



**Agronomická  
fakulta**

**Mendelova  
univerzita  
v Brně**



**Interakcia fytohormónov a vonkajších faktorov  
v dormancii hl'úz ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum*  
*L.*) odvodených v explantátovej kultúre**

Diplomová práce

*Vedoucí práce:*  
Ing. RNDr. Marek Klemš, Ph.D.

*Vypracoval:*  
Bc. Roman Maco

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Bc. Roman Maco**  
Studijní program: Fytotechnika  
Obor: Biotechnologie rostlin  
Název tématu: **Interakcia fytohormónov a vonkajších faktorov v dormancii hľúz fuľka zemiakového (*Solanum tuberosum* L.) odvođených v explantátové kulture**  
Rozsah práce: 40 textových, 10 grafických stran

### Zásady pro vypracování:

1. Mikropropagácia hľúz fuľka zemiakového za pomoci techniky *in vitro*, slúži k rýchlemu vytvoreniu mikrohľúz a k odvodeniu sadbového materiálu. Hľúzy vytvorené *in vitro* kultúre asynchronným spôsobom majú rôznu dĺžku dormancie a nevykazujú parametry kladené na homogenitu sadby. Nedajú sa využiť pre ďalšiu bonitáciu *in vivo*.
2. Študujte proces tvorby hľúz od indukcie, ukladanie zásobných látok až po proces dormancie a nového rastu pupenov. V literárnej rešerši sa zamerajte na proces dormancie hľúz a jeho ovplyvnenie fytohormónmi alebo inými látkami zásobného alebo nutričného charakteru.
3. Zložte viac experimentov *in vitro* pre odvedenie tvorby mikrohľúz. Sledujte anatomické a morfológické zmeny. Stanovte výťažnosť hľúz a dĺžku dormancie vzhľadom na dĺžku kultivácie. Vykonať experimentálne ošetrenie látkami narušujúcich alebo prehľbujúcich dormanciu.
4. Stanovte obsah fytohormonov vplývajúcich na dormanciu pomocou imunoanalytických metód prípadne obsah zásobných látok v hľúzach v prípade dormancie hľúz, skladovania alebo pučania pupenov.
5. Uvedte štatisticko-matematické spracovanie a vyhodnotenie, grafy a pripravte fotodokumentáciu. Získané výsledky diskutujte s výsledky iných autorov.


Seznam odborné literatury:

1. VREUGDENHIL, D. *Potato biology and biotechnology: advances and perspectives*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2007. 857 s. ISBN 978-0-444-51018-1.
2. HOSSAIN, J. *Potato Microtuber: A Prospective: Production and Dormancy Breaking of Potato Microtuber*. Germany: Lambert Academic Publishing AG & Co. KG, 2012. 386 s.
3. SOUČKOVÁ, H. *Potato Agrophysiology 2013 : proceedings of the 2nd International symposium on agronomy and physiology of potato : 15 – 19 September 2013, Prague, Czech Republic*. Havlíčkův Brod: Potato Research Institute, 2013. 240 s. ISBN 978-80-86940-52-6.
4. TAIZ, L. – ZEIGER, E. *Plant physiology*. 5. vyd. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 2010. 782 s. ISBN 978-0-87893-565-9.

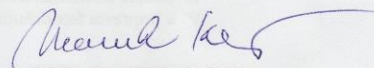
Datum zadání diplomové práce: listopad 2014

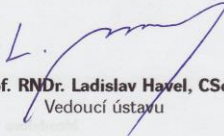
Termín odevzdání diplomové práce: duben 2016

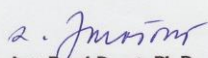
L. S.

  
**Bc. Roman Maco**  
Autor práce



  
**Ing. RNDr. Marek Klemš, Ph.D.**  
Vedoucí práce

  
**prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.**  
Vedoucí ústavu

  
**doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.**  
Děkan AF MENDELU

## Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že som prácu: Interakcia fytohormónov a vonkajších faktorov v dormancii hlúz ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum L.*) odvodených v explantátovej kultúre, spracoval samostatne a všetky použité pramene a informácie uvádzam v zozname použitej literatúry. Súhlasím, aby moja práca bola zverejnená v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách v znení neskorších predpisov a v súlade s platnou *Smernicou o zverejňovaní vysokoškolských záverečných prác*

Som si vedomý, že sa na moju prácu vzťahuje zákon č. 121/2000 Zb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brne má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy použitia a použitie tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona.

Ďalej sa zaväzujem, že pred spísaním licenčnej zmluvy o využití diela inou osobou (subjektom) si vyžiadam písomné stanovisko univerzity, že predmetná licenčná zmluva nie je v rozpore s oprávnenými záujmami univerzity, a zaväzujem sa uhradiť prípadný príspevok na úhradu nákladov spojených so vznikom diela, a to až do jeho skutočnej výšky

V Brne dňa:.....

