

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Vliv stresu suchem na obsah prolinu v hlízách brambor**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Čejková Žaneta**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.**

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv stresu suchem na obsah prolinu v hlízách brambor" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání \_\_\_\_\_

### **Poděkování**

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

# Vliv stresu suchem na obsah prolinu v hlízách brambor

## Souhrn

Brambory mají velký význam pro člověka, a to zejména díky svému vnitřnímu složení. Jsou zdrojem energie, sacharidů, bílkovin, vitamínů a dalších cenných látek. Brambory jsou mimo jiné složeny z hlíz, které slouží jako rozmnožovací orgán rostliny. Právě hlízy obsahují vysoké množství škrobu a tato část plodiny je velmi náchylná k deficitu vody, to se poté odráží na kvalitě a výnosu této plodiny. Brambory jsou plodinou velmi citlivou na sucho, a to díky krátkému kořenu, což způsobuje omezenou schopnost přijímat vodu. Brambory se pěstují při specifických klimatických podmínkách, a pokud tomu tak není, jsou napadány různými škůdci, a ti pak způsobují nemoci, které mohou plodině ublížit.

Vodní deficit způsobuje pokles turgoru a vodního potenciálu. Může také dojít k částečnému nebo úplnému uzavření průduchů a snížení rychlosti buňky, a to pak zapříčiní zhoršený růst rostlin, deformaci hlíz a nižší produktivitu. Je často doprovázen i slaností půdy, což narušuje průběh fotosyntézy, vyvolává přerušování dýchání, a tím může docházet k elektronovému úniku kyslíku a akumulaci reaktivních druhů kyslíku. Ty jsou schopné poškodit buňky a membrány této plodiny a podílí se na signalizaci stresu, čímž může nastat metabolická porucha, a pokud nedojde k jejich detoxikaci, pak i buněčná smrt.

K potlačení stresu si rostliny rozvíjejí různé adaptivní mechanismy. Takovýmto mechanismem je například prolin, který je pro brambory velice důležitý. Nahromadí se uvnitř plodiny, kde vyvolává osmotické úpravy. Zvyšuje tím schopnost odolat buněčné dehydrataci a chrání buňky před oxidačním poškozením a přímým vylučováním reaktivních druhů kyslíku. Prolinová katabolická dráha tvořená glutamátem umožňuje organismům využívat prolin jako zdroj uhlíku, dusíku a jako energetický zdroj.

Stanovení prolinu v laboratoři lze provést pomocí kapalinové chromatografie a ultrafialové, viditelné spektrofotometrie, které patří k základním metodám.

**Klíčová slova:** vodní deficit, hlízy, aminokyseliny, HPLC, spektrofotometrie

# Effect of drought stress on proline content in potato tubers

## Summary

Potatoes are of great importance to humans, especially due to their internal composition. They are the source of energy, carbohydrates, proteins, vitamins and other valuable substances. Potatoes are composed, among other things, of tubers that serve as plant reproductive organs. Tubs contain high amounts of starch and this part of the crop is very prone to water deficiency, which is then reflected in the quality and yield of this crop. Potatoes are very drought-sensitive crops, thanks to their short roots, which causes a limited ability to absorb water. Potatoes are grown under specific climatic conditions and, if they are not, they are attacked by pests and they cause diseases that can harm the crop.

Water deficiency causes a drop pressure inside mesh and tissue and a drop water potential. There may also be a partial or complete closure of the vents and a decrease in cell velocity, and this will result in impaired plant growth, tubular deformity, and lower productivity. It is often accompanied by soil salinity, which disrupt the photosynthesis causes breathing interruptions, and this can lead to electron leakage of oxygen and accumulation of reactive oxygen species. They are capable of damaging the cells and membranes of this crop and are involved in stress signaling, which can cause a metabolic disorder, and if detoxification occurs, then cell death.

In order to suppress stress, plants develop different adaptive mechanisms. Such a mechanism is, for example, a proline which is very important for potatoes. It accumulates inside the crop where it causes osmotic treatments. It increases the ability to withstand cell dehydration and protects cells from oxidative damage and direct excretion of reactive oxygen species. The proline catabolic pathway of glutamate allows organisms to use proline as a source of carbon, nitrogen and as a source of energy.

Determination of proline in the laboratory can be done by liquid chromatography and ultraviolet, visible spectrophotometry, which is one of the basic methods.

**Keywords:** water deficit, tubers, amino acids, HPLC, spectrophotometry

<b>1</b>	<b>Obsah</b>	
<b>2</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>2</b>
<b>4</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>3</b>
<b>4.1</b>	<b>Brambory</b>	<b>3</b>
4.1.1	Úvod	3
4.1.2	Využití	3
4.1.3	Historie	3
4.1.4	Popis	3
4.1.5	Varné typy brambor	6
4.1.6	Zásobní látky brambor	6
4.1.7	Choroby brambor	8
4.1.8	Škůdci brambor	9
4.1.9	Klimatické podmínky při růstu brambor	9
<b>4.2</b>	<b>Stres</b>	<b>11</b>
4.2.1	Úvod	11
4.2.2	Stres způsobený suchem	11
4.2.3	Stres způsobený suchem a podpořený slaností půdy	12
4.2.4	Stres způsobený suchem u brambor	15
4.2.5	Prolin jakožto užitečný indikátor u rostlin při stresu suchem	16
4.2.6	Regulátory růstu rostlin	18
4.2.7	Příprava na stres suchem	19
4.2.8	Sekundární metabolity při reakci na stres suchem	20
4.2.9	Techniky pro detekci stresu u rostlin	20
<b>4.3</b>	<b>Prolin</b>	<b>22</b>
4.3.1	Úvod	22
4.3.2	Biochemie	22
4.3.3	Biosyntéza prolinu	23
<b>4.4</b>	<b>Stanovení prolinu</b>	<b>25</b>
4.4.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	25
4.4.2	Kapilární elektroforéza	27
4.4.3	Ultrafialová, viditelná adsorpční spektroskopie	28
<b>5</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Vlastní stanovení</b>	<b>30</b>
5.1.1	Použité odrůdy brambor	30
5.1.2	Příprava brambor	31
5.1.3	Příprava kalibrační křivky	31
5.1.4	Příprava ninhydrinu	31
5.1.5	Pracovní postup přípravy vzorku	31

5.1.6	Samotné měření na spektrofotometru .....	31
5.1.7	Samotné měření na kapalinovém chromatografu s hmotnostním detektorem .....	32
<b>6</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>Použité zkratky .....</b>	<b>35</b>
<b>8</b>	<b>Souhrn .....</b>	<b>36</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>37</b>

## 2 Úvod

Brambory jsou velmi důležitou plodinou u nás i ve světě. Jsou zdrojem energie, sacharidů, bílkovin, vitamínů a dalších cenných látek, které náš organismus potřebuje. Nejčastěji se konzumují jako příloha k teplým pokrmům. Brambory jsou složeny z hlíz, což je zduřelý konec oddenku (stolonu), kde může probíhat rozmnožování. Jsou zde ukládány živiny pro nepříznivé období. V dnešní době jsou velkým problémem pro pěstování brambor vysoké teploty a extrémní sucho, které může být podpořeno vysokou salinitou půdy, což se následně odráží na kvalitě a výnosu brambor. Jedním z pozitivních faktorů, které mohou pomoci při stresu suchem, je aminokyselina prolin. Tato aminokyselina dokáže vyvolat osmotické úpravy uvnitř brambor a je schopna potlačit abiotické stresy v plodině. Napomáhá také rostlině zvládnout stres vyvolaný suchem a chrání její makromolekuly. Prolin má mnoho pozitivních vlastností, které rostlině pomáhají při těchto náročných stresových situacích.



### 3 Cíl práce

1. Popis brambor a zabývání se možnostmi, jak působí stres suchem na obsahové látky brambor a co se při tom v rostlině děje,
2. Popis prolinu, jakožto chemické látky, jak působí na brambory v období vystavení plodiny vysokým teplotám, stresu suchem a shrnutí, jak se prolin zapojuje do biochemického metabolismu při stresu suchem,
3. Návrhy možných způsobů stanovení prolinu podle odborné literatury a v praktické části také zahrnutí i pár výsledků vlastního měření.

## 4 Teoretická část

### 4.1 Brambory

#### 4.1.1 Úvod

Brambor (*Solanum tuberosum* L.) je velmi důležitá plodina a je jednou ze základních potravin ve světě. (Vokál a kol., 2013) Brambory jsou pěstovány ve 156 zemích světa a jsou důležitou hospodářskou a zemědělskou plodinou v severní Číně, kde mají velkou rozlohu pěstování. Jsou to plodiny, pro které je typické mírné podnebí a jsou citlivé na nedostatek vody. (Li. et al., 2015a) Doba sklizně brambor je celkem krátká s vysokou produkční rychlostí. I krátké období stresu sucha může vést k závažným škodám a způsobit snížení výnosu hlíz. (Cho et al., 2016) Existují dva základní a funkční typy rostlin, a to C<sub>3</sub> a C<sub>4</sub> rostliny s různými reakcemi na světlo, teplotu, CO<sub>2</sub> a N<sub>2</sub> během fotosyntetického procesu s rozlišnými fotosyntetickými cestami. (Yan et al., 2017) Brambora je klasifikována jako rostlina typu C<sub>3</sub>. Brambory se velmi často pěstují ve vysoké nadmořské výšce 1000-3000 m nad mořem. Hlavním problémem ve výsadbě brambor je teplota a vlhkost. Různé abiotické stresy, kterým můžou být brambory vystaveny, pak způsobí nižší produktivitu této plodiny. (Mariana et Hambdani, 2016)

#### 4.1.2 Využití

Brambory se využívají v potravinářství, ve škrobárenském průmyslu, používají se také jako meziplodina pro některé druhy rostlin, při výrobě papíru, při výrobě dextrinů (výroba lepidel), při krmení hospodářských zvířat, v lihovarnictví a při produkci bioplynu (Vokál a kol., 2013)

#### 4.1.3 Historie

V 60 letech 16. Století Španělé přivezli brambory z Peru domů. V 80 letech 16. Století pak angličtí mořeplavci dovezli brambory z Chile na britské ostrovy a poté ze Španělska a Británie šířily brambory do dalších oblastí Evropy. V prvních desetiletích 17. Století se dostaly i do českých zemí. (Vokál a kol., 2013)

#### 4.1.4 Popis

Brambor patří mezi dvouděložné rostliny čeledi lilkovité (Solanaceae). Brambor je samosprašnou rostlinou, ale může být opylen i přenesením pylu hmyzem. (Vokál a kol., 2013)

Brambory se rozmnožují vegetativně hlízkami nebo generativně semeny. Brambor je autotrofní rostlina, což znamená, že zdrojem uhlíku je anorganická látka ( $\text{CO}_2$ ). Z hlediska tvorby květu je brambor dlouhodobní rostlinou a z hlediska tvorby hlíz krátkodenní. (Vokál a kol., 2000)

Obr. 1 - Brambora



<https://leporelo.info/brambor>

#### 4.1.4.1 Trs bramboru

- **Nadzemní část** je tvořena lodyhou s listy. Na konci lodyhy, z paždí posledního nebo bočního listu, vyrůstá květní stopka, na které je uspořádáno květenství ve dvojvijanu. Květ se skládá z pěti kališních lístků, pěti korunních lístků, pěti tyčinek s krátkými nitkami a prašníky a z pestíků (semeník, čnělka, blizna). Plodem brambory je bobule, která v dužnaté části obsahuje semena.
- **Podzemní část** je tvořena částí stonků vyrůstající z mateční hlízy a také kořeny, které vyrůstají z uzlů na podzemní části stonku a stolony (podzemní odnože, oddenky) z axilárních pupenů (Vokál a kol., 2013)

#### 4.1.4.2 Hlíza brambor

Hlíza vzniká přeměnou stonku. Je to zduřelý konec oddenku (stolonu), jenž vzejde z úžlabního pupenu. Hlízu dělíme na pupkovou část, která má méně oček a souvisí se stolonem a korunkovou část, která má větší množství vrcholových a postranních oček. Má

funkci zásobního orgánu rostliny. (Vokál a kol., 2013) Maximální teplota půdy pro tvorbu hlíz je 25°C. Brambory jsou mělce kořenící a výnosy hlíz jsou velmi náchylné k deficitu vody. Přiměřená hydratace je tedy velmi důležitá pro výrobu a uvádění bramborové hlízy na trh. Brambory jsou plodiny typu C<sub>3</sub>, a proto dochází ke zvýšenému výnosu v reakci na obohacování CO<sub>2</sub>. Účinky obohacování CO<sub>2</sub> na rostliny ve vztahu k vodě jsou větší než pro extrémní sucho. (Yang et al., 2015)

#### 4.1.4.2.1 Tvorba hlíz

##### **Hlízy se tvoří na konci stolonu v sedmi fázích:**

- 1 konec stolonu je háčkovitě zahnutý (0-5 dní)
- 2 konec stolonu za podmínek dlouhého dne (5-6 dní)
- 3 subapikální hlízotvorný otok (6-7 dní)
- 4 zahájení tvorby hlízy (7-8 dní)
- 5 růst hlízy (9-15 dní) po přechodu na krátký den
- 6 růst hlízy (9-15 dní) po přechodu na krátký den
- 7 růst hlízy (9-15 dní) po přechodu na krátký den (Vokál a kol., 2013)

Inkubace = období mezi počátkem klíčení a počátkem tvorby hlíz.

