

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



Souvislost obsahu prolinu v hlízách ve vztahu k vodou stresovaným rostlinám bramboru (*Solanum tuberosum* L.)

Diplomová práce

Autor práce: Čejková Žaneta

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Souvislost obsahu prolinu v hlízách ve vztahu k vodou stresovaným rostlinám bramboru (*Solanum tuberosum* L.)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24.6.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mému vedoucímu práce panu Ing. Matyáši Orsákovi, Ph.D. za odbornou pomoc, za rady i připomínky při psaní mé diplomové práce.

Souvislost obsahu prolinu v hlízách ve vztahu k vodou stresovaným rostlinám bramboru (*Solanum tuberosum* L.)

Souhrn

Brambory jsou velmi důležitou plodinou u nás i ve světě a to díky své nutriční i výživové hodnotě. Slouží jako příloha k pokrmům, ale využívají se ve velké míře i jako krmivo, v lihovarnictví či při výrobě škrobu. Právě proto jsou brambory velmi oblíbenou pěstovanou plodinou. Spotřeba brambor na jednoho obyvatele Evropy přesahuje 80 kg/rok a z více jak poloviny se na produkci brambor podílejí rozvojové země. Přibližně čtyři desetiny světového povrchu země se nachází v suchých a polosuchých zónách, kde je voda hlavním omezujícím faktorem produktivity rostlin. Brambory jsou velmi citlivé na sucho, protože mají krátký kořen a právě jeho délka vede k omezené schopnosti transportovat vodu. Současným problémem je měnící se klima, které vede k problémům s pěstováním brambor. Brambory, které jsou vystavené biotickým a abiotickým stresům, jako je zvyšující se teplota a sucho, pak mohou podléhat oxidačnímu stresu, při kterém se hromadí reaktivní druhy kyslíku a ty poté způsobují zhoršenou funkci metabolismu lipidů, bílkovin a nukleových kyselin. V některých případech mohou způsobit i smrt rostliny. Rostlina se brání stresu tak, že kumuluje různé osmolyty. Jedním takovým je i aminokyselina prolin, která má antioxidační vlastnosti a chrání tedy rostlinu před účinky reaktivních druhů kyslíku. Pohlcuje volné radikály a ničí poškození způsobené těmito radikály. Prolin také pomáhá v osmotické úpravě kvůli udržení buněčného turgoru, což usnadňuje růst rostliny během sucha, pomáhá odolat buněčné dehydrataci způsobené abiotickými stresy a chrání buněčné struktury v případě dehydratace.

Experimentální část práce se věnuje vlivu obsahu prolinu v hlízách brambor při stresu ze sucha u čtyřech různých odrůd brambor a to Laura, Marabel, Milva a Valfi. Jako metoda pro stanovení prolinu a hydroxyprolinu byla použita LC-ESI-MS/MS a pro vyhodnocení program Statistica 12. Zjištěné hodnoty jsou zpracovány do tabulek a grafů. U všech čtyř odrůd byla naměřena nejvyšší průměrná koncentrace prolinu metodou pěstování za sucha s hodnotou $3,236 \pm 1,818$ mg/g DW. Nejvyšší obsah prolinu a hydroxyprolinu byl naměřen u odrůdy Marabel a stresu ze sucha, kde se obsah prolinu pohyboval v rozmezí hodnot 5,871-6,390 mg/g DW. Naopak výsledné koncentrace pro brambory přemokřené byly u všech odrůd velmi nízké nebo pod bodem detekce. Nejnižší množství prolinu u stresu ze sucha bylo naměřeno u odrůdy Valfi, kde se obsah pohyboval v rozmezí hodnot 1,560-1,646 mg/g DW. Dále se pomocí metody ANOVA zjistilo, že je statisticky významný rozdíl v akumulaci prolinu a hydroxyprolinu u rostlin pěstovaných za sucha a naopak rostliny přemokřené tento rozdíl nevykazovaly. Z výsledků je tedy vidět, že jednotlivé odrůdy reagují na stres z vysušení odlišně, což se projevuje rozdílnými obsahy prolinu a hydroxyprolinu.

Klíčová slova: vodní stres, sucho, aspartát, reakce na stres

Linking proline content in tubers in relation to water stressed potato plants (*Solanum tuberosum* L.)

Summary

Potatoes are a very important crop in the Czech Republic and abroad, thanks to their nutritional value. It serve as a side dish, but it's also widely used as feed, in distillery and in the manufacture of starch. That is reason why potatoes are a very popular cultivated crop. Potato consumption per capita in Europe exceeds 80 kg/year and developing countries produce more than half of the world's potato production. Approximately four-tenths of the world's surface is in dry and semi-dry zones where is water a major limiting factor in plant productivity. Potatoes are very sensitive to drought because they have a short root, and it's length leads to a limited ability to transport water. The current problem is the changing climate, which leads to problems with potato growing. Potatoes that are exposed to biotic and abiotic stresses, such as rising temperatures and drought, then it can be subjected to oxidative stress, which builds up reactive oxygen species, which in turn cause impaired lipid, protein and nucleic acid metabolism, and in some cases can also cause plant death. The plant resists stress by accumulating various osmolytes. One such is the amino acid proline, which has antioxidant properties, thus protecting the plant from the effects of reactive oxygen species. It absorbs free radicals and destroys the damage caused by these radicals. Proline also aids in osmotic conditioning to maintain cell turgor, which facilitates plant growth during drought, helps withstand cellular dehydration caused by abiotic stresses, and protects cellular structures in case of dehydration.

The experimental part of the thesis deals with the influence of proline content in potato tubers during drought stress in four different potato varieties, namely Laura, Marabel, Milva and Valfi. LC-ESI-MS/MS was used as a method for proline and hydroxyproline determination and Statistica 12 was used for evaluation. The obtained values are processed into tables and graphs. For all four varieties, the highest average proline concentration during the dry cultivation was $3,236 \pm 1,818$ mg/g DW. The highest proline and hydroxyproline content was measured for the Marabel variety and drought stress, where the proline content ranged from 5,871-6,390 mg/g DW. In contrast, the resulting concentrations for waterlogged potatoes were very low or bellow the detection point for all varieties. The lowest amount of proline in drought stress was measured in the Valfi variety, where the content ranged from 1,560-1,646 mg/g DW. Furthermore, the ANOVA method found that there was a statistically significant difference in the accumulation of proline and hydroxyproline in dry plant and, conversely, waterlogged plants did not show this difference. The results show that the individual varieties react differently to the stress of drying out, which is manifested in different contents of proline and hydroxyproline.

Keywords: water stress, drought, aspartate, dry reaction

Obsah

1	Úvod	7
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3	Lilek brambor (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	9
3.1	Chemické složení hlíz brambor	9
3.2	Stres	14
3.2.1	Abiotické faktory způsobující stres u rostlin	14
3.2.2	Stres ze sucha	15
3.2.3	Reaktivní druhy kyslíku	19
3.3	Prolin a hydroxyprolin	20
3.3.1	Charakteristika prolinu	20
3.3.2	Charakteristika hydroxyprolinu	23
3.4	Stanovení prolinu a hydroxyprolinu	26
3.4.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	26
3.4.2	Spektrofotometrie	26
3.4.3	Kapilární elektroforéza	26
3.4.4	Hmotnostní spektrometrie	27
4	Metodika	31
4.1	Pěstování brambor	31
4.2	Stanovení aminokyselin	34
4.2.1	Příprava brambor k analýze	34
4.2.2	Vlastní analýza	34
4.2.3	Kvantifikace	35
4.2.4	Statistické vyhodnocení	38
5	Výsledky	39
5.1	Vyhodnocení prolinu a hydroxyprolinu	39
5.1.1	Vyhodnocení obsahu prolinu	40
5.1.2	Vyhodnocení obsahu hydroxyprolinu	44
5.1.3	Celkové vyhodnocení	49
6	Diskuze	52
6.1	Varianta pěstování brambor za sucha	53
6.2	Varianta pěstování brambor v zamokření	53
6.3	Varianta pěstování brambor za optimálních podmínek	54
7	Závěr	55
8	Literatura	56
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	63

1 Úvod

Brambory (*Solanum tuberosum* L.) jsou velmi důležitou plodinou u nás i po celém světě. Bramborové hlízy jsou vynikajícím základním jídlem a po kukuřici, rýži a pšenici představují čtvrtou nejdůležitější plodinu s ohledem na celosvětovou produkci (Fukuda et al. 2019).

Brambory mají široké využití při výrobě škrobu, jako krmivo pro zvířata či v lihovarnictví. Jsou zdrojem energie a obsahují také mnoho cenných látek pro lidský organismus, a proto jsou nedílnou součástí našich jídelníčků (Vokál et al. 2013).

Z nutričního hlediska představují nejcennější zdroj hlízy brambor. Obsahují hodně polysacharidů, z nichž je nejvíce škrobu, dále vlákninu, antioxidanty, dusíkaté látky, popeloviny i tuk (Vokál et al. 2013). Hlízy se dají konzumovat buď čerstvé nebo zpracované ve formě hranolek či brambůrků, což je dnes velmi populární (Fukuda et al. 2019).

V dnešní době je velkým problémem měnící se klima a teplotní výkyvy spolu se srážkami. Tyto environmentální změny vedou ke stresovým reakcím rostlin, díky kterým se pak může změnit chemické složení plodin a tím i kvalita a výnos sklizených produktů. Brambory jsou kvůli svému krátkému kořenu velmi náchylné k deficitu vody, což může vést k jejich nižší produkci (Drupal et al. 2016).

Přibližně 6 % území světa je ovlivněno salinitou, zatímco asi 45 % zemědělské půdy po celém světě je vystaveno kontinuálním nebo častým podmínkám sucha. Odhaduje se, že zvýšený stres způsobený suchem vzroste až o 30 % do roku 2025 (Per et al. 2017).

Pokud u rostliny dojde ke stresu ze sucha, tak začne kumulovat různé ochranné mechanismy k potlačení tohoto stresu. Jednou z těchto mechanismů je i aminokyselina prolin mající ochranný účinek. Chrání buňky před oxidačním poškozením i dehydratací (Hossian et al. 2014).

V této práci jsem se věnovala stanovení množství prolinu a určení, zda je jeho obsah v období sucha prokazatelně odlišný oproti dostatečně zavlažovaným rostlinám.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíl práce:

- 1** Sestavit z literární rešerše základní popis brambor a jejich obsahových látek a zjištění, jak na ně působí stres suchem.
- 2** Charakterizovat aminokyselinu prolin, jeho význam pro rostlinu v období sucha, jeho obsahy a zapojení do biochemického metabolismu v tomto období.
- 3** Stanovit množství prolinu v hlízách vybraných odrůd brambor metodou kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem a elektrosprejovou ionizací u rostlin, které byly vystaveny vodnímu stresu a porovnat obsahy s optimálně zavlažovanými rostlinami.

Vědecká hypotéza:

- 1** Obsah prolinu v hlízách brambor je projevem vodního stresu.
- 2** Rostliny vystavené stresu suchem budou vykazovat vyšší obsahy prolinu.
- 3** Rostliny převlhčené budou také vykazovat zvýšené obsahy prolinu v hlízách oproti kontrole.
- 4** Odrůdy budou reagovat na vodní stres odlišně, což se projeví odlišnými obsahy prolinu.

3 Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.)

Brambory jsou nejlepším potravinovým koncentrátem na světě a zároveň levným zdrojem energie a nutričně významných látek. Čerpáme z nich asi 14 % pokrmové energie. Jsou bohaté na minerály, vitamíny, bílkoviny a jsou téměř bez tuku (Čepl 2017).

Podle poslední zprávy Úřadu pro potraviny a léčiva (FAO), byla v roce 2014 odhadnuta celková světová produkce brambor na 381,682 tisíc tun (Rodríguez-Pérez et al. 2018). Brambory se pěstují na 19 milionech ha a roční produkce je kolem 325 milionů tun. Rozvojové země produkují více než polovinu celkové světové produkce brambor (Monneveux et al. 2013). Spotřeba brambor na obyvatele je nejvyšší v Evropě a přesahuje 80 kg/rok. První bramborové hlízy byly přivezeny do Evropy z Jižní Ameriky na konci 16. století španělskými průzkumníky (Eichhorn&Winterhalter 2005).

V České republice patří brambory k oblíbenému jídlu v mnoha podobách. Nejčastěji jako přílohy, a to vařené nebo jako kaše a bramborové knedlíky či jako hlavní součást bramborového salátu. Dále dušené v malém množství vody, zapékané po oloupaní a smažené na tuku (hranolky, vlnky, americké brambory se slupkou, lupínky, bramboráky). Současné jsou brambory hodnotným a vyváženým zdrojem energie a nutričně významných látek. Tepelnou úpravou však jejich obsah klesá, což lze částečně eliminovat vhodnou přípravou, jakou je například vaření v páře, dušení v malém množství vody a jiné. Další ztrátu významných látek lze snížit konzumací hlíz se slupkou. Slupka brambor obsahuje většinu bramborové vlákniny a těsně pod slupkou se nachází mnoho dalších výživově důležitých složek, a to zejména vitamin C (Čepl 2017). Významný je zde i škrob, který má uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích, jako je potravinářský, textilní, papírenský a další (Vokál et al. 2000).

Brambory (*Solanum tuberosum* L.) patří mezi dvouděložné rostliny čeledi Solanaceae. Rod *Solanum* obsahuje řadu potravinářských druhů včetně lilku (*S. melongena*), bramboru (*S. tuberosum*) a rajčat (*S. lycopersicum*). Jedná se o rostlinu s bílými květy se žlutou tyčinkou, se slabými stonky stoupajícími vzhůru. Mají asi 1 m na délku s dlouhými zpeřenými listy a vejčitými letáky. Brambory se rozmnožují vegetativně hlízami nebo generativně semeny. Hlíza vzniká přeměnou stonku. Je to zduřelý konec oddenku (stolonu), jenž vzejde z úžlabního pupenu. Má funkci zásobního orgánu rostliny (Donald&Barceloux 2009). Při nedostatku půdní vlhkosti dojde ke snížení asimilačního výkonu a tím i k nižšímu výnosu hlíz. V důsledku ztráty vody se u rostlin začnou uzavírat průduchy a rostlina hladoví (Vokál et al. 2000).

3.1 Chemické složení hlíz brambor

Podle odrůdy, termínu sklizně i délky a způsobu skladování obsahují brambory asi 22 g sušiny a 78 g vody. V sušině jsou obsaženy zejména sacharidy (18,5 g), dusíkaté látky (1,9 g) a tuky (0,1 g) (Čepl 2017).

V buňkách hlíz se voda vyskytuje buď jako volná (vakuoly, buněčná šťáva, transpirační voda) nebo vázaná (kapilární, inhibiční, konstituční). Volná voda je hlavním podílem hlízové vody a je buněčnou šťávou, která obsahuje značný podíl rozpustné sušiny. Množství vázané vody je proměnlivé a je spojen s hydratací buněčných koloidů. Obsah sušiny v hlízách je závislý na odrůdě, fázi vývoje hlízy, průběhu povětrnostních podmínek a pěstitelské technologii (Vokál et al. 2013).

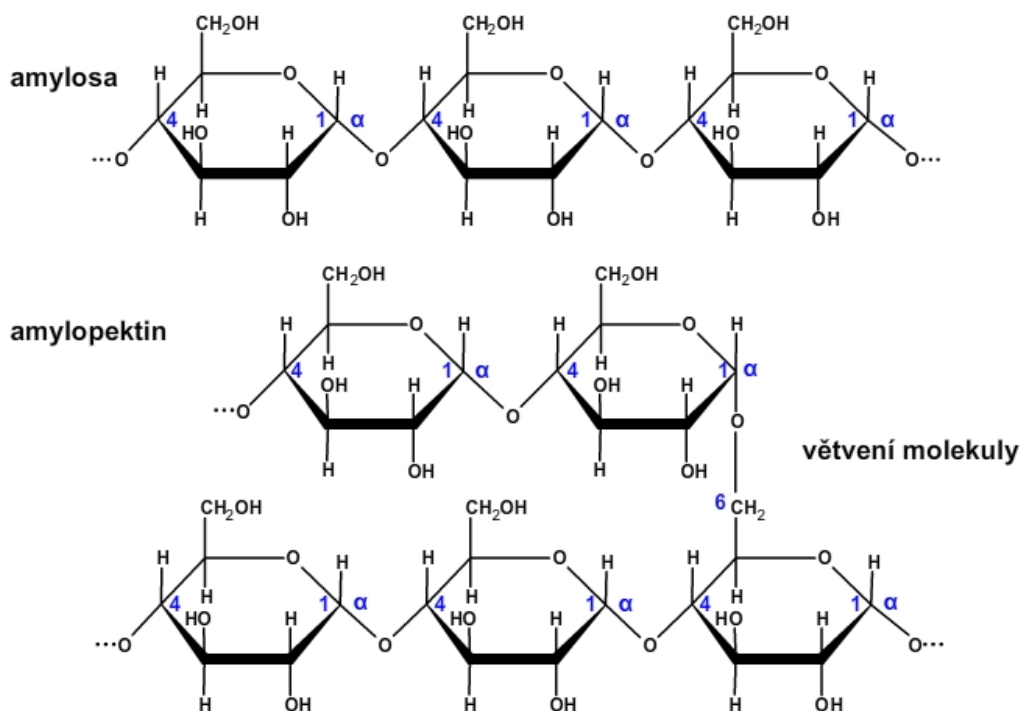
Sacharidy jsou zastoupeny ze 75 % škrobem (15,4 g), což je polysacharid, skládající se z amylázy a amylopektinu. Škrob má zde dietetický význam, protože je postupně odbouráván až na glukosu. Jednoduchých cukrů obsahují bramborové hlízy nízké množství, a to 0,8 g. Obsah vlákniny neboli nestravitelný polysacharid zahrnující hemicelulosu, pektiny, hexosany a pentosany, je i přes nižší množství, které tu činí 2,2 g významný (Čepl 2017). V původní hmotě hlíz je 0,11 % rozpustného pektinu, 0,45 % nerozpustného pektinu a 0,17-3,48 % vlákniny (Vokál et al. 2013). V bramborách se také nacházejí redukující cukry, které jsou zapojené do neenzymatické reakce hnědnutí, známé jako Maillardova reakce. Množství redukujících cukrů v bramborách v době zpracování závisí na podmínkách skladování (Hertog et al. 1997).

Hlavní zásobní látkou brambor je škrob. Ten plní funkci sytící. Formy škrobu mohou být buď jako málo přístupný pankreatické amyláze (škrob luštěnin), dále jako škrob syrových brambor nebo jako rezistentní škrob tráven enzymy v žaludku a v tenkém střevě. Rezistentní škrob má příznivé účinky jako vláknina. Přispívá k ochraně proti rakovině tlustého střeva a snižuje hladinu glukosy v krvi. Nejvíce rezistentního škrobu je při vaření a následnému zchlazení brambor. Škrob je energetickým zdrojem potravin a ovlivňuje jejich texturu a funkční vlastnosti. Jako zahušřovadlo a stabilizátor se tedy používá tzv. modifikovaný škrob, který je schopný vázat vodu v potravinových výrobcích. Jedná se o termické, chemické nebo biochemické produkty na bázi škrobu, ve kterých byla upravena škrobová zrna, nebo byly využity chemické reakce, kdy jsou v molekule škrobu přeměněny přítomné funkční skupiny (Vokál et al. 2013).

Frakce škrobu:

1. **amylosa:** je to polymer glukózy, jedná se o lineární 1,4- α -D-glukan s malým počtem dlouhých větví,
2. **amylopektin:** polymer glukosy, 1,6- α -D-glukan obsahující větve s vysokou hustotou (Lemos et al. 2019).

Relativní poměr amylózy k amylopektinu se značně liší, nejen mezi různými druhy rostlin, ale také v rámci jednoho druhu rostlinného orgánu. Poměr amylózy ovlivňuje některé vlastnosti, které jsou zvláště užitečné v potravinářském průmyslu, jako je želatinizace, rozpustnost, reologické vlastnosti a textura těsta. Tím je obsah amylózy důležitý parametr kvality pro výroby na bázi škrobu (Lemos et al. 2019).



Obrázek 1 amylosa a amylopektin

(http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky.html)

Dusíkaté látky (hrubé bílkoviny), podle klasifikace dle molekulové hmotnosti, obsahují rovnocenný podíl bílkovin a nebílkovinných dusíkatých látek. Bílkoviny hlíz brambor patří mezi nutričně nejhodnotnější bílkoviny rostlinného původu (Čepl 2017). Hlízové bílkoviny členíme do 3 hlavních skupin dle jejich molekulové hmotnosti, a to na patatin, na skupinu inhibitorů proteas a na ostatní bílkoviny. Patatinové bílkoviny jsou považovány za hlavní zásobní bílkoviny hlíz. Skupina inhibitorů proteas má v hlízách úlohu zásobních bílkovin a je součástí obranného systému (Vokál et al. 2013). Nebílkovinné dusíkaté látky členíme na volné aminokyseliny, amidy asparagin a glutamin, ostatní dusíkaté látky a na anorganický dusík (Bártová et al. 2013).

Podíl tuků je nejvíce zastoupen ve slupce a velké množství v bramborách je nenasycených mastných kyselin (kyselina linolová, linoleová, palmitová a stearová). Brambory jsou také zdrojem minerálních látek s nejvyšším obsahem K, Mg, P a Fe a z vitamínů je to především C, B1 a B6 (Vokál et al. 2013).

Brambory také obsahují barviva v hlízách. Ty obarvují dužinu a zvyšují podíl látek s antioxidační aktivitou. Anthokianiny jsou barviva zodpovědná za spektrum různých barev a odstínů jako je modrá, fialová, červená a oranžová a také vykazují mnoho biologických aktivit (Eichhorn&Winterhalter 2005).

Brambory jsou zároveň jedním z nejbohatších zdrojů antioxidantů v lidské výživě. Antioxidanty představují obranný systém vůči účinkům volných radikálů na lidský

organismus. Antioxidanty jsou molekuly, které reagují s volnými radikály a ukončují tak řetězovou reakci předtím, než dojde k poškození důležitých buněk. Mezi antioxidanty, které obsahují hlízy brambor, patří zejména polyfenoly (L-tyroxin, kyselina chlorogenová a její deriváty a kyselina kávová, anthokyany, tyrosin), karotenoidy (beta karoten, lutein a zeaxanthin), tokoferoly (vit. E), L-askorbová kyselina a selen (Čepl 2017). Fenolické sloučeniny jsou důležité pro adaptaci rostlin na prostředí a úzce souvisí s progresí několika chronických patologických stavů včetně rakoviny, obezity nebo cukrovky (Rodríguez-Pérez et al. 2018). Zajímavé je, že barevné hlízy vykazují 2–3x vyšší antioxidační potenciál, protože dochází k synergickému působení mezi anthokyany a vitaminem C (Čepl 2017).