.....

podpis

## **Pod'akovanie**

Rád by som poďakoval svojmu vedúcemu diplomovej práce Ing. RNDr. Markovi Klemšovi, Ph.D. za cenné rady, odbornú pomoc, pripomienky a venovaný čas pri tvorbe záverečnej práce. Ďalej by som chcel poďakovať Ing. Kamile Lónovej za príjemnú spoluprácu, podporu a cenné rady.

## **ABSTRAKT**

Z rastlín ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum L.*) kultivovaných v podmienkach *in vitro* boli získané mikrohl'uzy, ktoré boli používané v následných experimentoch. Bol sledovaný vplyv regulátorov rastu (FLD, AgNO<sub>3</sub>, BA, ABA) na dĺžku dormancie. Taktiež bol stanovený obsah ABA v pučiacich hl'uzách a obsah endogénnych CK (BA, IP, DHZ, DHZR, Z) v priebehu dormancie. Pomocou plynovej chromatografie sa stanovila produkcia ACC, etylénu, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> a etánu. Výrazný vplyv na skrátenie dormancie a stimuláciu rastu pupeňov mirkohl'úz mali varianty s obsahom FLD, AgNO<sub>3</sub> a BA. Pri ich použití sa zvýšil výskyt pučiacich hl'úz o 30-40 % oproti kontrole. Inhibične na rast pupeňov pôsobil variant s ABA. Obsah ABA koreloval s priebehom dormancie a s výskytom pučiacich hl'úz. Najvyšší obsah ABA bol vo variante s čerstvo pozberanými dormantnými hl'uzami. Koncentrácia jednotlivých CK bola v závislosti od typu CK a sledovaného variantu. Všeobecne sa mierne zvyšovala s výskytom pučiacich hl'úz.

**Kľúčové slová:** mikrohl'uzy, dormancia, *Solanum tuberosum L.*, ABA, CK

## **ABSTRACT**

Microtubers were obtained from potato plants (*Solanum tuberosum L.*) cultured *in vitro*, they were used in following experiments. The impact of growth regulators (FLD, AgNO<sub>3</sub>, BA, ABA) was monitored in length of dormancy. The content of ABA in the budding tubers and the content of endogenous CK (BA, IP, DHZ, DHZR, Z) was determined during the dormancy as well. Production of ACC, ethylene, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and ethane was determined by gas chromatography. Variants containing FLD, AgNO<sub>3</sub> and BA had a significant impact in the shortening of dormancy and stimulation the growth of buds microtubers. When they were used the occurrence of budding tubers was increased by 30-40 % over the control. Variant of ABA inhibited the growth of buds. ABA content correlated with the process of dormancy and the occurrence of budding tubers. The highest content of ABA was in variant with freshly collected dormant tubers. Concentration of various CK was dependent on the type of CK and monitored variant. Generally, It was slightly increased with occurrence of budding tubers.

**Keywords:** microtubers, dormancy, *Solanum tuberosum L.*, ABA, CK

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>CIEĽ PRÁCE.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÝ PREHĽAD.....</b>	<b>14</b>
3.1	Obsah chemických látok v hľúze.....	14
3.2	Mikropropagácia hľúz <i>in vitro</i> .....	16
3.3	Tuberizácia hľúz .....	18
3.3.1	Účinok gibberelínov .....	20
3.3.2	Účinok auxínov .....	21
3.3.3	Účinok cytokinínov.....	22
3.3.4	Ostatné hormóny .....	22
3.4	Dormancia .....	24
3.4.1	Dormancia semien.....	24
3.4.2	Dormancia pupeňov .....	25
3.4.3	Dormancia cibúľ .....	26
3.4.4	Dormancia a skladovanie hľúz .....	27
3.5	Vplyv vonkajších podmienok na dormanciu hľúz.....	29
3.5.1	Vplyv teploty a ovzdušia .....	29
3.5.2	Vplyv svetla a sacharózy .....	31



3.6	Vplyv vnútorných faktorov ovplyvňujúcich dormanciu .....	32
3.6.1	Účinok auxínov .....	32
3.6.2	Účinok cytokinínov.....	34
3.6.3	Účinok gibberelínov .....	36
3.6.4	Účinok kyseliny abscisovej .....	38
3.6.5	Účinok etylénu .....	41
3.6.6	Vplyv ostatných rastových regulátorov .....	42
3.7	Interakcie fytohormónov .....	44
4	MATERIÁL A METÓDY .....	46
4.1	Rastlinný materiál a kultivácia .....	46
4.2	Pokusné varianty .....	48
4.3	Stanovenie ACC, CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , etánu a etylénu.....	48
4.3.1	Postup pri stanovení ACC .....	49
4.4	Stanovenie CK.....	50
4.4.1	Extrakcia CK.....	51
4.4.2	Purifikácia CK.....	51
4.4.3	HPLC separácia .....	51
4.4.4	ELISA stanovenie.....	52
4.5	Stanovenie obsahu ABA v hľuzách.....	52