Tuberizace = schopnost tvorby hlíz. (Vokál a kol., 2000)

#### 4.1.4.2.2 Chemické složení hlíz brambor

Hlízy brambor představují rostlinný produkt s vysokým obsahem škrobu a také vody v čerstvé hmotě (68-83 %). V buňkách hlíz se voda vyskytuje buď jako volná nebo vázaná. 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 a kol., 2013)

##### **Hodnoty vyjádřené v čerstvé hmotě rostliny:**

- Voda 68-83 %,
- Sušina 17-32 %,
- Polysacharid (škrob): v hlízách je hlavní zásobní látkou 11-26 %,
- Monosacharidy: glukosa, fruktosa a disacharid sacharosa 0,5 %,
- Dusíkaté látky 1-3 %,

1 **bílkovinné dusíkaté látky** (30-80 %) dusíkatých látek bramborových hlíz, převážně vodorozpustné. Hlavní bílkovinou hlíz je patatin, má zásobní funkci a vykazuje enzymové funkce

2 **nebílkovinné dusíkaté látky**

- Vlákna 1-2 %,
- Volné aminokyseliny (asparagin, glutamin, prolin) 0,1-1 %,
- Lipidy (tuk) 0,1 %,
- Popeloviny (K, P, S, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn) 1,1 %,
- Antioxidanty (vitamín E, karotenoidy, polyfenoly, flavonoidy a prvek Se)

**Hlízy také obsahují látky, které působí negativně**

- Steroidní glykoalkaloidy, které při vyšším obsahu mohou působit negativně. Jedná se převážně o  $\alpha$ -solanin a  $\alpha$ -chaconin. Jsou to toxické látky, které způsobují inhibici cholinesterasy a porušují membrány zažívacího traktu. (Vokál a kol., 2013)

#### 4.1.5 Varné typy brambor

**Varný typ A:** pevné, lojovité brambory, jemné až středně jemné struktury, nerozvářivé, velmi slabě až slabě moučnaté. Vhodné k přípravě bramborového salátu a ke konzumu jako vařené.

**Varný typ B:** polopevné, polomoučnaté brambory s jemnou až hrubší strukturou, vlhké až sušší. Jsou vhodné jako příloha.

**Varný typ C:** měkké, moučné brambory s jemnou až středně hrubou strukturou, středně vlhké až suché. Jsou vhodné k přípravě výrobků z brambor, těst a kaší.

**Varný typ D:** hrubé, silně moučnaté, silně rozvářivé brambory nepřístupné pro přímý konzum. (Vokál a kol., 2000)

#### 4.1.6 Zásobní látky brambor

##### 4.1.6.1 Škrob

Hlavní zásobní látkou brambor je škrob. Ten plní funkci sytící. Škrob se nachází v několika formách. (Vokál a kol., 2013)

- 1 jako málo přístupný pankreatické amyláze (škrob luštěnin),
- 2 škrob syrových brambor,
- 3 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, snižuje hladinu glukosy v krvi. Nejvíce rezistentního škrobu je při vaření a následném zchlazení brambor. (Vokál a kol., 2013)

Škrob je energetickým zdrojem potravin a ovlivňuje jejich texturu a funkční vlastnosti. Jako zahušťovadlo 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 a kol., 2013)

#### **4.1.6.2 Vláknina**

Bramborové hlízy obsahují vlákninu, která se řadí mezi polysacharidy. Zahrnuje hemicelulosu, pektiny, hexosany a pentosany. V původní hmotě hlíz je 0,11 % rozpustného pektinu, 0,45 % nerozpustného pektinu a 0,17-3,48 % vlákniny. (Vokál a kol., 2013)

#### **4.1.6.3 Bílkoviny**

**Hlízové bílkoviny členíme do 3 hlavních skupin dle jejich molekulové hmotnosti:**

- 1 patatin,
- 2 skupina inhibitorů proteas,
- 3 ostatní bílkoviny (Vokál a kol., 2013)

Patatinové bílkoviny jsou považovány za hlavní zásobní bílkoviny hlíz. Skupina inhibitorů proteas má v hlízách úlohu zásobních bílkovin a je součástí obranného systému. (Vokál a kol., 2013)

#### **4.1.6.4 Nebílkovinné dusíkaté látky**

Nebílkovinné dusíkaté látky členíme na volné aminokyseliny, amidy asparagin a glutamin a ostatní dusíkaté látky. (Vokál a kol., 2013)

#### **4.1.6.5 Mastné kyseliny**

Podíl tuků je nejvíce zastoupen ve slupce a velké množství v bramborách je nenasycených mastných kyselin (kyselina linolová, linoleová, palmitová a stearová). (Vokál a kol., 2013)

#### 4.1.6.6 Minerální látky a vitamíny

Brambory jsou také zdrojem minerálních látek. Je v nich obsažen hlavně K, Mg a Fe. Obsah vitamínů v bramborách je především u vitamínů C, B<sub>1</sub> a B<sub>6</sub>. (Vokál a kol., 2013)

#### 4.1.6.7 Ostatní látky

Brambory obsahují fenolové látky, především kyselinu chlorogenovou a její deriváty, kyselinu kávovou a aminokyselinu tyrosin. (Vokál a kol., 2013)

Brambory také obsahují barviva v hlízách. Ty obarvují dužinu a zvyšují podíl látek s antioxidační aktivitou jako například karotenoidy (lutein, zeaxanthin, violaxanthin a  $\beta$ -karoten). (Vokál a kol., 2013)

Brambory ale také mohou obsahovat škodlivé látky pro lidský organismus. Jedná se o toxické glykoalkaloidy, především o solanin a chaconin. (Vokál a kol., 2013)

#### 4.1.7 Choroby brambor

Mohou být původu fyziologického, virového, bakteriálního a houbového. Napadány jsou jak nadzemní, tak podzemní části brambor. (Vokál a kol., 2000)

##### **Fyziologické choroby:**

jedná se o choroby vznikající působením nevhodných faktorů vnějšího prostředí. Mohou se projevit buď na nati v době vegetace, nebo na hlízách. (Vokál a kol., 2000)

##### 4.1.7.1 Příklady chorob

- **Hlízkování:** příznakem je nepravidelné vzházení a mezerovitost porostu. Příčinou jsou poruchy v látkové výměně způsobené extrémními teplotami v závěru vegetace,
- **Rozprasky hlíz:** na povrchu hlíz se vytvářejí podlouhlé a hluboké trhliny. Příčinou jsou výkyvy v průběhu klimatických podmínek, kdy se střídají suchá a vlhká období,
- **Zmlazování hlíz:** hlízy se deformují a prodlužují přirůstáním korunkové části. Vznikají pak hlízy lahvovitého tvaru. Příčinou jsou především extrémní klimatické podmínky, kdy se po dlouhotrvajícím suchu přijdou vydatnější dešťové srážky,
- **Nitkovitost klíčků:** z oček hlíz vyrůstají slabé, bílé klíčky dlouhé 2 mm. Příčinou jsou vysoké teploty a suché období v době tvorby hlíz,
- **Rzivost dužiny:** na vlhkých hlízách sklizených ze zamokřených lokalit se vytváří 2 mm velké bradavičnaté nárůstky. Příčinou jsou klimatické podmínky, a to především v suchých a teplých obdobích. (Vokál a kol., 2000)

#### 4.1.8 Škůdci brambor

Na bramborách se vyskytuje řada škůdců, které mohou parazitovat na nadzemních i podzemních částech rostlin. (Vokál a kol., 2000)

##### 4.1.8.1 Škůdci bramborové natě

- **Mšice (Aphidoidea):** sáním mohou způsobit oslabení bramborových trsů a na nich se pak můžou vyskytovat různé deformace. Nálet mšic vrcholí především v období nejvyšších teplot,
- **Křísi (Žilnatka vironosná – *Hyalestes absoletus* Sig.):** vysávají rostlinné šťávy a mohou přenášet nebezpečné choroby. Vyskytují se v teplejších oblastech a přenáší mykoplasmosu stolbur brambor,
- **Brouci (Mandelinka bramborová – *Leptinotarsa decemlineata* Say.):** především v teplých ranobramborářských oblastech. Okusem listů a stonků i hlíz může způsobit holožír. (Vokál a kol., 2000)

##### 4.1.8.2 Šůdci kořenů a hlíz brambor

- **Motýli (Osenice polní – *Agrotis septum* Schiff.):** samička klade vajíčka na hostitelské rostliny a tím poškozují hlízy brambor. K přemnožení dochází po suchých parných letech s tuhou zimou. (Vokál a kol., 2000)

#### 4.1.9 Klimatické podmínky při růstu brambor

##### 4.1.9.1 Teplota

Teplota je pro rostlinu důležitá kvůli tvorbě podzemních hlíz. Nejlépe plodina roste při teplotě 21-24 °C. Vysoká teplota může způsobit abnormální tvar brambor a může také zvýšit biosyntézu kyseliny gibberelové. Díky aplikaci PBZ na rostlinu můžeme inhibovat kyselinu gibberelovou a podpořit zvýšení tuberizace u brambor. (Mariana et Hambdani, 2016) Brambory jsou velmi citlivé na změny teploty, takže nad 30 °C klesá růstová rychlost. Hlízy snesou až 38 °C, což se využívá v termoterapii viróz. Nad 40 °C hlízy odumírají. (Vokál a kol., 2000)



#### **4.1.9.2 Vzduch**

Vzduch je pro brambory také velmi důležitý. Složení vzduchu a jeho cirkulace ovlivňuje kvalitu hlíz při skladování. Brambory mají vysoký nárok na provzdušnění půdy u kořenů (rhizosféře). Ve vzduchu je důležitá koncentrace CO<sub>2</sub>. (Vokál a kol., 2000)

#### **4.1.9.3 Voda**

Na stavbě těla brambor se nejvíce podílí voda, která může být buď volná (vakuoly, buněčná šťáva, transpirační voda) nebo vázaná (kapilární, inhibiční, konstituční). Obsah vody v jednotlivých částech brambor je následující: lístky bramboru obsahují 88-90 % vody, stonky a řapíky 90-95 %, hlízy 63-87 % a semena 5-15 %. Brambor má středně velké nároky na vláhu. Nejmenší požadavky na vláhu má hlíza při klíčení. Při nedostatku půdní vlhkosti dojde ke snížení asimilačního výkonu a tím i k nižšímu výnosu hlíz. Na lehčích až středních půdách vyžadují brambory 70 % plné vodní kapacity (tj. 70 % pórů s vodou a zbylých 30 % je vzduch). Tyto nároky jsou pokrývány hlavně dešťovými srážkami a zásobou půdní vláhy. K růstu hlíz se spotřebuje mnoho vody. V důsledku ztráty vody se u rostlin začnou uzavírat průduchy a rostlina hladoví. Na každou molekulu CO<sub>2</sub>, kterou rostlina přijme, ztratí asi 100-500 molekul vody. (Vokál a kol., 2000)