Hlízy brambor mohou obsahovat z hlediska lidské výživy i škodlivé látky. Jedná se zejména o toxické glykoalkaloidy, především pak α -solanin a α -chaconin. Glykoalkaloidy jsou přírodní rostlinné glykosidy, které obsahují dusík ve steroidní struktuře (aglykon) a sacharidovém postranním řetězci v pozici 3-OH (Donald&Barceloux 2009). Hexacyklické alkaloidní aglykony jsou odvozeny od cholesterolu. Jejich hladina je však sledována a při standardním způsobu skladování ve tmě by ke zvýšení obsahu (nad 200 mg/kg) nemělo dojít (Čepl 2017). Obsah glykoalkaloidů se ve většině kultivarů brambor pohybuje mezi 3 až 10 mg na 100 g hlíz. Hladiny glykoalkaloidů přítomných v bramborách mohou být ovlivněny četnými faktory, jako je typ kultivaru, správa plodin a klimatické podmínky (Bártová et al. 2013).

Tabulka 1 obsah vitamínů v hlíze bramboru (Čepl 2017)

Vitamin	Obsah v hlíze o hmotnosti 100 g	Podíl z denní potřeby v %
L-askorbová kys. (Vit. C)	20 mg	33
B1 thiamin	0,1 mg	5
B2 riboflavin	0,03 mg	2
B3 niacin	1,1 mg	6
B6 pyridoxin	0,2 mg	9
Kyselina listová	18 μ g	5
Kyselina pantotenová	0,3 mg	3
Vitamin K	2,9 μ g	4

Tabulka 2 obsah prvků v hlíze bramboru (Čepl 2017)

Prvek	Obsah v hlíze o hmotnosti 100 g	Podíl z denní potřeby v %
Vápník	10	1
Měď	0,1	7
Železo	0,5	4
Hořčík	22	5
Mangan	0,1	7
Fosfor	78	6
Draslík	450	15
Selen	0,5	1
Sodík	2	2
Zinek	0,5	2

Tabulka 3 varné typy brambor (Vokál et al. 2000).

Varný typ	Konzistence	Užití
A	pevná, nerozvářivá, lojovitá	do salátů, jako příloha
B	polopevná, polomoučná, nerozvářivá nebo slabě rozvářivá	pro přípravu jídel všeho druhu, jako příloha
C	měkká, moučná, středně rozvářivá	především pro přípravu těst a kaší

3.2 Stres

Přibližně čtyři desetiny světového povrchu země se nachází v suchých a polosuchých zónách, kde je voda hlavním omezujícím faktorem produktivity rostlin (Banik et al. 2016). Vystavení environmentálnímu stresu vyvolává četné fyziologické stresové reakce rostlin, které pak mohou změnit své chemické složení, a tím i kvalitu sklizených produktů. Abiotické stresové faktory jako je sucho, teplo, salinita půdy, troposférický ozon a přebytečné UV záření způsobuje významné zemědělské ztráty výnosů v důsledku globálních změn. Globální nedostatek vody a zvýšená salinizace způsobují značné ztráty plodin snížením průměrných výnosů většiny hlavních plodin o více než 50 % (Wang&Frei 2011).

Stres ze sucha je rostoucí hrozbou pro růst a produktivitu rostlin a nejkritičtější hrozbou pro zabezpečení potravin ve světě (Banik et al. 2016). Vystavení stresu vede k četným fyziologickým změnám v plodinách, jako jsou např. změny výměny fotosyntetického plynu a asimilace, translokace, absorpce vody a evapotranspirace. Také to má vliv na příjem živin, na antioxidační reakce, programovanou buněčnou smrt, změny genové exprese a na enzymovou aktivitu (Wang&Frei 2011). Sucho stejně jako mnoho dalších abiotických stresů je problémem u spousty rostlin a mobilizuje sektory rostlinného mechanismu jako součást odezvy na daný stres. Nepředvídatelnost povětrnostních podmínek, zejména v kritických obdobích, jako je vznik a tuberizace rostlin, může ovlivnit vývoj rostlin a vést k dramatickým ztrátám výnosů (Drapal et al. 2016).

3.2.1 Abiotické faktory způsobující stres u rostlin

Vystavení nízkým, ale nemrznoucím teplotám vyvolává rozklad škrobu, a tím dojde k akumulaci cukrů (sacharózy), takže brambory pak sládnou (Marangoni et al. 1996). Naopak vysoké teploty vyvolávají různé reakce na tkáňové, buněčné a subcelulární úrovni. Jako první reakcí je zvýšení hojnosti proteinů tepelného šoku, které pomáhají určitým proteinům udržovat jejich nativní stav. Dále dochází k zastavení buněčného cyklu a různým posttranslačním modifikacím proteinových molekul (Colignon et al. 2019). Dalším abiotickým stresem je vystavení plodin ozónu. Ozón indikuje zrychlené stárnutí listů kvůli poklesu syntézy enzymu ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa následované jeho sníženým množstvím v rostlině (Eckardt&Pell 1995). UV záření ve vysoké koncentraci může zase způsobovat inhibici fotosyntézy a také snížit aktivitu enzymu ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa, který je důležitý pro primární fixaci uhlíku (Hanelt et al. 2006).

Záplavy a nadměrná vlhkost jsou podmínky, které snižují zemědělské výnosy rostlin či snižují jejich růst (Youssef et al. 2019). Prvním účinkem podmáčení rostlin je snížení obsahu vody v rostlinách a produkce ATP, generovaná změnou z aerobního na anaerobní metabolismus, což způsobí pokles rychlosti všech metabolických procesů v rostlině (Velasco et al. 2019). Vodní zavlažování obvykle způsobuje anaerobní stav kvůli omezení O₂ difúze do půdy, čímž se sníží fyziologická aktivita rostlin (Xiao-Qingat et al. 2015). Účinky zamokření jsou složité a liší se v závislosti na genotypu rostliny, podmínkách prostředí, fázi růstu a době trvání zavlažování. Nadměrné zamokření způsobuje nedostatek kyslíku, který inhibuje

kořenové dýchání, rychlost fotosyntézy a asimilaci CO₂. První důsledek poškození zamokřením je stomatální uzavření, které má dopad nejen na výměnu plynu, ale i na snížení pasivního příjmu vody. Sníží se tak příliv CO₂ vstupující do listu a také se snižuje transpirace, což vede k vadnutí listů, jakož i snížený obsah chlorofylu, což má za následek nižší akumulaci sušiny (Lixin et al. 2019).

Nejzávažnější porucha, která je připisovaná záplavám, je hypoxie, tedy snížené či nedostatečné množství kyslíku, díky jeho redukované difúzi v roztoku. Dochází ke snížení fotosyntetické kapacity a rychlosti transpirace kvůli hypoxii v kořenech rostlin. Právě kořenové buňky jsou první, které reagují na hypoxii vyvolanou záplavami (Youssef et al. 2019). Zamokření je poměrně časté po silných deštích, zejména v půdě se špatnými drenážními vlastnostmi. Rozpuštěný O₂ je rychle snížen na úroveň, která již nepodporuje normální kořenové dýchání a následuje hypoxický stres. To pak vede k metabolickým změnám, které rostlině umožňují tolerovat tento stres (Vitor&Sodek 2019).

Pokud je však potlačeno aerobní dýchání, pak se zvyšuje koncentrace malondialdehydu a lipoperoxidačního produktu buněčných membrán, což vede k poškození struktury funkce membrány, a to přispívá k produkci reaktivních druhů kyslíku (ROS). Rovnováha mezi vznikem ROS a jeho odstraněním je velmi důležitá pro přežití rostlin při stresu ze zamokření. Celkově hraje vznik ROS zásadní roli při schopnosti rostlin bojovat proti nepříznivým účinkům a reagovat na biotické stresy. Rostliny jsou schopny si pomáhat enzymatickými a neenzymatickými mechanismy, které dokážou zachytit přebytek ROS, a tím zmírnit stres způsobený zamokřením. Mezi hlavní antioxidační enzymy patří superoxiddismutasa, glutathionreduktasa, peroxidasa, katalasa a askorbátperoxidasa. Činnosti antioxidačních enzymů v reakci na zamokření se mezi jednotlivými druhy liší (Luting et al. 2019). Vmnoha rostlinách se při stresu z přemokření zvyšuje syntézu molekul, jako je prolin, který chrání před poškozením způsobeným oxidačním stresem (Velasco et al. 2019).

Dlouhodobá expozice nízkého množství kyslíku může ohrozit funkci rostlin a změnit chování kořenového systému. Tyto kořeny vykazují zpomalující růst či se dokonce růst může i zastavit, a to pak negativně dopadá na celkovou výkonnost rostliny. Během hypoxie vzniká oxid dusnatý (NO), který prostřednictvím dusičnanové reduktasy ovlivňuje chování a strukturu kořenů. Fytoglobiny, což jsou rostlinné proteiny obsahující hem, jsou schopny vychytávat NO za stresových podmínek a zprostředkovat toleranci v období záplav (Youssef et al. 2019).

3.2.2 Stres ze sucha

Stres ze sucha je považován za jeden z nejzávažnějších abiotických stresů, a to díky škodlivým účinkům na produktivitu plodin (Tanveer et al. 2018). Snížení dostupnosti vody u rostlin vede ke změnám koncentrací mnoha metabolitů, následované narušením metabolismu kyselin a sacharidů (La et al. 2018). Tento stres také ovlivňuje retenci vody v rostlinách u buněk, tkání a orgánů, což způsobuje jak specifické, tak nespecifické reakce indukující adaptivní odpovědi (Cvikrová et al. 2013).

Negativní účinky sucha na rostlinu

- ztráta turgoru, rychlost asimilace uhlíku, výměna listového plynu, zvýšená oxidativní poškození, narušení absorpce iontů (Tanveer et al. 2018),
- snížení velikosti listů, změna rychlosti buněčné expanze a dělení,
- změna absorpce vody, která ovlivňuje vodní potenciál, prodlužování kořenů a stonků,
- nerovnováha živin, která dále omezuje produktivitu plodin,
- snížení rychlosti klíčení, změna výšky rostliny, snížení biomasy, zvýšení poměru kořen/výhonek,
- fyziologické vlastnosti jako např. snížení fotosyntézy, snížení transpirace, stomatální vodivosti a kutikulárního vosku, snížení obsahu relativní vody, obsahu chlorofylu a stability membrány (Anupama et al. 2018),
- inhibice nebo redukce fyziologických procesů a metabolismu rostlin v důsledku absence nebo nedostatečné dostupnosti vody,
- toxicita rostlin, a tím zhoršená enzymová aktivita, dochází k blednutí rostlin, k vadnutí listů, a nakonec ke smrti rostlin (Khan et al. 2019).

Důležitými rysy stresu ze sucha je snížená absorpce vody, vyšší rychlost transpirace, uzavření stomat a nadměrná produkce reaktivních druhů kyslíku. To pak vede k poškození buněk a k jejich zvýšené teplotě, k ukládání bílkovin a jejich denaturaci. Sucho ale také zvyšuje množství některých metabolitů, jako je prolin, trimethylglycin, rozpustné sacharidy nebo gama-aminobutyriková kyselina (Khan et al. 2019).

Reakce rostlin na stres závisí na několika faktorech

1. na míře závažnosti a době setrvání stresu,
2. na růstové fázi rostliny,
3. na genetických vlastnostech rostliny,
4. na faktorech prostředí (Tanveer et al. 2018).

Rostliny se vyrovnávají se suchem aktivací obranných mechanismů. Patří mezi ně stomatální uzavření, které snižuje rychlost transpirace a fotosyntézy, syntéza nových proteinů a akumulace osmolytů, jakými je například prolin. Interakce rostlin s prostředím jsou zprostředkované alespoň částečně fytohormony. Nejdůležitější fytohormon v období dehydratace je kyselina abscisová. Tato kyselina zprostředkovává jak rychlé reakce založené na modulaci aktivity iontových kanálů, tak také indukci stomatálního uzavření a pomalejší metabolické změny, které se shodují s aktivací obranných cest. Expozice rostlin vlivům prostředí, jako je teplo a sucho způsobuje tvorbu ROS. Zdá se, že vysoká úroveň ROS funguje jako signál a spouští ochranné reakce. Jsou však také potenciálně škodlivé pro všechny buněčné složky a negativně ovlivňují buněčné metabolické procesy. Za účelem udržení redoxní homeostázy, rostlinné buňky reagují na zvýšené hladiny ROS zvýšením exprese a aktivity enzymů zachycujících ROS a pomocí zvýšení produkce lipofilních a hydrofilních zachycovacích molekul. Osmotické nastavení rostlin je mechanismus pro udržování vody v rostlinných buňkách během období nedostatku vody. To zahrnuje akumulaci řady osmoticky

aktivních molekul iontů, jako jsou rozpustné cukry, cukerné alkoholy, prolin, organické kyseliny, ionty vápníku, draslíku a chloridu v buňce. Další skupinou osmoticky aktivních látek, která je důležitá při toleranci sucha, jsou polyaminy. Ty hrají roli v osmotické úpravě, udržování stability membrány a v zachycování volných radikálů (Cvikrová et al. 2013).

Se stresem ze sucha je úzce spojen i stres ze salinity. Salinita se považuje za trvalou hrozbu pro rostliny, protože přibližně 20 % zemědělských plodin a 33 % zavlažovaných plodin na celém světě trpí jejím zvýšeným množstvím. Ve vyprahlých a polosuchých oblastech je salinizace půdy způsobena několika faktory, jako je například nedostatek zavlažování vodou se špatným hospodařením a odvodněním, vysoká teplota odpařování vyvolaná horkým podnebím s nízkými srážkami a růst rostlin v blízkosti moře. Salinita snižuje schopnost rostliny těžit z vody a způsobuje snížení růstu a produkce inhibicí metabolismu rostlin. Salinita půdy také snižuje dostupnost vody pro rostlinu, což vede k nedostatku vody a nerovnováze živin. Nevyváženost živin je způsobena sníženým příjmem užitečných živin a zvýšeným příjmem specifických toxických iontů Na^+ a Cl^- , které rostliny stresují. Akumulace solí v apoplastu listů až do toxické úrovně vede ke ztrátě turgoru a dehydrataci a způsobuje poškození listových buněk (Rady et al. 2019). Stres ze salinity snižuje vodní potenciál, snižuje asimilaci CO_2 , narušuje metabolismus rostlin a způsobuje toxicitu iontů vedoucí k oxidačnímu stresu. Absorpce vody z půdy je inhibována v důsledku osmotického napětí vyvolaného solným napětím a iontovou nerovnováhou, ke které dochází v důsledku vyšší koncentrace toxických solí. Při zátěžových podmínkách poškozují ROS části rostlin vedoucí k buněčné smrti. Rostliny pod tlakem spotřebovávají obrovské množství enzymatických a neenzymatických antioxidantů k překonání poškození způsobeného stresem (Tahir et al. 2019).

Pozitivně působící látky při stresu suchem

Postupem pro zmírnění nepříznivých účinků stresu ze sucha může být například aplikace hormonů. Brassinolidy jsou novou třídou fytohormonů, které hrají důležitou roli v růstu a vývoji rostlin. Aktivním vedlejším produktem je 24-epibrassinolid, a ten je schopen stimulovat různé rostlinné metabolické procesy, jako fotosyntézu nebo biosyntézu proteinů a nukleových kyselin (Tanveer et al. 2018).

Jako ochranu proti stresu uvolňují rostliny signální molekuly, které iniciují kaskádu stres-adaptivních odpovědí vedoucích k naprogramované buněčné smrti nebo aklimatizaci rostlin. NO je malá, ale důležitá redoxní signální molekula, která je zapojena do různorodého rozsahu fyziologických procesů včetně klíčení, vývoje, kvetení, procesu stárnutí a abiotického stresu. V jejich přirozeném ekosystému jsou rostliny obvykle pod tlakem kvůli různým biotickým faktorům (patogeny jako jsou bakterie, houby a viry) a abiotickým faktorům (životní prostředí jako je sucho, sůl, povodně, teplo, chlad a kovy), které mohou ovlivnit normální růst, vývoj a výtěžek rostlin. Rostliny typicky reagují na abiotický stres produkcí ROS. NO je redoxní, plynný, vysoce reaktivní forma dusíku produkovaná v živých buňkách během biotického a abiotického stresu. Pokud se koncentrace ROS stane toxickou pro rostlinu, pak může NO působit jako detoxikátor a minimalizovat jakékoliv škodlivé účinky.

NO také hraje roli v dýchacím řetězci elektronové transportní cesty v mitochondriích, kde moduluje ROS, čímž aktivuje obranné mechanismy prostřednictvím zvýšené produkce antioxidantů v rostlinách vystavených různému abiotickému napětí. Navíc exogenní zásobování NO vede k aktivaci antioxidačních enzymů, zejména superoxiddismutasy a omezuje superoxidový anion, lipidový O₂ a organické radikály (Nabi et al. 2019).

Křemík má příznivé účinky na ochranu rostlin před abiotickým a biotickým stresem, jako je snížení ztráty transpirace a stimulace fotosyntézy (Anupama et al. 2018).

Malondialdehyd, přírodní reaktivní druh, může také působit jako biomarker pro stres, protože je sekundárním konečným produktem peroxidace lipidů, která obecně probíhá v přítomnosti volných radikálů generovaných v rostlinách za stresových podmínek (Anupama et al. 2018).

Stres ze sucha u brambor

Teplota je jedním z dominantních faktorů, které mají významný vliv na růst a vývoj brambor (Nurmanov et al. 2018). Brambory pravidelně trpí přechodným nedostatkem vody ve většině deštivých pěstitelských oblastech v důsledku kolísání srážek nebo nedostatečným technikám zavlažování (Monneveux et al. 2013). Pro brambory je optimální teplota kolem 21–24 °C. Brambory jsou velmi citlivé na změny teploty, takže nad 30 °C klesá růstová rychlost a nad 40 °C odumírají hlízy (Vokál et al. 2000). V případě hlíz je optimální teplota klíčení 7–80 °C a pro tvorbu hlíz by půda měla mít teplotu 16–18 °C. Zvýšená teplota (nad 25 °C) způsobí, že se stonky a boční větve začnou prodlužovat, listové čepele zúžovat, hladina chlorofylu v listech poklesne a květy odpadnou (Nurmanov et al. 2018). Vadnutí listů je nejviditelnější odpovědí na stres suchem (Banik et al. 2016). Dlouhé vystavení nízké teplotě (–1 až 2 °C) během tvorby hlíz způsobí, že stonky zčernají a odumřou, což není dobré pro produktivitu. Brambory jsou náročné na vlhkost půdy. Příznivé vlhkostní podmínky, které jsou více než 65–70 % v období od výsadby do klíčení, 75–85 % během kvetení a 60–65 %, když vrchol začíná vadnout (Nurmanov et al. 2018). Brambory jsou také velmi citlivé na sucho, protože mají krátký kořen, a právě jeho délka vede k omezené schopnosti transportovat vodu. Sucho snižuje růst rostlin, zkracuje růstový cyklus a snižuje počet a velikost hlíz. Omezené množství vody u rostlin snižuje růst listů, index plochy listů, pokrytí země, rychlost fotosyntézy na jednotku plochy listu a index sklizně. Sucho také snižuje aktivitu nitrátoreduktasy a následně ovlivňuje absorpci dusíku (Monneveux et al. 2013). Tvorba stolonu a tuberizace jsou nejcitlivější fáze při stresu ze sucha. Reakce brambor na sucho se u různých kultivarů liší a také se liší v rozsahu a načasování nedostatku vody (Banik et al. 2016).

Velikost účinku sucha na produkci brambor závisí na

- fenologickém načasování,
- délce trvání sucha,
- závažnosti stresu (Monneveux et al. 2013).

Flint (1992) poznamenává, že míra růstu a vývoje brambor závisí na životním prostředí. Hlízy brambor jsou velmi citlivé na vodní stres. Brambory mají mělký, řídký kořenový systém a asi 85 % kořenů se nacházejí v horních 30 cm půdy. Nedostatek vody v jakékoli fázi růstu může způsobit snížení výnosu a kvality hlíz brambor (Nurmanov et al. 2018).

Nedostatek vody je možné sledovat v listech, což je energetický produkční orgán rostlin. Společnou odezvou v listech v období nedostatku vody je snížení jejich stomatální vodivosti, a tím udržení vodní bilance rostliny. Při dlouhodobém snížení vody je ovlivněn buněčný turgor. Osmotický potenciál buňky je tedy snížen akumulací osmolytů jako jsou aminokyseliny, cukry a polyoly uvnitř buňky. Vedlejším účinkem stomatálního uzavření je snížení fotosyntézy v důsledku omezených intracelulárních hladin CO_2 . To v důsledku vede k nižší fixaci uhlíku a sníženému dělení asimilátů ovlivňujících hlízu (Drapal et al. 2016).

Důležitá je zde rostlinná minerální výživa, což je biologický proces nezbytný pro zdraví a produktivitu rostliny. Hlavním zdrojem potravy pro rostliny jsou hnojiva. Optimální výživa dusíkem přispívá k rychlé tvorbě vegetativní části, intenzivní fotosyntéze a umožňuje lepší využití půdní vlhkosti během růstu plodin. Nedostatek dusíku má za následek špatný vývoj brambor – listy zesvětlají, takže výtěžek a obsah škrobu v hlízách klesá. Přebytek jednostranné dusíkaté výživy je také nežádoucí, protože způsobuje nadměrný růst vrcholů a kontrastuje se zpóźděným růstem hlíz. Díky tomu se zvýší vegetační období a rostlina bude méně odolná vůči nepříznivým podmínkám (Nurmanov et al. 2018).

3.2.3 Reaktivní druhy kyslíku

Reaktivní druhy kyslíku vznikají v rostlinách během buněčného metabolismu. Extrémní podmínky prostředí, jako je sucho, slanost nebo záplavy mohou vést ke zvýšené úrovni těchto ROS v rostlinách, které pak způsobují zhoršenou funkci metabolismu lipidů, bílkovin a nukleových kyselin, a nakonec smrt rostliny (Kapoor et al. 2019). Nedostatek vody může u rostlin způsobit oxidativní poškození buněk (Drapal et al. 2016). Oxidační stres rostlin způsobený biotickým a abiotickým stresem (především suchem) způsobuje tvorbu reaktivních druhů kyslíku v chloroplastech a mitochondriích (Azmat&Moin 2019). Syntéza ROS také mění buněčnou redoxní homeostázu a nadprodukce ROS může poškodit buňky a vést k nekróze napříč rostlinnými druhy (Nabi et al. 2019).

Jedná se o

- singletový kyslík (O_2),
- superoxidové aniontové radikály (O_2^-),
- hydroxylové radikály (OH^\cdot),
- peroxid vodíku (H_2O_2) (Singh et al. 2019).

