabilnější osmotický stres než nízkomolekulární sorbitol, který do buněk oliv proniká.

To znamená, že sorbitol nejenom snižuje osmotický potenciál média, ale také se podílí na osmotickém vyrovnání uvnitř buněk.

6.8 Vliv osmotického stresu na růst a obsah endogenních sacharidů tkáňových kultur tabáku kontrolních a transformovaných genem *Spdc25*.

Z experimentů Petry Maškové (nepublikované výsledky) vyplývá, že tkáňové kultury tabáku transformované genem *cdc25* ze *S. pombe* vykazují určité změny v rozdělování rozpustných sacharidů. V souladu s těmito výsledky jsem zjistila vyšší zastoupení sacharózy ve spektru endogenních sacharidů oproti kontrolnímu netransformovanému materiálu. Tato změna by mohla mít pozitivní vliv na toleranci osmotického stresu. Proto byly tkáňové kultury tabáku kontrolní a transformované vystaveny osmotickému stresu aplikací 2 % sorbitolu do média. Tento experiment byl proveden ve dvou opakováních, jejichž výsledky se od sebe značně lišily. Nicméně lze konstatovat, že růst kultur na médiu s nízkým osmotickým potenciálem byl významně zredukován oproti kulturám rostoucím na médiu kontrolním u obou typů rostlinného materiálu. Ale mezi růstem kultur kontrolních a transformovaných nebyly průkazné rozdíly. To znamená, že předpoklad, že tkáňové kultury tabáku transformované genem *cdc25* ze *S. pombe* budou odolnější vůči osmotickému stresu, neplatí. Co se týká sacharidových spekter, transformované tkáňové kultury tabáku akumulovaly větší množství sacharózy než kultury kontrolní, a to jak za podmínek normálních, tak i stresových. Vystavení osmotickému stresu nevyvolalo ani zvýšení celkového obsahu sacharidů ani zvýšení podílu sacharózy v sacharidovém spektru, lze tedy předpokládat, že změny v obsahu sacharidů nejsou u těchto rostlin významným mechanismem reakce na osmotický stres.

Rostliny s velkou diverzitou fotosyntetických produktů vykazují specifické změny v obsahu a spektru sacharidů v závislosti na typu stresového faktoru, kterému je rostlinný materiál vystaven. Nadto výsledky poukazují na odlišnou strategii využití jednotlivých složek sacharidového spektra při řešení abiotického stresu u různých rostlinných druhů tohoto typu. Tkáňové kultury umožňující přesnější působení stresových faktorů i manipulaci s endogenními hladinami jednotlivých sacharidů představují vhodný model pro studium stresových reakcí na úrovni sacharidového metabolismu.

7. ZÁVĚRY

⊕ Manitol není vhodným zdrojem uhlíku a energie pro růst tkáňových kultur celeru jako sacharóza.

⊕ Se stoupající koncentrací sacharidu, jak sacharózy, tak i manitolu, v médiu se u tkáňových kultur celeru zvyšovalo zastoupení tohoto příslušného cukru ve spektru endogenních sacharidů i jejich celkový obsah. Obdobný charakter reakcí byl zaznamenán i u mateřských rostlin celeru *in vitro* Mgr. Lenkou Vítovou

⇒ **hypotéza 1 potvrzena.**

⊕ Obsah celkových sacharidů tkáňových kultur celeru vystavených aklimatizaci byl buďto srovnatelný nebo nižší než obsah celkových sacharidů kultur vystavených pouze 4°C a zastoupení sacharózy u kultur 'aklimatizovaných' bylo nižší. To znamená, že takto ošetřené kultury nebudou odolnější vůči následnému chladovému působení 4°C

⇒ **hypotéza 2 zamítnuta.**

⊕ Tkáňové kultury celeru vystavené chladovému působení (4°C) akumulovaly větší množství celkových sacharidů a zvýšený podíl sacharózy na úkor manitolu.

⊕ U tkáňových kultur celeru vystavených zasolení je zastoupení manitolu na celkových sacharidech vyšší než u kultur kultivovaných na médiu s nízkým osmotickým potenciálem.

