



Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
Hroznová 2, 656 06 Brno

v y d á v á
OSVĚDČENÍ

(78-13/KÚ-SŘÚ/UKZUZ/2013)

o uznání uplatněné certifikované metodiky
v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“

Název metodiky:

**„METODIKA STANOVENÍ ODOLNOSTI ROSTLIN
VŮČI VYŠŠÍM TEPLITÁM“**

Autoři:

*Prof. RNDr. Petr Ilík, Ph.D., RNDr. Martina Špundová, Ph.D.,
RNDr. Pavel Krchňák, Ph.D.*

Název organizace:

*Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum;
Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci*

Místo vydání metodiky:

Univerzita Palackého v Olomouci, Křížkovského 8, 771 47 Olomouc

*Metodika byla zpracována v rámci řešení výzkumného projektu č. TA01010254
„Vývoj metody a konstrukce přístroje pro rychlé monitorování vysokoteplotní
stability rostlin“.*

Brno 19. 11. 2013

(Jméno a funkce zástupce odborného útvaru státní správy): **Bc. Zdeněk Mach**
ředitel ústavu

(Podpis zástupce odborného útvaru státní správy):

(Razítko odborného orgánu státní správy):



METODIKA STANOVENÍ ODOLNOSTI ROSTLIN VŮČI VYŠŠÍM TEPLOTÁM

Petr Ilík, Martina Špundová, Pavel Krchňák,

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká
fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Autoři:

prof. RNDr. Petr Ilík, Ph.D. – podíl na metodice: 50 %

RNDr. Martina Špundová, Ph.D. – podíl na metodice: 35%

RNDr. Pavel Krchňák, Ph.D. – podíl na metodice: 15 %

Dedikace

Metodika byla vypracována a je uplatněna jako výsledek projektu TAČR č.
TA01010254 „Vývoj metody a konstrukce přístroje pro rychlé monitorování
vysokoteplotní stability rostlin“.

Oponenti

Ing. Tomáš Mezlík

Ústřední kontrolní a zkušební úřad zemědělský

Sekce rostlinné výroby

Hroznová 63/2

656 06 Brno

doc. RNDr. Vladimír Špunda, CSc.

Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity

Katedra fyziky

30. dubna 22

701 03 Ostrava

OBSAH

I) CÍL METODIKY	3
II) VLASTNÍ POPIS METODIKY.....	3
II.1 Úvod	3
II.2 Vliv vyšších teplot na rostliny	4
II.3 Princip metody	5
II.4 Postup měření	7
II.5 Příklady využití	10
II.5.1 Stanovení míry indukované odolnosti rostlin vůči vyšším teplotám	10
II.5.2 Stanovení míry konstitutivní odolnosti rostlin vůči vyšším teplotám	13
II.6 Závěr	13
III) SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	14
IV) POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	16
V) EKONOMICKÉ ASPEKTY	16
VI) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	17
VII) SEZNAM SOUVISEJÍCÍCH PUBLIKACÍ (VÝSTUPŮ)	18

I) CÍL METODIKY

Cílem metodiky bylo vyvinout rutinní metodu, která by zjednodušila a urychlila postup při stanovení odolnosti rostlin vůči vyšším teplotám. Snahou bylo eliminovat jednu z hlavních nevýhod klasických („ion-leakage“) metod stanovení termostability rostlin spočívající v nutnosti aplikace stresu vyšší teplotou a v potřebě nalezení optimální kombinace výše teploty a doby jejího působení. Předkládaná metodika umožňuje stanovení termostability rostlinného materiálu bez jakýchkoliv dalších procedur a manipulací s testovaným vzorkem. Metodika využívá lineárního ohřevu rostlinného vzorku, během kterého je současně měřena tzv. minimální chlorofylová fluorescence F_0 a měrná vodivost média, ve kterém je vzorek ponořen. Měřené parametry odrážejí vysokoteplotní stabilitu jak plazmatické, tak tylakoidní membrány chloroplastů. K měření předkládanou metodikou byl navržen a zkonstruován přístroj PlanTherm (Photon Systems Instruments, Brno), který je v současné době komerčně dostupný.

II) VLASTNÍ POPIS METODIKY

II.1 Úvod

V důsledku globálních klimatických změn dochází v poslední době ke zvyšování průměrné roční teploty a k častějšímu výskytu teplotních extrémů. V této souvislosti nabývá na významu problematika odolnosti rostlin vůči působení vyšších teplot. Snahou šlechtitelů a zemědělců je získání odrůd s vysokou termostabilitou, ať už pomocí klasického šlechtění nebo pomocí genových manipulací. Další možností zvyšování termostability rostlin je aplikace speciálních látek (například glycin betainu nebo fytohormonů).

Potřeba zvyšování termostability rostlin klade vyšší nároky na metodiku jejího stanovení. V současné době je odolnost rostlin vůči vyšším teplotám nejčastěji určována pomocí metody "ion-leakage": rostlinný materiál je umístěn do deionizované vody, vystaven působení vyšší teploty a poté je změřena měrná vodivost. Hodnota měrné vodivosti odpovídá množství iontů, které se z rostlinného materiálu uvolní přes buněčné membrány, jejichž celistvost je porušena zmíněným vysokoteplotním působením. Měrná vodivost je zpravidla vyjadřována v % maximální měrné vodivosti, která se měří po povaření nebo zmrazení a rozmrazení vzorku (Prášil a Zámečník 1990), při kterém dochází k úplné dezintegraci buněčných membrán a maximálnímu výtoku iontů do média.

Jedním z hlavních nedostatků metody "ion-leakage" je nutnost výběru vhodných teplot a doby jejich působení, což vyžaduje předběžná testovací měření a metoda je tudíž časově náročná. Ve většině srovnávacích studií je vybírána pouze jedna vyšší teplota a jedna doba působení, které se v jednotlivých studiích zpravidla liší, což stěžuje případně znemožňuje srovnání rostlinného materiálu testovaného v různých studiích. Dalším nedostatkem metody „ion-leakage“ je riziko zapojení aklimačních procesů vůči vysoké teplotě, což může zkreslit určení konstitutivní teplotní odolnosti. Zejména při delším vysokoteplotním působení lze očekávat rozdílné zastoupení aklimačních procesů u srovnávaných druhů, odrůd či genových linií a zkreslení výsledků.