## 4.2 Stres

### 4.2.1 Úvod

Rostliny jsou často vystaveny mnoha stresových podmínek, jako je nízká teplota, sůl, sucho, záplavy, vysoké teploty, oxidativní stres a toxicita těžkých kovů. (Jaleel et al., 2007) Abiotické stresy narušují buněčnou redoxní homeostázu, mění metabolické interakce a narušují klíčové fyziologické procesy rostlin. (Hossian et al., 2014) Procesy z hlediska fyziologických, morfologických a biochemických změn a hormonálních systémů pomáhají rostlinám přežít i při náročných podmínkách. V rostlinách existuje také mnoho obranných mechanismů, které jsou tolerantní ke stresu z nedostatku vody a soli, jako třeba osmoregulace, homeostáza iontů a antioxidační a hormonální systémy. Na druhou stranu obranné mechanismy u citlivých rostlin jsou slabší a vedou k nižšímu výtěžku a k inhibici rostlin. Z půdy kontaminované solí může vznikat iontová toxicita, a to má negativní vliv na růst a vývoj rostlin. (Cha-um et Kirdmance, 2009) Frekvence a trvání abiotických stresů se do budoucna bude stále zvyšovat kvůli globálním změnám klimatu, proto je snaha vyvinout odrůdy plodin tolerantní k abiotickým stresům. Hlavní překážkou moderního udržitelného zemědělského rozvoje je tedy vyvinout pokročilé chovatelské a inženýrské nástroje, které by mohly pomoci rozvíjet nové odrůdy s požadovanými agronomickými vlastnostmi. (Hossian et al., 2014)

### 4.2.2 Stres způsobený suchem

Stres způsobený suchem je hlavním faktorem, který způsobuje ztrátu zisku u rostlin. (Monreal et al., 2007) Vodní stres je důsledkem buď přebytku vody, nebo nedostatku vody. Více běžný je stres z nedostatku vody, protože má nepříznivý dopad na ekologické a zemědělské systémy. Růst a produktivita rostlin jsou negativně ovlivňovány různými způsoby. Jedná se o abiotické (neživé) a biotické (živé) stresové faktory. (Jaleel et al., 2007) Vztahy mezi fotosyntetickou aklimatizací, prolinem, rozpuštěným cukrem a antokyanech shromážděných v plodině mohou způsobit suchý stres rostliny. Tyto metabolity mohou mít tedy významnou úlohu v procesu aklimatizace na stres sucha. (Sperdouli et Monstakas, 2012)

Hlavní úlohu v metabolismu při stresu suchem u rostliny hraje fotosyntéza. Důležitá je rovnováha mezi zachyceným světlem a energií. (Sperdouli et Monstakas, 2012) Sucho by mohlo zabránit vstupu CO<sub>2</sub> do listů, ovlivnit absorpci CO<sub>2</sub> karboxylačním centrem a tím dojde ke snížení fotosyntetické rychlosti. (Li, et al., 2015a) Pokud klesne fotosyntéza, pak začne probíhat nadměrné buzení energií ve fotosystému II a to vede k narušení průběhu

fotosyntézy a akumulaci reaktivních druhů kyslíků, což následně vede k oxidativnímu stresu. (Sperdouli et Monstakas, 2012)

Vodní stres tedy akumuluje reaktivní druhy kyslíku a jejich nadměrná produkce mění aktivitu enzymů, které se podílejí na jejich odstranění. Nedostatek vody pak způsobuje stálé změny v aktivitách enzymů se zvýšenou hladinou prolinu. Formace reaktivních druhů kyslíků ohrožují buňku buď únikem elektronů nebo jako vedlejší produkt různých metabolických cest lokalizovaných v buněčných komorách. Tyto reaktivní druhy kyslíku se mohou také podílet na signalizaci přenosu stresu a poškození buněčných membrán. (Rai et al., 2012)

Stres suchem v rostlině také ovlivňuje aktivitu fotosystému II. (Sperdouli et Monstakas, 2012) Opakovaný nedostatek vody může snížit citlivost stomat na nízký potenciál pro vodu. Tento deficit je typický poklesem obsahu vody, turgoru a vodního potenciálu, částečným nebo úplným uzavřením stomat a snížením rychlosti buňky. Stres způsobený nedostatkem vody je výsledkem interakce mezi faktory v rhizosféře, rostlinami a atmosférou a množstvím vlhkosti pro rostliny. Vodní napětí má významný vliv na určité fáze cyklu rostliny. (Helaly et al., 2017)

Důležitým hormonem působícím v reakci na stres suchem u rostliny je abscisová kyselina. Tato kyselina spouští stomatální uzávěr a také reguluje expresi genů reagujících na sucho. (Fard et al., 2017) Přínosným prvkem pro různé druhy stresu je křemík. Ten aktivuje přirozenou obranu reakce a produkci fenolických sloučenin, které působí jako antioxidanty. Křemík se také může účastnit metabolických a fyziologických aktivit v rostlinách vystaveným stresem. (Helaly et al., 2017)

#### **4.2.3 Stres způsobený suchem a podpořený slaností půdy**

Nejvíce stresové podmínky způsobuje slanost a sucho. Pokud jsou tyto dvě složky kombinovány, pak představují nebezpečí pro rostlinu. Interferují akumulaci živin v rostlině a také mají na rostlinu inhibiční účinky. Nežádoucí účinky slanosti na rostlinu mohou podpořit sucho v rostlině. (Slama et al., 2008)

Stresem ze slanosti rozumíme působení NaCl na rostlinu, a to samozřejmě snižuje výnos dané rostliny a kvalitu výsledných produktů. (Barbieri et al., 2011) Brambory jsou klasifikovány jako středně citlivé na sůl a jako velmi citlivé na vodní napětí. (Heuer et Nadler, 1998) Hladina soli je ve většině zavlažovacích vod pod hranicí pro citlivější rostliny. Akumulace soli v zavlažovacích půdách může pocházet jak ze zavlažování, tak ze zdroje podzemní vody a mohou zvýšit slanost až na takovou úroveň, že může snížit růst a výnos i u více tolerantních rostlin. (Kahlaoui et al., 2015) Účinky poškození kvůli slanosti jsou spojeny

s klíčením, nedostatkem vody, iontovou nerovnováhou, minerální výživou, stomatálním chováním, fotosyntetickou účinností a využitím uhlíku. Slanost tedy může u rostlin způsobit různé deformace. Růst rostlin je retardovaný, sníží se výnosy hlíz, dojde ke změnám v obsahu sušiny, rozpustných pevných látek a sekundárních metabolitů v hlízách. (Levy et Tai, 2013)

K potlačení stresu si rostliny rozvíjejí různé adaptivní mechanismy. Adaptivní rostlina odpoví na reakci na stres syntézou a akumulací organických sloučenin o nízké molekulové hmotnosti v cytosolu a organelách. Tyto sloučeniny se nazývají kompatibilní osmolyty, protože se hromadí a působí bez narušení intracelulární biochemie jako enzymové aktivity v buňce. Kompatibilním osmolytem ovlivňující stres slaností může být jednoduchý cukr (fruktosa), disacharid (sacharosa), cukerné alkoholy nebo polyoly (sorbitol), aminokyseliny (prolin) a sulfoniové sloučeniny. (Kahlaoui et al., 2015)

Pokud jsou rostliny vystavené působení NaCl, můžeme jim pomoci tak, že aplikujeme prolin na list v průběhu růstového cyklu nebo jim také může pomoci expozice světla během skladování po sklizni. Aplikace prolinu na list sníží obsah dusičnanů během skladování a zvýší množství karotenoidů a chlorofylu. Skladování rostlin v prosvětleném prostoru sníží ztráty hmotnosti a sníží obsah dusičnanů oproti tmavému úložnému prostoru. (Barbieri et al., 2011)

Aktivní nebo pasivní akumulace prolinu je důležitá pro adaptační mechanismus rostliny v závislosti na osmotickém namáhání jako je stres z nedostatku vody a vysoká úroveň slanosti. Tak mnoho organismů může syntetizovat rozpuštěné látky, které pomáhají udržovat vodu uvnitř buněk nebo chránit organely z dehydratace. (Oufir et al., 2009) Slanost z NaCl se vyskytuje při kombinaci osmotické a iontové toxicity, protože snižuje kapacitu absorpce vody, a tím ovlivňuje fyziologii rostliny. Stres slanosti také vyvolávají toxické hladiny  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  v buňkách, čímž se omezí snížení absorpčních schopností aktivity  $\text{K}^+$  vyžadující enzymy. (Singh et al., 2016)

#### **4.2.3.1 Reaktivní druhy kyslíku (ROS) u stresu z nedostatku vody a slanosti**

Slanost NaCl vyvolává přerušování dýchání a fotosyntetické přenosy elektronů, a tím dojde k elektronovému úniku kyslíku a k vytváření reaktivních druhů kyslíku. (Singh et al., 2016)

**Jedná se o:**

- 1 superoxidový radikál  $O_2^-$ ,
- 2 hydroxylové radikály OH,
- 3 singletový kyslík  $O_2$ ,
- 4 peroxid vodíku  $H_2O_2$  (Singh et al., 2016)

Nadbytečná akumulace reaktivních druhů kyslíku v buňkách vede ke zvýšení rychlosti lipidové peroxidace a oxidace proteinů a způsobuje poškození buněk, membrán a enzymů. (Singh et al., 2016) ROS způsobují oxidační poškození mnoha buněčných struktur. To pak způsobí metabolickou poruchu, a pokud nedojde k detoxikaci ROS, pak i buněčnou smrt. (Hossian et al., 2014)

Aby se zabránilo poškození buněk v důsledku ROS, produkují rostliny řadu kompatibilních řešení. (Nxele et al., 2017)

**Kompatibilní řešení:**

- enzymatické (superoxid dismutasa, peroxidasa, katalasa, glutathion-S-transferasa),
- neenzymatické antioxidanty (prolin), které jsou indukovány k zajištění sekundární ochrany proti oxidačnímu stresu. (Nxele et al., 2017)

ROS jsou produkovány v mitochondriích, chloroplastech, peroxizomech a apoplastech. (Hossian et al., 2014)

Fyziologické procesy jako je dýchání a fotosyntéza produkují pouze omezené množství ROS, zatímco různé biotické a abiotické stresy produkují zvýšené hladiny ROS, které vedou až k oxidativnímu stresu. Tyto vyšší hodnoty pak mohou vést k inaktivaci proteinů a inhibici aktivity enzymů. Primárním zdrojem ROS jsou chloroplasty. V reakci na stres slanosti to vede ke snížení stomatální vodivosti, sníží se přebytek ztráty vody, a tím dojde ke snížení vnitřních koncentrací  $CO_2$ , zpomaluje se snížení  $CO_2$  Calvinovým cyklem a indukuje se fotoreaktivace. V reakci na stres sucha rostlina tedy uzavře stomatální uzávěr, a to má za následek zablokování vstupu  $CO_2$  do listů a tím se omezí fotosyntetická fixace uhlíku. Tím dojde ke zrychlení fotorespirační dráhy. (Hossian et al., 2014)

Většina ROS, které vznikají v mitochondriích se tvoří především v oblasti komplexu I (NADH dehydrogenasa) a ubiquinonu. V mitochondriích jsou enzymy, které také dovedou produkovat ROS. Mitochondriální ROS jsou ale důležité pro adaptaci rostliny na stres či naprogramované smrti buněk. (Hossian et al., 2014)

Suchost a slanost vyvolávají různé interakční události včetně inhibice enzymových aktivit v metabolických cestách. Kompatibilní rozpustné látky jako je prolin se hromadí při abiotických stresových podmínkách u mnoha druhů rostlin. U brambor je prolin důležitý kvůli osmotickému nastavení. (Nxele et al., 2017) Zvýšená biosyntéza prolinu hraje významnou roli u osmotického přizpůsobení při stresu slanosti. Prolin působí jako osmolit, také je důležitý pro chytání elektronů, stabilizuje subcelulární struktury a vyrovnává buněčný redoxní potenciál při stresu slanosti. (Singh et al., 2016)