Všechny čtyři základní formy ROS mají specifický poločas a schopnost oxidovat buněčné složky. Na rozdíl od atmosférického kyslíku, ROS, zejména OH^\cdot , a O_2 jsou

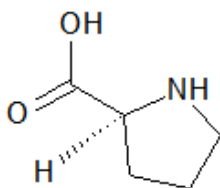
katalycky velmi aktivní. V závislosti na buněčné koncentraci mají ROS dvojí roli ve stresovém prostředí. (Azmat&Moin 2019). Vysoké hladiny ROS způsobují oxidační poškození nukleových kyselin, lipidů, proteinů a kofaktorů potřebné pro enzymatickou aktivitu. Tyto cytotoxické vlastnosti ROS pak vedou k vývoji a mechanismu detoxikace v rostlinách, určené k udržování buněčné homeostázy (Singh et al. 2019).

Stresované rostliny přijímají obranu neboli mechanismy, pro jejich ochranu proti škodlivým účinkům ROS. Tato obrana zahrnuje neenzymatické systémy (např. Glutathiony, a-tokoferoly, karotenoidy a flavonoidy) a enzymatické systémy (např. superoxididismutasa, glutathionperoxidasa a glutathionreduktasa) (Xiao et al. 2019). Neenzymatické zdroje vzniku ROS zahrnují mitochondriální elektronový transport složek řetězce a enzymatické zdroje zahrnují xantinoxidasu a NADPH oxidasu (Luting et al. 2019). Údržba buněčného turgoru osmotickou úpravou je důležitá pro udržení vodního potenciálu v rostlinách (Xiao et al. 2019). Antioxidační enzymové aktivity jako superoxididismutasa a katalasa generované v reakci na stres ze sucha slouží k vylučování ROS prostřednictvím degradace na kyslík, peroxid vodíku a vodu. V nich obvykle hrají roli vysoké hladiny antioxidantů s lepší tolerancí a odolností proti oxidačnímu poškození (Azmat&Moin 2019).

3.3 Prolin a hydroxyprolin

3.3.1 Charakteristika prolinu

Jedná se o aminokyselinu, u které se postranní řetězec váže k hlavnímu řetězci za vzniku pyrrolidinového kruhu (Fujisawa et al. 2018). Tvoří proteiny a je široce distribuován v mikrobech, zvířatech a rostlinách. V rostlinách působí prolin jako osmolyt, antioxidant, chelátor kovu a signální molekula za různých stresových podmínek (Suekawa et al. 2019). Osmolyty jsou kompatibilní roztoky, které se rychle hromadí v reakci na abiotický stres bez zásahu do jiných biochemických reakcí v rostlinách (Xiao et al. 2019). Prolin je aktivně syntetizován a vysoce akumulován při stresu ze sucha a za vysoké salinity (Suekawa et al. 2019).



Obrázek 2 prolin

Prolin hraje důležitou roli v rostlinách proti škodlivým účinkům ROS. Jedná se o aminokyselinu, která brání rostlinu během dehydratace a buněčných osmotických úprav (Azmat&Moin 2019).

Zvýšená hladina prolinu v rostlinách při stresu ze sucha vzniká v důsledku

- zvýšení biosyntézy prolinu,
- poklesu v syntéze spotřeby bílkovin nebo spotřeby prolinu,
- snížení degradace prolinu a hydrolýzy proteinů (Azmat&Moin 2019).

Prolin také pomáhá v osmotické úpravě kvůli udržení buněčného turgoru, což usnadňuje rozšíření a růst rostliny během sucha. Při stresu suchem působí prolin jako pohlcovač volných radikálů a ničí poškození způsobené těmito radikály (Azmat&Moin 2019).

Akumulace ROS a prolinu je obecně považována jako projev stresové reakce. ROS jsou produkovány metabolickou cestou v důsledku neúplné redukce kyslíku. Syntéza prolinu katalyzovaná pyrrolin-5-karboxylátsyntetasou (P5CS) a pyrrolin-5-karboxylátreduktasou (P5CR) je mechanismus regenerace NADP^+ v chloroplastech. Zabraňuje tak produkci ROS a podílí se na modulaci jak vyvíjení ROS, tak zachycování iontů. Významnou roli v syntéze ROS a prolinu hrají fytohormony (La et al. 2018).

Akumulace prolinu může být rozhodující součástí obecné adaptace na životní prostředí a je dána především stimulací biosyntézy prolinu ve stresovaných rostlinách. U rostlin vzniká prolin biosyntasa nejen z glutamátové dráhy, ale také z ornitinové dráhy. $\Delta 1$ -pyrrolin-5-karboxylátsynthetasa (P5CS) a ornithin- δ -aminotransferasa (δ -OAT) jsou klíčové enzymy, které se účastní dráhy glutamátu. Akumulace prolinu také závisí na jeho degradaci, která je katalyzována prolin dehydrogenasou (ProDH) (Xiao-Qingat al. 2015).

Funkce prolinu

- osmotické přizpůsobení a to tak, že zvyšuje schopnost rostliny odolat buněčné dehydrataci způsobené abiotickými stresy,
- ochrana buněčné struktury během dehydratace. Degradace prolinu je rozhodující pro tlumení redoxního potenciálu v buněčných organelách (cytosol, plastidy), protože syntéza prolinu vytváří NADP^+ , zatímco oxidace prolinu produkuje NADPH. Proto je prolin důležitý při toleranci stresu zlepšením posunu redoxního potenciálu doplněním o NADP^+ ,
- zvýšená rychlost biosyntézy prolinu v chloroplastech během stresu pomáhá udržet nízké poměry NADPH/ NADP^+ , stabilizuje redoxní rovnováhu a snižuje fotoinhibici,
- skladování a přeprava redukčních látek. Důležitost je při přenosu energie a při snižování potenciálu,
- také ovlivňuje proliferaci buněk a buněčnou smrt a vyvolává expresi genu nezbytnou pro obnovu rostlin před stresem a růst a rozvoj rostlin,
- chrání rostlinné buňky před oxidačním poškozením přímým vylučováním ROS,
- je také prekurzorem pro jiné antioxidační molekuly,

- slouží jako chelatační činidlo. ROS mohou rychle oxidovat DNA, proteiny a lipidy, což v horším případě může vést k indukci autokatalytické lipidové peroxidaci. Oxidační poškození těchto makromolekul může způsobit poškození membrány a dysfunkci, ztrátu enzymových aktivit a praskliny DNA,
- inhibuje buněčnou smrt podobnou apoptóze (Hossian et al. 2014).

Biochemie prolinu

Prolinová katabolická dráha tvořená glutamátem umožňuje organismům využívat prolin jako zdroj uhlíku, dusíku a jako energetický zdroj. FAD dependentní prolin dehydrogenasa (PRODH) a NAD^+ dependentní glutamát semialdehyddehydrogenasa (GSALD) přeměňují prolin na glutamát ve dvou postupných oxidačních krocích. Flavoenzym prolinová dehydrogenasa katalyzuje 2-elektronovou oxidaci prolinu se současným snížením flavinového kofaktoru (FAD). Tato reakce je spojena s redukcí druhého substrátu nacházejícího se v membráně (např. ubichinon), který naopak reoxiduje redukovaný flavin, což umožňuje další kolo katalýzy. Produkt flavoenzymé prolinové dehydrogenasové reakce, $\Delta 1$ -pyrrolin-5-karboxylát se podrobí neenzymatické hydrolýze na acyklický L-glutamát- γ -semialdehyd. Nakonec je L-glutamát- γ -semialdehyd převeden na glutamát L-glutamát- γ -semialdehyddehydrogenasou přes NAD^+ (Liu et al. 2017).

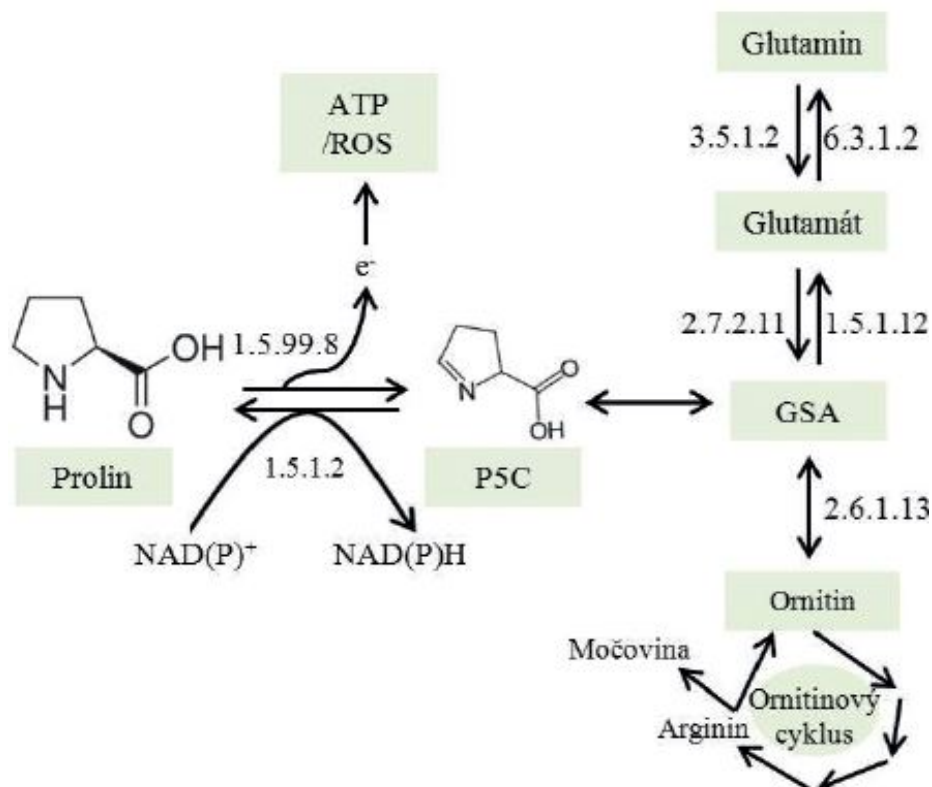
1. Glutamátová cesta

Jako prekurzor se používá glutamát. Vyžaduje 2 enzymy, a to $\Delta 1$ -pyrrolin-5-karboxylátsyntetasu (P5CS) a $\Delta 1$ -pyrrolin-5-karboxylátreduktasu (P5CR). První P5CS fosforyluje a redukuje glutamát na glutamát-semialdehyd (GSA), který je spontánně přeměněn na pyrrolin-5-karboxylát (P5C) a následně enzym P5CR přemění P5C na prolin (Hossian et al. 2014). Za osmotických stresových podmínek převažuje glutamátová dráha (Kahlaouli et al. 2015).

2. Ornitinová cesta

Jako prekurzor se používá ornitin. Tato cesta prochází přes enzym ornithin- δ -aminotransferasu (δ -OAT). Akumulace prolinu přes tuto cestu je důležitá v období růstu semenáčku. Prolin se akumuluje v cytosolu nebo chloroplastu, ale degradace prolinu (oxidace prolinu na glutamát) probíhá v mitochondriích prostřednictvím enzymů. Jako první enzym prolindehydrogenasa (PRODH) přemění prolin na pyrrolin-5-karboxylát (P5C) a enzym pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa (P5CDH) mění P5C na glutamát (Hossian et al. 2014).

Důležitým enzymem u vyšších rostlin je glutamin syntetasa (GS), ten se podílí na reasimilaci NH_4^+ . Také se podílí na asimilaci anorganického dusíku do organické formy a katalyzuje kondenzaci závislou na ATP a NH_4 s glutamátem za vzniku glutaminu, který pak poskytuje dusíkatou skupinu. Glutaminsyntetasa se v rostlinách vyskytuje ve 2 formách. První izoenzym je lokalizován v plastidách a druhý v cytosolu (Kahlaouli et al. 2015).



Obrázek 3 syntéza prolinu

(https://www.google.com/search?q=biochemie+prolinu&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwivtb7MmtzjAhWSKFAKHQEYB5wQ_AUIESgB&biw=1600&bih=750#imgrc=kjIMqIp0v_PqFM:)

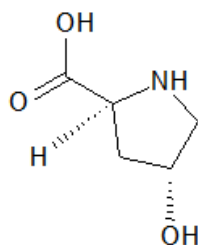
Označení použitých enzymů

1. Prolin dehydrogenasa (PRODH): EC 1.5.5.2 (dříve EC 1.5.99.8)
2. Glutamát semialdehyddehydrogenasa (GSALD): EC 1.2.1.88
3. Pyrrolin-5-karboxylátsyntetasa (P5CS): EC 2.7.2.11
4. Pyrrolin-5-karboxylátreduktasa (P5CR): EC 1.5.1.2
5. Ornithin- δ -aminotransferasa (δ -OAT): EC 2.6.1.13
6. Pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa (P5CDH): EC 1.5.1.12 – v roce 2013 byl enzym smazán a pojmenován jako L-glutamát- γ -semialdehyddehydrogenasa
7. Glutamin syntetasa (GS): EC 6.3.1.2

3.3.2 Charakteristika hydroxyprolinu

Všechny rostlinné patogeny interagují s rostlinnými buněčnými stěnami, které jsou vysoce hydratované a podobné gelu. Na nejjednodušší úrovni poskytují stěny fyzickou bariéru mezi patogeny a protoplastem rostlinných buněk. Rostlinné buněčné stěny zahrnují hlavně

dlouhé celulóзовé fibrily, hemicelulózu, pektin a několik strukturálních stěnových glykoproteinů jako jsou glykoproteiny bohaté na hydroxyprolin a proteiny bohaté na glycin (Deepak et al. 2006). Glykonjugáty hydroxyprolinu byly poprvé popsány v buněčné stěně Lamportem a Clarkem roku 1969 (Taylor et al. 2011).



Obrázek 4 hydroxyprolin

Funkce hydroxyprolinu:

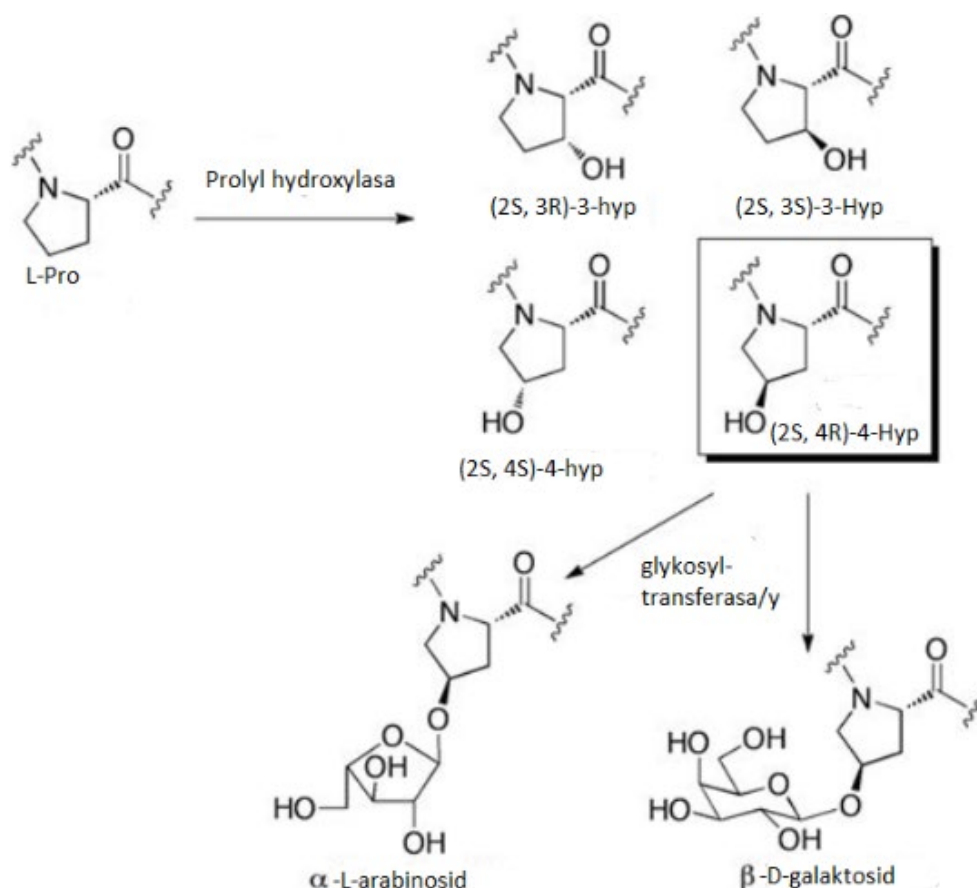
Glykoproteiny bohaté na hydroxyprolin (HGRP) hrají důležitou roli v růstu a vývoji rostlin. HRGP se běžně dělí do tří hlavních multigenových rodin, vysoce glykosylované arabinogalaktanové proteiny (AGP), středně glykosylované extensiny (EXT) a minimálně glykosylované proteiny bohaté na prolin. Pátevní bílkoviny těchto HRGP se vyznačují rozdíly v zaujatosti aminokyselin a opakujícími se motivy charakteristickými pro každou rodinu a zahrnují posttranslační modifikaci prolinu na Hydroxyprolin. Každá z těchto rodin je dále rozpracována chimérickými a hybridními HRGP, což komplikuje nejen klasifikaci členů, ale také objasnění jejich funkcí (Johnson et al. 2017). HRGP jsou všudypřítomné složky rostlinné extracelulární matrice a tvoří až ~ 10% (hm/hm) buněčné stěny ve dvouděložných rostlinách. Vytvářejí kovalentně zesítené sítě, vytvářející negativně nabitě polštáře na rozhraní membránové stěny, a tím zajišťují funkce, jako jsou bariéry proti vniknutí patogenu, lepidlo pro zachycení pylu, primery pro biosyntézu polysacharidů na stěně a regulátory signalizace Ca^{2+} . HRGP mají charakteristicky opakující se peptidové motivy, které specifikují rozsah a typ glykosylace na některých zbytcích hydroxyprolinu (Chen et al. 2015). EXT bohaté na hydroxyprolin jsou zapojeny do klíčových událostí růstu a vývoje rostlin, včetně hnojení, buněčného dělení a diferenciaci, elongace buněk, hlízování a procesů stárnutí. EXT reagují na různé biotické a abiotické stresy, jako jsou patogeny, poranění a některé ROS (O_3 a H_2O_2) (Zhang et al. 2014).

Aminokyselina hydroxyprolin má potenciál pro sledování rostlinného dusíku, protože glykoproteiny bohaté na hydroxyprolin, strukturální proteiny v buněčných stěnách rostlin, jsou jeho jediným hlavním biochemickým zdrojem v půdě. Aminokyselina 4-hydroxyprolin je slibným kandidátem na rostlinný indikátor N. Má pouze dva hlavní biochemické zdroje, a to glykoproteiny bohaté na hydroxyprolin v rostlinách a kolagen neboli strukturální protein u zvířat. Glykoproteiny v rostlinách jsou homologní rodinné bílkoviny v primárních buněčných stěnách všech rostlin, nejvíce v zelených řasách. Jsou nerozpustné a hrají strukturální roli ve zvýšené tažné síle buňky rostlin a přispívají k obraně proti patogenům (Philben&Benner 2013).

Aplikace hydroxyprolinu na list rostliny zvyšuje růst a výnos, rostlina snižuje účinek autotoxicity, což je forma interspecifické alopatie a nastává, když rostlina uvolňuje chemické látky, které inhibují nebo zpožďují vlastní klíčení a růst. K autotoxicitě může dojít z důvodu uvolnění chemikálií do rhizosféry prostřednictvím různých mechanismů jako je louhování, volatilizace, exsudace kořenů, rozšíření pylu v některých rostlinách a rozklad zbytků plodin (Talukder et al. 2018).

Přeměna prolinu na hydroxyprolin:

Intracelulární signalizace je životně důležitá pro všechny organismy. Ligandy na bázi peptidů obsahujících prolin jsou důležitou třídou signálních molekul v rostlinné říši. Navíc jsou prolinové zbytky často hydroxylovány a následně sulfatovány nebo glykosylovány. Hydroxylace a následná glykosylace prolinu představují dvě sekvenční posttranslační modifikace, a tedy významnou investici do genetického a enzymatického aparátu na straně organismu. Z přírody byly izolovány čtyři izomery hydroxyprolinu. Nejběžnějšími vazbami nalezenými v HRGP jsou α -L-arabinosid a β -D-galaktosid. Prolin je jednou z nejdůležitějších kódovaných aminokyselin vzhledem ke konformaci peptidů a proteinů (Taylor et al. 2011).



Obrázek 5 přeměna prolinu na hydroxyprolin
(<https://academic.oup.com/glycob/article/22/6/757/1988097>)

3.4 Stanovení prolinu a hydroxyprolinu

V této části se budu zaměřovat na literární rešerši hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací, protože se tomu pak nadále věnuji v praktické části práce.

3.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Tuberoso et al. (2019) stanovovali aminokyseliny a biogenní aminy ve vínech. Stanovení aminokyselin bylo provedeno po derivatizaci s danzyl chloridem. Směs byla převedena do 1,5 ml ependorfy a bylo přidáno 50-100 μ l vzorku vína, 10 μ l norvalínu (100 mg/l), 100 μ l danzyl chloridu a 0,2 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (pH 9,3) do celkového objemu 1000 μ l. Směs byla inkubována po dobu 30 minut při 40 °C v ultrazvukové lázni a poté centrifugována po dobu 10 minut v odstředivce. Supernatant byl izolován a naředěn methanolem 1:1 pro kapalinovou chromatografii s fluorescenčním detektorem. Metoda HPLC slouží k separaci složek vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti i koncentrace ve vzorku. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril, separace proběhla na koloně za použití pufru acetát/ CH_3CN o pH 4,1 (rozpouštědlo mix CH_3COOH , CH_3CN , CH_3COONa a voda). Byla provedena kvantitativní analýza pomocí kalibračních grafů a zjistily se vysoké hodnoty aminokyselin, přičemž prolin byl nejhojnější s průměrnými hladinami 1244 ± 398 a 1008 ± 281 mg/l ve vínech Cannonau a Vermentino.

3.4.2 Spektrofotometrie

Meda et al. (2005) měřili obsah prolinu v medu kde byl jeho obsah stanoven pomocí srovnání barvy po obarvení s ninhydrinem a pomocí standardu prolinu. 0,05 g medu bylo smícháno s 1 ml kyselinou mravenčí a 1 ml roztoku ninhydrinu a roztok se 15 minut třepal. Poté se směs umístila na 15 minut do vroucí lázně a na 10 minut do lázně při 70 °C. Do směsi bylo přidáno 5 ml roztoku 50 % 2-propanolu ve vodě, a to se nechalo vychladnout. Po vychladnutí byly vzorky měřeny pomocí spektrofotometru při absorpční vlně 510 nm a z kalibrace byla zjištěna koncentrace prolinu. Spektrofotometrie je analytická metoda pro měření vlastností vzorku na základě pohlcování světla různých vlnových délek spektra. Obsah prolinu kolísal od 437,8 mg/kg do 2169,4 mg/kg s průměrem $989,5 \pm 407,4$ mg/kg.