Cílem předkládané metodiky bylo výrazně zjednodušit a urychlit klasickou metodu „ion-leakage“ pro stanovení vysokoteplotní stability rostlin. Pomocí přístroje PlanTherm (Photon Systems Instruments, Brno), který byl za tímto účelem vyvinut a zkonstruován, a který využívá lineárního ohřevu vzorku, lze stanovit vysokoteplotní odolnost rostlinného materiálu bez předchozího působení vyšší teploty (toto působení je nahrazeno právě lineárním ohřevem). Během lineárního ohřevu je současně měřena minimální chlorofylová fluorescence F_0 listového vzorku a měrná vodivost média, ve kterém je vzorek ponořen. Předkládaná metodika umožňuje díky měření těchto dvou parametrů stanovení vysokoteplotní stability jak plazmatické, tak tylakoidní membrány chloroplastů během jednoho lineárního ohřevu.

II.2 Vliv vyšších teplot na rostliny

Reakce rostlin na vyšší teploty je velmi komplexní (např. review Mittler a kol. 2012), přičemž závisí na výši teploty, době působení a rychlosti nárůstu teploty. Při působení vyšších teplot dochází v rostlinách k anatomickým, fyziologickým a biochemickým změnám, které ovlivňují růst a vývoj rostlin a mohou vést k výraznému poklesu výnosu u plodin. Velmi vysoké teploty způsobují už po několika minutách výrazné až letální poškození rostlinných buněk v důsledku degradace buněčných membrán a biomolekul. Při středně vysokých teplotách dochází k inhibici funkce a k poškození struktury proteinů a k nárůstu fluidity buněčných membrán spojenému s nárůstem jejich propustnosti pro ionty (např. Horvath a kol. 2012). Změny propustnosti membrán pro ionty jsou podstatou „ion-leakage“ metod (např. Ibrahim a Quick 2001).

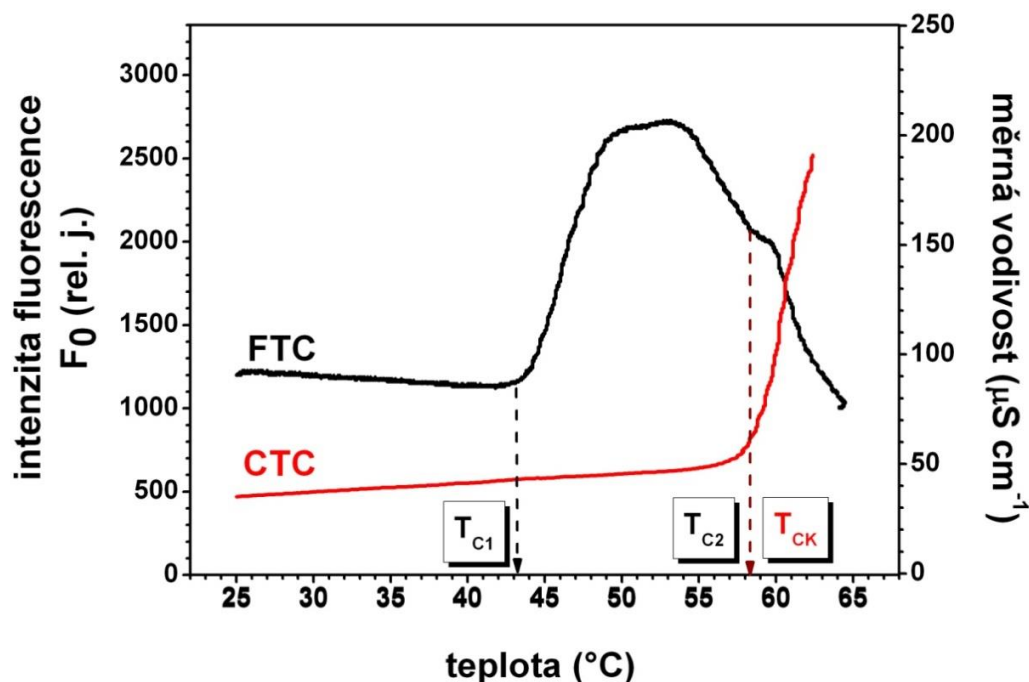
Jedním z procesů nejcitlivějších k působení vyšších teplot je fotosyntéza, a to jak její primární fáze probíhající na tylakoidních membránách, tak fáze fixace CO_2

probíhající ve stromatu chloroplastů. Citlivost fotosyntézy k vyšší teplotě je využívána k testování termotolerance rostlin pomocí měření fotosyntetických parametrů. Jako velmi efektivní se jeví neinvazivní monitorování (na celých listech) účinnosti primárních reakcí fotosyntézy pomocí parametrů fluorescence chlorofylu (např. Maxwell a Johnson 2000). Například nárůst tzv. minimální fluorescence F_0 při lineárním ohřevu listů, který odráží pokles fotochemické účinnosti fotosystému II v tylakoidních membránách chloroplastů, byl několikrát úspěšně použit k monitorování vysokoteplotní stability rostlin (např. Bilger a kol. 1984, Havaux 1992, Lazár a Ilík 1997).

V rostlinách existují mechanismy, které jim umožňují přežít působení vyšších teplot. Můžeme je rozdělit na fenologické a morfologické adaptační mechanismy, které určují přirozenou (konstitutivní) termotoleranci rostlin, a na aklimační mechanismy, které jsou podstatou tzv. indukované (získané) termotolerance. Mezi nejdůležitější mechanismy indukované termotolerance patří syntéza tzv. „heat-shock“ proteinů (např. review Kotak a kol. 2007) a změna složení buněčných membrán, které vedou k udržení funkce proteinů a membrán a tedy k zachování základních buněčných procesů i při zvýšené teplotě.

II.3 Princip metody

Předkládaná metodika stanovení odolnosti rostlin vůči vyšším teplotám je založena na lineárním ohřevu rostlinného vzorku ponořeného v médiu (deionizovaná voda). Rychlost lineárního ohřevu je volena mezi 1 – 2 °C za minutu v teplotním rozsahu 25 – 65 (75) °C. Při lineárním ohřevu je kontinuálně měřena minimální chlorofylová fluorescence F_0 rostlinného vzorku (listu) a měrná vodivost média, ve kterém je vzorek umístěn. Parametr F_0 odráží termostabilitu tylakoidních membrán, změny v měrné vodivosti pak termostabilitu plazmatické membrány. S nárůstem teploty dochází k typickému průběhu F_0 (tzv. FTC) charakterizovanému dvěma kritickými teplotami (T_{C1} , T_{C2} - Obr. 1), který odráží postupný pokles účinnosti fotochemických procesů a stabilitu tylakoidních membrán (Havaux 1992, Lazár a Ilík 1997).