4.5.1	Princíp radioimunoanalytického stanovenia ABA.....	53
4.5.2	Postup RIA.....	53
4.6	Štatistické spracovanie dát .....	55
4.7	Fotodokumentácia .....	55
5	VÝSLEDKY.....	56
5.1	Dĺžka dormancie u jednotlivých variant .....	56
5.2	Vplyv jednotlivých variant na obsah endogénnych CK .....	58
5.3	Obsah ACC, CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , etylénu a etánu v priebehu pučania hl'úz .....	61
5.4	Obsah ABA v jednotlivých variantoch počas pučania hl'úz .....	64
6	DISKUSIA .....	66
7	ZÁVER.....	70
8	POUŽITÁ LITERATÚRA .....	71
9	ZOZNAM GRAFOV .....	85
10	ZOZNAM OBRÁZKOV .....	86
11	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....	87

# 1 ÚVOD

Ľuľok zemiakový (*Solanum tuberosum* L.) patrí medzi plodiny pradávneho pôvodu. Prvé zmienky o rastlinách s hľuzami sú staré približne 7000 rokov a pravdepodobne pochádzajú z oblasti pohoria Ánd v Južnej Amerike, ktoré sa nachádzajú na území Bolívie a Peru. Boli objavené po príchode Španielov do Ameriky v 16. storočí a ich následná domestikácia a introdukcia do Európy je predmetom mnohých diskusií (HAWKES 1978). V Európe sa ľuľok zemiakový rýchlo rozšíril a získal veľkú obľubu medzi obyvateľmi. Bol používaný ako stabilizujúca potravina v prípade hladomoru a nedostatku obilovín. Dokonca bol zistený nárast počtu obyvateľov v priľahlých mestách, kde sa ľuľok zemiakový pestoval (BROWN a HENFLING 2014).

Zemiaky patria medzi najhlavnejšie plodiny pestované za účelom výživy človeka a zvierat, ale aj za účelom priemyselného spracovania. Vo svetovej ekonomike sú štvrtou najdôležitejšou plodinou hneď po kukurici, ryži a pšenici (JACKSON 1999). Zemiaky majú veľkú výhodu v husto obývaných oblastiach najmä preto, že poskytujú viac potravy na plochu pôdy oproti ostatným konvenčným plodinám (HABIB 1999). Vo svete je známych viac než 4000 jednotlivých odrôd, ktoré môžu byť pestované na väčšine kontinentoch v rôznych tvaroch, farbách a veľkostiach.

Medzi najväčších pestovateľov ľuľka zemiakového v rokoch 2010-2011 patrila Čína, kde v roku 2011 výroba dosahovala 88,3 tony za rok a postupne sa zvyšuje. Priemerná spotreba v Európe bola v roku 2009 stanovená na 85,5 kg na osobu. Zemiaky sa predávajú buď čerstvé alebo v rôznych formách ako hlboko mrazené výrobky a špeciálne pochúťky - chipsy (BROWN a HENFLING 2014). Zemiaky sú vysoko stráviteľné. Taktiež poskytujú vitamíny, aminokyseliny, bielkoviny a minerálne látky. V malých koncentráciách obsahujú aj toxické glykoalkaloidy, ktoré slúžia hlavne ako obrana proti škodcom a patogénom (NAVARRE et al. 2014).

Ľuľok zemiakový patrí do čeľade ľuľkovitých (*Solanaceae*) a rodu ľuľok (*Solanum*). Vyrastá do výšky približne 50-100 cm, listy sú striedavé 20 až

30 cm dlhé, kvety najčastejšie biele až fialové. Plody sú zelené až žltozelené bobule, ktoré obsahujú semená. Rozmnožuje sa hlavne vegetatívne, ale aj generatívne. Luľok zemiakový sa pestuje práve pre podzemné hľuzy, ktoré vznikajú metamorfózou stonky. Hľuzy alebo celé rastliny sú v hovorovej reči pomenované jednoducho zemiaky.