3.4.3 Kapilární elektroforéza

Dominguez et al. (2016) stanovovali obsah prolinu v medu pomocí kapilární elektroforézy. Obsah prolinu v medu se stanovuje jako kritérium pro odhad kvality a někdy i pro odhad zralosti medu a jako indikátor pro detekci falšování cukru. Kapilární elektroforéza je separační metoda založená na diferenciální rychlosti migrace nabitých druhů látek v pufrovém roztoku, na které bylo aplikované stejnosměrné elektrické pole. Separace byla prováděna v kapilární zóně s nepřímou detekcí UV v kapiláře z taveného oxidu křemičitého. Vstřikování vzorků bylo prováděno hydrodynamicky režimově po dobu 3 sekund při 0,5 psi. Základním elektrolytem bylo 10 mmol/l benzoátu sodného s 1,5 mmol/l cetyl trimethyl ammonium bromidem při pH 12,4. Závěrem bylo zjištěno, že obsah prolinu ve vzorcích medu byl v souladu s Codex Alimentarius, což je minimálně 180g prolinu/kg medu.

3.4.4 Hmotnostní spektrometrie

Je to technika široce využívaná v kvalitativní analýze pro stanovení organických a anorganických struktur buď samostatně, nebo ve spojení s další spektrometrickou technikou. Také se využívá v kvantitativní analýze, a to, když je připojen k chromatografu. Principem je získání plynných iontů z organických nebo anorganických molekul v plynné fázi nebo těžkých iontů z vhodně dispergovaných velmi polárních anorganických nebo organických molekul v kapalně fázi. Ionty jsou pak separovány dle jejich hmotnosti a náboje, a nakonec zaznamenány na vhodný detektor (Andrade – Garda et al. 2017).

Popis

1. Vstup vzorku

Molekuly jsou analyzovány v plynné fázi (Andrade – Garda et al. 2017).

2. Systém ionizace

Typy ionizačních systémů, které jsou tříděné podle jejich snižující se energie (Andrade – Garda et al. 2017).

Elektronová nárazová ionizace (EI): molekuly v plynné fázi jsou ionizovány procházejícím elektronovým paprskem s vysokou energií,

chemická ionizace (CI): k ionizaci molekul dojde díky kolizi s reaktivním plynem ionizovaným elektronovým paprskem,

ionizace bombardováním rychlými atomy (FAB): ionizace molekul je tvořena pomocí bombardování urychlovaných iontů na suspenzi požadované sloučeniny ve vhodné matici,

matricí asistovaná laserová desorpční ionizace (MALDI): ionizace molekul se tvoří ozářením suspenze požadované molekuly laserem ve vhodné matici,

elektrosprejová ionizace (ESI): produkce iontů je dosaženo pomocí generování spreje z elektrody vystavené vysokému napětí (Andrade – Garda et al. 2017).

3. Systém analýzy iontů

Kvadrupólový analyzátor (QMS): tvořen čtyřmi kovovými tyčemi s kruhovým řezem, kde uprostřed je paprsek dopadající do zdroje. Tyče jsou vystaveny stálému potenciálu, takže kvadrupól funguje jako hmotnostní filtr pro výběr hmoty, která se přenáší do detekčního zařízení (Andrade – Garda et al. 2017),

- **trojitý kvadrupólový analyzátor:** dochází k vymývání peptidů, kde první kvadrupól slouží jako hmotnostní filtr pouze k izolaci peptidů s cíleným m/z . Druhý kvadrupól slouží jako kolizní buňka pro rozdělení peptidu na fragmenty. Třetí kvadrupól funguje jako druhý hmotnostní filtr pro specifické fragmenty m/z původního rodičovského peptidu. Detektor pak zaznamenává intenzitu přechodu jednotlivých fragmentů iontů (Wiita et al. 2014),

magnetický analyzátor: když ionty opouštějí ionizační komoru, zrychlené elektrickým polem, kterému byly vystaveny, vstupují do magnetického pole kolmého na jejich pohyb. Jsou nuceni opsat kruhový pohyb, jehož poloměr závisí na magnetickém poli, náboji a hmotnosti iontů. Intenzita magnetického pole způsobuje výběr určitých iontů dle hmotnosti, které dopadají na detektor,

analyzátor iontové pasti (IT): je to modifikace kvadrupólového analyzátoru, založená na použití elektromagnetické ochranné zóny generované dvěma vysokofrekvenčními signály. Skládá se ze tří elektrod s hyperbolickým povrchem. Střed je prstencový, zatímco horní a dolní elektroda tvoří uzavření prstencových konců. Dutina tvořená třemi elektrodami je prostorem, ve kterém dochází k analýze ionizační a fragmentační hmoty,

analyzátor času letu (TOF): ionty ze zdroje jsou urychlovány pulsem elektrického potenciálu, kdy urazí určitou délku uvnitř analyzátoru (Andrade – Garda et al. 2017).

4. Detektor

Faradayova krabice: sestává z krabice, ve které je nakloněna deska tak, aby se zabránilo odrazu iontů. Když se ionty srazí s deskou, tak dojde k vyjmutí elektronů, aby neutralizovaly svůj náboj, a generují proud, jehož intenzita je přesně úměrná počtu iontů, které dosáhly destičky,

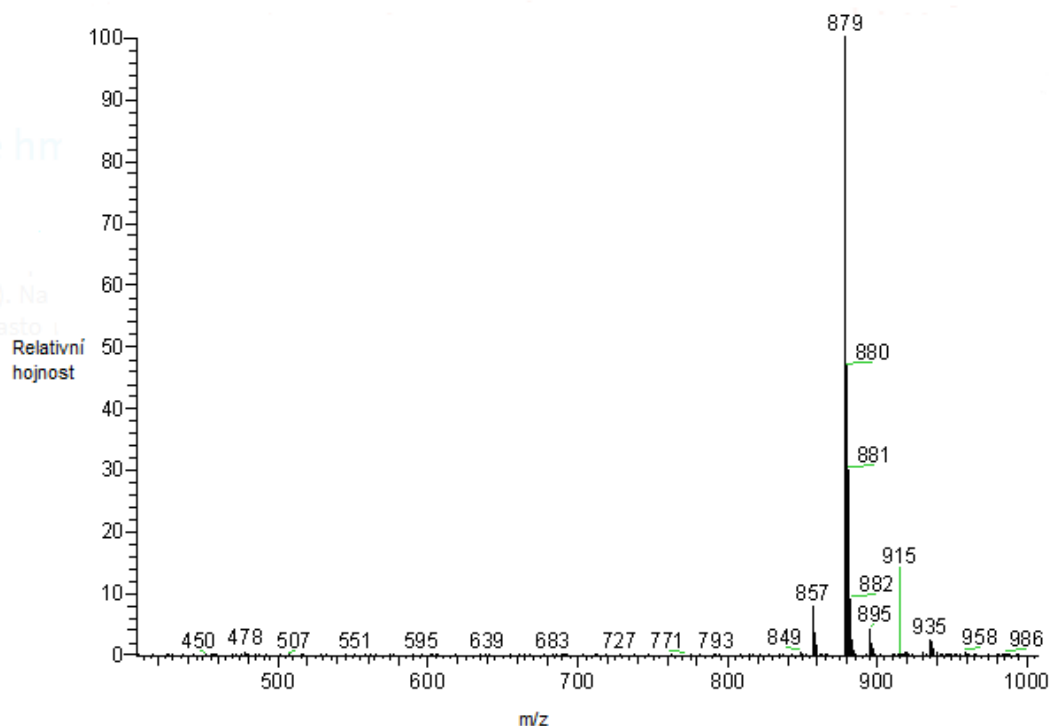
multiplikátor: tento detektor používá kinetickou energii iontů dopadajících na desku, jejíž povrch je potažen oxidy vzácných zemin. Když se ionty srazí s deskou, proud elektronů se uvolní směrem k druhé destičce,

fotografické desky: mají omezené použití, používají se pouze v zařízeních s mimořádně vysokou citlivostí a rozlišením (Andrade – Garda et al. 2017).

5. PC

Iontové hmotnostní spektrum

V plynové a kapalinové chromatografii se složky směsi vymývají z chromatografické kolony v různých retenčních časech. Pokud je jako chromatografický detektor (LC-MS) použit hmotnostní spektrometr, musí jeho výstup představovat chromatogram, který by byl získán s jinými chromatografickými detektory. Hmotnostní spektrum je pak dvourozměrný poměr intenzity signálu k poměru hmotnost/náboj (m/z) (Gross 2011).

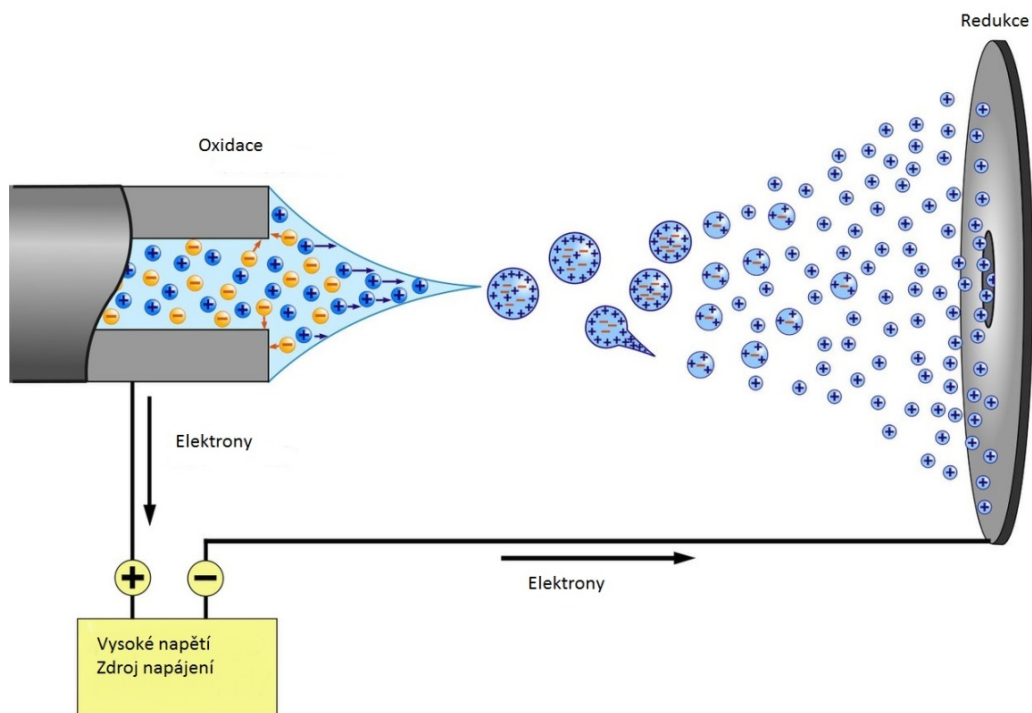


Obrázek 6 příklad hmotnostního spektra

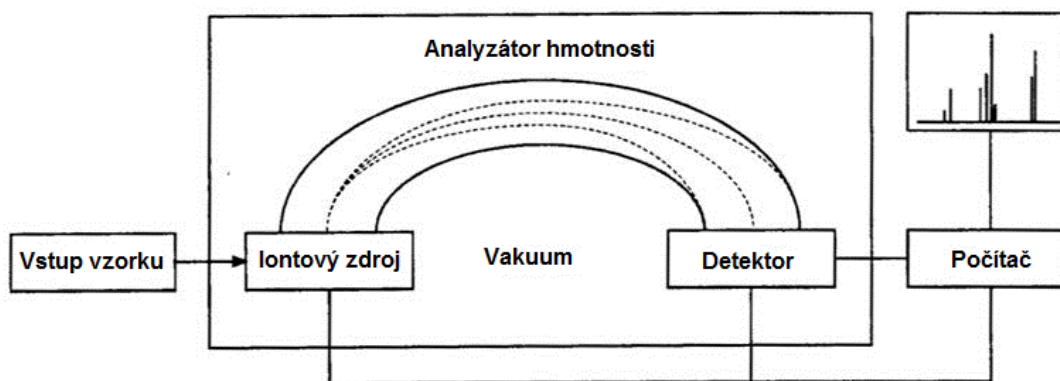
(<https://clab.vscht.cz/ms/interpretace-ms#/images/0!0/uzel/0024847/8w2OLy5IzS4pKs0FAA.png>)

Elektrosprej

Je to metoda, díky které mohou být ionty přítomné v roztoku přenášeny do plynné fáze. Spočívá v aplikaci elektrického pole na špičku kapiláry obsahující roztok elektrolytových iontů v koncentraci $C > 10^{-6}$ mol/l. Přítomnost pole vede k vytvoření dipolární vrstvy v menisku kapaliny na špičce kapiláry. Dvojitá vrstva je způsobena částečným prostorovým oddělením elektrolytových iontů. Když je kapilára pozitivní, kladné ionty elektrolytu z dvojitě vrstvy se přiblíží k povrchu a destabilizují (znerovnováží) meniskus. Forma kužele, paprsku kapaliny a tryska emituje kladně nabitě malé kapičky. Kapičky jsou nabíjeny kvůli nadbytku kladných elektrolytových iontů. Proud kapek vede elektrický proud, který je většinou menší jak $1 \mu\text{A}$. Přebytek unipolárních iontů je zajištěn elektrolytickým procesem v kapiláře, který, když je kapilára pozitivní, přidá do roztoku kladné ionty nebo z roztoku odstraní záporné ionty elektrolytu (Cole 1997).



Obrázek 7 schéma procesů v elektrospreji
 (https://en.wikipedia.org/wiki/Electrospray_ionization)



Obrázek 8 schéma hmotnostního spektrometru
 (<https://slideplayer.cz/slide/4188584/>)

4 Metodika

4.1 Pěstování brambor

Rostliny brambor byly pěstovány v 5 l květináčích v substrátu Hawita baltisches trisubstrát (dávkování 45 025; pH 5,8; CaCl₂, bílá rašelina 70 %, černá rašelina 30 %, struktura jemná, HAWITA Gruppe GmbH, Vechta, Německo). Před zahájením experimentu byly do nádoby přidány 2 g hnojiva NPK 8-24-24. V každém květináči byla vypěstována jedna rostlina brambor. Experiment byl proveden ve čtyřech replikách za rok. Květináče byly umístěny do skleníku podle metody latinského čtverce. Rostliny byly pěstovány v režimu přirozeného světla, kde délka dne byla 13 hodin a tma 11 hodin. Získaná sadba pro každou odrůdu byla ponechána 3 týdny v chladu při teplotě 4–5 °C, aby mohla proběhnout jarovizace, hlízy byly vysázeny do kontejnerů o objemu 5 l a ponechány růst do doby, dokud nedosáhly 60 % vláhové jistoty.

Jednalo se o náhodný pokus ve skleníku. Teplota ve skleníku byla nastavena na 17 °C během noci a na 22 °C během dne. Relativní vlhkost vzduchu dosahovala 70 %. Během celého pokusu byl jednou aplikován insekticid a jednou fungicid. Hlízy odrůd byly pěstovány ve třech různých variantách.

1. Anoxie: rostliny a substrát udržovány v anoxii umístěním květináčů do lázně s vodou,
2. ve stresové variantě: deficit vody indukován metodou postupného přirozeného vysoušení ze substrátu,
3. kontrola: optimální závlaha, kdy byly rostliny zavlažovány destilovanou vodou v pravidelných tří denních intervalech s množstvím vody 450 ml na nádobu.

Stres rostlin ve druhé a třetí variantě experimentu byl indukován ve vývojové fázi BBCH 109. Rostliny všech experimentálních variant byly dvakrát feritizovány 3 % roztokem NPK 8-24-24 ve 450 ml vody pro zalévání ve vývojových stádiích 406 a 703 BBCH. Do živného roztoku bylo přidáno 2,40 g N; 3,14 g P a 5,98 g K v čistých živinách. Vzorkování hlíz bylo provedeno podle stupnice BBCH 909 (sklizený produkt, 71 dní stresu). Sklizené hlíz proběhly dne 17. 5. 2017.

Pro stanovení obsahu prolinu a hydroxyprolinu byly použity čtyři odrůdy brambor.

Laura

Jedná se o poloranou odrůdu určenou pro přímý konzum, varného typu B. Hlízy jsou dlouze oválné, slupka je červená a dužnina tmavě žlutá. Jedná se o vzhledné hlízy. Výnos tržních hlíz je nižší a jsou méně odolné proti napadení plísní bramborovou (Čermák 2015).



Obrázek 9 odrůda Laura
(<https://europlant.cz/laura>)

Marabel

Jedná se o konzumní odrůdu dosahující vyššího výnosu hlíz. Hlízy jsou středně velké a oválné s tmavě žlutou dužinou a žlutou slupkou. Vařené hlízy jsou jemné a netmavou a mají varný typ BA – B. Počáteční růst natě je středně rychlý a růst hlíz je velmi rychlý. Počet hlíz je střední. Tato odrůda je odolná vůči hád'átku bramborovému, virovým chorobám a silně náchylná rakovině brambor. Marabel je registrována od roku 1995 (Vokál et al. 2000).



Obrázek 10 odrůda Marabel
(<https://europlant.cz/marabel>)

Milva

Je to taktéž poloraná odrůda určená pro přímý konzum, varného typu AB, vhodná pro úpravu loupáním. Dužnina je žlutá a hlízy krátce oválné. Výnos tržních hlíz je velmi vysoký a hlízy netmavnou po uvaření. Pěstitelské riziko zde představuje náchylnost k napadení virovými chorobami (Čermák 2015).



Obrázek 11 odrůda Milva
(<https://eurolant.cz/milva>)

Valfi

Jedná se o odrůdu s delší vegetační dobou (poloranou až polopozdní) s modrofialově zbarvenou slupkou a modrofialově mramorovanou dužninou s nižším výnosem středně velkých hlíz. Zabarvení hlíz pozitivně ovlivňuje teplota v průběhu pěstování. Proto lze předpokládat intenzivnější zbarvení při pěstování v přirozeně teplejších oblastech a na lehčích půdách. Jedná se o speciální odrůdu, která je velmi cenná obsahem prospěšných látek. Jedná se především o obsah antokyanů, které mají v lidské výživě velký zdravotní význam. Působí především antioxidačně, což má vliv na snížení nebezpečí výskytu aterosklerózy a určitého 59. typu rakoviny. Antioxidační aktivita modrofialově zbarvených brambor je dvakrát až třikrát vyšší než u brambor se žlutou dužninou (Domkářová et al. 2006).



Obrázek 12 odrůda Valfi
(<https://www.vubhb.cz/cs/clanky/brambory/valfi-varny-typ-bc>)

4.2 Stanovení aminokyselin

4.2.1 Příprava brambor k analýze

Chemikálie

- Methanol (p.a., Lach-Ner, Česká republika),
- methanol (gradient grade, FisherScientific, UK),
- L-prolin ($\geq 99\%$), L-4-hydroxyprolin ($\geq 99\%$),
- heptafluoromáselná kyselina (HFBA, $\geq 99\%$, Merck Německo).

Zpracování brambor

Aby bylo možné provést stanovení, tak byly všechny čtyři odrůdy brambor rozmixovány v mixéru. Bylo naváženo 0,5 g lyofylovaného bramborového vzorku hlízy do 15 ml plastové kyvety (falkonky) od každé brambory (Lyovac GT2, Německo). K tomu se přidalo 5 ml extrakční směsi (methanol:voda) v poměru 1:1. Poté se směs třepala 30 minut na třepače (150 kyv/min; GFL 3006, Německo). Po třepání byly vzorky dány do odstředivky (5810R, Eppendorf, Německo) při 8228 rcf po dobu 5 minut. Supertant se naředil 100x demineralizovanou vodou (Simplicity UV, Merck Millipore, KGaA, Německo) a vzorky byly poté přefiltrovány přes nylonový mikrofiltr (0,22 μm) a analyzovány na LC-ESI-MS/MS.

4.2.2 Vlastní analýza

LC-ESI-MS/MS analýza

K analýze aminokyselin byl použit kapalinový chromatograf (Ulti Mate 3000 RS, Thermo Fisher Scientific, USA) spojený s hmotnostní detekcí (A3200 QTRAP, kvadrupólový hmotnostní spektrometr, AB Sciex, USA). Separace aminokyselin v podmínkách RP-HPLC byla docílena pomocí ion-párové chromatografie. Jako ion-párové činidlo byla do mobilní fáze přidána heptafluoromáselná kyselina (HFBA).