Obr. 1 Typická závislost intenzity fluorescence F_0 (FTC) a měrné vodivosti (CTC) na teplotě při lineárním ohřevu listu ječmene v deionizované vodě. Šipky označují kritické teploty T_{C1} , T_{C2} a T_{CK} . Rychlost ohřevu byla $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Měrná vodivost s rostoucí teplotou nejprve mírně roste, při určité (kritické) teplotě (T_{CK}) pak dochází k jejímu výraznému nárůstu (CTC – Obr. 1), který odráží masivní uvolňování iontů z rostlinných buněk do média v důsledku poškození plazmatické membrány. Zmíněná kritická teplota T_{CK} odpovídá teplotě druhého maxima FTC – T_{C2} , které je dáváno do souvislosti s denaturací proteinových komplexů obsahujících chlorofyl a uvolněním chlorofylů (Lípová a kol. 2010). Je pravděpodobné, že vysokoteplotní dezintegrace pigment-proteinových komplexů v chloroplastech souvisí s hypotonickým šokem způsobeným vysokoteplotní dezintegrací plazmalemy v deionizované vodě. Během jednoho lineárního ohřevu listu je tedy možné získat trojici kritických teplot charakterizujících termostabilitu funkce a integrity tylakoidních membrán (T_{C1} , T_{C2}) a termostabilitu plazmatické membrány (T_{CK}). Při použití stejné rychlosti ohřevu mohou být tyto kritické teploty použity jako indikátory vysokoteplotní stability rostlin. Průběh křivek CTC a FTC a hodnoty kritických teplot závisejí na rychlosti lineárního ohřevu, při srovnávání různých rostlinných vzorků je tedy nutné použít stejnou rychlost ohřevu.

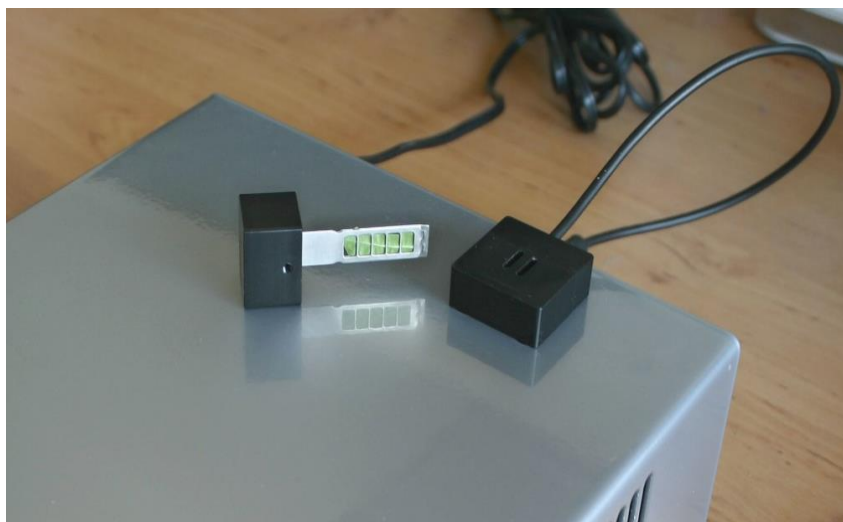
II.4 Postup měření

Postup měření je velmi jednoduchý. Ke stanovení odolnosti rostlin vůči vyšším teplotám je použit přístroj PlanTherm (Photon Systems Instruments, Brno; Obr. 2), který umožňuje současné měření minimální chlorofylové fluorescence F_0 a měrné vodivosti média při lineárním ohřevu. V ovládacím programu k přístroji je třeba nastavit rychlost ohřevu (zpravidla 1 – 2 °C za minutu) a teplotní rozsah (zpravidla 25 – 70 °C).

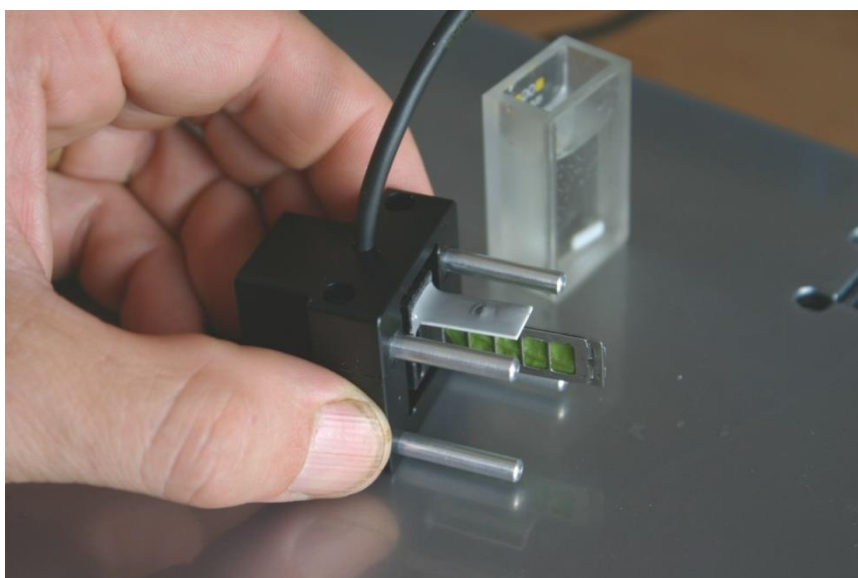


Obr. 2 Přístroj PlanTherm (Photon Systems Instruments, Brno) použitý ke stanovení vysokoteplotní stability rostlin.

Před měřením minimální fluorescence F_0 je rostliny nutné zatemnit minimálně na 15 min. Pokud je měřena pouze měrná vodivost, není nutné rostliny zatemňovat. Z listu se poté oddělí segment o velikosti přibližně 5 x 20 mm; v případě menších listů – např. *Arabidopsis* – je možné použít celý list. Vzhledem k principu metody není u segmentů nutné zachovávat stejnou řeznou plochu: v případě, že je řezná plocha větší a tudíž únik iontů z buněk na řezu do média větší, počáteční hodnota měrné vodivosti je větší, nicméně hodnota kritické teploty T_{CK} , na základě které je posuzována vysokoteplotní stabilita rostliny, není ovlivněna.



Obr. 3 Držák vzorku s listovým segmentem používaný přístrojem PlanTherm.