#### **4.2.4 Stres způsobený suchem u brambor**

Brambory jsou citlivé na sucho, protože mají krátký kořen, což způsobuje omezenou schopnost přijímat vodu. Stres suchem ovlivňuje růst a vývoj výhonků, kořenů a hlíz. Tím pak dojde nejen ke snížení kvality hlíz a také ke snížení produkce hlíz. Odezva brambor při stresu suchem se mezi kultivary značně liší jak v rozsahu, tak v časování deficitu vody. Během iniciace hlízy potenciál půdní vody, který je menší než 25 kPa ovlivňuje počet hlíz. Nejvíce používané indikátory na stres suchem je odpor, množství vody v listu a odstraněná voda z listu. Nejvíce zjevnou odpovědí na stres suchem je větrání listů. (Banik et al., 2016)

Některé rostliny jsou dokonce schopné zvýšit odolnost proti stresu vystavením se nízkému stresu (aklimatizací). Aklimatizace závisí jak na genotypu rostliny, tak na celkovém prostředí. (Banik et al., 2016) U brambor může docházet ke stresu suchem zvláště kvůli nepravidelným srážkám nebo nedostatečným zavlažováním. Brambory jsou považovány za plodiny, které jsou více náchylné na sucho. (Ambrosone et al., 2017)

Existuje tzv. stresová paměť, kdy si rostlina po sérii jdoucích stresů navodí stresovou paměť. Ta reaguje agresivněji na budoucí stres, který může přijít. (Ambrosone et al., 2017)

Existuje také tzv. krátkodobá paměť (mitotická), která má časové rozpětí menší než 1 týden a dlouhodobá paměť (meiotická), kdy je paměť napětí přenášena na nestresované potomstvo v rámci dědičnosti a mohla by být udržována během dalšího vývoje v rámci životnosti organismu. Přežití nebo smrt rostlin je dán rostlinou genetikou, vývojovými fázemi rostlin a jejich morfologií a závažností a trváním stresové události. Geny mohou velmi výrazně souviset se stresem, jelikož upravují důležité mechanismy buněk, jako metabolismus proteinů, homeostázu iontů, transkripční a postranskripční regulaci, detoxikaci nebo opravu poškození rostliny. Pokud je stres vody postupně zaváděn do bramborových buněk, pak se slučují s aktivním buněčným růstem v důsledku obnovení syntézy proteinů, akumulaci prolinů a polyaminů a změnách v membránovém složení. Celá rostlina, na kterou působí stres, může být v in vitro podmínkách identifikována zjednodušenou buněčnou cestou, a to systémem

vybraných počtů genů v buňkách brambor reagujících na stres. Buňky brambor tedy reagují na nedostatek vody podle intenzity a trvání omezení množství vody v rostlině. (Ambrosone et al., 2017) Dlouhotrvající stres způsobuje tmavnutí listů a zvlnění kvůli ztrátě vnitřního tlaku vody v rostlinných buňkách. (Chang et al., 2018)

#### **4.2.5 Prolin jakožto užitečný indikátor u rostlin při stresu suchem**

Reakce na vodní stres se liší dle typu rostlin. Hlavní první reakcí na deficit vody u všech rostlin jsou osmotické úpravy v rostlině. Kompatibilní akumulace rozpoznávaných látek v cytoplasmě je považována za mechanismus přispívající ke stresové toleranci. Aby byly potlačeny abiotické stresy u rostliny, tak roste rostlinám osmotický potenciál jejich buněk shromážděním kompatibilního osmolytu, jako je například prolin. (Jaleel et al., 2007)

Akumulace prolinu je jednou z hlavních úprav na salinitu a deficit vody. Vysoká úroveň prolinu umožňuje rostlinám udržet nízký potenciál vody a umožňuje převzít dodatečné množství vody z prostředí, čímž se vyrovná okamžitý nedostatek vody v organismu. Prolin také funguje jako záchytka redoxních potenciálů, jako rozpouštědlo, které chrání makromolekuly proti denaturaci a snížení kyselosti v buňce a působí jako skladovací sloučenina a zdroj dusíku pro rychlý růst. (Kahlaoui et al., 2015) Prolin je důležitou látkou, která pomáhá rostlině zvládnout osmotický stres nebo stres způsobený suchem. Prolin chrání rostlinné buňky osmotickým nastavením nebo stabilizací membrán. Úroveň volného prolinu je regulována poměrem rychlosti jeho biosyntézy a degradace. (Sperdouli et Monstakas, 2012)

Nedostatek vody v listové tkáni také ovlivňuje fyziologické procesy v rostlině, a tím snižuje výnos. (Monreal et al., 2007) Listový sprej o nízké koncentraci prolinu může zvýšit toleranci kultivaru na slanost za polních podmínek. (Kahlaoui et al., 2015) Prolin je velmi užitečným indikátorem v kořenech rostlin. Indikuje situace, které mohou vést ke snížení výnosu a kvality kořene. Danou situací může být přebytek dusíku nebo právě stres způsobený suchem. Vysoká hladina dusíku totiž zvyšuje množství prolinu částečným zvýšením indexu listové plochy. Stres suchem a nadbytek dusíku vedou k mobilizaci uložených sacharidů a tím k dodání energie. (Monreal et al., 2007)

Stres suchem způsobí postupnou ztrátu vody a nárůst prolinu v rostlině o 10 % a také nárůst aktivity enzymu pyrrolin-5-karboxylát syntetasy. Akumulace volného prolinu je velmi známá metabolická reakce rostliny na stres suchem. Prolin je osmolyt, který umožňuje osmotické nastavení v rostlině, stabilizuje strukturu bílkovin a buněčných membrán, působí jako ochranná látka pro enzymy, ničí volné radikály a je také antioxidantem. Prolin může

také zajistit regulaci kyseliny citrónové a slouží jako rezerva pro uhlík a dusík po stresovém uklidnění a může působit jako signální molekula schopná aktivovat obranné reakce. Prolin, který se nahromadí při stresu suchem nebo prolin aplikovaný exogenně ovlivňuje odolnost proti stresu prostřednictvím zmírnění tkáňové dehydratace a ochrany buněčných membrán a enzymů ze škodlivého účinku dehydratace. Gen pyrrolin-5-karboxylát syntetasa, pyrrolin-5-karboxylát reduktasa a prolin dehydrogenasa regulují metabolismus prolinu. Jedna z reakcí na stres sucha je, že k poklesu dostupnosti vody v rostlině dochází při akumulaci prolinu. Prolin je nezbytný pro metabolismus a syntézu bílkovin a přispívá ke složení, struktuře a stabilitě bílkovin. (Bandurska et al., 2017) Prolin hromadící se při stresu suchu může rostlině pomoci se přizpůsobit osmotickému stresu. MikroRNA (MirRNA) jsou malé endogenní RNA, které jsou důležité při vývoji rostlin a reakce rostliny na stres tím, že negativně ovlivňují expresi genu po transkripci a při posttranskripčních úpravách. MirRNA je známé tím, že regulují prolin akumulací v rostlině. V rostlinách se MirRNA váží na mRNA s téměř dokonalou komplementaritou. (Yang et al., 2013)

#### **Shrnutí funkcí prolinu:**

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



- Další funkcí prolinu je to, že 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,
- Prolin inhibuje buněčnou smrt podobnou apoptóze. (Hossian et al., 2014)

## 4.2.6 Regulátory růstu rostlin

### 4.2.6.1 Paclobutrazol

Paclobutrazol [(2RS,3RS)-1-(4-chlorophenyl-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pentan-3-ol)] je sloučenina, která pomáhá rostlině, když je vystavena solnému prostředí nebo nedostatku vody, díky snížení organické sloučeniny Malondialdehydu ((CHO)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) a únikem elektrolytu. Tím vyvolá zvýšení množství vody, prolinu a antioxidantu v rostlině. (Junglkang e al., 2017) PBZ patří do skupiny triazolových sloučenin a mezi regulátory růstu. Většinou se aplikuje přímo do půdy, kde může zůstat aktivní. Ovlivňuje růst a vývoj následných plodin a také mikrobiální aktivitu. (Liu et al., 2016) Zabraňuje růstu rostlin inhibicí sterolu a hormonu gibberellinu. Ovlivňuje také vývoj změny rychlosti fotosyntézy a modifikace rostliny. (Kuai et al., 2015)

### 4.2.6.2 Brassinosteroidy

Brassinosteroidy jsou nové přírodní rostlinné hormony všudypřítomné v rostlinách a hrají důležitou klíčovou roli při regulaci vývoje rostlin, růstu a odolnosti vůči různým enviromentálním stresům. (Gao et al., 2016) Jsou třídou polyhydroxylovaných steroidních rostlinných hormonů. Jsou zapojeny do fyziologických, biochemických a molekulárních reakcí v rostlinách jako je klíčivost semen, rozdělení a prodloužení buněk, vaskulární diferenciaci, fotomorfogeneze, fotosyntéza, aktivace enzymů a stárnutí. BR také zvyšují výnos u některých obilnin, luštěnin a olejnin. Jsou nezbytné pro normální růst a vývoj rostlin. Účinnost BR na růst rostlin a jejich výnos je pouze při použití nízkých dávek. BR se vyskytují téměř ve všech částech rostlin (pyl, květní pupeny, plody, semena, vaskulární kambia, listy, výhonky a kořeny). Tyto steroidní sloučeniny se vyskytují ve volné formě a konjugují se z cukrů a mastných kyselin. Jsou také přítomny v hmyzu a v korunách stromů. (Ali, 2017)

### 4.2.6.3 Cytokininy

Jsou hlavní třídou rostlinných hormonů, které ovlivňují růst a rozvoj rostlin. Modulace CK homeostázy nebo její signalizace může potencionálně ovlivnit přizpůsobení rostlin stresům a pomoci tak zvýšení výnosů rostlin. CK regulují růst a vývoj rostlin prostřednictvím komplexu sítě signalizace a prostřednictvím interakce s dalšími rostlinnými hormony (auxin, ethylen, gibberellin, kyselina abscisová). (Li et al., 2015b) CK tolerance ke stresu by mohla být použita ve dvou hlavních přístupech. První je založen na zvýšené koncentraci CK. To podporuje aklimatizaci rostlin a míru přežití a minimalizuje ztráty na výnosu. Druhý přístup snižuje obsah CK v kořenech nadprodukcí CK degradačních enzymů, což vede ke změně morfologie kořene nebo ke zvýšení kořenové biomasy. (Pospíšilová a kol., 2016)

### 4.2.7 Příprava na stres suchem

Příprava na sucho před stresem suchem může být pro rostlinu velmi přínosné, protože pomáhá rostlině zvýšit toleranci následných stresových stavů vyvoláním rychlejšího a silnějšího obranného mechanismu. Rostliny dokáží tolerovat stres suchem, pokud se jim vylepší listový vodní potenciál, obsah chlorofylu a obsah ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasy/oxygenasy. Zlepšená fotosyntéza, lepší fotoprotekce a účinný enzymatický, antioxidační systém vedou k menšímu snížení výnosu. Při silném stresu suchem nastává stomatální omezení, také špatná účinnost fotosystému II a pokles aktivity CO<sub>2</sub> asimilačních enzymů jako je ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa. Pokud nejsou oxidativní druhy kyslíku zničeny antioxidanty, pak může nastat oxidace proteinů, membránová lipidová peroxidace, inhibice DNA a RNA a hormonální aktivity, které způsobí, že u buňky nastane oxidativní stres, který brání růstu nebo může způsobit až smrt buňky. (Abid et al., 2016)

Pro přípravu sucha u rostliny můžou složit některé chemické indukce jako třeba oxid dusnatý, sirovodík, peroxid vodíku a kyselina β-aminomáselná. Rostliny, které jsou předem vystavené stresu životního prostředí, mohou využít potenciál pro rychlejší a silnější obranu na stres okolí. (Abid et al., 2016) Aby se rostliny vyrovnaly s nedostatkem vody, tak si vyvinuly sadu strategií. Jedná se o morfologické nebo fyziologické přizpůsobení biochemickým reakcím tak, aby lépe přežívaly stres v období sucha. (Shu-han et al., 2018)