⊕ Kultury oliv pěstované na médiu s přidavkem polyetylglykolu ukládají ve svých pletivech větší množství manitolu než rostliny kultivované na médiu s přidavkem sorbitolu. Hladina RFO je snížena v obou případech ⇒ **hypotéza 3 potvrzena.**

⊕ Kultury oliv *in vitro* jsou schopny využívat jako zdroje uhlíku a energie kromě sacharózy a manitolu i rafinózu ⇒ **hypotéza 4 potvrzena.**

⊕ Tkáňové kultury tabáku transformované genem *cdc25* ze *S. pombe* rostou na médiu s osmotickým stresem srovnatelně jako kultury kontrolní. Obsah celkových sacharidů byl nejvyšší u kultur kontrolních vystavených osmotickému stresu nebo byl srovnatelný s obsahem celkových sacharidů kultur transformovaných vystavených osmotickému stresu. U transformovaných tkáňových kultur tabáku docházelo k výraznější akumulaci sacharózy ⇒ **hypotéza 5 zamítnuta.**

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alvarez, M.E., Pennell, P.J., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C.:** Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784, 1998.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., Blumwald, E.:** Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258, 1999.
- Bachmann, M., Keller, F.:** Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. Inter- a intracellular compartmentation. *Plant Physiol.* 109: 991-998, 1995.
- Bartoníčková, A.:** Vliv osmotického stresu na růst rostlin celeru řapíkatého (*Apium graveolens* L.) v podmínkách *in vitro*, Diplomová práce. Praha, 1999.
- Bialeski, R.L., Redgwell, R.J.:** Synthesis of sorbitol in apricot leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 4: 1-10, 1977.
- Bialeski, R.L.:** Accumulation and translocation of sorbitol in apple phloem. *Austral. J. Biol. Sci.* 22: 611-620, 1969.
- Bialeski, R.L.:** Sugar Alcohols. *Encyklopedia of Plant Physiology, New Series* (Loewus, F., Tanner, W., eds) 13A: 158-192, Springer-Verlag, Berlin, 1982.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., Jensen, R.G.:** Adaptation to environmental stress. *Plant Cell* 7: 1099-1111, 1995.
- Bohnert, H.J., Shen, B.:** Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae* 78: 237-260, 1999.
- Bray, E.A.:** Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040, 1993.
- Bray, E.A.:** Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2(2): 48-55, 1997.
- Bressan, R.A., Handa, A.K., Handa, S., Hasegawa, P.M.:** Growth and water relations of cultured tomato cells after adjustment to low external water potentials. *Plant Physiol.* 70: 1303-1309, 1982.
- Briens, M., Larher, F. (1983).** Citováno podle Wang, Z., Quebedeaux, B., Stutte, G.W.: Partitioning of [¹⁴C] glucose into sorbitol and other carbohydrates in apple under water stress. *Aust. J. Plant Physiol.* 23: 245-251, 1996

- Brito, G., Costa, A., Fonseca, H.M.A.C., Santos, C.V.:** Response of *Olea europaea* spp. Maderensis in vitro shoots exposed to osmotic stress. *Scientia Horticulturae* 97: 411-417, 2003.
- Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P., Ross, A.B. (1988).** Citováno podle Shen, B., Jensen, R.G., Bohnert, H.J.: Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol* 113: 1177-1183, 1997.
- Caffrey, M., Fonseca, V., Leopold, C.:** Lipid-sugar interactions. *Plant Physiol.* 86: 754-758, 1988.
- Cabib, E., Leloir, L.F.:** The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.* 231: 259-275, 1958.
- Campalans, A., Messeguer, R., Goday, A., Pages, M.:** Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 327-340, 1999.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M.:** Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 579-599, 1992.
- Daie, J.:** Kinetics of sugar transport in isolated vascular bundles and phloem tissue celery. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 111: 216-220, 1986.
- Davies, W.J., Mansfield, T.A., Hetherington, A.M.:** Sensing of solid water status and the regulation of plant growth and development. *Plant Cell Environ.* 13: 709-719, 1990.
- Davis, D.J., Burlak, C., Money, N.P. (2000).** Citováno podle Noiraud, N., Maurousset, L., Lemoine, R.: Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 717-728, 2001.
- Davis, J.M., Fellman, J.K., Loescher, W.H.:** Biosynthesis of sucrose and mannitol as a function of leaf age in celery (*Apium graveolens* L.). *Plant Physiol.* 86: 129-133, 1988.
- Doehlert, D.C., Huber, C.S.:** Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate and pH. *Plant Physiol.* 73: 989-994, 1983.
- Eberhardt, H.J., Wegmann, K.:** Effects of abscisic acid and proline adaptation of tobacco callus cultures to salinity and osmotic shock. *Physiol. Plant.* 76: 283-288, 1989.