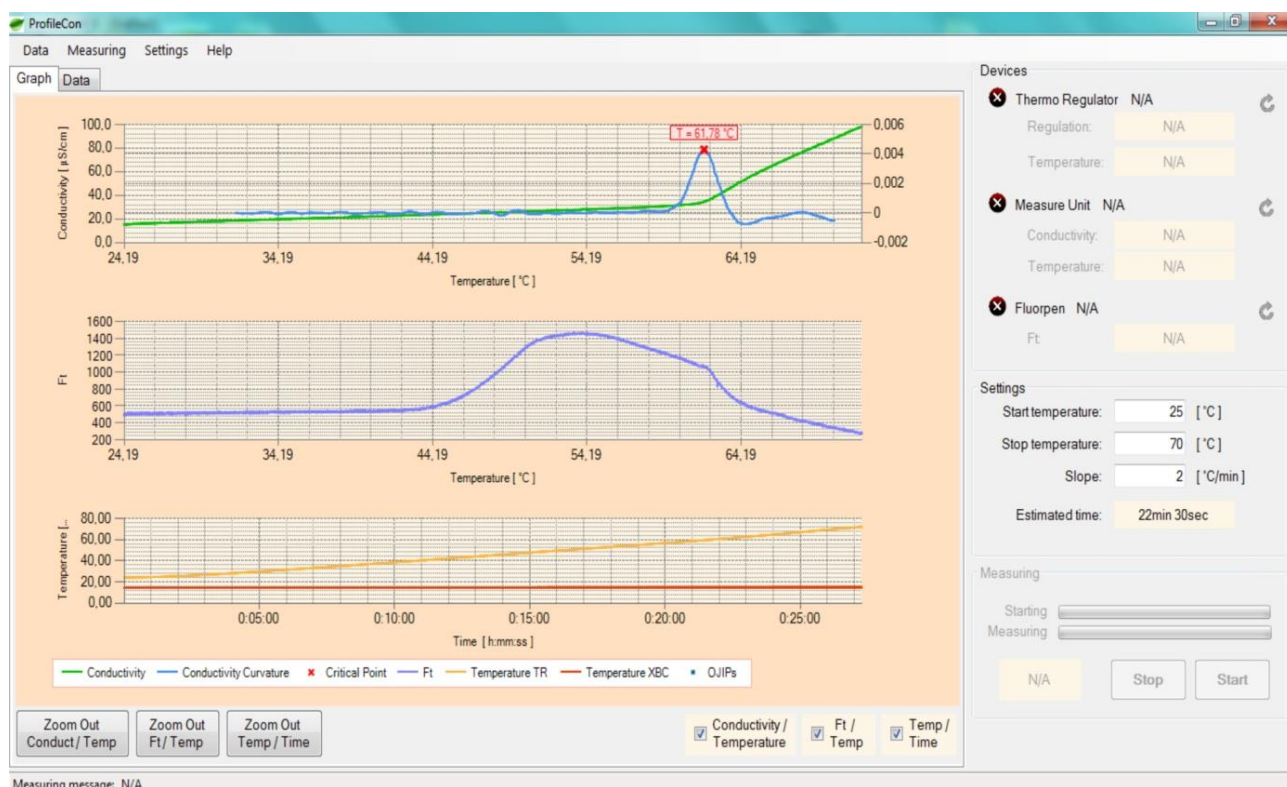
Obr. 4 Držák vzorku s listovým segmentem umístěný v hlavici s vodivostním čidlem a kyveta s deionizovanou vodou před vložením do měřicího prostoru přístroje PlanTherm.

Oddělený segment je vložen do držáku vzorku (Obr. 3), ten do hlavice s vodivostním senzorem (Obr. 4) a hlavice pak do kyvety s deionizovanou vodou, která se vloží do měřicího prostoru přístroje. Následně je spuštěna automatická měřicí procedura. Průběh měření lze sledovat v ovládacím programu, ve kterém se zobrazuje: hodnota měrné vodivosti v závislosti na teplotě, hodnota minimální fluorescence F_0 v závislosti na teplotě a hodnota teploty v závislosti na čase (Obr. 5). Program umožňuje automatické vyhodnocení kritické teploty T_{CK} (Obr. 5 - nahoře)

jako teploty v čase, ve kterém má křivka závislosti měrné vodivosti na teplotě maximální křivost. Křivost K v čase t je počítána z časové závislosti naměřené měrné vodivosti podle vztahu:

$$K(t) = \left| \frac{\ddot{x}(t)}{\sqrt[3]{(1 + \dot{x}(t)^2)^3}} \right|$$

a lze ji také při měření sledovat v ovládacím programu (Obr. 5). Po vyjmutí změřeného vzorku, opláchnutí držáku vzorku, vodivostního čidla a kyvety a po výměně deionizované vody v kyvetě je aparatura připravena k měření dalšího vzorku. Při rychlosti ohřevu 2 °C za minutu z 25 °C na 70°C trvá procedura 22,5 minuty.