### **Existují 4 hlavní mechanismy odolnosti na stres suchem u rostlin:**

1. vyhýbání se suchu,
2. tolerance na sucho,
3. únik sucha,
4. obnovení sucha

Vyhýbání se suchu se týká především schopnosti rostlin udržovat vysoký stav vody zvýšením příjmu vody nebo snížením ztráty vody v období sucha. Tolerancí sucha u rostlin se rozumí schopnost rostlin udržovat určitou úroveň fyziologické aktivity. Tolerance sucha je obvykle spojena s fyziologickými parametry týkající se osmotické úpravy. Jedná se o aminokyselinu prolin, obsahu rozpustného cukru a kyseliny abscisové a zmírnění škod způsobených suchem. Aby se snížil nepříznivý dopad stresu suchem na rostlinnou výrobu, bylo vymyšleno několik metod a technologií ke zvýšení odolnosti plodin na stres suchem. Suché vytvrzení je vhodnou a proveditelnou metodou, které zahrnuje vystavení rostlin suchým podmínkám (snížené zavlažování). (Shu-han et al., 2018)

### **4.2.8 Sekundární metabolity při reakci na stres suchem**

#### **4.2.8.1 Trichoderma**

Jedná se o houbu, která pochází buď z půdy, ze stromové kůry nebo z volné přírody. Je schopna zabít další houby a pronikat kořeny, a proto se používá jako biofungicid, a tak chrání rostliny proti patogenům. (Mendoza-Mendoza et al., 2017)

Trichoderma má potenciál vyvolat hostitelskou rostlinnou toleranci k některým biotickým a abiotickým stresům jako je právě sucho a salinita. Podílí na podpoře růstu kořenů, udržuje příjem živin a také spouští ochranné mechanismy k odvrácení oxidativního poškození a to tak, že podporuje aktivitu antioxidantních enzymů jako je superoxid dismutasa, katalasa a askorbát peroxidasa. (Alwhibi et al., 2017)

### **4.2.9 Techniky pro detekci stresu u rostlin**

Existují bezdotykové techniky založené na dálkovém snímání pro detekci stresu u rostlin. (Gerhards et al., 2016)

**Takovýmto zařízením může být:**

1. termografie,
2. UV/VIS (ultrafialová/viditelná spektroskopie),
3. NIR/SWIR (infračervená/krátkovlnná spektroskopie),
4. Fluorescence (Gerhards et al., 2016)

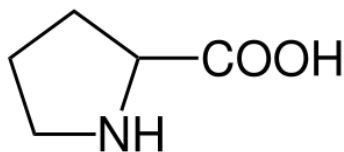
Stres z nedostatku vody je fenotypová charakteristika, která ukazuje na dehydrataci v rostlině. Stomatální vodivost rostlin je možno měřit porometrem, který měří koncentraci páry ve dvou různých hodnotách pomocí snímačů vlhkosti, ze které se pak vypočte transpirace listů. Stomatální regulace také závisí na meteorologickém stavu jako je sluneční záření, rychlost větru i teplota a tlak páry. Tlak páry, je rozdíl mezi skutečným množstvím vodní páry ve vzduchu a maximální množství vodní páry ve vzduchu pro danou teplotu, a proto také poskytuje schopnost transpirace listů. Čím je vyšší tlak páry, tím vyšší je transpirace listů u zdravé rostliny. Stomatální uzavření je jednou z prvních odpovědí k nedostatku vody u rostlin. Na detekci stresu u rostlin se dají také použít ruční širokopásmové infračervené kamery, jež jsou schopné zachytit teplotu a mohou odvodit spektrální emisivitu. Vodní napětí mění teplotu v listu, emisivitu a obsah vody v listu, obsah pigmentu i strukturu. (Gerhards et al., 2016)

## 4.3 Prolin

### 4.3.1 Úvod

Jedná se o aminokyselinu, u které se postranní řetězec váže k hlavnímu řetězci za vzniku pyrrolidinového kruhu. (Fujisawa et al., 2018)

Obr. 2 - Vzorec prolinu



<https://www.wikiskripta.eu/w/Prolin>

Prolin je zapojený do různých fyziologických procesů. Je to hlavní organický osmolyt hromadící se v různých druzích rostlin v reakci na environmentální napětí (sucho, slanost, extrémní teploty, UV záření nebo těžké kovy). Prolin ovlivňuje proliferaci buněk nebo buněčnou smrt a vyvolává specifické exprese genu, které mohou být nezbytné pro obnovu rostlin vystavených stresu z okolí. (Fujisawa et al., 2018)

### 4.3.2 Biochemie

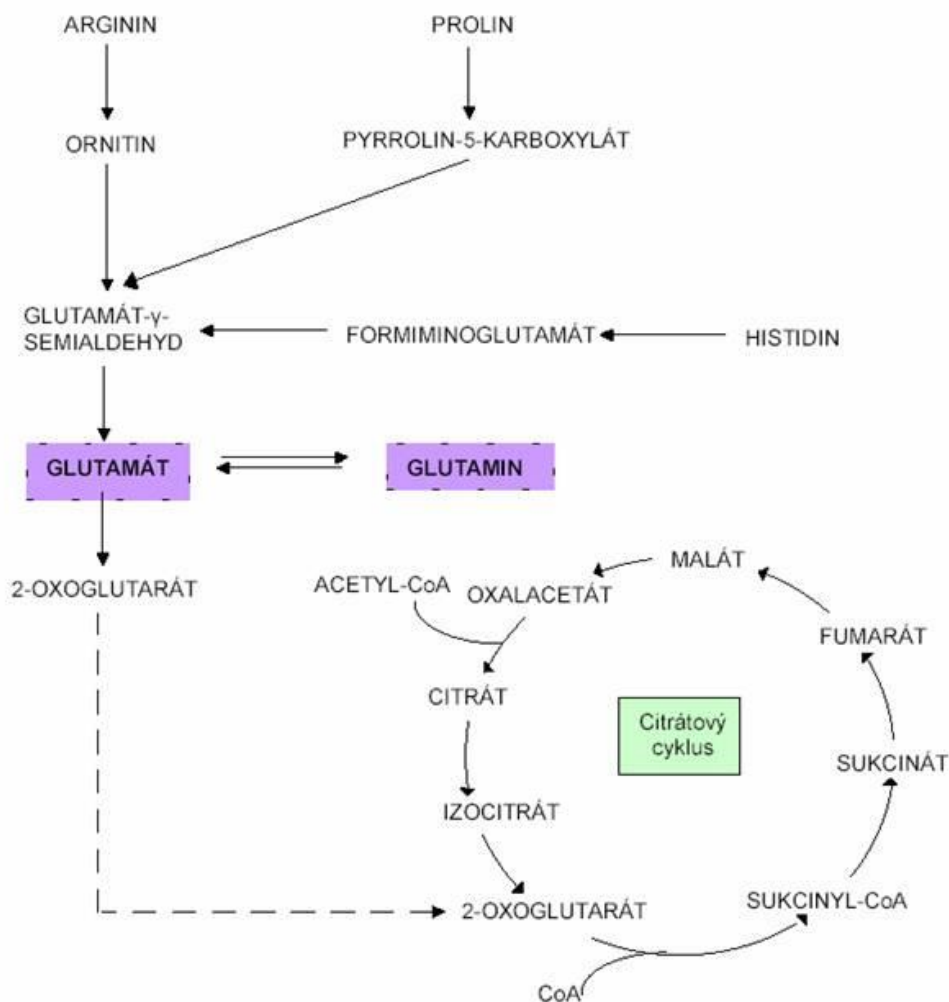
Prolinová katabolická dráha tvořená glutamátem umožňuje organismům využívat prolin jako zdroj uhlíku, dusíku a jako energetický zdroj. FAD dependentní prolin dehydrogenasa (PRODH) a  $\text{NAD}^+$  dependentní glutamát semialdehyd dehydrogenasa (GSALD) přeměňují prolin na glutamát ve dvou postupných 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. ubiquinon), 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- $\gamma$ -semialdehyd. Nakonec je L-glutamát- $\gamma$ -semialdehyd převeden na glutamát L-glutamát- $\gamma$ -semialdehyd dehydrogenasou přes  $\text{NAD}^+$ . (Liu et al., 2017)

### 4.3.3 Biosyntéza prolinu

#### 4.3.3.1 Glutamátová cesta

Jako prekurzor se používá glutamát. Vyžaduje 2 enzymy, a to  $\Delta^1$ -pyrrolin-5-karboxylát syntetasu (P5CS) a  $\Delta^1$ -pyrrolin-5-karboxylát reduktasu (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)

Obr. 3 - Schéma biosyntézy prolinu



<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/KPAAJ.htm>

#### 4.3.3.2 Ornitinová cesta

Jako prekurzor se používá Ornitin. Tato cesta prochází přes enzym ornithin- $\delta$ -aminotransferasu ( $\delta$ -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 prolin dehydrogenasa (PRODH) přemění prolin na pyrrolin-5-karboxylát (P5C) a enzym pyrrolin-5-karboxylát dehydrogenasa (P5CDH) mění P5C na glutamát. (Hossian et al., 2014) Za osmotických stresových podmínek převažuje glutamátová dráha. (Kahlaouli et al., 2015)

Důležitým enzymem u vyšších rostlin je glutamin syntetasa (GS), která se podílí na reasimilaci  $\text{NH}_4$ . Podílí se na asimilaci anorganického dusíku do organické formy a katalyzuje kondenzaci závislou na ATP a  $\text{NH}_4$  s glutamátem za vzniku glutaminu, který pak poskytuje dusíkatou skupinu. Glutamin syntetasa se v rostlinách vyskytuje ve 2 formách. První izoenzym je lokalizován v plastidách a druhý v cytosolu. (Kahlaouli et al., 2015)

##### Označení použitých enzymů:

1. Prolin dehydrogenasa (PRODH): EC 1.5.5.2
2. Glutamát semialdehyd dehydrogenasa (GSALD): EC 1.2.1.88
3. Pyrrolin-5-karboxylát syntetasa (P5CS): EC 2.7.2.11
4. Pyrrolin-5-karboxylát reduktasa (P5CR): EC 1.5.1.2
5. Ornithin-  $\delta$ -aminotransferasa ( $\delta$ -OAT): EC 2.6.1.13
6. Pyrrolin-5-karboxylát dehydrogenasa (P5CDH): EC 1.5.1.12 – v roce 2013 byl enzym smazán a pojmenován jako L-glutamát- $\gamma$ -semialdehyd dehydrogenasa
7. Glutamin syntetasa (GS): EC 6.3.1.2

## **4.4 Stanovení prolinu**

### **4.4.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie**

Je to nejrozšířenější metoda používaná pro většinu analytických separačních technik. Můžeme zde měřit aminokyseliny, proteiny, nukleové kyseliny, hydrokarbonáty, karbohydráty, terpenoidy, pesticidy, antibiotika, drogy, steroidy, organické druhy kovů a různé druhy anorganických substancí. V moderní kapalinové chromatografii se dosahuje přiměřený průtok eluentu s obalem o velikosti částic 2-10  $\mu\text{m}$ . (Skoog et al., 1998)

#### **4.4.1.1 Vybavení**

##### **4.4.1.1.1 Nádrže mobilní fáze**

Moderní HPLC je vybaveno jedním či více nerezových rezervoárů a každý z nich obsahuje 200-1000 ml roztoku. Rezervoáry jsou často vybaveny prostředkem pro odstraňování plynů (kyslíku a dusíku). Ty interferují vytváření bublin v koloně a v detekčním systému, protože bubliny mohou narušovat výkon detektoru. Jako jediné rozpouštědlo se používá anorganická eluce, což je jediné rozpouštědlo s konstantním složením. Jako mobilní fázi můžeme použít roztok methanolu a vody (50:50). (Skoog et al., 1998)

##### **4.4.1.1.2 Čerpací systém**

Zahrnuje generátor tlaků, pulzní výstup, průtok v rozmezí 0,1-10 ml/min., řízenost a reprodukovatelnost toku a korozivzdorné součásti. (Skoog et al., 1998)

- reciproční čerpadlo – je nejpoužívanější,
- posuvné čerpadlo,
- pneumatické čerpadlo (Skoog et al., 1998)

##### **4.4.1.1.3 Systém vstřikování vzorků**

Použité objemy jsou malé (několik desetin  $\mu\text{l}$  až 500  $\mu\text{l}$ ). Nejrozšířenější metoda měření vzorků je založená na vzorkovacích smyčkách. (Skoog et al., 1998)