Tabulka 4 parametry detektoru

Parametry detektoru	Nastavení	
	L-Prolin	L-4-Hydroxyprolin
$[\text{M}^+\text{H}]^+$	116,1	132,2
Fragmenty	70,0	86,1; 68,1
DP	25 V	27 V
CE	20 V	20 V
EP	3,6 V	3,6 V
CXP	2,2 V	2,3 V

Tabulka 5 podmínky chromatografické separace

Ukazatelé	Nastavení
Analytická kolona	ZORBAX SB-C18; 3,0 x 150 mm; 5 µm (Agilent, USA); T 25 °C
Autosampler	T 10 °C
Mobilní fáze	A: 20 mM HFBA ve vodě B: 20 mM HFBA v methanolu (gradientová eluce) <ul style="list-style-type: none"> • 0-0,5 min: 20 % B isokrat. • 0,5-9 min: 60 % B lin. grad. • 9-10 min: 60 % B isokrat. • 10-11 min: 20 % B lin. grad. • 11-15 min: 20 % B isokrat.
Doba analýzy	15 minut
Průtok	0,3 ml/min
Objem nástřiku	1 µl

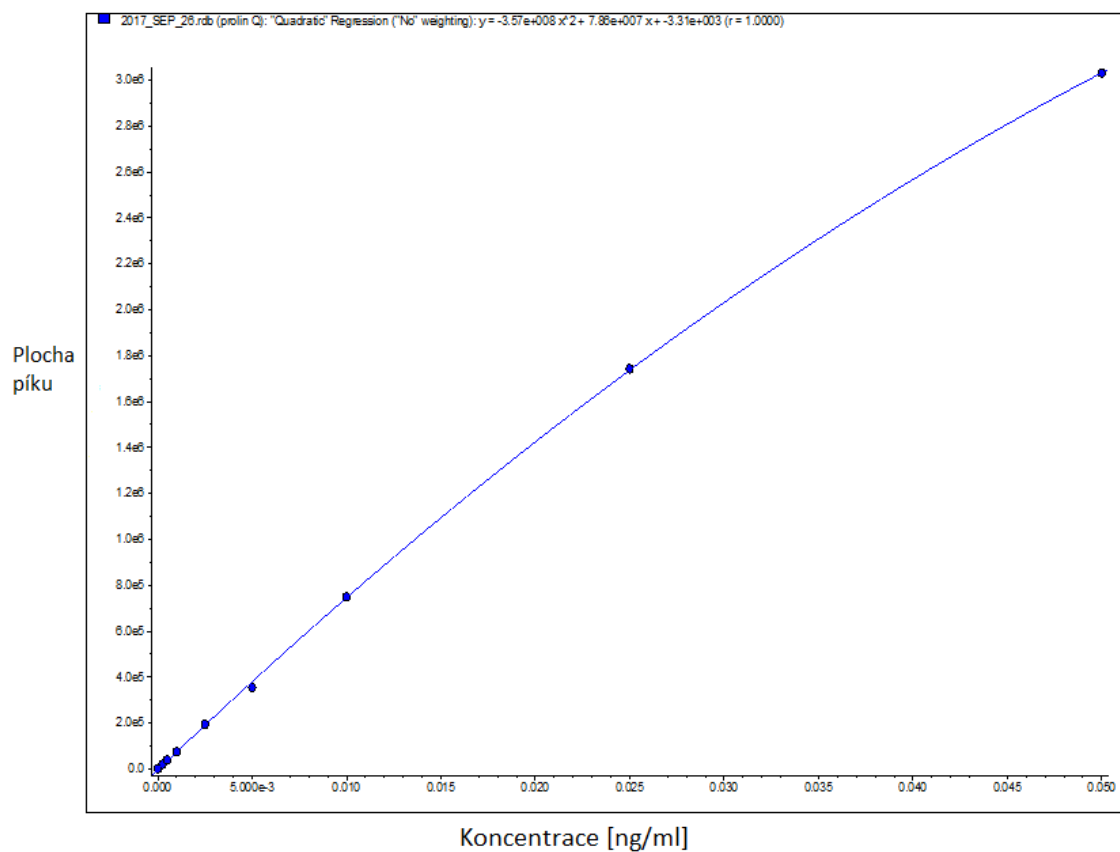
Tabulka 6 podmínky MS detekce

Parametry zdroje	Nastavení
Ionizace	ESI v pozitivním módu
Curtaingas	30 psig
Iontové střídavé napětí	5500 V
Teplota	700 °C
Plyn 1 (Nebulizer)	55 psig
Plyn 2 (Turbo plyn)	50 psig

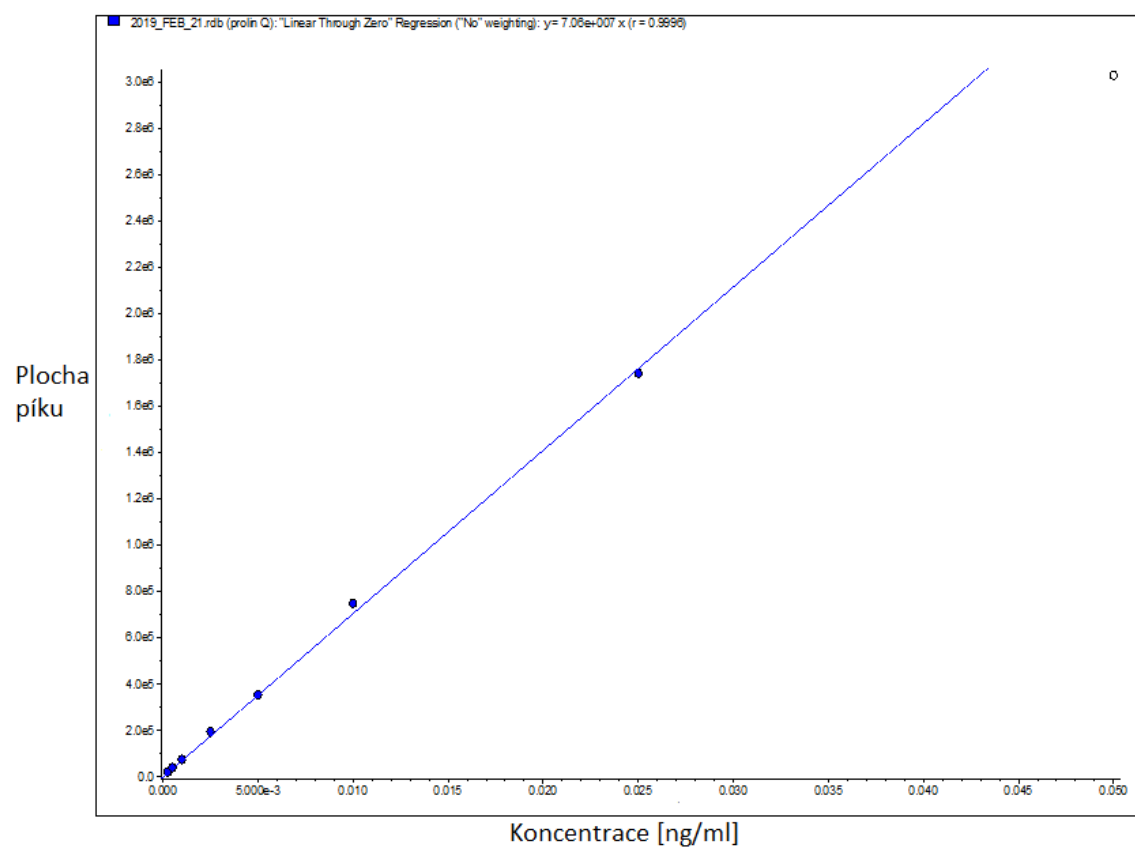
4.2.3 Kvantifikace

Kvantifikace aminokyselin byla provedena metodou externí kalibrace. Z analytických standardů aminokyselin byla sestrojena osmibodová kalibrace v rozmezí koncentrací 0,00025-0,05 µM každé aminokyseliny/ml. LOD (limit detekce) (S/N = 3) prolinu a hydroxyprolinu činil 7 a 12 ng/ml. Naměřené hodnoty aminokyselin jsou vyjádřeny v mg/g suchého vzorku (DW).

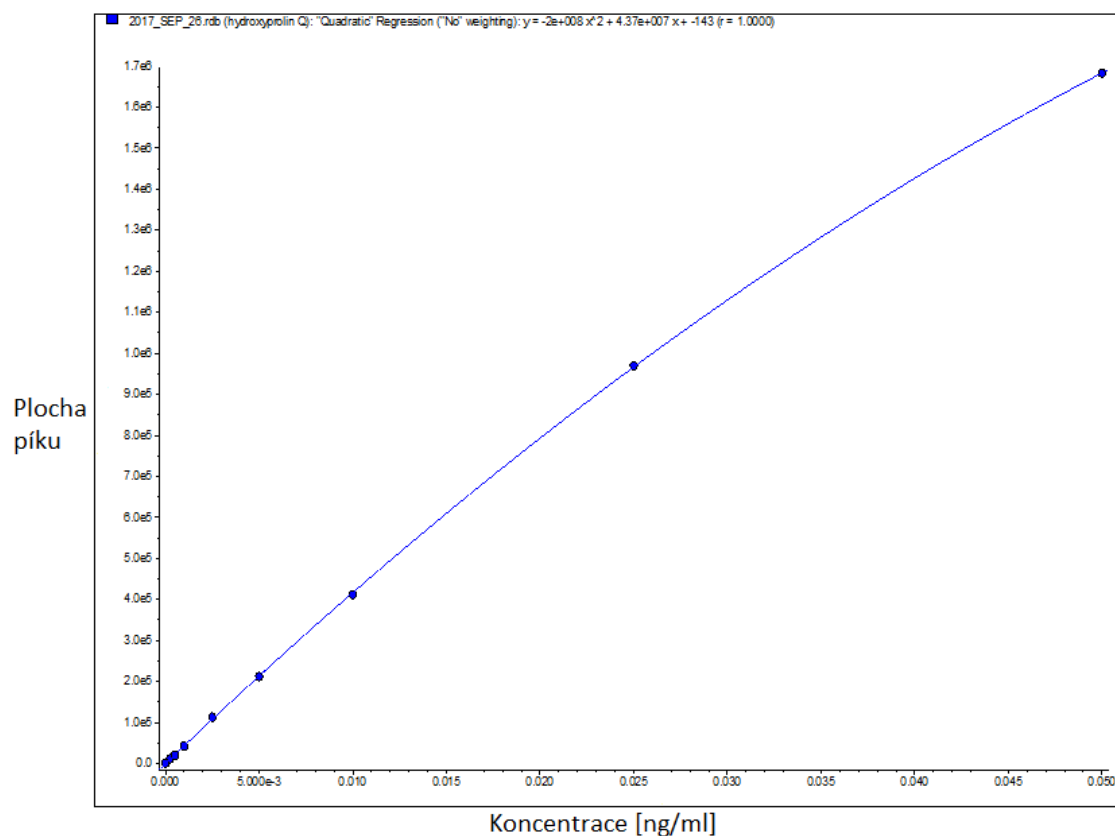
Graf 1 kalibrační křivka prolinu v celém rozsahu koncentrací



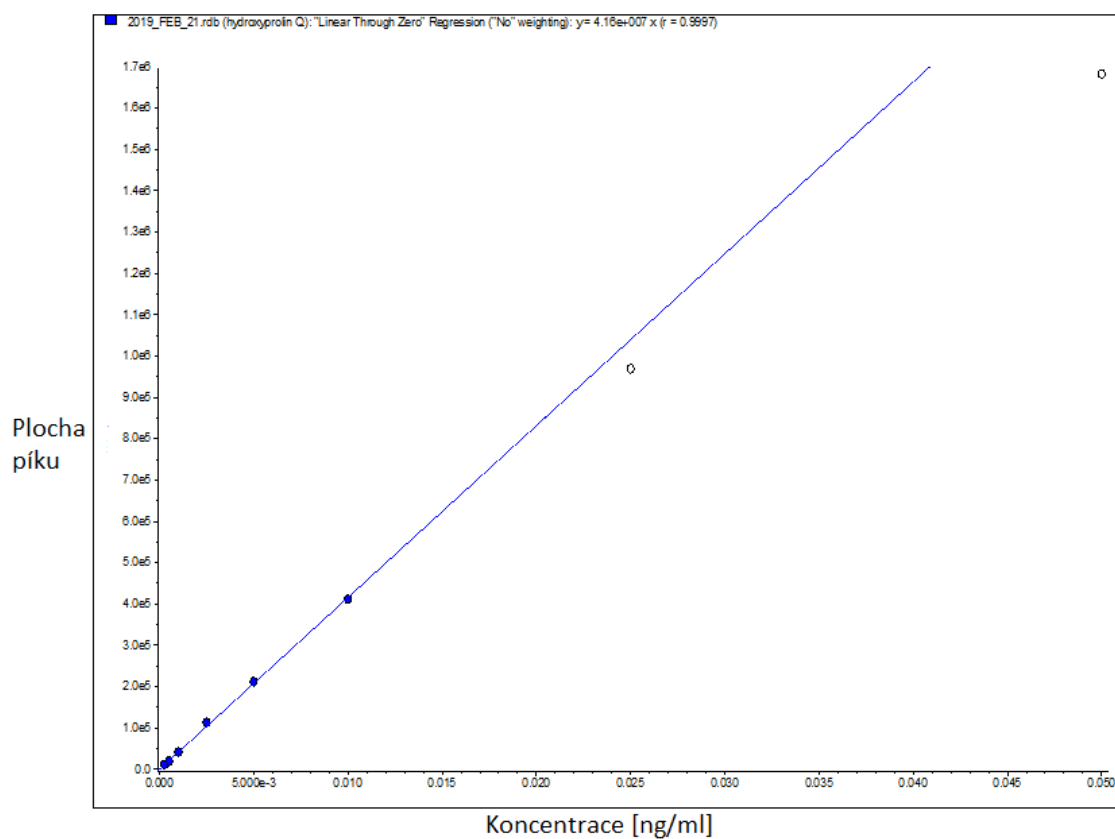
Graf 2 kalibrační křivka prolinu k reálné kvantifikaci vzorku



Graf 3 kalibrační křivka hydroxyprolinu v celém rozsahu koncentrací



Graf 4 kalibrační křivka hydroxyprolinu k reálné kvantifikaci vzorku



4.2.4 Statistické vyhodnocení

Pro každou odrůdu, variantu, prolin a hydroxyprolin byl stanoven statisticky významný rozdíl v programu Statistica 12 pomocí dvoufaktorové anovy s interakcemi na hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$ s faktory odrůda a varianta měření. Interval spolehlivosti α byl stanoven na 95 %. Na základě toho bylo vyhodnoceno, zda mezi jednotlivými proměnnými existuje statisticky významný rozdíl. Na začátku byly stanoveny celkem čtyři nulové hypotézy. H0₁: obsah prolinu v hlízách brambor je projevem vodního stresu. H0₂: rostliny vystavené stresu suchem vykazují vyšší obsah prolinu. H0₃: rostliny převlhčené vykazují zvýšené obsahy prolinu v hlízách oproti kontrole. H0₄: odrůdy reagují na vodní stres odlišně. Pro vyhodnocení byl použit F-test. Pokud u něj p hodnota vyjde nižší než stanovená hladina významnosti, pak nulovou hypotézu zamítáme.

5 Výsledky

Ve vzorcích hlíz brambor odrůdy Laura, Marabel, Milva a Valfi byl stanoven obsah prolinu a hydroxyprolinu ve třech variantách, a to sucho, zamokření a kontrola. Každá z variant byla měřena třikrát, z důvodu co nejpřesnějšího výsledku a pro případné odhalení chyby v měření. Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako v mg/g DW.

Výsledky jednotlivých měření jsou zpracovány do tabulek a grafů podle jednotlivých odrůd pro aminokyselinu prolin a hydroxyprolin. Poslední grafy jsou souhrnné pro všechny odrůdy a varianty pěstování.

5.1 Vyhodnocení prolinu a hydroxyprolinu

Tabulka 7 popisné statistiky prolinu a hydroxyprolinu všech odrůd pro variantu pěstování v suchu

Proměnná	Popisné statistiky (List1 v Pro + hydpro sucho)							
	N platných	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Rozptyl	Sm.odch.	Var.koef.
Prolin	12	3,236377	2,596182	1,559530	6,389715	3,305950	1,818227	56,18094
Hydroxyprolin	12	0,018734	0,017668	0,015080	0,023210	0,000007	0,002644	14,11402

Tabulka 8 popisné statistiky prolinu a hydroxyprolinu všech odrůd pro variantu pěstování v zamokření

Proměnná	Popisné statistiky (List1 v pro + hydpro zamokření)							
	N platných	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Rozptyl	Sm.odch.	Var.koef.
Prolin	12	0,105512	0,105632	0,066545	0,152817	0,000842	0,029014	27,49837
Hydroxyprolin	12	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00000

Tabulka 9 popisné statistiky prolinu a hydroxyprolinu všech odrůd pro variantu pěstování u kontroly

Proměnná	Popisné statistiky (List1 v pro + hydpro kontrola)							
	N platných	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Rozptyl	Sm.odch.	Var.koef.
Prolin	12	0,931459	0,486028	0,123189	2,683309	1,098663	1,048171	112,5300
Hydroxyprolin	12	0,008453	0,007118	0,000000	0,020063	0,000080	0,008952	105,9088

Z tabulky č. 7, 8 a 9 je vidět, že průměrný obsah prolinu je pro všechny varianty pěstování vyšší než obsah hydroxyprolinu. Nejvyšší množství prolinu bylo naměřeno u brambor pěstovaných v suchých podmínkách s průměrnou hodnotou $3,236 \pm 1,818$ mg/g DW. Naopak metodou pěstování v zamokření vyšel obsah prolinu i hydroxyprolinu nejnižší.

Tabulka 10 vliv odrůdy a varianty na obsah prolinu a hydroxyprolinu

Efekt	Vícerozměrné testy významnosti (List1 v aminokyseliny vs odrůda a varianta) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy					
	Test	hodnota	F	Efekt sv	Chyba sv	p
Abs. člen	Wilksův	0,140677	88,57304	2	29	0,000000
Odrůda	Wilksův	0,295108	8,12786	6	58	0,000002
Varianta	Wilksův	0,156062	22,20451	4	58	0,000000

Dle tabulky č. 10 je zřejmé, že efekt proměnných (odrůda a varianta pěstování) na závisle proměnné (prolin a hydroxyprolin) je významný ($p < 0,05$), a proto následuje podrobnější vyhodnocení pomocí Scheffeho testu.

5.1.1 Vyhodnocení obsahu prolinu

Tabulka 11 podrobnější vyhodnocení pro prolin pomocí Scheffeho testu

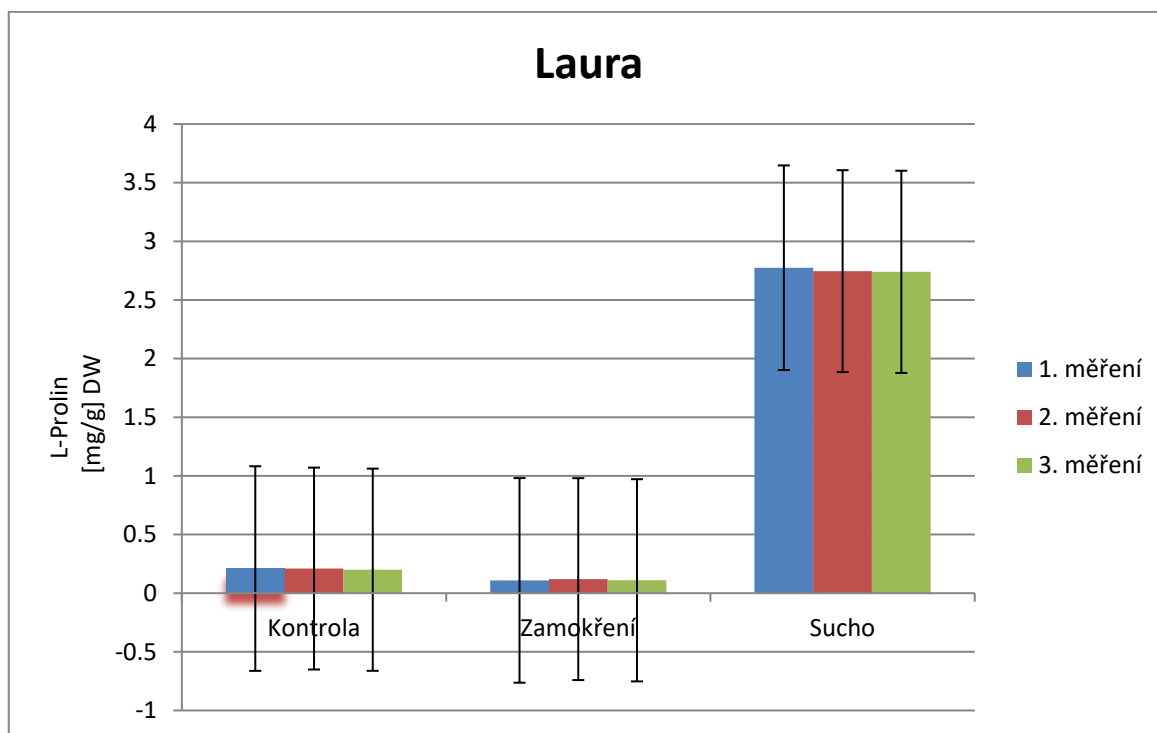
Scheffeho test; proměnná Prolin (List1 v prolin) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 6626,3, sv = 24,000														
Č. buňky	Odrůda	Varianta	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
			206,71	112,71	2753,6	769,82	143,81	1617,4	133,46	97,772	2415,2	2615,8	67,752	6159,3
1	Laura	kontrola		0,997326	0,000000	0,000064	0,999939	0,000000	0,999731	0,990707	0,000000	0,000000	0,943571	0,00
2	Laura	zamokření	0,997326		0,000000	0,000005	1,000000	0,000000	1,000000	1,000000	0,000000	0,000000	0,999998	0,00
3	Laura	sucho	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,038331	0,946725	0,000000	0,00
4	Valfi	kontrola	0,000064	0,000005	0,000000		0,000011	0,000000	0,000008	0,000003	0,000000	0,000000	0,000001	0,00
5	Valfi	zamokření	0,999939	1,000000	0,000000	0,000011		0,000000	1,000000	0,999997	0,000000	0,000000	0,999615	0,00
6	Valfi	sucho	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00
7	Milva	kontrola	0,999731	1,000000	0,000000	0,000008	1,000000	0,000000		1,000000	0,000000	0,000000	0,999907	0,00
8	Milva	zamokření	0,990707	1,000000	0,000000	0,000003	0,999997	0,000000	1,000000		0,000000	0,000000	1,000000	0,00
9	Milva	sucho	0,000000	0,000000	0,038331	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,614383	0,000000	0,00
10	Marabel	kontrola	0,000000	0,000000	0,946725	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,614383		0,000000	0,00
11	Marabel	zamokření	0,943571	0,999998	0,000000	0,000001	0,999615	0,000000	0,999907	1,000000	0,000000	0,000000		0,00
12	Marabel	sucho	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00

Jak je vidět v tabulce č. 11, tak v rámci pěstování brambor za sucha byl stanoven statisticky významný rozdíl mezi všemi odrůdami. Oproti tomu metodou pěstování v zamokření bylo stanoveno, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi žádnou z odrůd. U kontroly vyšlo, že mezi všemi odrůdami existuje statisticky významný rozdíl kromě odrůdy Laura v kombinaci s Milva.