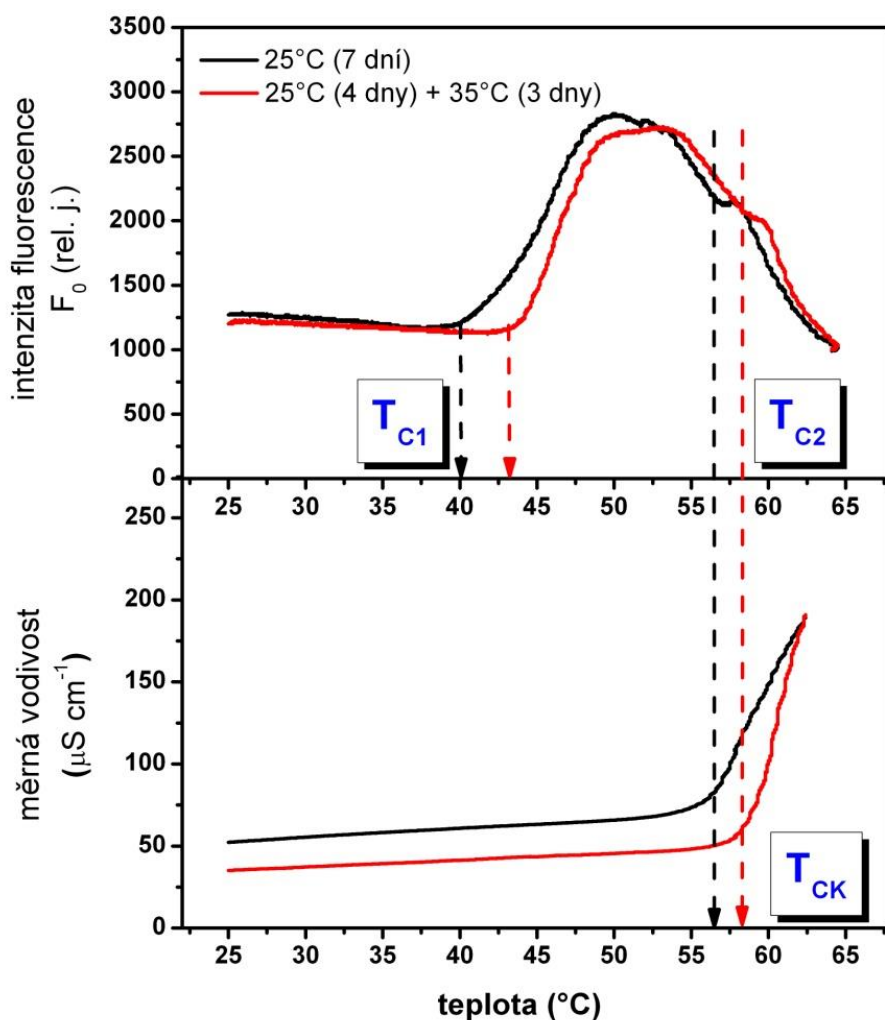


Obr. 5 „Printscreen“ ovládacího programu přístroje PlanTherm s on-line znázorněním měrné vodivosti v závislosti na teplotě (zeleně), derivace měrné vodivosti podle času (světle modře) s vyznačením maxima odpovídajícího kritické teplotě T_{CK} , minimální fluorescence F_0 v závislosti na teplotě (tmavě modře) a teploty v závislosti na čase (žlutě).

II.5 Příklady využití

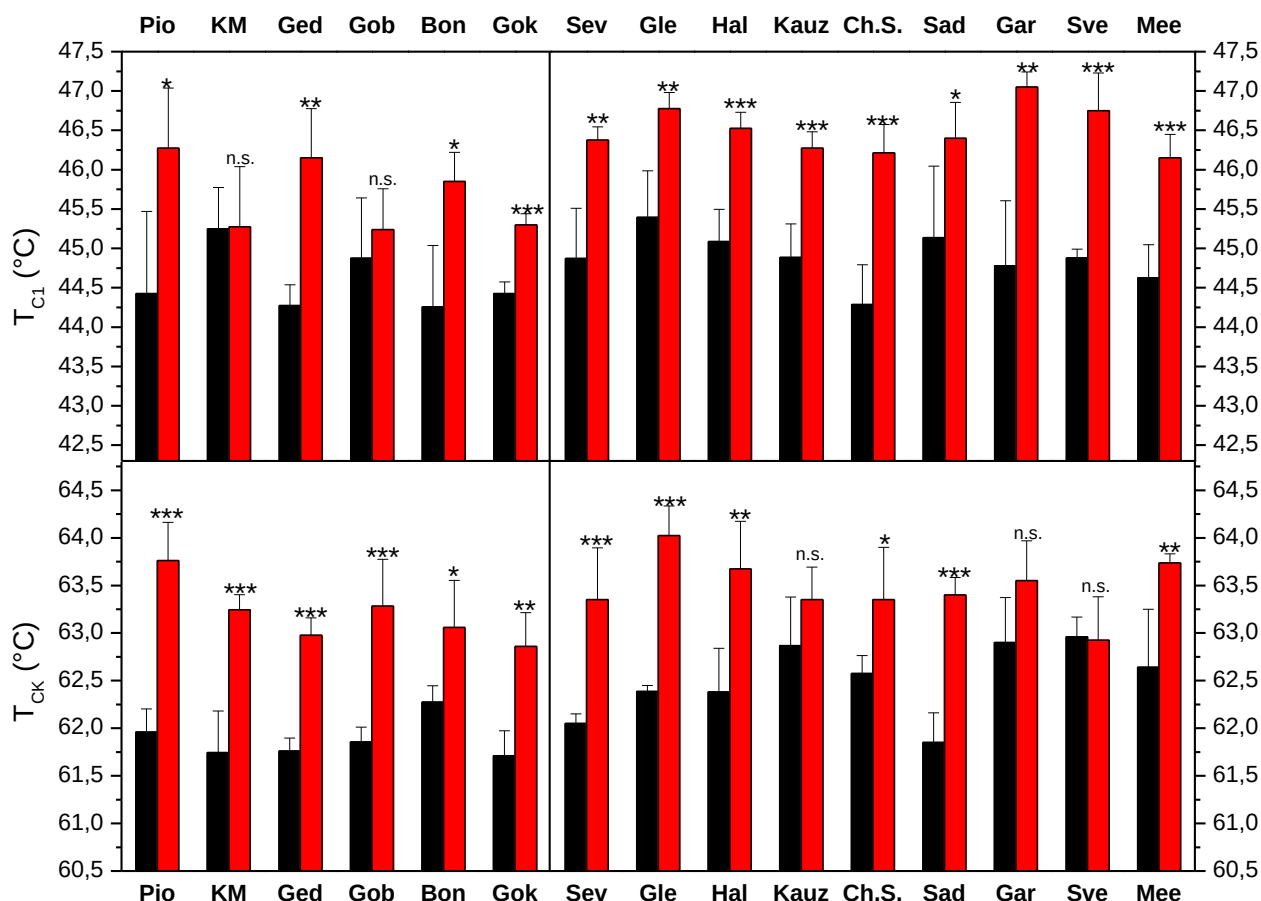
II.5.2 Stanovení míry indukované odolnosti rostlin vůči vyšším teplotám

Metodika se osvědčila při posuzování míry indukované odolnosti rostlin vůči vyšším teplotám. Při působení vyšších teplot zpravidla dochází k aklimaci rostlin na vyšší teplotu, která je spojená s nárůstem termostability buněčných membrán. Nárůst termostability membrán se projeví posunem kritických teplot v křivkách FTC a CTC k vyšším hodnotám. Čím vyšší je míra aklimace, tím větší posun lze pozorovat.



Obr. 6 Křivky závislosti intenzity fluorescence F_0 (FTC) a měrné vodivosti (CTC) na teplotě při lineárním ohřevu (rychlostí $1\ ^\circ C\ min^{-1}$) primárních listů ječmene jarního kontrolních rostlin (pěstovaných při teplotě $25\ ^\circ C$, černě) a rostlin aklimovaných na zvýšenou teplotu ($35\ ^\circ C$) po dobu 3 dnů (červeně).