Hľuza je skrútená, zhustená stonka s redukovanými listami s axilárnymi pupeňmi, ktoré sa nazývajú očká (STRUİK 2007). Hľuzy vznikajú počas procesu, ktorý sa nazýva tuberizácia. Proces tuberizácie zahŕňa štyri fázy: indukcia stolonov, vetvenie a rast, inhibícia rastu a indukcia rastu hľúz (VREUGDENHIL a STRUİK 1989). Indukcia tuberizácie závisí od rôznych faktorov prostredia ako sú teplota, svetlo, fotoperiódka, vlhkosť a niektoré geneticky podmienené aspekty (NEAG et al. 2009).

Po dozretí a vytvorení hľúz nasleduje ich dormancia. Je to dôležité obdobie, kedy dochádza k spomaleniu fyziologických procesov, preto sa toto obdobie nazýva aj obdobím pokoja. Dormanciu ovplyvňujú rôzne vonkajšie aj vnútorné faktory. Udržanie dormancie, alebo naopak jej prerušenie, je dôležitým aspektom pri sadbovej výrobe zemiakov z dôvodu urýchlenej výroby alebo dosiahnutia kvalitného sadbového materiálu. Predčasne pučiace zemiakové hľuzy predstavujú problém pre priemysel. Takéto hľuzy strácajú nutričnú hodnotu a kvôli zvýšenému obsahu redukujúcich cukrov sú nevhodné na výrobu zemiakových produktov (HAINES et al. 2003).

Luľok zemiakový hrá významnú rolu vo výžive ľudstva a jeho produkcia sa zvyšuje aj vzhľadom na nenáročnosť tejto plodiny a širokej oblasti pestovania. V súčasnosti prebieha šľachtenie rôznych odrôd podľa záujmu využitia.

## **2 CIEĽ PRÁCE**

Cieľom práce bolo spracovanie teoretických poznatkov týkajúcich sa hľúz ľuľka zemiakového, špeciálne dormancie hľúz a látok uplatňujúcich sa v jej regulácii. Hlavným cieľom praktickej časti bolo vyprodukovanie mikrohľúz z rastlín ľuľka zemiakového a sledovanie vplyvu jednotlivých látok na dĺžku dormancie. Ďalším sledovaným aspektom bol obsah ABA, ACC a CK v priebehu dormancie jednotlivých experimentálnych variant. Obsah ABA bol stanovovaný pomocou RIA analýzy. Obsah CK bol stanovený pomocou HPLC a ELISA a plynovou chromatografiou bol stanovený obsah plynov.

### 3 LITERÁRNÝ PREHĽAD

#### 3.1 Obsah chemických látok v hľuze

Hľuzy sú vynikajúcim zdrojom sacharidov, vitamínov a minerálnych látok. Zložené sú hlavne z vody, ktorá tvorí 70-75 % a sušiny tvoriacej zvyšných 20-25 %. Stredne veľký zemiak s čerstvou hmotnosťou 200 g, podľa amerických kritérií odporúčanej dennej dávky môže poskytnúť 26 % medi, 17 % draslíka, 18 % fosforu a železa a 5 % až 13 % zinku, horčíku a mangánu (WHITE et al. 2009). Zemiaky sú všeobecne bohaté na vápnik aj sodík, ale taktiež môžu byť pri správnom hnojení cenným zdrojom stopových prvkov, ako sú selén a jód (BROADLEY et al. 2006).

Zemiaky sú teda bohatým zdrojom minerálnych látok - ich množstvo závisí hlavne od genotypu, prostredia, ale aj od pôdneho typu a od pH pôdy. Na obsah minerálov má vplyv obsah pôdnej organickej hmoty a taktiež hnojenie a zavlažovanie (NAVARRE et al. 2014). Vplyv rôznych režimov hnojenia na distribúciu prvkov potvrdili aj LERICHE et al. (2009), ktorí zároveň zistili ich rôzne gradienty v rámci hľuzy. Aplikácia minerálnych hnojív má rozmanité účinky na koncentráciu minerálov v hľuze. V závislosti na zložení hnojív dochádza medzi jednotlivými minerálnymi látkami k rôznym interakciám. Vplyvom hnojenia sa tak môže zvýšiť alebo naopak znížiť koncentrácia určitých prvkov v hľuze (WHITE et al. 2009).

Hľuzy ľuľka zemiakového obsahujú z prevažnej časti škrob. Škrob je hlavnou zložkou obsahu sušiny hľúz a tvorí 70 až 80% sušiny. Škrob je tvorený amylopektínom a amyložou, ktoré sú zvyčajne v pomere 3:1 (WOOLFE a POATS 1987). Pomer zrážok má vplyv na obsah škrobu v hľuzách a v menšej miere aj teplota (RYMUZA et al. 2015). Škrob je dôležitou komoditou v priemyselnom odvetví. V Českej republike je škrob vyrobený najmä zo zemiakov (asi 60 %) a pšenice (40 %). Vo svetovej produkcii prevláda kukuričný škrob. Pomer amyložy a amylopektínu určuje vlastnosti škrobu, ale aj jeho konečné použitie. Pre potravinárske účely sa

používajú odrody s vyšším obsahom amylózy a pre priemyselné odvetvia sú preferované odrody s vyšším zastúpením amylopektínu (ŠIMKOVÁ et al. 2013).