- Everard, J.D., Cantini, C., Grumet, R., Plummer, J., Loescher, W.H.:** Molecular cloning of mannose-6-phosphate reductase and its developmental expression in celery. *Plant Physiol.* 113: 1427-1435, 1997.
- Everard, J.D., Franceschi, V.R., Loescher, W.H.:** Mannose-6-phosphate reductase, a key enzyme in photoassimilate partitioning, is abundant and located in the cytosol of photosynthetically active cells of celery (*Apium graveolens* L.) source leaves. *Plant Physiol.* 102: 345-356, 1993.
- Everard, J.D., Gucci, 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: 281-292, 1994.
- Everard, J.D., Kann, S.C., Loescher, W.H.:** Investigations into the salt tolerance of mannitol producer celery. *Plant Physiol.* 99: S-28, 1992.
- Fellman, J.K., Loescher, W.H.:** Comparative studies of sucrose and mannitol utilization in celery (*Apium graveolens*). *Physiol. Plntarum* 69: 337-341, 1987.
- Flora, L.L., Madore, M.A.:** Stachyose and mannitol transport in olive (*Olea europaea* L.). *Planta* 189: 484-490, 1993.
- Flowers, T.J., Troke, P.F., Yeo, A.R.:** The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 28: 89-121, 1977.
- Gao, Z., Loescher, W.H.:** NADPH supply and mannitol biosynthesis. Characterization, cloning, and regulation of the non-reversible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in celery leaves. *Plant Physiol.* 124: 321-330, 2000.
- Goddijn, O.J.M., van Dun, K.:** Trehalose metabolism in plants. *Trends in plant science* 4(8): 315-319.
- Guy, Ch.L., Huber, J.L., Huber, S.C.:** Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiol.* 100: 502-508, 1992.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M.C. (1990).** Citováno podle Shen, B., Jensen, R.G., Bohnert, H.J.: Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol.* 115: 527-532, 1997.
- Holmström, Kjell-Ove:** Engineering plant adaptation to water stress. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Science, 1997.
- Hu, H., Penn, S.G., Lebrilla, C.B., Brown, P.H.:** Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants. The mechanism of phloem mobility of boron. *Plant Physiol.* 113: 649-655, 1997.

- Huber, C.S., Israel, D.W.:** Biochemical basis for partitioning of photosynthetically fixed carbon between starch and sucrose in soybeans (*Glycine max* Merr.) leaves. *Plant Physiol.* 69: 691-696, 1982.
- Huber, C.S.:** Role of sucrose-phosphate synthase in partitioning of carbon in leaves. *Plant Physiol.* 71: 818-821, 1983.
- Jennings, D.B., Ehrenshaft, M., Pharr, D.M., Williamson, J.D.:** Role for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15129-15133, 1998.
- Karkas, B., Ozias-Akins, P., Stushnoff, C., Suefferheld, M., Rieger, M.:** Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell and Environment* 20: 609-616, 1997.
- Keller, F., Matile, P.:** Storage of sugars and mannitol in petioles of celery leaves. *New Phytol.* 113: 291-299, 1989.
- Keller, F., Matile, P.:** The role of the vacuole in storage and mobilization of stachyose in tubers of *Stachis sieboldii* J. *Plant Physiol.* 119: 369-380, 1985.
- Keller, F.:** Biochemistry and physiology of non-fructan sucrosyloligosaccharides and sugar alcohols in higher plants. *J. Plant Physiol.* 134: 141-147, 1989.
- Koch, K.E.:** Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 509-540, 1996.
- Leifert, C., Murphy, K.P., Lumsden, P.J.:** Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 14: 83-109, 1995.
- Leung, J., Giraudat, J. (1998).** Citováno podle Campalans, A., Messeuger, R., Goday, A., Pages, M.: Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 37 (5): 327-340, 1999.
- Lichtenthaler, H.K.:** Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148: 4-14, 1996.
- Lipavská, H., Vreugdenhil, D.:** Uptake of mannitol from media by in vitro plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 103-107, 1996.
- Liu, 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 Sci.* 134: 11-20, 1998.
- Loescher, W.H., Tyson, R.H., Everard, J.D., Redgwell, R.J., Bielecki, R.L.:** Mannitol synthesis in higher plants. *Plant Physiol.* 98: 1396-1402, 1992.