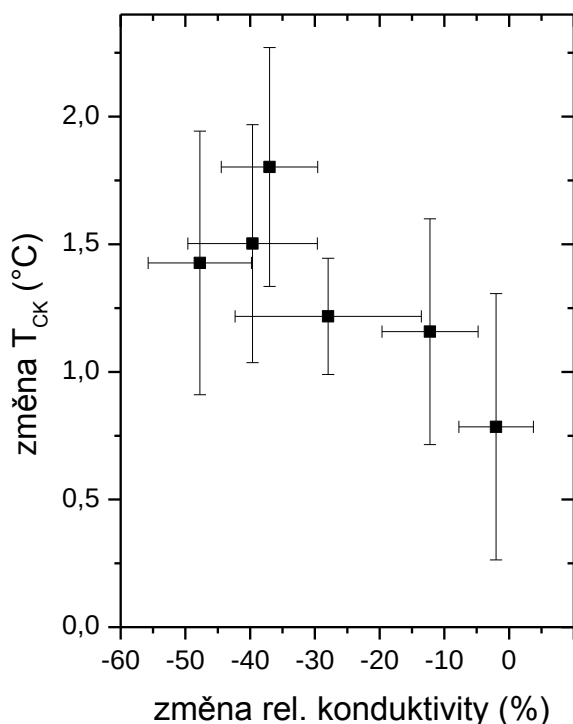
Na Obr. 6 jsou uvedeny křivky FTC a CTC u kontrolních a aklimovaných rostlin ječmene jarního: rostliny původně pěstované při 25 °C byly po 3 dny vystaveny působení zvýšené teploty 35 °C. K měření byly použity primární listy. Z Obr. 6 je zřejmé, že v tomto konkrétním případě se aklimace rostlin ječmene na zvýšenou teplotu projevila posunem kritických teplot T_{Cl} , T_{C2} a T_{CK} přibližně o 2 – 3 °C, což odráží zvýšení termostability jak tylakoidních membrán, tak membrány plazmatické.



Obr. 7 Hodnoty T_{Cl} a T_{CK} před (černé sloupce) a po aklimaci rostlin (červené sloupce) vybraných odrůd pšenice na zvýšenou teplotu. První skupina odrůd (ozimé pšenice - levá část grafu) byla vystavena zvýšené teplotě 33 °C, druhá skupina (pravá část grafu) teplotě 30 °C po dobu 3 dnů. Měřeno na druhých listech rostlin ve fázi 4. – 5. listu. Pio – Piopio 4 (Mexiko), KM – KM 55-09 LG (ČR), Ged – Gedania (Polsko), Gob – Gobustan (Azerbajdžán), Bon – Bona Vita (Slovensko), Gok – Goksu (Turecko). Sev – Sever (Portugalsko), Gle – Glenlea (Kanada), Hal – Halberd (Rakousko), Kauz – Kauz „S“ (34) (Mexiko), Ch. S. – Chinese Spring (Čína), Sad – Sadovo I (Bulharsko), Gar – Gargano (Itálie), Sve – Svevo (Itálie), Mee – Meering (Rakousko). Uvedeny průměry a SD (n = 5). ***, **, * - statisticky významný rozdíl mezi neaklimovanými a aklimovanými rostlinami dané odrůdy na hladině významnosti 0,001; 0,01 a 0,05; n. s. – nesignifikanční rozdíl.

Na Obr. 7 jsou prezentovány hodnoty T_{C1} a T_{CK} rostlin vybraných odrůd pšenice před aklimací a po aklimaci na zvýšenou teplotu. Experiment probíhal ve dvou modifikacích: první skupina odrůd (ozimé pšenice - levá část grafu) byla vystavena zvýšené teplotě 33°C (původní pěstební teplota byla 25°C), druhá skupina (pravá část grafu) teplotě 30°C (původní pěstební teplota byla také 25°C) po dobu 3 dnů. K měření byly použity 2. listy. Je zřejmé, že aklimace rostlin na zvýšenou teplotu byla i v tomto případě doprovázena nárůstem obou kritických teplot (T_{C1} i T_{CK}), který byl u převážné většiny testovaných odrůd statisticky významný.

Aklimace rostlin pšenice se projevila také změnou relativní konduktivity měřené metodou „ion-leakage“: zvýšení termostability plazmatické membrány zmírnilo její poškození vyvolané působením vyšší teploty (50 °C), výtok iontů z buněk do média byl tedy menší a relativní konduktivita byla tudíž u aklimovaných listů nižší v porovnání s listy měřenými před aklimací. Na Obr. 8 jsou znázorněny uvedené změny relativní konduktivity společně se změnami kritické teploty T_{CK} u odrůd ozimé pšenice z Obr. 7. Při stanovení relativní konduktivity metodou „ion-leakage“ byla použita 80-ti minutová inkubace listových vzorků ve zvýšené teplotě 50 °C. Z Obr. 8 je patrná tendence, že čím více relativní konduktivita vlivem aklimace poklesla, tím více narostla T_{CK} .



Obr. 8 Změny T_{CK} a relativní konduktivity měřené metodou „ion-leakage“ způsobené aklimací rostlin vybraných odrůd ozimé pšenice na zvýšenou teplotu. Rostliny byly vystaveny zvýšené teplotě 33 °C po dobu 3 dnů a při stanovení relativní konduktivity metodou „ion-leakage“ byly listy inkubovány 80 min při teplotě 50 °C. Měřeno na druhých listech rostlin ve fázi 4. – 5. listu. Uvedeny průměry a SD (n = 3 – 5).

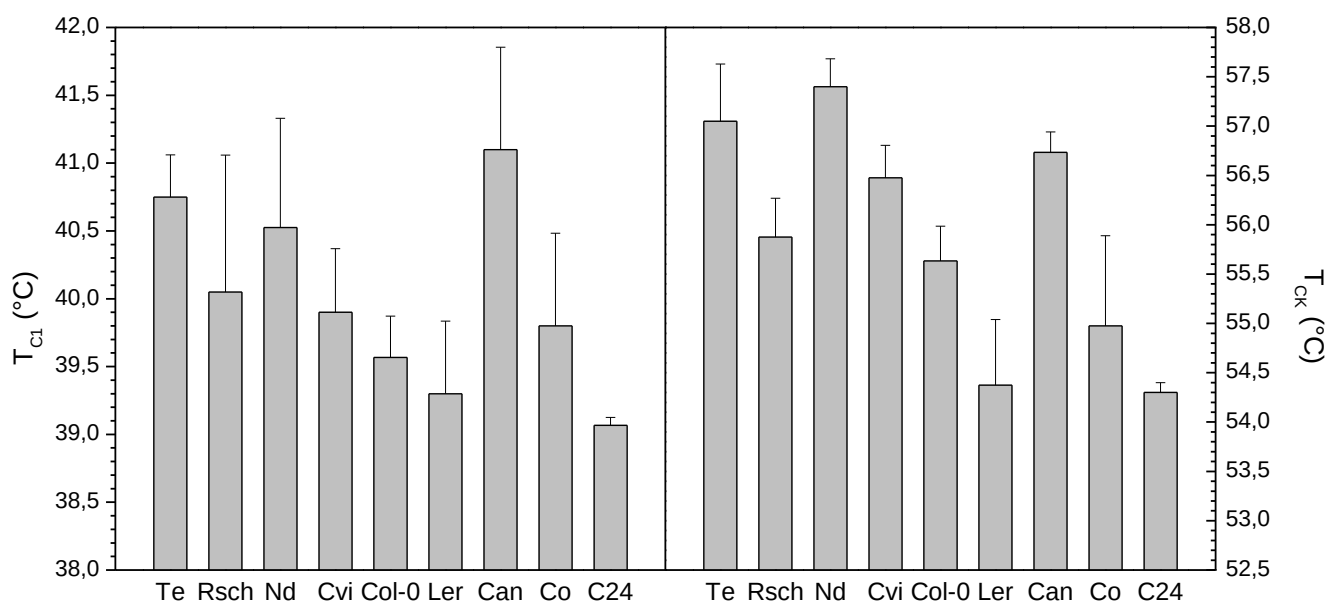
Z výsledků vyplývá, že předkládaná metodika může nahradit metodu „ion-leakage“, přičemž se značně zjednoduší celková měřicí procedura. Problém metody „ion-leakage“ spočívající v nutnosti výběru vhodné teploty a doby vysokoteplotního působení se prohlubuje právě v případě testování aklimace rostlin na vyšší teploty: tím, že se při aklimaci mění termostabilita membrán, mění se i „optimální“ parametry metody „ion-leakage“: doba a teplota vybraná a použita pro neaklimované vzorky nemusí být vhodná pro vzorky aklimované.