Obsah bielkovín v zemiakových hľuzách sa pohybuje v rozmedzí 1,7-2,1 g na 100 g čerstvej hmotnosti, čo sú približne 2 %. Zemiaky síce nepatria medzi významne bielkovinové potraviny, avšak v krajinách s vysokou spotrebou zemiakov na jedného obyvateľa môžu mať vyššiu proteínovú a nutričnú využiteľnosť. Vo Veľkej Británii poskytujú zemiaky podľa odhadu 3,4 % celkových bielkovín v strave. Pre porovnanie, vajcia, ryby a syry poskytujú 4,6 %, 4,8 % a 5,8 % bielkovín z prijatej potravy (STOREY 2007). Najviac obsiahnutým proteínom je patatín. Predstavuje asi 40 % rozpustného proteínu v hľuzách, ale zvyčajne je nezistiteľný v iných orgánoch (PIKKARD et al. 1987). Zemiakové hľuzy obsahujú veľké množstvo esenciálnych aminokyselín, medzi ktoré patria: lyzín, leucín, treonín, fenylalanín a valín (STOREY 2007). Na obsah bielkovín v sušine sú porovnateľné s obilninami. Avšak na rozdiel od obilnín, zemiaky majú vysoký obsah vysoko kvalitného proteínu lyzínu (WOOLFE a POATS 1987).

Medzi vitamíny, ktoré sú obsiahnuté v hľuzách patria B vitamíny typu B<sub>1</sub>(tiamín), B<sub>3</sub>(niacín), B<sub>5</sub>(kyselina pantoténová), B<sub>6</sub>(pyridoxín), B<sub>7</sub>(biotín) a málo obsiahnuté B<sub>2</sub>(riboflavín) a B<sub>9</sub>(folát). Zaujímavosťou je, že zemiakové lupienky obsahovali najvyššie hodnoty vitamínov. V dôsledku toho by mohli byť lupienky, ktoré sú pečené, ale nie smažené, propagované ako pochutina so zvýšeným obsahom vitamínov skupiny B (NAVARRE et al. 2014). Vitamín C je obsiahnutý vo veľkom množstve. Preto zemiaky patria medzi významné zdroje vitamínu C. Hladina vitamínu C môže rýchlo klesať v priebehu skladovania a môže sa znížiť až o 20 do 60 % v závislosti od genotypu (DALE et al. 2003).

Glykoalkaloidy obsiahnuté v hľuzách môžu byť zdraviu škodlivé, ak sú obsiahnuté vo väčšom množstve. Najviac sa vyskytujú v plodoch, listoch a hlavne v okách na pučiach hľuzách. Patria sem hlavne solanín a chakonín, ktoré slúžia hlavne ako obrana proti nežiadúcim škodcom a patogénom (NAVARRE et al. 2014). V posledných rokoch sa

glykoalkaloidom venuje viac pozornosti v súvislosti ich liečivého využitia hlavne proti rakovintvorným bunkám. Tomatín, chakonín a solanín podávané v rôznych koncentráciách potlačovali rast rakovinových buniek hrubého čreva a rakovinových buniek pečene (LEE et al. 2004), avšak potláčali rast aj normálnych buniek pečene.

K ďalším zdraviu prospešným látkam obsiahnutých v hľuzách patria tzv. sekundárne metabolity, ako sú fenolové kyseliny: antokyany, flavonoly, kyselina chlorogénová a iné (NAVARRE et al. 2014). Tieto látky slúžia aj ako antioxidanty. Najviac je zastúpená kyselina chlorogénová, ktorá pôsobí na zníženie relatívneho rizika kardiovaskulárnych ochorení, diabetu typu 2, Alzheimerovej choroby a má antibakteriálne a protizápalové účinky. FARAH et al. (2008) skúmali tieto účinky na kávovníku. K ďalším fenolovým kyselinám patria kyselina kávová, kyselina protokatechová, kyselina p-kumarová, kyselina ferulová, kyselina sinapová, kyselina salicylová, ktoré boli identifikované hlavne v ružových a červených hľuzách (LEWIS et al. 1998).

REDDIVARI et al. (2007) dokázali, že antokyanový extrakt vyrobený zo zemiakov mal protirakovinové účinky. Flavonoly majú zdraviu prospešné účinky, vrátane zníženia rizika ochorenia srdca, znižujú riziko astmy a bronchitídy a taktiež znižujú riziko rakoviny prostaty a pľúc (NAVARRE et al. 2014).