#### 4.4.1.1.4 Kapalinové chromatografické sloupce

Jsou obvykle konstruovány z trubek z nerezové oceli. Jsou dlouhé 10-30 cm. Často bývají spárovány dvěma a více sloupci dohromady. Vnitřní průměr je 4-10 mm a nejběžnější velikost částic obalů je 5-10  $\mu\text{l}$ . Můžou být buď stínící sloupce nebo sloupcové termostaty. (Skoog et al., 1998)

#### 4.4.1.1.5 Kolony

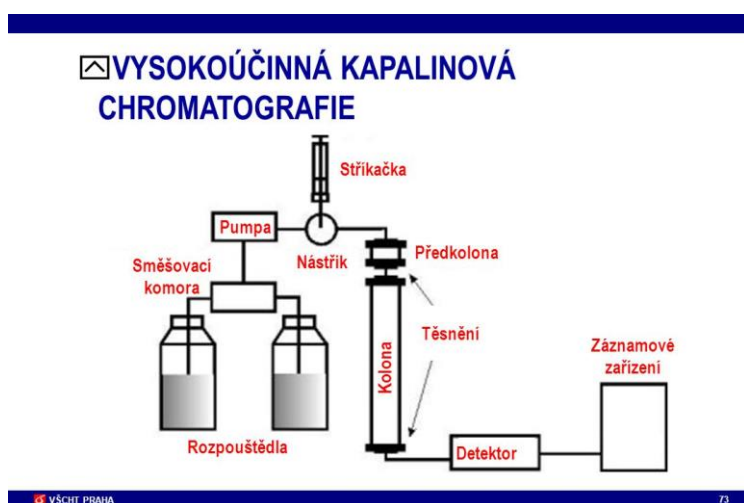
- **pelikulární** se skládají ze sférických, neporézních, skleněných nebo polymerních kuliček s typickým průměrem 30-40  $\mu\text{m}$ ,
- **porézní** se skládají z porézních mikročástic vyskytujících se v rozmezí 3-10  $\mu\text{m}$  (Skoog et al., 1998)

#### 4.4.1.1.6 Detektor

- hromadné detektory vlastností, které reagují na vlastnosti volné mobilní fáze,
- detekce vlastností rozpuštěné látky reagující na určité vlastnosti rozpuštěných látek (Skoog et al., 1998)

Absorpční detektory mají omezený objem 1-10  $\mu\text{l}$ . (Skoog et al., 1998)

Obr. 4 - Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie



<http://slideplayer.cz/slide/3160943/>

#### 4.4.2 Kapilární elektroforéza

Je to separační metoda založená na diferenciální rychlosti migrace nabitých druhů látek v pufrovém roztoku, na které bylo aplikované stejnosměrné elektrické pole. Přináší vysokorychlostní separaci s vysokým rozlišením a malých objemech vzorků. (Skoog et al., 1998)

##### Elektroosmotický průtok

Když je vysoká účinnost aplikována přes kapilární trubici obsahující pufrovací roztok, obvykle dochází k elektroosmotickému toku, ve kterém migruje rozpouštědlo směrem ke katodě nebo anodě. Příčinou elektroosmotického toku je elektrická dvojvrstva, která se vyvíjí na rozhraní oxidu křemičitého/roztoku. Nad hodnotu pH 3 je vnitřní stěna kapiláry oxidu křemičitého negativně nabitá ionizací povrchových silanových skupin (Si-OH). Pufrové kationty se shromažďují v elektrické dvojvrstvě přiléhající k negativnímu povrchu silikonové kapiláry. (Skoog et al., 1998)

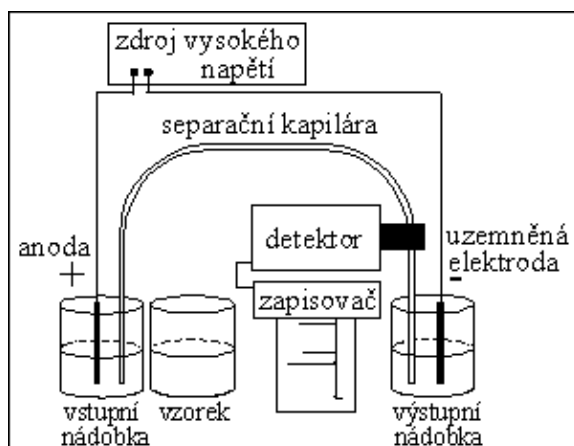
##### 4.4.2.1 Přístrojové vybavení pro kapilární elektroforézu

Kapilára z taveného oxidu křemičitého naplněná pufrem, vnitřní průměr je 10-100  $\mu\text{m}$ , délka 40-100 cm. Rozkládá se mezi dvěma vyrovnávacími zásobníky, které drží platinovou elektrodu. Zavádění vzorku probíhá na jednom konci a detekce na druhém. Objem kapiláry je 4-5  $\mu\text{l}$ , nasátí a detekce musí být ale menší než tento objem. (Skoog et al., 1998)

###### 4.4.2.1.1 Vstřikování vzorku

- **elektrokinetické vstřikování:** ponoří se jeden konec kapiláry a elektrody do zkoumaného vzorku, tím vzorek vstoupí do kapiláry. Kapilární konec a elektroda se potom umístí zpět do pufrovacího roztoku po dobu separace,
- **tlakové vstřikování:** koncovka kapiláry se zavede do vzorku a tlakový rozdíl se pak použije pro přivedení roztoku vzorku do kapiláry (Skoog et al., 1998)

Obr. 5 - Schéma kapilární elektroforézy



<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html>

#### 4.4.3 Ultrafialová, viditelná adsorpční spektroskopie

Spektrální rozsah zájmů lze rozdělit do tří rozsahů. Blízké UV záření v rozsahu 185-400 nm, viditelné záření v rozsahu 400-700 nm a části infračerveného záření v rozsahu 700-1100 nm. Tyto přístroje umožňují získat spektrum absorbancí jako funkci vlnové délky. Vlnová délka je vyjadřována v nanometrech (nm). (Rouessac et Rouessac, 2000)

##### 4.4.3.1 Ultrafialová, viditelná spektrofotometrie

Zahrnuje 3 komponenty: zdroj, disperzní systém a detektor. (Rouessac et Rouessac, 2000)

###### 4.4.3.1.1 Zdroje světla

- **Žárovka:** je vyrobená z wolframového vlákna uloženého ve skleněné obálce. Ta se používá pro viditelnou část spektra nad 350 nm,
- **Deuteriová oblouková lampa:** má 2 elektrody ponořené v atmosféře deuteria. Pod proudem elektronů se molekuly deuteria disociují a vyzařují fotony v rozmezí 160-400 nm. (Rouessac et Rouessac, 2000)

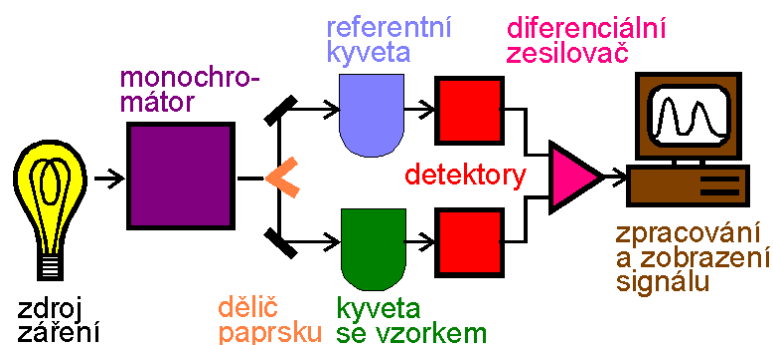
#### 4.4.3.1.2 Disperzní systém a monochromátory

Světlo vyzařované zdrojem je zde rozptýleno rovinnou nebo konkávní mřížkou. Pro skenovací spektrofotometry je mřížka integrována do sestavy nazývané monochromátor. (Rouessac et Rouessac, 2000)

#### 4.4.3.1.3 Detektor

Měří vlnový signál při dané vlnové délce. Použití velkého počtu detektorů ve formátu diodového pole dovolí stimulovat vícekanálovou detekci. Existují 2 typy detektorů, a to fotonásobící trubice, což je velmi citlivé zařízení (nejpoužívanější) a polovodiče. (Rouessac et Rouessac, 2000)

Obr. 6 - Schéma ultrafialové, viditelné spektrofotometrie



<http://docplayer.cz/38655488-6-metody-molekulove-spektroskopie-spektrofotometrie-luminiscencni-metody.html>

## **5 Experimentální část**

V experimentální části jsem si zkusila naměřit pár výsledků a seznámit se s metodikou.

### **5.1 Vlastní stanovení**

#### **5.1.1 Použité odrůdy brambor**

##### **5.1.1.1 Laura**

Jedná se o poloranou odrůdu, která je určená 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).

##### **5.1.1.2 Milva**

Je to rovněž poloraná odrůda určená pro přímý konzum, varného typu AB. Dužnina je žlutá a hlízy krátce oválné. Výnos tržních hlíz je velmi vysoký a hlízy obvykle netmavnou po uvaření. Tato odrůda je náchylnější k napadení virovými chorobami (Čermák, 2015).

##### **5.1.1.3 Marabel**

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

##### **5.1.1.4 Valfi**

Jedná se o poloranou až polopozdní odrůdu s delší vegetační dobou, s modrofialově zbarvenou slupkou a modrofialově mramorovanou dužninou, s nižším výnosem středně velkých hlíz. Zabarvení hlíz pozitivně ovlivňuje teplota v průběhu pěstování, a proto lze předpokládat intenzivnější zabarvení při pěstování v přirozeně teplejších oblastech a na lehčích půdách (Domkářová et al., 2006). (Domkářová et al., 2006).

### **5.1.2 Příprava brambor**

Aby bylo možné provést stanovení, tak jsem všechny 4 odrůdy brambor rozmixovala v mixéru. Navázila jsem 0,5 g bramborové hlízy od každé brambory. Přidala k ní 5 ml extrakční směsi (methanol : voda) v poměru 1 : 1. Poté jsem směs třepala 30 minut na třepačce. Po třepání jsem dala vzorky odstředit na 5 minut do odstředivky. Supertant (tekutina nad sedimentem) jsem naředila 100x demineralizovanou vodou a vzorky poté přefiltrovala přes nylonový mikrofiltr.

### **5.1.3 Příprava kalibrační křivky**

Připravila jsem si 1mM prolinu v destilované vodě (0,0115 g prolinu do 100 ml odměrné baňky). Do 8 zkumavek jsem napipetovala roztok prolinu o objemech 0; 20; 50; 75; 100; 150; 200 a 250  $\mu$ l a přidala jsem demineralizovanou vodu do celkového objemu 1 ml.

### **5.1.4 Příprava ninhydrinu**

Navázila jsem si 1,25 g ninhydrinu a přidala k němu 30 ml kyseliny octové a 7,5 ml kyseliny orthofosforečné a doplnila demineralizovanou vodou do objemu 50 ml. Poté jsem roztok dala na chvíli do ultrazvuku, abych urychlila rozpouštění.

### **5.1.5 Pracovní postup přípravy vzorku**

Do 8 zkumavek jsem napipetovala 1 ml vzorku, 1 ml ninhydrinu a 1 ml kyseliny octové. Pro kontrolu jsem si připravila dvě opakování. Stejným způsobem jsem si připravila i kalibrační roztoky. Zkumavky jsem uzavřela a nechala je míchat na třepačce asi 15 minut. Poté jsem vzorky vařila při teplotě 80-90 °C 30 minut (růžové zbarvení). Do vychlazených zkumavek jsem poté přidala 3 ml toluenu a nechala třepat opět 15 minut. Po důkladném protřepání jsem čekala asi 20 minut na oddělení fází vzorků.

### **5.1.6 Samotné měření na spektrofotometru**

#### **5.1.6.1 Princip**

Prolin tvoří s ninhydrinem barevný komplex, jehož absorpční maximum je při vlnové délce 520 nm.

### 5.1.6.2 Postup

Na spektrofotometru jsem si změřila vodní blank z nulového pokusu, který mi vyšel 0 a poté jsem si změřila kalibraci. Když mi kalibrace vyšla, tak jsem si změřila jednotlivé vzorky při 520 nm.