II.5.2 Stanovení míry konstitutivní odolnosti rostlin vůči vyšším teplotám

Metodiku lze použít také ke stanovení konstitutivní (přirozené) odolnosti rostlin vůči vyšším teplotám bez nutnosti aplikace stresu vyšší teplotou. Na Obr. 9 jsou prezentovány hodnoty T_{C1} a T_{CK} u 9 typů rostlin *Arabidopsis thaliana*, u kterých byla zjištěna různá míra tolerance k nízkým teplotám (Hannah a kol. 2006). I když byly rostliny vypěstovány při stejných podmínkách, hodnoty T_{C1} a T_{CK} se u jednotlivých typů lišily, což svědčí o jejich různé toleranci také k vyšším teplotám. Typy *Arabidopsis* jsou v Obr. 6 seřazeny podle míry konstitutivní tolerance vůči nízkým teplotám (Te – nejvyšší tolerance, C24 – nejnižší tolerance): lze vysledovat, že u většiny typů s větší tolerancí k nízkým teplotám (Te, Nd, Cvi) byly hodnoty T_{C1} a T_{CK} vyšší (a tedy tolerance k vyšším teplotám větší) než u většiny typů s nižší tolerancí k nízkým teplotám (Ler, Co, C24). Z Obr. 9 je zřejmé, že hodnoty T_{C1} a T_{CK} si v rámci daného typu *Arabidopsis* odpovídaly: pokud byla vyšší (nižší) hodnota T_{C1} , byla vyšší (nižší) i hodnota T_{CK} . Tato skutečnost poukazuje na spojitost mezi termostabilitou tylakoidní a plazmatické membrány.

II.6 Závěr

Prezentované výsledky získané použitím předkládané metodiky demonstrují použitelnost metodiky pro stanovení termostability rostlin a možnost jejího použití místo klasické metody „ion-leakage“. Použití předkládané metodiky je výhodné zejména v případě testování indukované termostability rostlin. Při aplikaci zvýšené teploty zpravidla dochází k aklimaci rostlin včetně nárůstu termostability membrán, což komplikuje výběr vhodné teploty a doby vysokoteplotního působení používaný v metodě „ion-leakage“.



Obr. 9 Hodnoty T_{ci} a T_{ck} naměřené u 9 typů *Arabidopsis thaliana* s různou mírou konstitutivní tolerance (seřazeno zleva doprava od největší po nejmenší míru tolerance) vůči nízkým teplotám (Hannah a kol. 2006): Te – Tenela, Finsko; Rsch – Rschew, Rusko; Nd – Niederzenz, Německo; Cvi – Cape Verde Islands; Col-0 – Columbia 0, odvozená od Guckingham, Německo; Ler – Landsberg *erecta*, Polsko; Can – Canary Islands; Co – Coimbra, Portugalsko; C24 – Portugalsko. Rostliny byly vypěstovány za stejných podmínek. Uvedeny průměry a SD ($n = 4$).

III) SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

V současné době je odolnost rostlin vůči vyšším teplotám nejčastěji určována pomocí metody "ion-leakage": rostlinný materiál je umístěn do deionizované vody, vystaven definovanému působení vyšší teploty (např. 50 °C) a poté je změřena měrná vodivost, která odráží míru propustnosti buněčných membrán pro ionty. Aby bylo možné porovnávat různé vzorky mezi sebou, je potřeba měrnou vodivost vyjádřit v % maximální měrné vodivosti, která se měří po poškození nebo zmrazení a rozmrazení vzorku, při kterém dochází k úplné dezintegraci buněčných membrán a maximálnímu výtoku iontů do média.

Metoda "ion leakage" má řadu nedostatků. Prvním z nich je poměrně velká časová náročnost měření: po působení vyšší teploty je nutné čekat desítky minut až hodiny na ustálení rovnováhy iontů mezi pletivem a médiem (Prášil a Zámečník 1990, 1998). Časovou náročnost metody dále zvyšuje procedura úplné dezintegrace

membrán zmíněná výše. Časově nejnáročnější je však nalezení vhodných vyšších teplot a doby jejich působení u konkrétního rostlinného materiálu, které vyžaduje řadu předběžných testovacích měření. To představuje problém zejména v případě testování indukované termostability rostlin, kdy se v rámci aklimace rostlin na vyšší teploty mění termostabilita membrán a vyšší teplota a doba jejího působení, která je optimální u neaklimovaných vzorků, nemusí být vyhovující u vzorků aklimovaných. Ve většině srovnávacích studií je z důvodu časové náročnosti vybírána pouze jedna vyšší teplota a jedna doba působení. V různých studiích se vybrané doby a teploty působení liší, což znesnadňuje porovnávání rostlin použitých v těchto studiích.

Dalším nedostatkem metody „ion-leakage“ je riziko zapojování aklimačních procesů působících v rostlinách proti účinkům působení vyšší teploty, což může zkreslit určení konstitutivní teplotní odolnosti. Rozdílné zastoupení aklimačních procesů lze očekávat u srovnávaných druhů, odrůd či genových linií zejména při delších vysokoteplotních působeních.