Tabulka 12 výsledky měření na LC-ESI-MS/MS pro odrůdu Laura

Odrůda	Varianta	L-Prolin [mg/g] DW
Laura	Kontrola	0,210
Laura	Kontrola	0,210
Laura	Kontrola	0,200
Laura	Zamokření	0,109
Laura	Zamokření	0,120
Laura	Zamokření	0,110
Laura	Sucho	2,775
Laura	Sucho	2,746
Laura	Sucho	2,740

Graf 5 obsah L-prolinu pro odrůdu Laura v závislosti na variantě pěstování

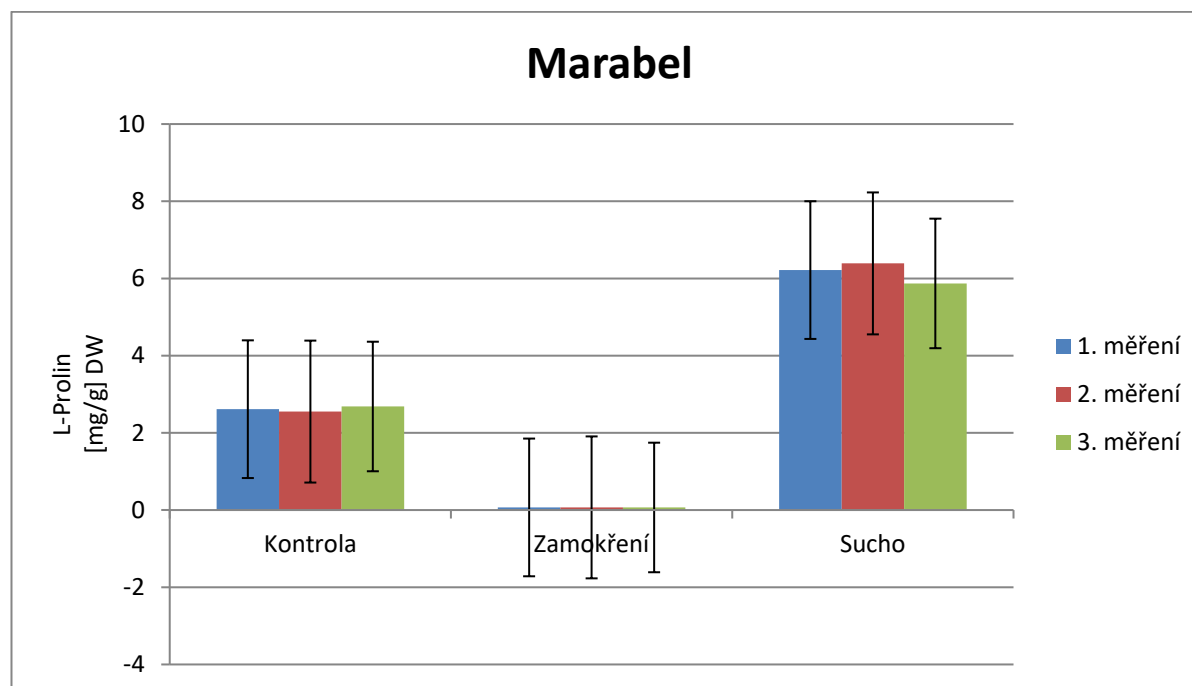


Z tabulky č. 12 a grafu č. 5 odrůdy Laura vyplývá zjištění, že obsah prolinu byl nejvyšší u varianty pěstování brambor v suchu. Oproti kontrole vyšel obsah prolinu až 13x vyšší, zatímco metodou zamokření vyšel jeho obsah v nízkých koncentracích.

Tabulka 13 výsledky měření na LC-ESI-MS/MS pro odrůdu Marabel

Odrůda	Varianta	L-Prolin [mg/g] DW
Marabel	Kontrola	2,613
Marabel	Kontrola	2,551
Marabel	Kontrola	2,683
Marabel	Zamokření	0,068
Marabel	Zamokření	0,069
Marabel	Zamokření	0,067
Marabel	Sucho	6,217
Marabel	Sucho	6,390
Marabel	Sucho	5,871

Graf 6 obsah L-prolinu pro odrůdu Marabel v závislosti na variantě pěstování

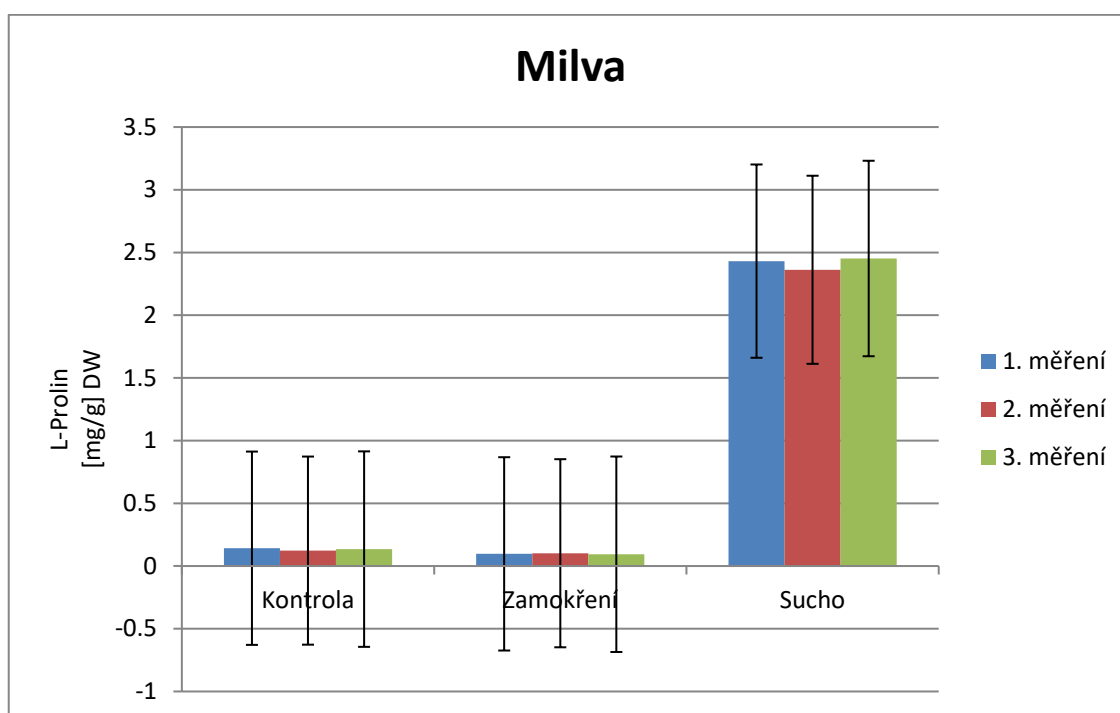


Z tabulky č. 13 a grafu č. 6 odrůdy Marabel vyplívá, že obsah prolinu je skoro 2,5x vyšší v porovnání s kontrolou. Pěstováním metodou zamokření vyšel jeho obsah téměř pod mezi detekce.

Tabulka 14 výsledky měření na LC-ESI-MS/MS pro odrůdu Milva

Odrůda	Varianta	L-Prolin [mg/g] DW
Milva	Kontrola	0,142
Milva	Kontrola	0,123
Milva	Kontrola	0,135
Milva	Zamokření	0,097
Milva	Zamokření	0,102
Milva	Zamokření	0,094
Milva	Sucho	2,431
Milva	Sucho	2,362
Milva	Sucho	2,452

Graf 7 obsah L-prolinu pro odrůdu Milva v závislosti na variantě pěstování

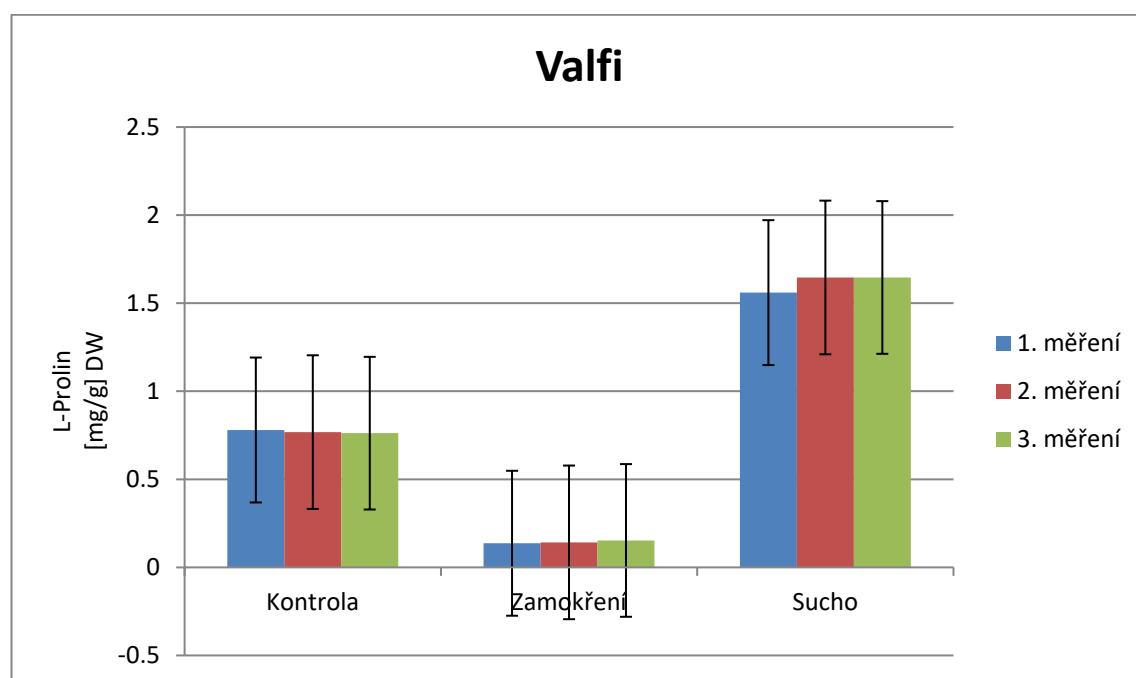


Z tabulky č. 14 a grafu č. 7 odrůdy Milva vyplývá, že je opět velký nárůst obsahu prolinu u varianty pěstování brambor v suchu. Metoda pěstování v zamokření vyšla nižší oproti kontrole.

Tabulka 15 výsledky měření na LC-ESI-MS/MS pro odrůdu Valfi

Odrůda	Varianta	L-Prolin [mg/g] DW
Valfi	Kontrola	0,780
Valfi	Kontrola	0,768
Valfi	Kontrola	0,762
Valfi	Zamokření	0,137
Valfi	Zamokření	0,142
Valfi	Zamokření	0,153
Valfi	Sucho	1,560
Valfi	Sucho	1,646
Valfi	Sucho	1,646

Graf 8 obsah L-prolinu pro odrůdu Valfi v závislosti na variantě pěstování



Z tabulky č. 15 a grafu č. 8 odrůdy Valfi vyplývá, že obsah prolinu je 2x větší u varianty pěstování v suchu v porovnání s kontrolou, zatímco metoda pěstování v zamokření vyšla téměř 6x nižší oproti kontrole.

5.1.2 Vyhodnocení obsahu hydroxyprolinu

Tabulka 16 podrobnější vyhodnocení pro hydroxyprolin pomocí Scheffeho testu

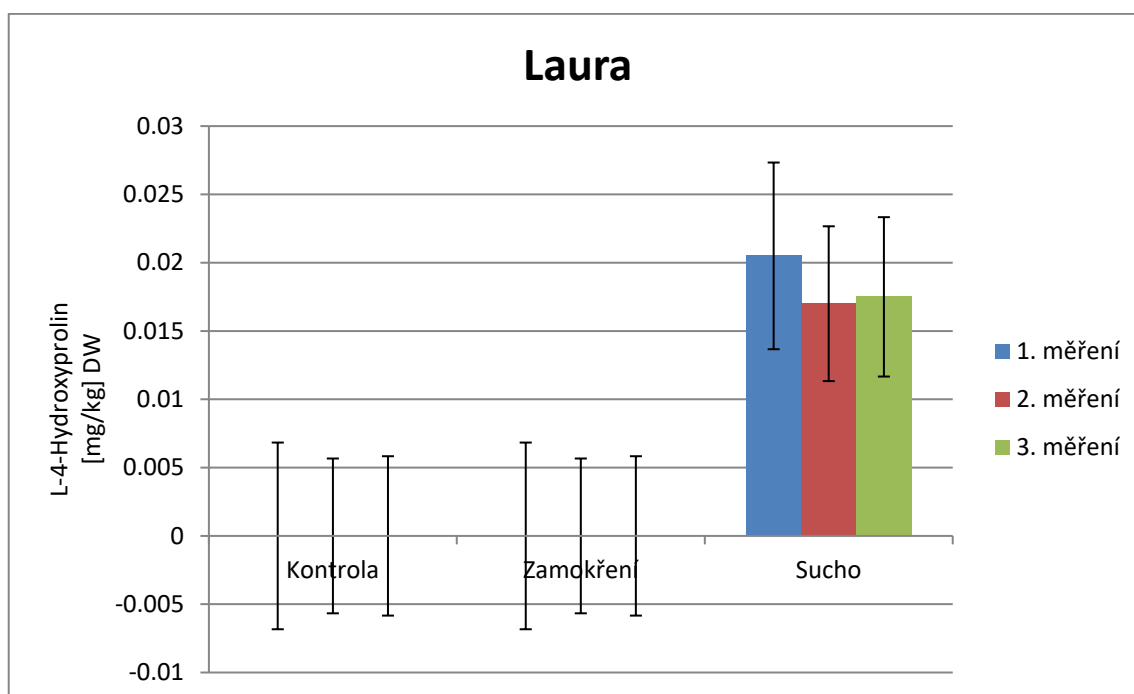
Scheffeho test; proměnná Hydroxyprolin (List1 v hydroxyprolin) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 1,7125, sv = 24,000														
Č. buňky	Odrůda	Varianta	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
1	Laura	kontrola	0,0000	0,0000	18,303	16,183	0,0000	17,415	0,0000	0,0000	16,827	17,627	0,0000	22,393
2	Laura	zamokření	1,000000		0,000000	0,000000	1,000000	0,000000	1,000000	1,000000	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000
3	Laura	sucho	0,000000	0,000000		0,960479	0,000000	0,999983	0,000000	0,000000	0,997820	0,999999	0,000000	0,267263
4	Valfi	kontrola	0,000000	0,000000	0,960479		0,000000		0,000000	0,000000	0,999999	0,998205	0,000000	0,010429
5	Valfi	zamokření	1,000000	1,000000	0,000000	0,000000		0,000000	1,000000	1,000000	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000
6	Valfi	sucho	0,000000	0,000000	0,999983	0,999587	0,000000		0,000000	0,000000	1,000000	1,000000	0,000000	0,079441
7	Milva	kontrola	1,000000	1,000000	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000		1,000000	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000
8	Milva	zamokření	1,000000	1,000000	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000	1,000000		0,000000	0,000000	1,000000	0,000000
9	Milva	sucho	0,000000	0,000000	0,997820	0,999999	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000		0,999994	0,000000	0,031211
10	Marabel	kontrola	0,000000	0,000000	0,999999	0,998205	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000	0,999994		0,000000	0,108983
11	Marabel	zamokření	1,000000	1,000000	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000	1,000000	1,000000	0,000000	0,000000		0,000000
12	Marabel	sucho	0,000000	0,000000	0,267263	0,010429	0,000000	0,079441	0,000000	0,000000	0,031211	0,108983	0,000000	

Co se týče výsledků z tabulky č. 16, je patrné, že u varianty pěstování v zamokření není statisticky významný rozdíl mezi žádnou z odrůd. U varianty pěstování brambor za sucha existuje statisticky významný rozdíl pouze mezi odrůdou Marabel v kombinaci s Milva. U kontroly pak bylo stanoveno, že existuje statisticky významný rozdíl mezi odrůdou Laura v kombinaci s Valfi a Marabel a též Milva v kombinaci s Valfi a Marabel.

Tabulka 17 výsledky měření na LC-ESI-MS/MS pro odrůdu Laura

Odrůda	Varianta	L-4-Hydroxyprolin [mg/g] DW
Laura	Kontrola	<msm
Laura	Kontrola	<msm
Laura	Kontrola	<msm
Laura	Zamokření	<msm
Laura	Zamokření	<msm
Laura	Zamokření	<msm
Laura	Sucho	0,0205
Laura	Sucho	0,0170
Laura	Sucho	0,0174

Graf 9 obsah L-4-hydroxyprolinu pro odrůdu Laura v závislosti na variantě pěstování

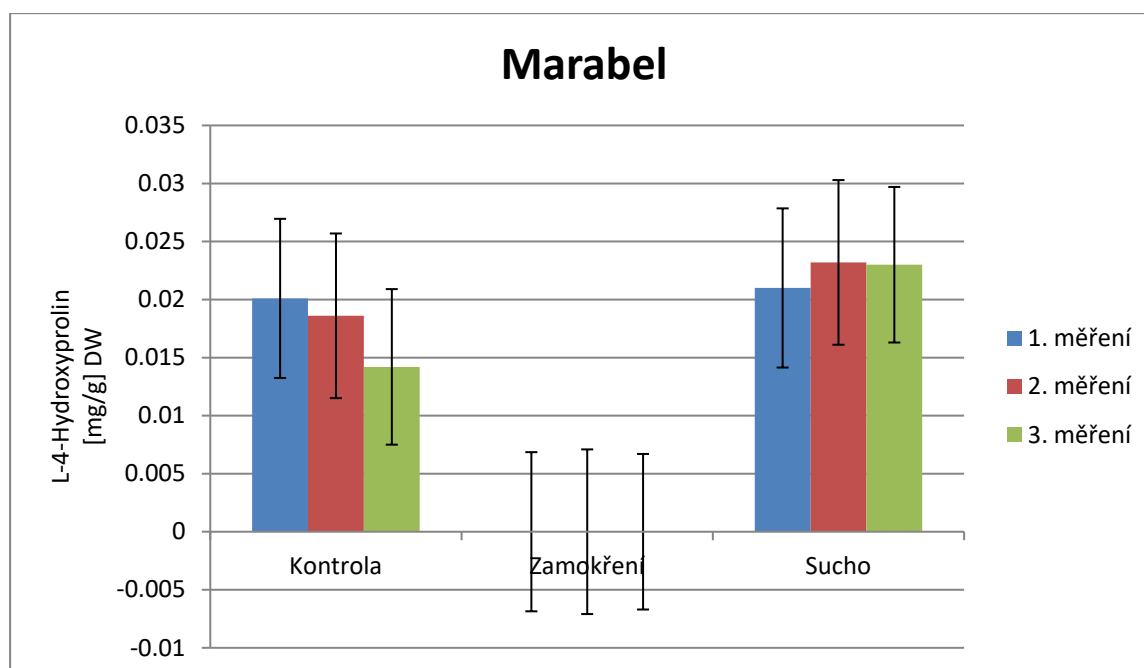


Z tabulky č. 17 a grafu č. 9 vyplývá, že nejvyšší obsah hydroxyprolinu byl naměřen u metody pěstování brambor v suchu. U zbylých variant se obsah pohyboval pod mezí detekce.

Tabulka 18 výsledky měření na LC-ESI-MS/MS pro odrůdu Marabel

Odrůda	Varianta	L-4-Hydroxyprolin [mg/g] DW
Marabel	Kontrola	0,0201
Marabel	Kontrola	0,0186
Marabel	Kontrola	0,0142
Marabel	Zamokření	<msm
Marabel	Zamokření	<msm
Marabel	Zamokření	<msm
Marabel	Sucho	0,0210
Marabel	Sucho	0,0232
Marabel	Sucho	0,0230

Graf 10 obsah L-4-hydroxyprolinu pro odrůdu Marabel v závislosti na variantě pěstování

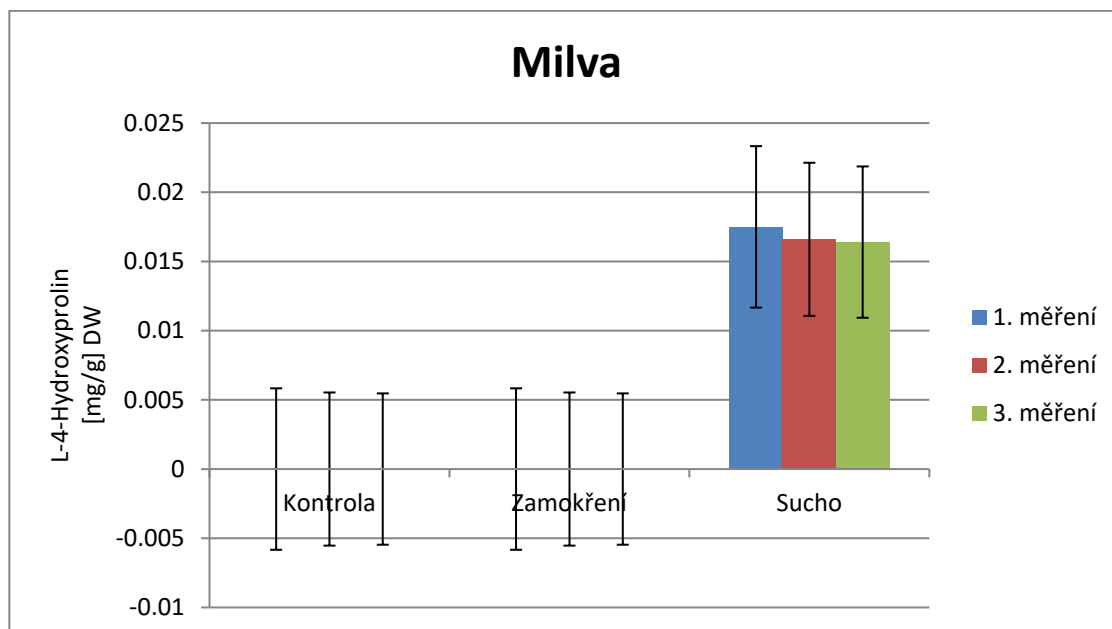


Z tabulky č. 18 a grafu č. 10 vyplývá, že nejvyšší obsah hydroxyprolinu byl naměřen metodou pěstování brambor v suchu s hodnotami téměř shodnými s kontrolou. Metodou pěstování zamokřením vyšel obsah opět pod mezem detekce.

Tabulka 19 výsledky měření na LC-ESI-MS/MS pro odrůdu Milva

Odrůda	Varianta	L-4-Hydroxyprolin [mg/g] DW
Milva	Kontrola	<msm
Milva	Kontrola	<msm
Milva	Kontrola	<msm
Milva	Zamokření	<msm
Milva	Zamokření	<msm
Milva	Zamokření	<msm
Milva	Sucho	0,0175
Milva	Sucho	0,0166
Milva	Sucho	0,0164

Graf 11 obsah L-4-hydroxyprolinu pro odrůdu Milva v závislosti na variantě pěstování

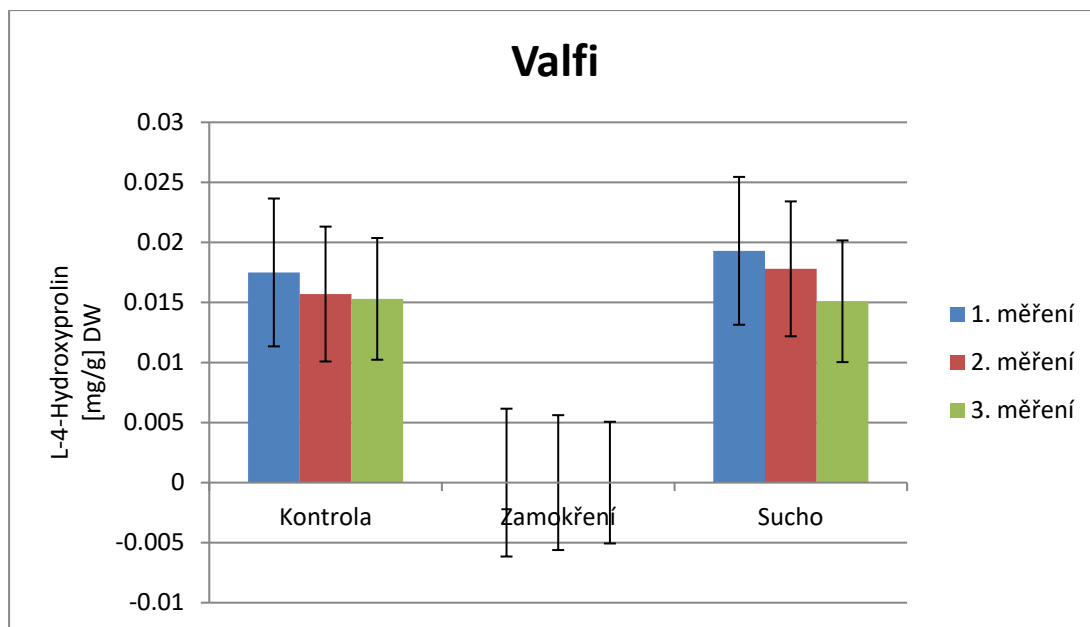


Z tabulky č. 19 a grafu č. 11 vyplývá, že hydroxyprolin byl naměřen pouze u varianty pěstování brambor v suchu. Zbylé varianty vyšly pod mezí detekce.