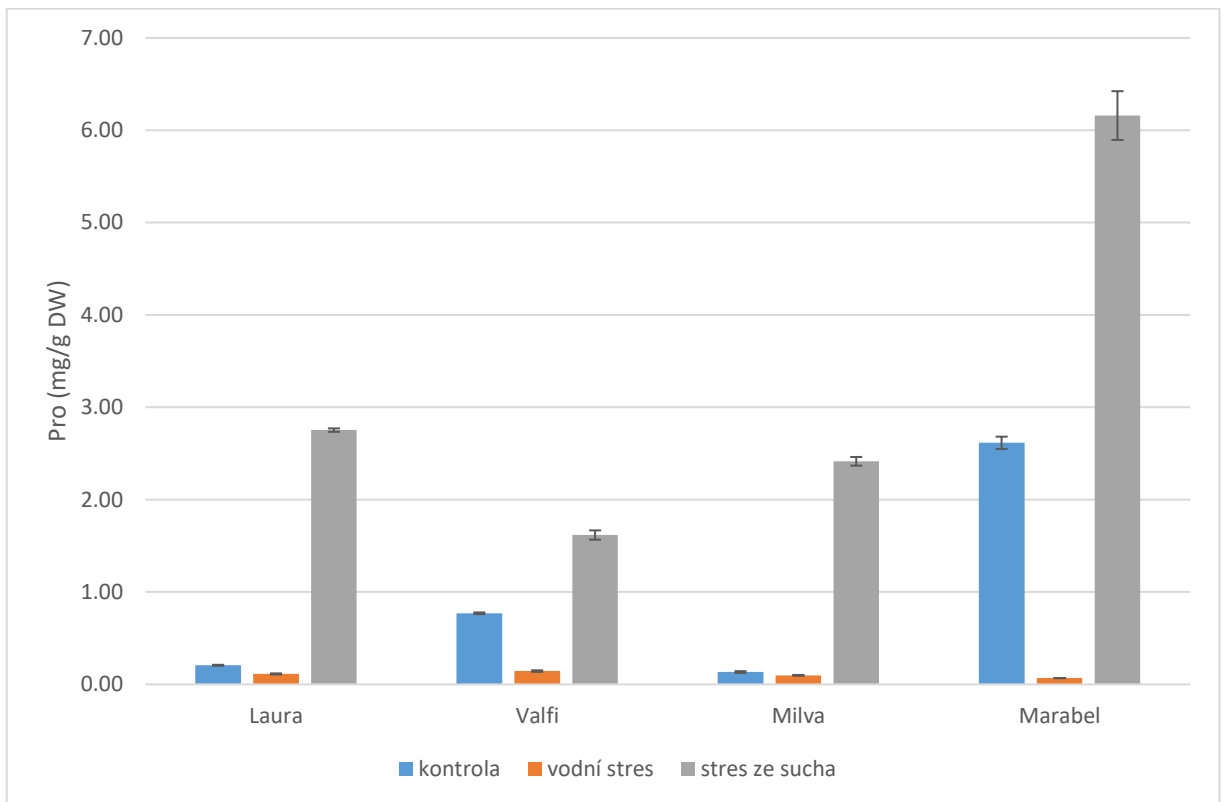
### 5.1.7 Samotné měření na kapalinovém chromatografu s hmotnostním detektorem

Separace prolinu byla docílena pomocí ion-párové chromatografie. Jako ion-párové činidlo byla do mobilní fáze přidána heptafluoromáselná kyselina. Vzorky se v přístroji měřily 15 minut a poté byla sestavena osmibodová kalibrace v rozmezí koncentrací 0,00025-0,05  $\mu\text{M}/1\text{ ml}$ . Mez detekce pro prolin je 7 ng/ml.

Tabulka 1- výsledky měření na LC-MS v mg/g DW

ODRŮDA	KONTROLA	VODNÍ STRES	STRES ZE SUCHA	PRŮMĚR HODNOT			SD		
	[K]	[VS]	[SZS]	[K]	[VS]	[SZS]	[K]	[VS]	[SZS]
LAURA	0,21	0,11	2,77						
LAURA	0,21	0,12	2,75	0,21	0,11	2,75	0,01	0,01	0,02
LAURA	0,2	0,11	2,74						
VALFI	0,78	0,14	1,56						
VALFI	0,77	0,14	1,65	0,77	0,14	1,62	0,01	0,01	0,05
VALFI	0,76	0,15	1,65						
MILVA	0,14	0,1	2,43						
MILVA	0,12	0,1	2,36	0,13	0,1	2,42	0,01	0	0,05
MILVA	0,13	0,09	2,45						
MIRABEL	2,61	0,07	6,22						
MIRABEL	2,55	0,07	6,39	2,62	0,07	6,16	0,07	0	0,26
MIRABEL	2,68	0,07	5,87						

Graf 1- výsledky měření na LC-MS





## 6 Přílohy

Tabulka 2 – Detekční parametry aminokyselin

Sloučenina	t <sub>R</sub> [min]	[M+H] <sup>+</sup> [m/z]	Produkty iontů* [m/z]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]	LOD [ng/ml]
Asparagin	3.40	133.0	116.0 (Q) 87.0 (C)	30.0	7.0	10.0	2.5	33
Hydroxyprolin	3.45	132.2	86.1 (Q) 68.1 (C)	27.0	3.6	20.0	2.3	12
Glutamin	3.57	147.0	84.1 (Q) 130.1 (C)	18.0	3.0	24.0	2.3	12
Serin	3.59	106.2	60.1 (Q) 88.3 (C)	35.0	8.0	15.0	2.0	13
Glycin	3.62	76.0	76.0 (Q)	25.0	4.0	5.0	2.0	38
Kyselina asparagová	3.76	134.1	88.1 (Q) 74.1 (C)	35.0	7.0	14.0	2.5	11
Kyselina glutamová	4.13	148.1	130.1 (Q) 102.0 (C)	15.0	6.0	15.0	2.0	18
Alanin	4.37	90.0	44.0 (Q)	25.0	4.0	16.0	2.5	12
Cystein	4.62	122.0	59 (Q) 76 (C)	18.0	3.6	32.0	2.0	60
<b>Prolin</b>	<b>4.67</b>	<b>116.1</b>	<b>70.0 (Q)</b>	<b>25.0</b>	<b>4.3</b>	<b>20.0</b>	<b>2.2</b>	<b>7</b>
Valin	7.66	118.1	72.2 (Q) 55.0 (C)	30.0	9.0	30.0	2.2	10
Tyrosin	8.02	182.1	136.1 (Q) 165.0 (C)	18.0	4.0	17.0	2.4	22
Methionin	8.08	150.1	133.0 (Q) 56.0 (C)	15.0	4.0	14.0	2.0	18
Histidin	8.31	156.1	110.2 (Q)	35.0	9.0	19.0	2.0	19
Lysin	8.47	147.3	84.3 (Q) 130.1 (C)	35.0	8.0	23.0	2.5	35
Arginin	9.02	175.2	70.2 (Q) 116.1 (C)	35.0	9.0	40.0	2.5	23
Isoleucin	9.80	132.0	86.0 (Q) 91.0 (C)	20.0	4.0	18.0	2.3	20
Leucin	10.20	132.2	86.2 (Q)	30.0	8.0	14.0	2.5	20
Threonin	10.63	120.1	103.1 (Q) 77.1, 91.1 (C)	35.0	7.0	13.0	2.0	17
Fenylalanin	10.65	166.0	120.0 (Q) 103.0 (C)	20.0	3.0	20.0	2.2	14
Tryptofan	11.26	205.0	188.0 (Q) 146.0 (C)	18.0	3.0	14.0	2.8	13

## 7 Použité zkratky

\*(C) = přechod používaný k potvrzení totožnosti

\*(Q) = přechod pro kvantifikaci

[K] = kontrola

[M+H]<sup>+</sup> = parametry detektoru

[m/z] = hmotnost iontu/náboj iontu

[SZS] = stres ze sucha

[VS] = vodní stres

ATP = adenosintrifosfát

BR = Brassinosteroidy

CE = kolizní energie

CK = cytokinin

CXP = výstupní potenciál z cely

DP = deklasterační potenciál (potenciál vyloučení)

DW = sušina

EP = vstupní potenciál do cely

FAD = koenzym flavinadenindinukleotid

GS = enzym glutamin syntetasa

GSALDH = enzym glutamát semialdehyd dehydrogenasa

LC-MS = kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem

LOD = mez detekce

NAD<sup>+</sup> = oxidovaná forma koenzymu nikotinamidadenindinukleotidu

NADP<sup>+</sup> = oxidovaná forma koenzymu nikotinadenindinukleotidfosfátu

NADPH = redukční činidlo koenzymu nikotinadenindinukleotidfosfátu

P5C = enzym pyrrolin-5-karboxylát

P5CDH = enzym pyrrolin-5-karboxylát dehydrogenasa

P5CR = enzym pyrrolin-5-karboxylát reduktasa

P5CS = enzym pyrrolin-5-karboxylát syntetasa

PBZ = paclobutrazol

PRODH = enzym prolin dehydrogenasa

ROS = reaktivní druhy kyslíku

SD = směrodatná odchylka

t<sub>R</sub> = retenční čas

UV/VIS = ultrafialová, viditelná spektrofotometrie

## 8 Souhrn

V této práci jsem se zabývala působením stresu suchem na obsahové látky brambor, hlízy brambor a brambory samotné. Popsala jsem brambory z jejich morfologické části i z jejich vnitřního obsahového složení. Poukázala jsem na to, co u brambor může způsobit stres suchem, který je často doprovázen slaností půdy. U takto vystresované plodiny se častěji vyskytují škůdci, a tím dojde k onemocnění plodiny, což souvisí s nižšími výnosy. Brambory by se měly pěstovat při teplotě 21-24 °C, půda by měla být provzdušněná a měl by v ní být dostatek vody, aby se rostlina vyhnula těmto abiotickým stresům.

Jako další jsem se věnovala aminokyselině prolin, která právě v tomto náročném období pomáhá bramborám, a to především díky její akumulaci uvnitř plodiny. Tím zvýší schopnost rostliny odolat buněčné dehydrataci a buňky před oxidačním poškozením. Ovlivňuje také bujení buněk a buněčnou smrt a dokáže vyvolat expresi genu nezbytnou pro obnovu rostliny před stresem a růst rostliny. Vyjmenovala jsem tři regulátory růstu, které dokáží rostlině pomoci při stresu suchem a ovlivňují její růst a vývoj. Jedná se o PBZ, který se dá aplikovat přímo do půdy, BR, které jsou již v rostlinách přítomny a CK, což jsou rostlinné hormony. Vypsala jsem také možné bezdotykové techniky pro detekci stresu u rostlin založené na dálkovém snímání. Jsou to ultrafialová/viditelná spektroskopie, infračervená/krátkovlnná spektroskopie, termografie a fluorescence. V práci jsou také zaznamenané způsoby přípravy na stres suchem, které by plodině mohly pomoci zvýšit toleranci následných stresových stavů vyvoláním rychlejšího a silnějšího obranného systému. Jako příprava na sucho u rostliny může sloužit například  $N_2O$ ,  $H_2S$ ,  $H_2O_2$  nebo kyselina  $\beta$ -aminomáselná.

Prolinu jsem se věnovala i z jeho biochemické stránky, a to především, jak působí na rostlinu a co se v ní po chemické stránce děje. Stručně jsem popsala 2 biochemické dráhy prolinu, a to glutamátovou a ornitinovou cestu.

Ve své práci jsem také zmínila a popsala 3 hlavní metody pro stanovení prolinu v laboratoři a jejich bližší charakteristiku. Jedná se o kapalinovou chromatografii, ultrafialovou, viditelnou spektrofotometrii a kapilární elektroforézu.

Na konci práce v experimentální části jsem si dovolila vypsát i pár výsledků z měření na kapalinovém chromatografu s hmotnostním detektorem.

## 9 Seznam použité literatury

Abid, M., Tian, Z., Karim, S. T. A. U., Liu, Y., Cui, Y., Zahoor, R., Jiang, D., Dai, T. Improved tolerance to post-anthesis drought stress by pre-drought priming at vegetative stages in drought-tolerant and -sensitive wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*. [online]. 2016. 106. p. 218-219. [cit. 2017-07-23]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.003>>.