- Loescher, W.H.:** Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiol. Plant.* 70: 553-557, 1987.
- Lunn, J.E., Furbank, R.T.:** Sucrose biosynthesis in C₄ plants. *Tansley Review No.* 105. *New Phytol.* 143: 221-237, 1999.
- Lunn, J.E., MacRae, E.:** New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 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.
- McCue, K.F., Hanson, A.D.:** Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol.* 8: 358-362, 1990.
- McKersie, D.B., Leshem, Y.Y.:** *Stress and Stress Coping in cultivated plants*, 1994.
- Mittler, R.:** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7 (9): 405-410, 2002.
- Müller, J., Boller, T., Wiemken, A.:** Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci.* 112: 1-9, 1995.
- Munns, R.:** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250, 2002.
- Munns, R.:** Genes and salt tolerance: bringing them together. *Tansley review. New Phytol.* 167: 645-663, 2005.
- Murashige, T., Skoog, F.:** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497, 1962.
- Neto, V.B.de Paiva, Otoni, W.C.:** Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Scientia Horticulturae* 97: 193-202, 2003.
- Niknam, V., Bagherzadeh, M., Ebrahimzadeh, H., Sokhansanj, A.:** Effect of NaCl on biomass and contents of sugars, proline and proteins in seedlings and leaf explants of *Nicotiana tabacum* grown *in vitro*. *Biologia Plantarum* 48 (4): 613-615, 2004.
- Noiraud, N., Delrot, S., Lemoine, R.:** The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiol.* 122: 1447-1455, 2000.
- Noiraud, n., Maurousset, L., Lemoine, R.:** Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *The Plant Cell* 13: 695-705, 2001.
- Noiraud, N., Maurousset, L., Lemoine, R.:** Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 717-728, 2001.

- Opatrný, Z.:** Použití explantátových kultur v rostlinné genetice. Kandidátská disertační práce, 1971.
- Ouellet, F.:** Out of the cold: Unveiling the elements required for low temperature induction of gene expression in plants. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 396-403, 2002.
- Pattanagul, W., Madore, M.A.:** Water deficit Effects on Raffinose Family Oligosaccharide Metabolism in Coleus. *Plant Physiol.* 121: 987-993, 1999.
- Peterbauer, T., Richter, A.:** Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science research* 11: 185-197, 2001.
- 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.
- Pollock, C.J., Lloyd, E.J., Stoddard, J.L., Thomas, H.:** Growth, photosynthesis and assimilate partitioning in *Lolium temulentum* exposed to chilling temperatures. *Physiol. Plantarum* 59: 257-262, 1983.
- Prata, R.T.N., Williamson, J.D., Conkling, M.A., Pharr, D.M.:** Sugar repression of mannitol dehydrogenase activity in celery cells. *Plant Physiol.* 114: 307-314, 1997.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kolektiv:** Fyziologie rostlin. Academia Praha, 1998.
- Reed, R.H., Davison, I.R., Chudek, J.A., Foster, R. (1985).** Citováno podle Iwamoto, K., Shiariwa, Y.: Salt-regulated mannitol metabolism in algae. *Marine Biotechnology* 7: 407-415, 2005.
- Rejšková, A.:** Role sacharidů při navození odolnosti k abiotickým stresům u olivy (*Olea europaea* L.). Diplomová práce. Praha, 2003,
- Salerno, G.L., Curatti, L.:** Origin of sucrose metabolism in higher plants: When, how and why? *Trends in Plant Science* 8(2): 63-69, 2003.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.:** Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 194-199, 2003.
- Selye, H.:** A syndrome produced by various nocuous agents. (1936). Citováno podle McKersie, D.B, Leshem, Y.Y: *Stress and Stress Coping in cultivated plants*, 1994.