Tabulka 20 výsledky měření na LC-ESI-MS/MS pro odrůdu Valfi

Odrůda	Varianta	L-4-Hydroxyprolin [mg/g] DW
Valfi	Kontrola	0,0175
Valfi	Kontrola	0,0157
Valfi	Kontrola	0,0153
Valfi	Zamokření	<msm
Valfi	Zamokření	<msm
Valfi	Zamokření	<msm
Valfi	Sucho	0,0193
Valfi	Sucho	0,0178
Valfi	Sucho	0,0151

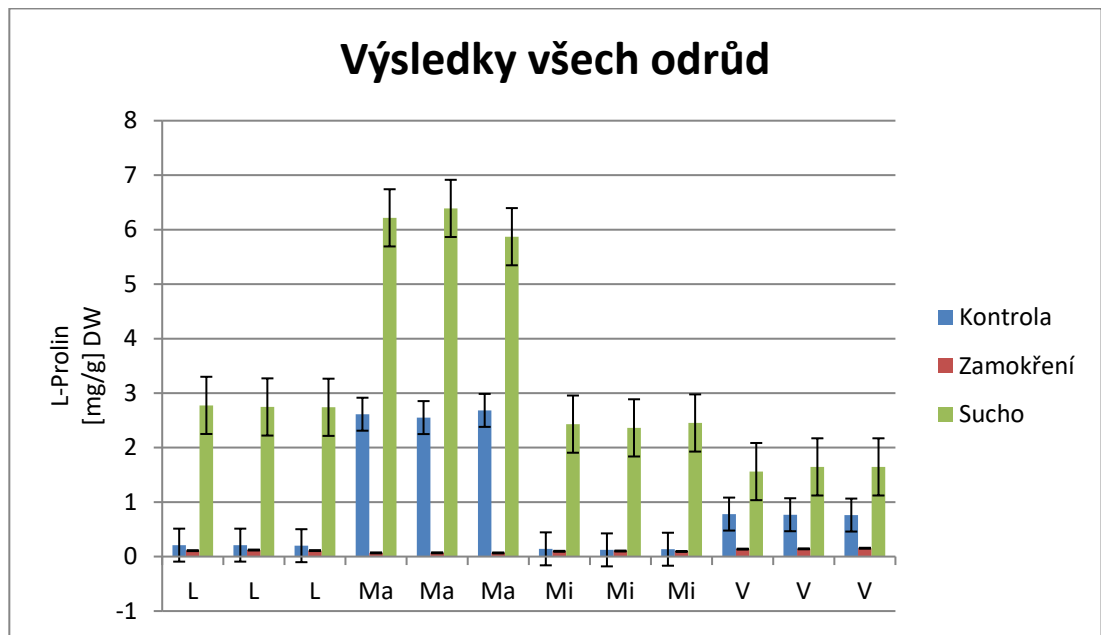
Graf 12 obsah L-4-hydroxyprolinu pro odrůdu Valfi v závislosti na variantě pěstování



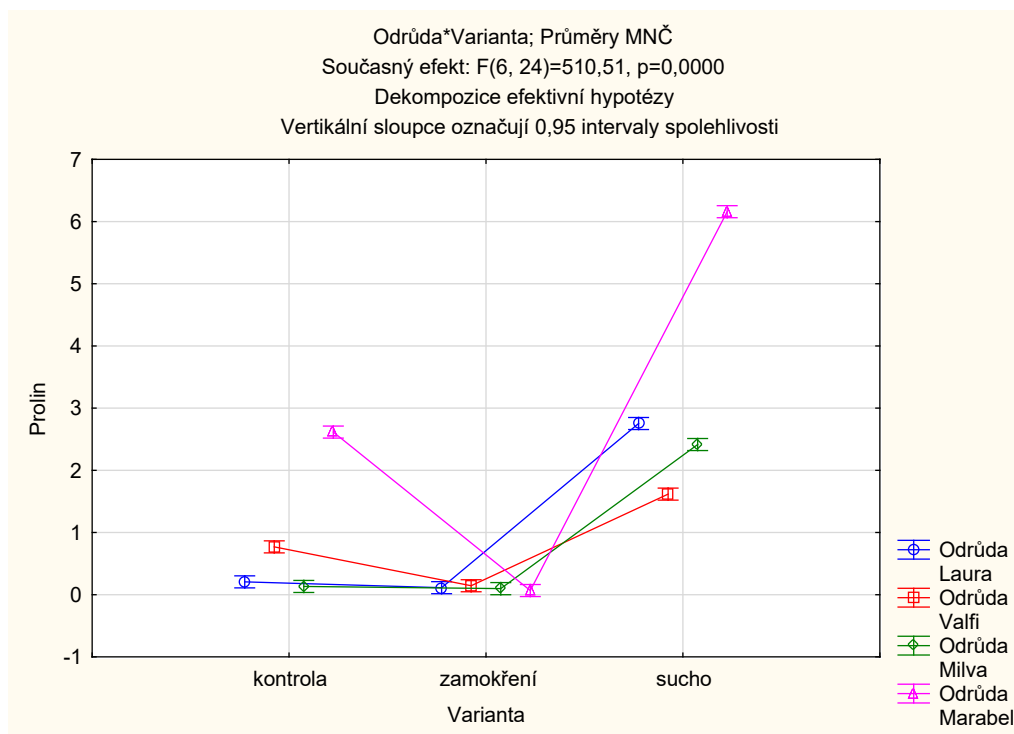
Z tabulky č. 20 a grafu č. 12 vyplývá, že u odrůdy Valfi se obsah hydroxyprolinu pohyboval ve stejných hodnotách pro pěstování v suchých podmínkách i pro kontrolu. Metodou zamokření nám obsah opět vyšel pod mezí detekce.

5.1.3 Celkové vyhodnocení

Graf 13 porovnání variant pěstování pro L-prolin v závislosti na odrůdě



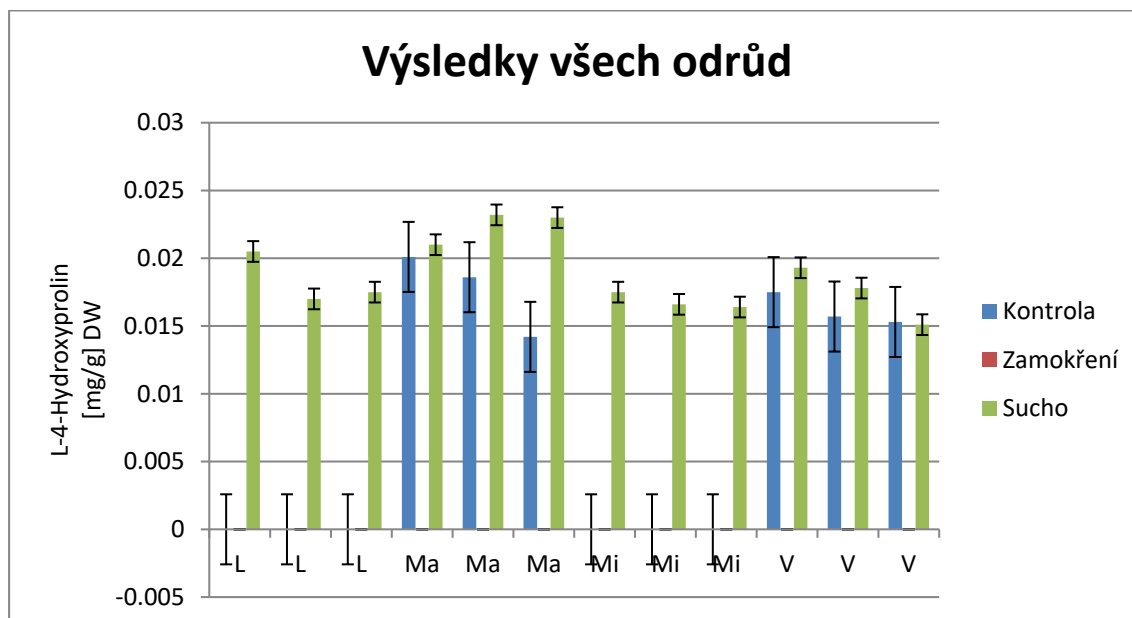
Graf 14 vliv podmínek pěstování na obsahu prolinu pro všechny typy odrůd



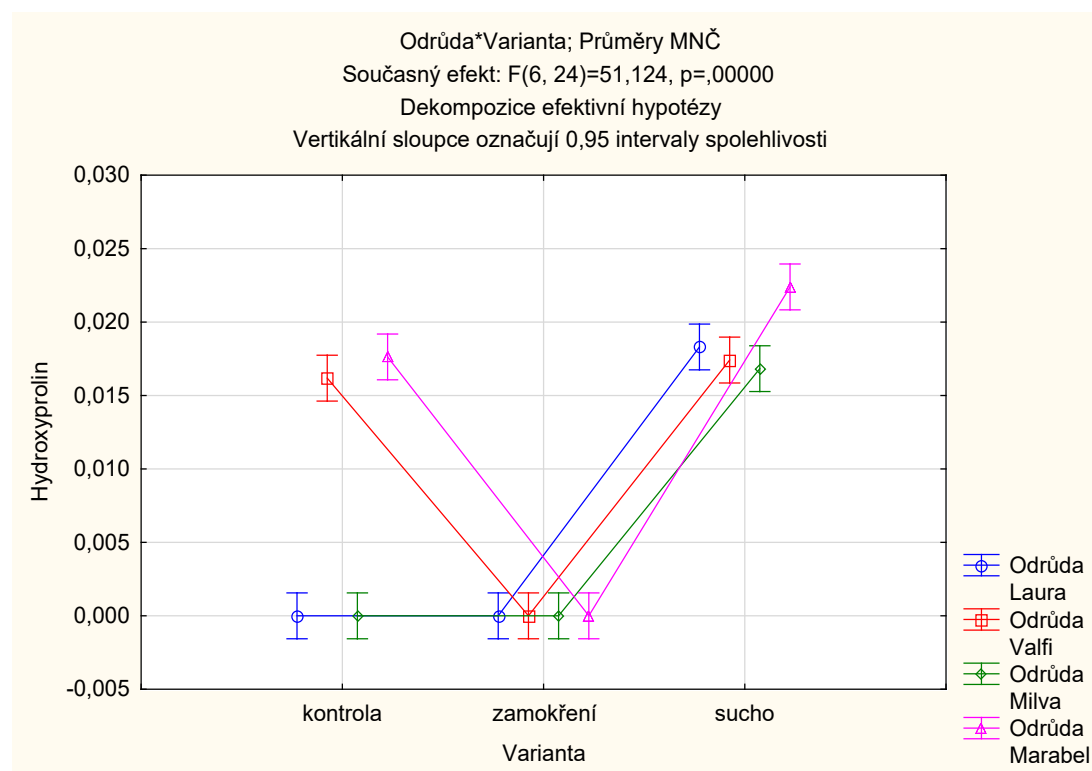
Následující grafy č. 13 a 14 ukazují vliv závisle proměnné (prolin) na podmínkách pěstování u všech čtyř typů odrůd brambor. Lze pozorovat trend snížení v důsledku pěstování

v zamokření, a naopak zvýšení v důsledku pěstování za sucha. Z grafů nám vyplývá, že v suchých podmínkách pěstování má ze všech čtyř odrůd nejvyšší obsah prolinu odrůda Marabel. Obsah prolinu se u této odrůdy pohybuje v rozmezí hodnot 5,87-6,22 mg/g DW a nejnižší obsah prolinu byl naměřen u odrůdy Valfis hodnotami 1,56-1,646 mg/g DW.

Graf 15 porovnání variant pěstování pro L-4-Hydroxyprolin v závislosti na odrůdě



Graf 16 vliv podmínek pěstování na obsahu hydroxyprolinu pro všechny typy odrůd



Následující grafy č. 15 a 16 ukazují vliv závisle proměnné (hydroxyprolin) na podmínkách pěstování u všech odrůd brambor. Jak je vidět, tak nejvyšší obsah hydroxyprolinu byl naměřen u odrůdy Marabel s hodnotami v rozmezí 0,0210-0,0232 mg/g DW při pěstování brambor v suchých podmínkách. Ostatní odrůdy se pohybovaly při stresu suchem <0,02 mg/g DW a zbylé varianty pěstování pod mezí detekce. I zde je vidět, že nejvyšší obsah hydroxyprolinu byl naměřen u varianty pěstování v suchu pro všechny čtyři odrůdy.

6 Diskuse

V následující kapitole jsou porovnány výsledky pokusu se současnými poznatky z vědecké literatury. Jak uvádí Tanveer et al. (2018), stres ze sucha je považován za jeden z nejvýznamnějších abiotických stresů, a to díky škodlivým účinkům na produktivitu plodin. Banik et al. (2016) tvrdí, že stres ze sucha je rostoucí hrozbou pro růst a produktivitu rostlin a nejkritičtější hrozbou pro zabezpečení potravin ve světě. Nurmanov et al. (2018) zase uvádí, že teplota je jedním z dominantních faktorů, které mají významný vliv na růst a vývoj brambor. Brambory jsou díky svému krátkému kořenu velmi náchylné na nedostatek zavlažování. Období sucha působí na rostlinu nerovnováhou živin, sníženou rychlostí klíčení, ztrátou turgoru, snižuje se fotosyntéza, dochází k inhibicím fyziologických procesů a také k poškozením, které mohou vést až ke smrti rostliny. V neposlední řadě pak dochází k produkci reaktivních druhů kyslíku. Rady et al. (2019) uvádí, že se stresem ze sucha je úzce spojen i stres ze salinity. Salinita se považuje za trvalou hrozbu pro rostliny, protože přibližně 20 % zemědělských plodin na celém světě trpí jejím zvýšeným množstvím. Problémem je i stres ze zamokření, protože podle Xiao-Qingata et al. (2015) v rostlině dochází ke snížené produkci ATP, čímž se změní metabolismus rostlin na anaerobní v důsledku omezení O₂ difúze do půdy a dojde ke snížení fyziologické aktivity rostlin, což se odrazí na nižší produktivitě stejně jako u stresu ze sucha.

Sledovanými faktory v této práci byl typ odrůdy brambor a varianta pěstování, tedy brambory přemokřené, přesušené a kontrola neboli brambory pěstované bez stresu. Zkoumány byly čtyři odrůdy brambor (Laura, Marabel, Milva a Valfi) a jejich obsah prolinu a hydroxyprolinu při různých podmínkách pěstování. Prolin je považován za osmolyt působící pozitivně na stres ze sucha a jeho množství a množství hydroxyprolinu bylo stanoveno pomocí metody LC-ESI-MS/MS. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda, která se jeví jako nejčastěji volený způsob separace, což potvrzuje i Wang et al. (2020), narozdíl od volby detektorů, který se velmi liší. Douglas et al. (2007) tvrdí, že chromatografie je výkonná separační metoda, která nachází uplatnění ve všech oborech vědy. Zahrnuje rozmanitou a důležitou skupinu metod, které umožňují separaci, identifikaci a stanovení složek komplexních směsí. Skoog et al. (1998) uvádí, že zde můžeme měřit aminokyseliny, proteiny, nukleové kyseliny, hydrokarbonáty, karbohydráty, terpenoidy, pesticidy, antibiotika, drogy, steroidy, organické druhy kovů a různé druhy anorganických substancí. Z výsledků pokusu je zřejmé, že prolin se kumuluje, když je rostlina vystavena stresu ze sucha. Suekawa et al. (2019) potvrzuje, že prolin působí v rostlinách jako osmolyt, antioxidant, chelátor kovu a signální molekula za různých stresových podmínek. Azmat&Moin (2019) doplňují, že prolin je aminokyselina, která brání rostlinu během buněčných osmotických úprav a funguje jako pohlcovač volných radikálů a ničí poškození způsobené těmito radikály. Kapoor et al. (2019) uvádí, že extrémní podmínky prostředí, jako je sucho, slanost nebo záplavy mohou totiž vést ke zvýšené úrovni reaktivních druhů kyslíku v rostlinách, které pak způsobují zhoršenou funkci metabolismu lipidů, bílkovin a nukleových kyselin, a nakonec mohou způsobit i smrt rostliny.

6.1 Varianta pěstování brambor za sucha

Brambory jsou často pěstovány v suchých oblastech s nedostatkem srážek či závlahy. Banik et al. (2016) uvádí, že přibližně čtyři desetiny světového povrchu země se nachází v suchých a polosuchých zónách, kde je voda hlavním omezujícím faktorem produktivity rostlin, proto je velmi důležité zkoumat změny, které v nich během tohoto stresu probíhají. Jednou takovou změnou je podle Suekawy et al. (2019) i hromadění osmolytu prolinu, který brambory v tomto nepříznivém období chrání. Důležitou vlastností prolinu je podle Hossiana et al. (2014), že zvyšuje schopnost rostliny odolat buněčné dehydrataci způsobené právě abiotickými stresy. Dle výsledků je vidět, že při stresu brambor ze sucha dochází k velkému nárůstu obsahu prolinu i hydroxyprolinu u všech odrůd. Zde vyšel průměrný obsah prolinu $3,236 \pm 1,818$ mg/g DW, což je téměř 4x vyšší jak u kontroly a až 30x vyšší než pěstování brambor v přemokřených podmínkách a průměrný obsah hydroxyprolinu $0,018 \pm 0,003$ mg/g DW. To souhlasí se studií u Shu-han et al. (2018), kde také vyšlo, že pokud jsou brambory vystaveny stresu ze sucha, tak se významně zvýší obsah prolinu. Nejvyšší množství prolinu obsahovala jednoznačně odrůda Marabel, tedy klasická konzumní odrůda, kde se obsah prolinu pohyboval v rozmezí 5,871-6,390 mg/g DW a obsah hydroxyprolinu 0,021-0,0232 mg/g DW. Obsah prolinu u odrůdy Laura vyšel 2,740-2,775 mg/g DW a obsah hydroxyprolinu 0,0170-0,0205 mg/g DW. Následuje odrůda Milva s koncentrací prolinu 2,362-2,452 mg/g DW a koncentrací hydroxyprolinu 0,0164-0,0175 mg/g DW. Naproti tomu nejnižší obsah byl naměřen u odrůdy Valfi, což je barevná odrůda s obsahem anthokyanových barviv, které ji dodávají fialovou barvu, kde se koncentrace pohybovala 1,560-1,646 mg/g DW a obsah hydroxyprolinu 0,0151-0,0193 mg/g DW. Touto variantou pěstování vyšel statisticky významný rozdíl pro prolin mezi všemi odrůdami a statisticky významný rozdíl pro hydroxyprolin u odrůdy Marabel v kombinaci s Milva.

6.2 Varianta pěstování brambor v zamokření

Youssef et al. (2019) tvrdí, že záplavy a nadměrná vlhkost jsou podmínky, které snižují zemědělské výnosy rostlin či snižují jejich růst. Velasco et al. (2019) dodává, že prvním účinkem podmáčení rostlin je snížení obsahu vody v rostlinách a produkce ATP, generovaná změnou z aerobního na anaerobní metabolismus, což způsobí pokles rychlosti všech metabolických procesů v rostlině. Dochází ke snížení množství O_2 , které způsobuje inhibici kořenového dýchání, rychlost fotosyntézy a asimilaci CO_2 . Brambory jsou rostliny typu C_3 , proto dochází ke zvýšenému výnosu v reakci na obohacování CO_2 . Prvním projevem zamokření je stomatální uzavření, které snižuje přijímané množství CO_2 , což vede ke stárnutí kořenových buněk. Protože volný prolin je často považován za vylučovače ROS, tak byl zkoumán jeho obsah v hlízách brambor. Pokud dojde ke stresu ze zamokření, tak si rostlina pomáhá jak enzymatickými, tak neenzymatickými mechanismy. Takovým neenzymatickým mechanismem je podle Velasca et al. (2019) i aminokyselina prolin, která chrání rostlinu před oxidačním stresem. Pěstování brambor v zamokřených podmínkách nám ale ukazuje, že nedochází ke kumulaci prolinu ani hydroxyprolinu. Z výsledků je vidět, že průměrný obsah prolinu se pohyboval $0,110 \pm 0,029$ mg/g DW, což je skoro až 9x nižší v porovnání s kontrolou. Nejvyšší množství bylo naměřeno u odrůdy Valfi s obsahem prolinu 0,137-0,153

mg/g DW. U zbylých odrůd bylo naměřeno podobně nízké množství. Druhý nejvyšší obsah byl naměřen u odrůdy Laura s hodnotami 0,109-0,120 mg/g DW, poté Milva s hodnotami 0,094-0,102 mg/g DW, a nakonec odrůda Marabel, kde obsah prolinu vyšel v rozmezí hodnot 0,067-0,069 mg/g DW. Hydroxyprolin byl u všech odrůd pod mezí detekce. Z toho důvodu po vyhodnocení vyšlo, že mezi žádnou z odrůd neexistuje statisticky významný rozdíl jak pro prolin, tak pro hydroxyprolin. Očekávalo se, že u této varianty pěstování budou jednotlivé odrůdy vykazovat vyšší hodnoty prolinu a hydroxyprolinu než u varianty pěstování za optimálních podmínek. Tato hypotéza se ale nepotvrdila, z výsledků je patrné, že u pěstování brambor v zamokření vyšly nízké obsahy obou aminokyselin. Důvodem, jak zmínil Galdón et al. (2010), mohou být odlišné genetické vlastnosti brambor a velkou roli hraje i odrůda. To potvrzuje i hypotéza v mé práci, která vyšla, že jednotlivé odrůdy reagují na vodní stres odlišnými obsahy prolinu. Yang et al. (2015) tvrdí, že na množství prolinu může mít vliv i množství CO₂. Lixin et al. (2019) dodává, že účinky zamokření se liší i v závislosti na podmínkách prostředí, fázi růstu a době trvání zavlažování. Dalším důvodem, proč se hypotéza nepotvrdila, může být i chyba při pěstování brambor v zamokření.