### **3.2 Mikropropagácia hľúz *in vitro***

Mikropropagácia je rýchla a efektívna metóda, ktorá umožňuje rýchle namnoženie rastlinného materiálu v *in vitro* podmienkach (NISTOR et al. 2010). Je to technológia, ktorá sa vyvinula za posledných 30 rokov. Takto vznikajú geneticky identické rastliny, inak nazývané klony. Táto metóda sa používa vo vedeckých štúdiách, ale aj pre komerčné účely, kedy dochádza k rýchlemu množeniu rastlín kvôli predaju a zisku. V *in vitro* laboratórnych podmienkach môžeme optimalizovať podmienky pre rast a vývoj k urýchleniu tvorby sadbového materiálu.

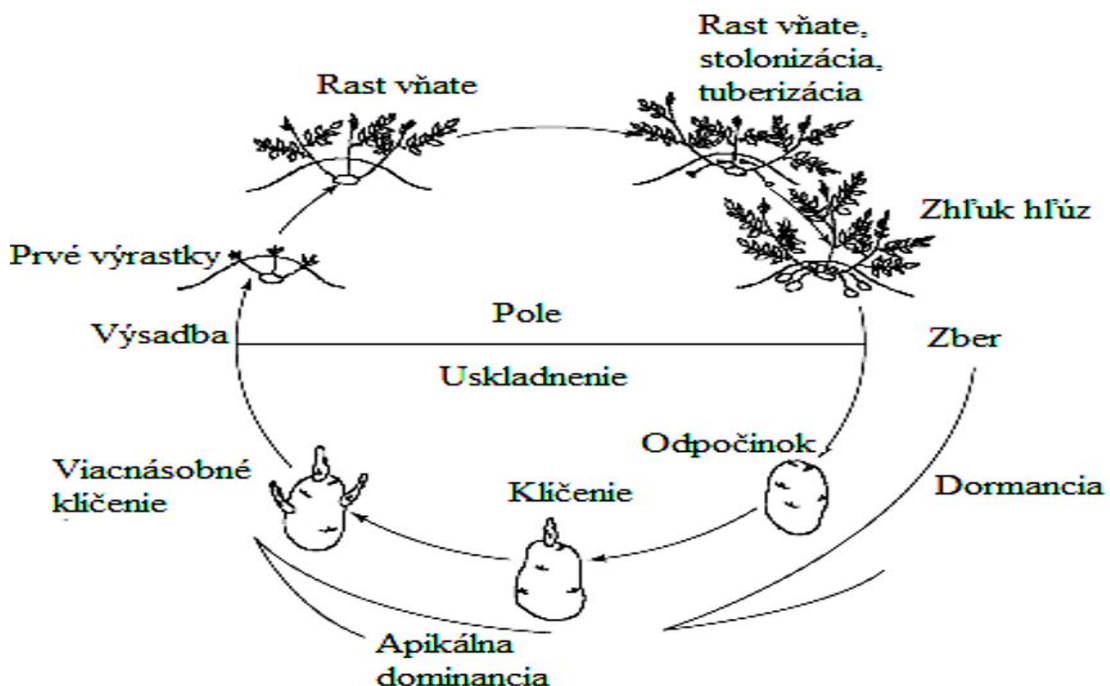


Mikropropagácia predstavuje 4 fázy: fáza 0 je prípravný stupeň, fáza 1 zahŕňa vytvorenie životaschopných kultúr, fáza 2 sa zameriava na proliferáciu buniek, vo fáze 3 sa vytvárajú rastliny alebo odrezky a fáza 4 slúži k aklimácii rastlín z podmienok *in vitro* kultivácie na *ex vitro* podmienky skleníku výsevom do skleníkov. Predpokladom úspechu je zdravý východiskový materiál v dobrej kondícii a sterilné prostredie bez kontaminácií (DEBERGH a READ 1991).