Předkládaná metodika výrazně zjednodušuje a urychluje klasickou metodu „ion-leakage“ pro stanovení vysokoteplotní stability rostlin. Principiálně „novým postupem“ je použití lineárního ohřevu média s rostlinným vzorkem a měření parametrů odrážejících poškození membrán v průběhu tohoto lineárního ohřevu. Během ohřevu z pokojové teploty (25 °C) na teplotu kolem 65 °C dochází k narušení celistvosti plazmatické membrány a vylití iontů z cytoplazmy buněk do ohřevného média (deionizované vody). Nepřetržitým měřením měrné vodivosti média během ohřevu lze zjistit (kritickou) teplotu, při které dochází k masivnímu uvolnění iontů z rostlinných buněk odrážejícímu vysokoteplotní dezintegraci plazmatické membrány. Při stejné rychlosti ohřevu lze použít naměřenou hodnotu kritické teploty jako indikátor vysokoteplotní stability rostlin. Výhodou tohoto přístupu je skutečnost, že každý vzorek lze charakterizovat jedním parametrem – kritickou teplotou dezintegrace plazmalemy, který je možno pro dané pěstební podmínky a rychlost lineárního ohřevu tabelovat. Tabelované hodnoty mohou sloužit k následným srovnávacím studiím.

Metodika umožňuje stanovení termostability rostlinného materiálu bez jakýchkoliv dalších procedur a manipulací s testovaným vzorkem a eliminuje tak základní nedostatky klasických „ion-leakage metod:

1. Není nutné aplikovat stres vyšší teplotou a tudíž hledat optimální kombinaci výše teploty a doby jejího působení.

2. Při použití stejných parametrů lineárního ohřevu lze srovnat kritickou teplotu odrážející termostabilitu různého rostlinného materiálu včetně srovnání kontrolních vzorků a vzorků aklimovaných na vyšší teplotu.

3. Během lineárního ohřevu je doba působení vyšších teplot na rostlinný materiál relativně krátká, čímž je potlačeno riziko zapojení aklimačních procesů a dá se předpokládat, že složka termostability indukovaná vysokoteplotním působením během měřicí procedury bude (na rozdíl od metod „ion-leakage“) minimální.

Další vylepšení metodiky oproti klasickým „ion-leakage“ metodám spočívá v tom, že během lineárního ohřevu je společně s měrnou vodivostí možné měřit minimální chlorofylovou fluorescenci F_0 , jejíž změny odrážejí vysokoteplotní stabilitu tylakoidní membrány chloroplastů. Předkládaná metodika tedy umožňuje stanovení vysokoteplotní stability jak plazmatické, tak tylakoidní membrány chloroplastů během jedné měřicí procedury.

IV) POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je určena zejména pro výzkumná, zkušební a šlechtitelská pracoviště, která se zabývají odolností rostlin vůči vyšším teplotám. Metodika má potenciál zjednodušit a urychlit vyhledávání a šlechtění nových odrůd ekonomicky významných plodin, které budou disponovat zvýšenou odolností vůči vyšším teplotám. Metodiku lze také efektivně využít při testování látek, jejichž aplikace ovlivňuje termostabilitu rostlin.

V) EKONOMICKÉ ASPEKTY

Předpokládaný ekonomický přínos předkládané metodiky spočívá zejména ve zjednodušení a zmenšení časové náročnosti testování termostability rostlin v porovnání s klasickými metodami „ion-leakage“, které umožní:

- 1) efektivnější testování, výběr a šlechtění odrůd se schopností aklimace na vyšší teploty;
- 2) testování a výběr látek zvyšujících termostabilitu rostlin;
- 3) snížení ekonomických ztrát daných poklesem výnosu v důsledku působení vysokých teplot.

Doba potřebná na otestování jedné odrůdy klasickou metodou „ion-leakage“ je odhadována na 16 hodin. V případě použití předkládané metodiky je možno tuto dobu snížit na přibližně 2 hodiny (při 4 - 5 opakováních), což při ceně práce kolem 150 Kč na hodinu (vycházející z průměrné hrubé mzdy 24 953 Kč) představuje úsporu ve výši kolem 2 000 Kč. Procedura je velmi jednoduchá a po spuštění automatická, takže pracovník provádějící měření se může po dobu měření věnovat jiné činnosti. Nezanedbatelná bude i úspora energie z důvodu ohřevu jen velmi malého objemu vody v porovnání s velkými objemy termostatovanými při klasické metodě „ion-leakage“. Vzhledem k výše uvedené výrazné úspoře času se investice vložená do přístroje PlanTherm v základní verzi umožňující měření CTC ve výši 6 600 Euro vrátí po otestování méně než 100 vzorků.

(Cena verze přístroje měřícího CTC i FTC je 9 900 Euro).

VI) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Bilger W a kol. (1984) Determination of leaf heat resistance: comparative investigation of chlorophyll fluorescence changes and tissue necrosis methods. *Oecologia* 63, 256-262

Hannah MA a kol. (2006) Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 142, 98-112

Havaux M (1992) Stress tolerance of photosystem II in vivo. Antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiology* 100, 424-432

Horvath I a kol. (2012) Heat shock response in photosynthetic organisms: Membrane and lipid connections. *Progress in Lipid Research* 51, 208-220

Ibrahim AMH a Quick JS (2001) Genetic control of high temperature tolerance in wheat as measured by membrane thermal stability. *Crop Science* 41, 1405-1407

Kotak S a kol. (2007) Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 310-316

Lazár D a Ilík P (1997) High-temperature induced chlorophyll fluorescence changes in barley leaves. Comparison of the critical temperatures determined from fluorescence induction and from fluorescence temperature curve. *Plant Science* 124, 159-164

Lípová L a kol. (2010) Heat-induced disassembly and degradation of chlorophyll-containing protein complexes in vivo. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* 1797, 63-70

Maxwell K a Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659-668

Mittler R a kol. (2012) How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences* 37, 118-125

Prášil I a Zámečník J (1990) Time course of electrolyte leakage from various samples killed by frost, liquid nitrogen or boiling. *Biologia Plantarum* 32, 77-80

Prášil I a Zámečník J (1998) The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury. I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of degree of injury. *Environmental and Experimental Botany* 40, 1-10

VII) SEZNAM SOUVISEJÍCÍCH PUBLIKACÍ (VÝSTUPŮ)

Kouřil R a kol. (2001) Chlorophyll fluorescence temperature curve on *Klebsormidium flaccidum* cultivated at different temperature regimes. *Journal of Plant Physiology* 158, 1131-1136

Lazár D a Ilík P (1997) High-temperature induced chlorophyll fluorescence changes in barley leaves. Comparison of the critical temperatures determined from fluorescence induction and from fluorescence temperature curve. *Plant Science* 124, 159-164

Lípová L a kol. (2010) Heat-induced disassembly and degradation of chlorophyll-containing protein complexes in vivo. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* 1797, 63-70