6.3 Varianta pěstování brambor za optimálních podmínek

Aby bylo možné porovnat výsledky pěstování brambor a nárůst prolinu a hydroxyprolinu za stresových podmínek, tak byly brambory pěstovány i jako tzv. kontrola, tedy za normálních podmínek. Nurmanov et al. (2018) tvrdí, že teplota je jedním z dominantních faktorů, které mají významný vliv na růst a vývoj brambor. Vokál et al. (2000) doplňuje, že optimální teplota pro růst brambor je 21-24 °C. Z výsledků měření je vidět, že průměrný obsah prolinu vyšel 0,931±1,048 mg/g DW. V této variantě byl naměřen nejvyšší obsah prolinu opět u odrůdy Marabel s jeho koncentrací 2,551-2,683 mg/g DW a koncentrací hydroxyprolinu 0,0142-0,0201 mg/g DW. Následuje odrůda Valfi, kde se celkové množství prolinu pohybovalo v rozmezí 0,762-0,780 mg/g DW a hydroxyprolinu 0,0153-0,0175 mg/g DW. Obsah prolinu u odrůdy Laura v této práci vyšel 0,200-0,210 mg/g DW a hydroxyprolinu pod mezí detekce. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u odrůdy Milva s obsahem prolinu 0,123-0,142 mg/g DW a obsahem hydroxyprolinu, který také vyšel pod mezí detekce. Naměřené hodnoty ukazují, že existuje statisticky významný rozdíl mezi všemi odrůdami až na odrůdu Laura v kombinaci s Milva. Hydroxyprolin u odrůdy Laura a Milva byl naměřen pod mezí detekce, zbylé odrůdy Marabel a Valfi se pohybovaly v rozmezí hodnot 0,0142-0,0201 mg/g DW. Z výsledků je vidět, že u prolinu existuje statisticky významný rozdíl mezi všemi odrůdami až na odrůdu Laura v kombinaci s Milva. U hydroxyprolinu je zase zřejmé, že se potvrdil statisticky významný rozdíl u odrůdy Laura v kombinaci s Valfi a Marabel a u odrůdy Milva v kombinaci s Valfi a Marabel.

Po zhodnocení všech výsledků měření je tedy jasné, že jednotlivé odrůdy reagují odlišně na různé podmínky pěstování a obsahují rozdílné množství aminokyseliny prolinu a hydroxyprolinu. To se shoduje s tvrzením Galdóna et al.(2010), který uvedl, že koncentrace aminokyselin v bramborách závisí na odrůdě a také, že genetické vlastnosti odrůd brambor ovlivňují profil aminokyselin.

7 Závěr

Tato práce se zabývala souvislostí obsahu prolinu v hlízách ve vztahu k vodou stresovaným rostlinám bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Cílem praktické části bylo zjistit obsah prolinu ve čtyřech odrůdách brambor (Laura, Marabel, Milva a Valfi) a stanovit množství prolinu v hlízách vybraných odrůd brambor metodou kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem a elektrosprejovou ionizací u rostlin, které byly vystaveny vodnímu stresu, a porovnat obsahy s optimálně zavlažovanými rostlinami.

Z výsledků měření je patrné, že obsah prolinu v hlízách je projevem vodního stresu. Dle výsledků vyšlo, že rostliny vystavené stresu suchem vykazují vyšší obsah prolinu, což potvrzují i vědecké studie. Je zde vidět rostoucí trend koncentrací prolinu u všech odrůd. Tvrzení, že rostliny převlhčené budou vykazovat zvýšené obsahy prolinu oproti kontrole se nepodařilo potvrdit. V některých případech vyšly hodnoty při pěstování v zamokření obdobně jako u kontroly a jindy byly až několikanásobně nižší. Dále je vidět, že jednotlivé odrůdy reagují na vodní stres odlišnými obsahy prolinu. Tato hypotéza se tedy potvrdila a z výsledků měření je patrné, že nejvyšší obsah prolinu byl naměřen u odrůdy Marabel, naopak nejnižší u odrůdy Valfi. Výsledky také ukazují, že existuje statisticky významný rozdíl mezi všemi odrůdami pěstovanými v suchých podmínkách. Naopak u metody pěstování v zamokření bylo stanoveno, že mezi odrůdami neexistuje statisticky významný rozdíl, pouze u odrůdy Marabel v kombinaci s Milvou se potvrdil. Obsah prolinu byl významně ovlivněn odrůdou brambor i variantou pěstování. Hodnoty prolinu značně stouply při stresu ze sucha, naopak při stresu ze zamokření nedošlo k výraznému navýšení. Určitě je tedy možné pěstovat brambory v sušších oblastech, avšak je důležité zvolit správnou odrůdu, která bude kumulovat velké množství prolinu a tím dokáže rostlinu dostatečně ochránit před oxidačním stresem a dehydratací.

8 Literatura

Andrade – Garda JM, Carlosena – Zubieta A, Gómez –Carracedo MP, Maestro – Saavedra MA, Prieto – Blanco MC, Soto – Ferreira RM. 2017. Problems of Instrumental Analytical Chemistry: A Hands – On Guide. World Scientific Publishing Europe Ltd., London. ISBN-13: 978-1786341808; ISBN-10: 1786341808.

Anupama A, Bhugra S, Lall B, Chaudhury S, Chugh A. 2018. Assessing the correlation of genotypic and phenotypic responses of in dica rice varieties under drought stress. Plant Physiology and Biochemistry (e0981-9428) DOI:10.1016/j.plaphy.2018.04.001.

Ardrey B. 2003. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. John Wiley&Sons, LTD, England. ISBN: 9780471497998.

Azmat R, Moin S. 2019. The remediation of drought stress under VAM inoculation through proline chemical transformation action. Journal of Photochemistry&Photobiology, B: Biology (e1011-1344) DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.03.002.

Banik P, Zeng W, Tai H, Bizimungu B, Tanino K. 2016. Effects of drought acclimation on drought stress resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes. Environmental and Experimental Botany (e0098-8472) DOI: 10.1016/j.envexpbot.2016.01.008.

Bártová V, Diviš J, Bárta J, Brabcová A, Švajnerová M. 2013. Variation of nitrogenous components in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers produced under organic and conventional crop management. European Journal of Agronomy (e1161-0301) DOI: 10.1016/j.eja.2013.02.009.

Cole RB. 1997. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals instrumentation&Applications. John Wiley&Sons, LTD, New York. ISBN: 0-471-14564-5.

Colignon B, Delaive E, Dieu M, Demazy C, Muhovski Y, Antoine A, Raes M, Mauro S. Dual coordination of the SUMOylation and phosphorylation pathways during the response to heat stress in *Solanum tuberosum*. Environmental and Experimental Botany (e0098-8472) DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.02.024.

Cvikrová M, Gemperlová L, Martincová O, Vanková R. 2013. Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. Plant Physiology and Biochemistry (e0981-9428) DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.08.005.

Čepl J. 2017. Stabilita produkce brambor s využitím agrotechnických a půdoochranných opatření. Agrární komora České republiky, Praha.

Deepak S, Shailasree S, Sujeeth N, Kini RK, Shetty SH, Mithöfer A. 2006. Purification and characterization of proline/hydroxyproline-rich glycoprotein from pearl millet coleoptiles

infected with downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. *Phytochemistry* (e0031-9422) DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.10.024.

Domkářová J, Teplíková J, Vokál B. 2006. Modrofialové brambory zpestří jídelníček. *Zahrádkář*.

Dominguez MA, Jacksén J, Emmer Å, Centurión MA. 2016. Capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of carbohydrates and proline in honey samples. *Microchemical Journal* (e0026-265X) DOI: 10.1016/j.microc.2016.05.017.

Donald G, Barceloux MD. 2009. Potatoes, Tomatoes, and Solanine Toxicity (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L.). *Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants, and Venomous Animals* (e0011-5029) DOI: 10.1016/j.disamonth.2009.03.009.

Douglas AS, Holler FJ, Crouch SR. 2007. *Principles of Instrumental Analysis*. 6th ed. Brooks/Cole, Cengage Learning, United States of America. ISBN: 13: 978-0-495-12570-9, 10: 0-495-12570-9.

Drapal M, Farfan-Vignolo EL, Gutierrez OR, Bonierable M, Mihovilovich E, Fraser PD. 2016. Identification of metabolites associated with water stress responses in *Solanum tuberosum* L. clones. *Phytochemistry* (e0031-9422) DOI: 10.1016/j.phytochem.2016.12.003.

Eckardt NA, Pell EJ. 1995. Effects of ethylene diurea (EDU) on ozone-induced acceleration of foliar senescence in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Environmental pollution* (e0269-7491) DOI: 10.1016/0269-7491(95)00111-5.

Eichhorn S, Winterhalter P. 2005. Anthocyanins from pigmented potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Science Direct* (e0963-9969) DOI: 10.1016/j.foodres.2005.03.011.

Fujisawa I, Kitamura Y, Kato R, Aoki K. 2018. Crystal structures of resorcin[4]arene and pyrogallol[4]arene complexes with proline: A model for proline recognition through C-H $\cdots\pi$ interaction. *Journal of Molecular Structure* (e0022-2860) DOI: 10.1016/j.molstruc.2018.02.047.

Fukuda T, Takamatsu K, Bamba T, Fukusaki E. 2019. Gaschromatography-mass spectrometry metabolomics-based prediction of potato tubers prouting during long-term storage. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (e1389-1723) DOI: 10.1016/j.jbiosc.2019.01.016.

Galdón BR, Mesa DR, Rodríguez EMR, Romero CD. 2010. Amino acid content in traditional potato cultivars from the Canary Islands. *Journal of Food Composition and Analysis* (e0889-1575) DOI: 10.1016/j.jfca.2009.08.009.

Gross JH. 2011. Mass Spectrometry: A Textbook. 2th ed. Springer-Verlag Heidelberg, Berlin. ISBN: 978-3-642-10709-2.

Hanelt D, Hawes I, Rae R. 2006. Reduction of UV-B radiation causes an enhancement of photo inhibition in high light stressed aquatic plants from New Zealand lakes. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology (e1011-1344) DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2006.01.013.

Hertog MLATM, Tijskens LMM, Hak PS. 1997. The effects of temperature and senescence on the accumulation of reducing sugars during storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers: A mathematical model. Postharvest Biology and Technology DOI: 10.1016/S0925-5214(97)87276-6.

Hossian MA, Hoque A, Burritt DJ, Fujita M. 2014. Proline Protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanisms. Academic Press DOI: 10.1016/B978-0-12-799963-0.00016-2.

Chen Y, Ye D, Held MA, Cannon MC, Ray T, Saha P, Frye AN, Mort AJ, Kieliszewski MJ. 2015. Identification of the Abundant Hydroxyproline-Rich Glycoproteins in the Root Walls of Wild-Type Arabidopsis, an ext3 Mutant Line, and Its Phenotypic Revertant. Plants DOI: 10.3390/plants4010085.

Johnson KL, Cassin AM, Lonsdale A, Wong Ka-Shu G, Soltis DE, Miles NW, Melkonian M, Melkonian B, Deyholos MK, Leebens-Mack J, Rothfels CJ, Stevenson DW, Graham SW, Wang X, Wu S, Pires JCH, Edger PP, Carpenter EJ, Bacic A, Doblin MS, Schultz CJ. 2017. Insights into the Evolution of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins from 1000 Plant Transcriptomes. American Society of Plant Biologists DOI: 10.1104/pp.17.00295.

Kahlaoui B, Hachicha M, Misle E, Fidalgo F, Teixeira J. 2015. Physiological and biochemical responses to the exogenous application of proline of tomato plants irrigated with saline water. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences (e1658-077X) DOI: 10.1016/j.jssas.2015.12.002.

Kapoor D, Singh S, Kumar V, Romero R, Prasad R, Singh J. 2019. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). Plant Gene (e2352-4073) DOI: 10.1016/j.plgene.2019.100182.

Khan M, Sakaram S, Hemalatha S. 2019. Detection of biochemical and molecular changes in *Oryza sativa* L. during drought stress. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (e1878-8181) DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101150.

La VH, Bok-Rye L, Islam MT, Sang-Hyun P, Ha-II J, Dong-Won B, Tae-Hwan K. 2018. Characterization of salicylic acid-mediated modulation of the drought stress responses: Reactive oxygen species, proline, and redox state in *Brassica napus*. Environmental and Experimental Botany (e0098-8472) DOI: 10.1016/j.envexpbot.2018.09.013.

- Lemos PVF, Barbosa LS, Ramos IG, Coelho RE, Druzian JI. 2019. Characterization of amylose and amylopectin fractions separated from potato, banana, corn, and cassava starches. *International Journal of Biological Macromolecules* (e0141-8130) DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.086.
- Li-Kai L, Becker DF, Tanner JJ. 2017. Structure, function, and mechanism of proline utilization A (PutA). *Archives of Biochemistry and Biophysics* (e0003-9861) DOI: 10.1016/j.abb.2017.07.005.
- Lixin T, Jing L, Shiyu Z, Lijie L, Wenlong L, Lei S. 2019. Effects of waterlogging stress at different growth stages on the photosynthetic characteristics and grain yield of spring maize (*Zea mays* L.) under field conditions. *Agricultural Water Management* (e0378-3774) DOI: 10.1016/j.agwat.2019.03.054.
- Luting J, Xu Q, Deguo L, Sijun Q, Peng Z. 2019. ROS production and scavenging in three cherry root stocks under short-term waterlogging conditions. *Scientia Horticulturae* (e0304-4238) DOI: 10.1016/j.scienta.2019.108647.
- Marangoni AG, Duplessis PM, Lencki RW, Yada RY. 1996. Low-temperature stress induces transient oscillations in sucrose metabolism in *Solanum tuberosum*. *Biophysical chemistry* (e0301-4622) DOI: 10.1016/S0301-4622(96)02202-8.
- Meda A, Lamien ChE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* (e0308-8146) DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.10.006.
- Monneveux P, Ramírez DA, María-Teresa P. 2013. Drought tolerance in potato (*Solanum tuberosum* L.) Can we learn from drought tolerance research in cereals? *Plant science* (e0168-9452) DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.01.011.
- Nabi RBS, Tayade R, Hussian A, Kulkarni KP, Imran QM, Bong-Gyu M, Byung-Wook Y. 2019. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany* (e0098-8472) DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.02.003.
- Nurmanov YT, Chernenok VG, Kuzdanova RS. 2018. Potato in response to nitrogen nutrition regime and nitrogen fertilization. *Field Crops Research* (e0378-4290) DOI: 10.1016/j.fcr.2018.11.014.
- Peksa A, Kita A, Kulakowska K, Hamouz K, Nemš A. 2013. The quality of protein of coloured fleshed potatoes. *Food Chemistry* (e0308-8146) DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.125.

Per TS, Khan NA, Reddy PS, Masood A, Hasanuzzaman M, Khan MIR, Anjum NA. 2017. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. *Plant Physiology and Biochemistry* (e0981-9428) DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.03.018.

Philben M, Benner R. 2013. Reactivity of hydroxyproline-rich glycoproteins and their potential as biochemical tracers of plant-derived nitrogen. *Organic Geochemistry* (e0146-6380) DOI: 10.1016/j.orggeochem.2013.01.003.

Rady MM, Elrys AS, El-Maati MFA, El-Sayed MD. 2019. Interplaying roles of silicon and proline effectively improve salt and cadmium stress tolerance in *Phaseolus vulgaris* plant. *Plant Physiology and Biochemistry* (e0981-9428) DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.04.025.

Rodríguez-Pérez C, Gómez-Caravaca AM, Guerra-Hernández E, Cerretani L, García-Villanova B, Verardo V. 2018. Comprehensive metabolite profiling of *Solanum tuberosum* L. (potato) leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS. *Food Research International* (e0963-9969) DOI: 10.1016/j.foodres.2018.06.060.

Rouessac F, Rouessac A. 2000. *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*. John Wiley & Sons, LTD, England. ISBN: 0-471-97261-4.

Shu-han Z, Xue-feng X, Ye-min S, Jun-lian Z, Cao-zhou L. 2018. Influence of drought hardening on the resistance physiology of potato seedlings under drought stress. *Journal of Integrative Agriculture* DOI: 10.1016/S2095-3119(17)61758-1.

Singh A, Kumar A, Yadav S, Singh IK. 2019. Reactive oxygen species-mediated signaling during abiotic stress. *Plant Gene* (e2352-4073) DOI: 10.1016/j.plgene.2019.100173.

Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. 5th ed. Harcourt Brace & Company, United States of America. ISBN: 0030020786.

Suekawa M, Fujikawa Y, Esaka M. 2019. Exogenous proline has favorable effects on growth and browning suppression in rice but not in tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry* (e0981-9428) DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.06.032.

Tahir M, Ahmad I, Shahid M, Shah GM, Farooq ABU, Akram M, Tabassum SA, Naeem MA, Khalid U, Ahmad S, Zakir A. 2019. Regulation of antioxidant production, ion uptake and productivity in potato (*Solanum tuberosum* L.) plant inoculated with growth promoting salt tolerant *Bacillus* strains. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (e0147-6513) DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.04.027.

Talukder MR, Asaduzzaman M, Tanaka H, Asao T. 2018. Light-emitting diodes and exogenous amino acids application improve growth and yield of strawberry plants cultivated

in recycled hydroponics. *Scientia Horticulturae* (e0304-4238) DOI: 10.1016/j.scienta.2018.05.033.

Tanveer M, Shahzad B, Sharma A, Khan EA. 2018. 24-Epibrassinolide application in plants: An implication for improving drought stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* (e0981-9428) DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.12.013.

Taylor CM, Karunaratne ChV, Xie N. 2011. Glycosides of hydroxyproline: some recent, unusual discoveries. *Glycobiology* DOI: 10.1093/glycob/cwr188.

Tuberoso CIG, Congiu F, Serreli G, Mamei S. 2014. Determination of dansylate amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food Chemistry* (e0308-8146) DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.120.

Velasco NF, Ligarreto GA, Díaz HR, Fonseca LPM. 2019. Photosynthetic responses and tolerance to root-zone hypoxia stress of five bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *South African Journal of Botany* (e0254-6299) DOI: 10.1016/j.sajb.2019.02.010.

Vitor SC, Sodek L. 2019. Products of anaerobic metabolism in waterlogged roots of soybean are exported in the xylem. *Plant Science* (e0168-9452) DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.03.023.

Vokál B, Bárta J, Bártová V, Čepl J, Čížek M, Doležal P, Domkářová J, Dohanyos M, Faltus M, Greplová M, Hamouz K, Hausvater E, Homolka P, Horáčková V, Hůla J, Kasal P, Kopačka V, Koukalová V, Mayer V, Melzoch K, Opatrný Z, Patáková P, Paulová L, Polzerová H, Rajchl A, Rychtera M, Šantrůček L, Šárka E, Ševčík R, Tajovský M, Vejchar D, Zámečník J. 2013. *Brambory*. Profi Presss.r.o., Praha. ISBN: 9788086726540.

Vokál B, Cvrček M, Čepel J, Čížek M, Domkářová J, Fér J, Hausvater E, Králíček J, Prugar J, Rasocha V, Zrůst J. 2000. *Brambory*. Agrospoj, Praha.

Wang Y, Frei M. 2011. Stressed food – The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* (e0167-8809) DOI: 10.1016/j.agee.2011.03.017.

Wang Q, Wang Ch, Wang J, Liu W, Hao L, Zhou J, Wang Z, Wu Q. 2020. Sensitive determination of phenylurea herbicides in soybean milk and tomato samples by a novel hypercrosslinked polymer based solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* (e0308-8146) DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126410.

Wiita AP, Seaman JE, Wells JA. 2014. Chapter Thirteen – Global Analysis of Cellular Proteolysis by Selective Enzymatic Labeling of Protein N-Termini. *Methods for Enzymology* DOI: 10.1016/B978-0-12-417158-9.00013-3.

Xiao-Qing T, Li S, Qiang-Sheng W, Ying-Ning Z. 2015. Alleviation of waterlogged stress in peach seedlings inoculated with *Funneliformis mosseae*: Changes in chlorophyll and proline metabolism. *Scientia Horticulturae* (e0304-4238) DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.022.

Xiao W, Zhiqiang M, Jia Z, Mehmood H, Mei H, Jian C, Qin Z. 2019. Osmolyte accumulation plays important roles in the drought priming induced tolerance to post-anthesis drought stress in winter wheat (*Triticum aestivum*L.). *Environmental and Experimental Botany* (e0098-8472) DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.103804.

Yang J, Fleisher DV, Sicher RC, Kim J, Baligar VC, Reddy VR. 2015. Effects of CO₂ enrichment and drought pretreatment on metabolite responses to water stress and subsequent rehydration using potato tubers from plants grown in sunlit chambers. *Journal of Plant Physiology* (e0176-1617) DOI: 10.1016/j.jplph.2015.10.004.

Youssef MS, Mira MM, Millar JL, Becker MG, Belmonte MF, Hill RD, Stasolla C. 2019. Spatial identification of transcripts and biological processes in laser microdissected sub-regions of waterlogged corn roots with altered expression of phytoalbumin. *Plant Physiology and Biochemistry* (e0981-9428) DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.03.036.

Zhang X, Ma H, Qi H, Zhao J. 2014. Roles of hydroxyproline-rich glycoproteins in the pollen tube and style cell growth of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Plant Physiology* DOI: 10.1016/j.jplph.2014.02.010.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

AGP = arabinogalaktanové proteiny

AMK = aminokyselina

CE = kolizní energie

CO₂ = oxid uhličitý

CXP = výstupní potenciál z cely

DP = deklasterační potenciál

DW = sušina

EP = vstupní potenciál do cely

EXT = extensiny

FAD = kofaktor flavinadenindinukleotid

GS = enzym glutaminsyntetasa

GSALDH = enzym glutamát semialdehyddehydrogenasa

HGRP = glykoproteiny bohaté na hydroxyprolin

LC-ESI-MS/MS = kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem a elektrosprejovou ionizací

msm = mez detekce

NAD⁺ = oxidovaná forma koenzymu nikotinamidadenindinukleotidu

NADP⁺ = oxidovaná forma koenzymu nikotinamidadenindinukleotid fosfátu

NADPH = redukováná forma koenzymu nikotinamidadenindinukleotid fosfátu

NO = oxid dusnatý

O₂ = singletový kyslík

P5C = enzym pyrrolin-5-karboxylát

P5CDH = enzym pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa

P5CR = enzym pyrrolin-5-karboxylátreduktasa

P5CS = enzym pyrrolin-5-karboxylátsyntetasa

PRODH = enzym prolindehydrogenasa

ROS = reaktivní druhy kyslíku