Pri mikropropagácii ľuľka zemiakového v procese tuberizácie dochádza k tvorbe mikroľúz. Sú to *in vitro* vyvinuté hľuzy (NISTOR et al. 2010). Mikroľuzy ponúkajú mnoho výhod pri skladovaní, preprave a pri manipulácii vzhľadom k ich malej veľkosti a zníženej hmotnosti. Môžu byť zasadené priamo do pôdy a môžu byť vyprodukované v ktoromkoľvek období počas roka. Majú podobnú morfológiu a biochemické črty ako klasické hľuzy (NISTOR et al. 2010). Dôležitými faktormi v období tuberizácie mikroľúz sú: koncentrácia cukru v médiu; obsah dusíka, teplota a svetelné podmienky. Tuberizácia môže nastať v tme alebo pri krátkej dobe svetla približne 8 h (RANALLI 2007). Mikroľuzy dorastajú do malej veľkosti, ich priemer je 4-7 mm a dĺžka 10-12 mm. Líšia sa taktiež tvarom, sú zaoblené alebo podlhovasté, povrch majú jemný alebo drsný, farba je žltá až do zelena a ich hmotnosť sa pohybuje okolo 300 mg (RANALLI 2007). Jednotlivé faktory závisia taktiež od genotypu. Bola zistená rôzna hmotnosť a dĺžka hľúz ako aj množstvo vytvorených hľúz, dĺžka dormancie a celková produktivita rastliny u rôznych genotypov (NISTOR et al. 2010, DONNELLY et al. 2003). Mikroľuzy sa stali dôležitou súčasťou produkcie sadbového materiálu. Skracujú dobu na získanie sadbového materiálu na sadbu o 3 a viac rokov. Výrazne zvyšujú kvalitu sadbového materiálu potlačením vírusových, bakteriálnych a plesňových chorôb. Taktiež majú významnú úlohu ako základný nástroj rôznych výskumov pre štúdium rastu a vývoja, tuberizácie, tolerancie abiotického stresu alebo dormancie hľúz (DONNELLY et al. 2003).

### 3.3 Tuberizácia hľúz

Podzemné šikmo alebo vodorovne rastúce výhonky ľuľka zemiakového sa nazývajú stolony. Ich vrcholy sa metamorfujú v zásobné hľuzy. Tvorba stolonov začína veľmi skoro po vzídení, často skôr ako sa ukáže nadzemná časť. Tuberizácia prebieha skôr, ako sú všetky stolony sformované a ich rast ukončený. Pred začatím tuberizácie sa však spomaľuje rast stolonov. Po vytvorení viac ako jednej hľuzy na stolone prebieha silné súperenie o zdroje a to má vplyv na veľkosť a usporiadanie hľúz (STRUİK 2007).



**Obrázok 1** Tradičný spôsob rozmnožovania a vývoj zemiakov. Nasadenie hľúz a pučanie hľúz za vhodných podmienok po ukončení dormancie (podľa STRUIK 2007).

Tuberizácia je ovplyvňovaná veľkou škálou vnútorných či vonkajších faktorov. Ľuľok zemiakový vníma zmenu okolitého prostredia a reaguje na ňu. Vysoká teplota pôsobí inhibične na indukciu hľúz počas krátkeho aj dlhého dňa (JACKSON 1999). Fotoperiódou ovplyvňuje zakladanie hľúz v závislosti na odrode ľuľka zemiakového. Dôležitá je hlavne skotoperiódou ako fotoperiódou (JACKSON 1999). Krátky deň pôsobí stimulačne na proces tuberizácie (SEABROOK 2005). Vysoká teplota, podobne ako aj nedostatočné osvetlenie môže spôsobovať sekundárne založenie hľúz

(JACKSON 1999, SEABROOK 2005). Nízka teplota pôsobí priaznivo na skoršie zakladanie hľúz. Pri nízkej teplote sa produkuje aj kvalitnejší sadbový materiál. CUTTER (1978) popísala viacero štúdií, v ktorých potvrdzuje indukčný charakter nízkej teploty na tuberizáciu. Krátke dni stimulujú tuberizáciu aj za predpokladu, že je nočná teplota dostatočne nízka.

Dĺžka dňa je detekovaná v listoch rastliny kyselinou jasmonovou (HELDER 1994). Nízka teplota spolu s krátkym dňom zrejme podnecujú produkciu špecifických metabolitov, ktoré stimulujú indukciu hľúz. Listom rastlina vníma zmenu teploty a fotoperiody. Aktivuje indukčný signál, ktorý sa prenáša do cieľového orgánu – stolonu (HANNAPPEL 2007). Nastáva zmena bunkového rastu stolonu, dochádza k následnému hrubnutiu a vytvára sa zásobný orgán - sink (VREUGDENHIL et al. 1999). V *in vitro* podmienkach krátky deň podporuje proces tuberizácie, ale skraca čas tvorenia mikrohľúz a aj ich hmotnosť. Optimálna fotoperiódou 12 h by mohla poskytnúť včasnú tvorbu mikrohľúz bez straty ich počtu a hmotnosti (GARNER a BLAKE 1989). Rastliny ľuľka zemiakového vystavené dlhému dňu mali aktívny vegetatívny rast. V konečnom dôsledku aj tieto rastliny indukovali tvorbu hľúz, ale s oneskorením 3 až 5 týždňov oproti rastlinám kultivovaných pri krátkom dni (CHAPMAN 1958). Vystavenie rastlín dlhým dňom po dobu aspoň 4 týždňov a neskôr krátkym dňom má za následok včasnú, rýchlu a vyrovnanú tuberizáciu (GARNER a BLAKE 1989). Účinok fotoperiody je silno ovplyvnený genotypom rastliny (SEABROOK 2005). Niektoré kultivary pestované pri 24h svetle produkovali hľuzy v prípade dostatočnej nízkej teploty (HELDER 1994). Medzi takéto odrody patria aj skoré odrody zemiakov, ktoré tvoria hľuzy aj pri dlhej fotoperióde.