Ali, B. Practical applications of brassinosteroids in horticulture-Some fields perspectives. *Scientia Horticulturae*. [online]. 2017. 225. p. 15-16. [cit. 2017-09-28]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.051>>.

Alwhibi, M. S., Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Soliman, D. W. K., Wirth, S., Egamberdieva, D. Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *Journal of Integrative Agriculture*. [online]. 2017. 16 (8). p. 1751-1752. [cit. 2017-12-06]. Dostupné z <[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61695-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61695-2)>.

Ambrosone, A., Batelli, G., Bostan, H., D'Agostino, N., Chiusano, M. L., Perrotta, G., Leone, A., Grillo, S., Costa, A. Distinct gene networks drive differential response to abrupt or gradual water deficit in potato. *Gene*. [online]. 2017. 597. p. 30-31. [2017-07-29]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.024>>.

Bandurska, H., Niedziela, J., Pietrowska-Borek, M., Nuc, K., Chadzinikolaou, T., Radzikowska, D. Regulation of proline biosynthesis and resistance to drought stress in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes of different origin. *Plant Physiology and Biochemistry*. [online]. 2017. 118. p. 427. [2017-12-06]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.006>>.

Banik, P., Zeng, W., Tai, H., Bizimungu, B., Tanino, K. Effects of drought acclimation on drought stress resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes. *Environmental and Experimental Botany*. [online]. 2016. 126. p. 76-77. [2017-07-29]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.01.008>>.

Barbieri, G., Bottino, A., Stasio, E. D., Vallone, S., Maggio, A. Proline and light as quality enhancers of rocket (*Eruca sativa* Miller) grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae*. [online]. 2011. 128 (4). p. 393-394. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.02.010>>.

Čermák, V. 2015. Seznam doporučených odrůd bramboru 2015. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Brno. ISBN: 978-80-7401-072-9.

Domkářová, J., Teplíková, J., Vokál, B. 2006. Modrofialové brambory zpestří jídelníček. *Zahrádkář*. 38 (2). 19.

Fard, E. M., Bakhshi, B., Keshavarznia, R., Nikpay, N., Shahbazi, M., Salekdeh, G. H. Drought responsive microRNA in two barley cultivars differing in their level of sensitivity to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. [online]. 2017. 118. p. 121. [cit. 2017-07-18]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.007>>.

Fujisawa, I., Kitamura, Y., Kato, R., Aoki, K. 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*. [online]. 2018. p. 2-3. [cit. 2018-02-18]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.02.047>>.

Gao, H., Zhang, Z., Lv, X., Cheng, N., Peng, B., Cao, W. Effect of 24-epibrassinolide on chilling injury of peach fruit in relation to phenolic and proline metabolisms. *Postharvest Biology and Technology*. [online]. 2016. 111. p. 390. [cit. 2017-03-04]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.031>>.

Gerhards, M., Rock, G., Schlerf, M., Udelhoven, T. Water stress detection in potato plants using leaf temperature, emissivity, and reflectance. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*. [online]. 2016. 53. p. 27-28. [cit. 2017-07-29]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.jag.2016.08.004>>.

Helaly, M. N., Hoseiny, H. E., Sheery, N. I. E., Rastogi, A., Kalaji, H. M. Regulation and physiological role of silicon alleviating drought stress of mango. *Plant Physiology and*

Biochemistry. [online]. 2017. 118. p. 32. [cit. 2017-07-18]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.05.021>>.

Heuer, B., Nadler, A. Physiological response of potato plants to soil salinity and water deficit. Plant Science. [online]. 1998. 137 (1). p. 43. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z <[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00133-2)>.

Hossain, M. A., Hoque, M. A., Burritt, D. J., Fujita, M. Proline protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanism. Academic Press. [online]. 2014. p. 477-478, 480, 482-484, 486-490, 493. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00016-2>>.

Cha-um, S., Kirdmance, Ch. Proline Accumulation, Photosynthetic Abilities and Growth Characters of Sugarcane (*Sacharum officinarum* L.). Plantlets in Response to Iso-Osmotic Salt and Water-Deficit Stress. Agricultural Sciences in China. [online]. 2009. 8 (1). p. 51-52 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z <[https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60008-0](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60008-0)>.

Chang, D. Ch., Jin, Y. I., Nam, J. H., Cheon, Ch. G., Cho, J. H., Kim, S. J., Yu, H. S. Early drought effects on canopy development and tuber growth of potato cultivars with different maturities. Field Crops Research. [online]. 2018. 215. p. 157. [2018-02-12]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.10.008>>.

Cho, K. S., Han, E. H., Kwak, S. S., Cho, J. H., Im, J. S., Hong, S. Y., Sohn, H. B., Kim, Y. H., Lee, S. W. Expressing the sweet potato orange gene in transgenic potato improves drought tolerance and marketable tuber production. Comptes Rendus Biologies. [online]. 2016. 339 (5/6). p. 208. [cit. 2017-07-29]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.04.010>>.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R., Panneerselvam, R. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. [online]. 2007. 60 (1). p. 110-111. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.06.006>>.

Junglkang, J., Saengnil, K., Uthaibutra, J. Effects of water-deficit stress and paclobutrazol on growth, relative water content, electrolyte leakage, proline content and some antioxidant changes in *Curcuma alismatifolia* Gagnep. cv. Chiang Mai Pink. Saudi Journal of Biological Sciences. [online]. 2017. 24 (7). p. 1506. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.017>>.

Kahlaouli, B., Hachicha, M., Misle, E., Fidalgo, F., Teixeira, J. 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. [online]. 2016. p. 1-2. [cit. 2017-07-14]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.12.002>>.

Kuai, J., Yang, Y., Sun, Y., Zhou, G., Zuo, Q., Wu, J., Ling, X. Paclobutrazol increases canola seed yield by enhancing lodging and pod shatter resistance in *Brassica napus* L. Field Crops Research. [online]. 2015. 180. p. 2. [cit. 2017-07-15]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.05.004>>.

Levy, D., Tai, G. C. C. Differential response of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to salinity in an arid environment and field performance of the seed tubers grown with fresh water in the following season. Agricultural Water Management. [online]. 2013. 116 (1). p. 122. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2012.06.022>>.

Li, J., Cang, Z., Jiao, F., Bai, X., Zhang, D., Zhai, R. Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potatoe at seedling stage. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. [online]. 2015a. 16 (1). p. 82-83. [cit. 2017-07-29]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.03.001>>.

Li, Y. J., Wang, B., Doug, R. R., Hou, B. K. *AtUGT76C2*, an *Arabidopsis* cytokinin glycosyl transferase is involved in drought stress adaptation. Plant Science. [online]. 2015b. 236. p. 157. [2018-02-11]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.04.002>>.

Liu, L. K., Becker, D. F., Tanner, J. J. Structure, function, and mechanism of proline utilization A (PutA). Archives of Biochemistry and Biophysics. [online]. 2017. 632. p. 142-143. [cit. 2017-12-06]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.07.005>>.

Liu, Z., Wei, X., Ren, K., Zhu, G., Zhang, Z., Wang, J., Du, D. Highly efficient detection of paclobutrazol in environmental water and soil samples by time-resolved fluoroimmunoassay. *Science of the Total Environment*. [online]. 2016. 569-570. p. 1629-1630. [cit. 2017-07-16]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.089>>.

Mariana, M., Hambdani, J. S. Growth and yield of *Solanum tuberosum* at Medium Plain with Application of Paclobutrazol and Paranet Shade. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. [online]. 2016. 9. p. 27. [cit. 2017-07-16]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.117>>.

Mendoza-Mendoza, A., Zaid, R., Lawry, R., Hermosa, R., Monte, E., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K. Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*. [online]. 2018 p. 1. [2018-02-18]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.12.001>>.

Monreal, J. A., Jiménez, E. T., Remesal, E., Velarde, R. M., Mauriño, S. G., Echchevaría, C. Proline content of sugar beet storage roots: Response to water deficit and nitrogen fertilization at field conditions. *Environmental and Experimental Botany*. [online]. 2007. 60 (2). p. 257-258. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.11.002>>.

Nxele, N., Klein, A., Ndimba, B. K. Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *South African Journal of Botany*. [online]. 2017. 108. p. 261. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.11.003>>.

Oufir, M., Schulz, N., Vallikhan, P.S. S., Wilhelm, E., Burg, K., Hausman, J. F., Hoffmann, L., Guignard, C. Simultaneous measurement of proline and related compounds in oak leaves by high-performance liquid-exchange chromatography for environmental stress studies. *Journal of Chromatography A*. [online]. 2009. 1216 (7). p. 1094. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.030>>.

Pospíšilová, H., Jiskrová, E., Vojta, P., Mrízová, K., Kokáš, F., Majeská Čudejková, M., Bergougnoux, V., Plíhal, O., Klimešová, J., Novák, O., Dzurová, L., Frébort, I., Galuszka, P. Transgenic barley overexpressing a cytokinin dehydrogenase gene shows greater tolerance to



drought stress. *New Biotechnology*. [online]. 2016. 33 (5) partB. p. 692-693. [cit. 2018-02-11]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.12.005>>.

Rai, A. Ch., Singh, M., Shah, K. Effect of water with drawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in *ZAT12*-transformed transgenic tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. [online]. 2012. 61. p. 108. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.09.010>>.

Ramírez, D. A., Rolando, J. L., Yactayo, W., Monneveux, P., Mares, V., Quiroz, R. Improving potato drought tolerance throught the induction of long-term water stress memory. *Plant Science*. [online]. 2015. 238. p. 26-27. [2017-07-29]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.016>>.

Rouessac, F., Rouessac, A. 2000. *Chemicalanalysis. Modern Instrumental Methods and Techniques*. John Willey&Sons, Ltd. England. p. 189, 198-200. ISBN: 0471972614.

Shu-han, Z., Xue-feng, X., Ye-min, S., Jun-lian, Z., Chao-zhou, L. Influence of drought hardening on the resistance physiology of potato seedlings under drought stress. *Journal of Integrative Agriculture*. [online]. 2018. 17 (2). p. 336-337. [cit. 2018-02-11].

Singh, M., Singh, V. P., Prasad, S. M. Nitrogen modifies NaCl toxicity in eggplant seedlings: Assessment of chlorophyll a fluorescence, antioxidative response and proline metabolism. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. [online]. 2016. 7. p. 76-77. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.007>>.

Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. 5th ed. Harcourt Brace&Company. United Statesof America. p. 726-733, 779-783. ISBN: 0030020786.

Slama, I., Ghnaya, T., Saviouré, A., Abdelly, Ch. Combined effects of long-term salinity and soil drying on growth, water relations, nutrient status and proline accumulation of *Sesuvium portulacastrum*. *Plant biology and pathology*. [online]. 2008. 331 (6). p. 443. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.crvl.2008.03.006>>.

Sperdouli, I., Monstakas, M. Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *Journal of Plant Physiology*. [online]. 2012. 169 (6). p. 577-578. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.12.015>>.

Vokál, B., Bárta, J., Bártová, V., Čepel, 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 Press s.r.o. Praha. 10-13, 20-23, 25, 30-31, 138, 143-145, 147, 149 s. 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. 15, 22, 28, 32-33, 36-37, 39, 124-128, 153-158, 164, 177, 245 s.

Yan, H., Wang, S. Q., Billesbach, D., Oechel, W., Bohrer, G., Meyers, T., Martin, T. A., Matamala, R., Phillips, R. P., Rahman, F., Yu, Q., Shugart, H. H. Improved global simulations of gross primary product based on a new definition of water stress factor and a separate treatment of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Ecological Modelling*. [online]. 2015. 297. p. 46. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2014.11.002>>.

Yang, J., Fleisher, D. H., Sicher, R. C., Kim, J., Baligar, V. C., Reddy, V. R. Effects of CO<sub>2</sub> 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*. [online]. 2015. 189. p. 126-127. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.10.004>>.

Yang, J., Zhang, N., Ma, C., Qu, Y., Si, H., Wang, D. Prediction and verification of microRNA related to proline accumulation under drought stress in potato. *Computational Biology and Chemistry*. [online]. 2013. 46. p. 48-49. [2017-07-29]. Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2013.04.006>>.