- Selye, H.:** Stress without distress (1975). Citováno podle McKersie, D.B, Leshem, Y.Y.: Stress and Stress Coping in cultivated plants, 1994.
- Sharma, Y.K., Leon, J., Raskin, I., Davis, K.R.:** Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5099-5104, 1996.
- Shen, B., Jensen, R.G., Bohnert, H.J.:** Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplast. Plant Physiol. 113: 1177-1183, 1997.
- Silvius, J.E., Chatterton, N.J., Kremer, D.F.:** Photosynthate partitioning in soybean leaves at two irradiance levels. Comparative responses of acclimated and unacclimated leaves. Plant Physiol. 64: 872-875, 1982.
- Singh, K.N., Chatrath, R.:** Salinity tolerance. www.plantstress.com.
- Smirnov, N.:** Plant resistance to environmental stress. Current Opinion in Biotechnology 9: 214 - 219, 1998.
- Smirnov, N.:** The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytol. 125: 27-58, 1993.
- Solomon, A., Beer, S., Waisel, Y., Jones, G.P., Paleg, L.G.:** Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of prolin-related compatible solutes. Physiol. Plantarum 90: 198-204, 1994.
- Sprenger, N., Keller, F.:** Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the role of two distinct galactinol synthases. The Plant Journal 21(3): 249-258, 2000.
- Stodůlková, E.:** Vliv exogenních sacharidů na růst *in vitro* pěstovaných rostlin celeru řapíkatého (*Apium graveolens*, var. *dulce* [Mill.] DC). Diplomová práce. Praha, 1997.
- 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 Physiol. 103: 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.:** Manitol metabolism in plants: a model for coping with stress. Trends Plant Sci 1: 139-144, 1996.

- Tarczynsky, M.C., Jensen, R.G., Bohnert, H.J.:** Expression of a bacterial mt1D gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2600-2604, 1992.
- Tattini, M., Gucci, R., Romani, A., Baldi, A., Everard, J.D.:** Changes in non-structural carbohydrates in olive (*Olea europaea*) leaves during root zone salinity stress. Physiol. Plant. 98: 117-124, 1996.
- Teiz, L., Zeiger, E.:** Plant physiology, chapter Stress Physiology: 607-608, 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.
- Vítová, L., Stodůlková, E., Bartoničková, A., Lipavská, H.:** Mannitol utilisation by celery (*Apium graveolens*) plants grown under different conditions in vitro. Plant Science 163: 907-916, 2002.
- Vogel, G., Aeschbacher, R.A., Müller, J., Boller, T., Wiemken, A.:** Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: Identification by functional complementation of the yeast tps mutant. Plant J. 13: 673-683, 1998.
- Wallaart, R.A.:** Distribution of sorbitol in *Rosaceae*. Phytochemistry 19: 2603-2610, 1980.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A.:** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Toward genetic engineering for stress tolerance. Planta (2003) 218: 1-14.
- Wang, Z., Quebedeaux, B., Stutte, G.W.:** Partitioning of [¹⁴C] glucose into sorbitol and other carbohydrates in apple under water stress. Aust. J. Plant Physiol. 23: 245-251, 1996.
- Webb, K.L., Burley, J.W.A.:** Sorbitol translocation in apple. Science 137: 776, 1962.
- Williamson, J.D., Jennings, D.B., Guo, Wei-Wen, Pharr, D.M.:** Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: Polyols-multifunctional plant protection?J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127(4): 467-473, 2002.
- Wrzaczek, M., Hirt, H.:** Plant MAP kinase: how many and what for? Biology of the Cell 93: 81-87, 2001.
- Xiong, L., Zhu, J.K.:** Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant, Cell and Environment 25: 131-139, 2002.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., Zhu, J-K.:** Cell signaling during cold, drought and salt stress. Plant Cell 165-183, 2003.

- Yamamoto, Y.T., Zamski, E., Williamson, J.D., Conkling, M.A., Pharr, D.M.:** Subcellular localization of celery mannitol dehydrogenase. *Plant Physiol.* 115: 1397-1403, 1997.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N.:** Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science, New Series* 217: 1214-1222, 1982.
- Zamski, E., Guo, W., Yamamoto, Y.T., Pharr, D.M., Williamson, J.D.:** Analysis of celery (*Apium graveolens*) mannitol dehydrogenase (Mtd) promoter regulation in *Arabidopsis* suggest roles for MTD in key environmental and metabolic responses. *Plant Molecular Biology* 47: 621-631, 2001.
- Zhang, F., Yang, 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 Cell. Dev. Biol.-Plant* 40: 491-494, 2004.
- Zhu, Jian-Kang:** Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6(2): 66-71, 2001.
- Zhu, Jian-Kang:** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 441-445, 2003.
- Zimmermann, M.H., Ziegler, H.:** List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. –In *Encyklopedia of Plant Physiology, New Series* (Zimmermann, M.H., Milburn, J.A., eds) 1: 480-503, Springer-Verlag, New York. ISBN 3-540-07314-0.