Ako negatívny regulátor tuberizácie sa javí fytochróm B. Transgénne rastliny ľuľka zemiakového so zníženým obsahom fytochrómu B strácajú schopnosť reagovať na podmienky dlhého dňa. Tuberizácia u takýchto rastlín prebieha nezávisle na dĺžke dňa podobne, ako je to u rastlín kultivovaných pri krátkom dni (JACKSON et al. 1996). Fytochróm B, ktorý

sa podieľa na inhibícii tuberizácie pri dlhom dni, je zrejme spojený s produkciou inhibičného signálu, ktorý prebieha v listoch (JACKSON 1999).

Jedným z ďalších príznakov tvorby hľúz je zvýšenie obsahu škrobu a zníženie obsahu glukózy a fruktózy (HELDER 1994). Pri zvýšenom obsahu dusíku v médiu GARNER a BLAKE (1989) sledovali zmeny v počte vytvorených hľúz a ich hmotnosti. Pri optimálnom zvýšení sa vytvorilo väčšie množstvo hľúz a dosiahol sa nárast ich hmotnosti. Avšak pri veľmi vysokej koncentrácii už obsah dusíku pôsobil inhibične. K podobným výsledkom dospeli aj ZARRABEITIA et al. (1997), ktorí taktiež kultivovali rastliny na MS médiu (MURASHIGE a SKOOG 1962) obohatenom o dusík. Zvýšený obsah sacharózy v médiu taktiež pôsobí na zakladanie hľúz, ich veľkosť a hmotnosť. Obsah 8 % sacharózy v médiu sa javilo ako optimum pre vyrovnané zakladanie hľúz oproti 4 a 12 percentám (GARNER a BLAKE 1989). Hydroponická kultivácia rastlín zemiaku v roztoku o pH 3,5 mala za následok včasnú indukciu hľúz oproti roztokom s pH 4 a 5,5 (WAN et al. 1994).

NAVARRO et al. (2011) preukázali, že indukcia kvitnutia, podobne ako aj indukcia tuberizácie je riadená najmenej dvoma génmi *StSP3D* a *StSP6A*. Génová expresia *StSP6A* prudko stúpa vystavením rastlín krátkemu dňu a naopak umlčanie génu *StSP6A* prudko odďaľuje tuberizáciu. Je pravdepodobné, že *StSP6A* je hlavným spúšťačom prechodu z rastu stolonov na indukciu hľúz (KLOOSTERMAN a BACHEM 2014).

### 3.3.1 Účinok giberelínov

Vonkajšie faktory ako fotoperiódá, obsah dusíku, teplota alebo obsah cukru v médiu môžu ovplyvňovať endogénnu hladinu rastlinných hormónov. Hladina endogénnych giberelínov (GA), najmä GA<sub>1</sub>, v rastline ľuľka zemiakového je zvýšená za neindukčných podmienok a naopak ich hladina sa znižuje pri začiatku tuberizácie (VREUGDENHIL a SERGEEVA 1999). Navodenie indukčných podmienok pomocou zvýšenej koncentrácie sacharózy vedie taktiež k zníženej hladine GA. Zníženie koncentrácie

fytochrómu B vedie k indukčným podmienkam a taktiež môže viesť k zníženej koncentrácii GA alebo citlivosti rastliny na GA (JACKSON 1999). Exogénne aplikované GA majú inhibičný účinok na tuberizáciu, to znamená, že ju potláčajú alebo spomaľujú a hľuzy sa tvoria s časovým oneskorením (OKAZAWA 1967). Vysoká koncentrácia dusíku, dlhá dĺžka dňa a vysoká teplota vedú k potlačeniu tuberizácie a to zrejme súvisí s vyššou koncentraciou GA. Giberelíny teda patria medzi hlavné regulátory tuberizácie, pri ktorej sa však uplatňujú sa aj ďalšie fytohormóny.

Kyselina abscisová (ABA) je hlavný antagonista GA. Tuberizácia je preto primárne riadená pomerom GA k ABA. Vyšší pomer GA v rastline vedie hlavne k vegetatívne rastu a inhibícii tuberizácie. Vyšší pomer ABA vedie k indukcii hľúz (WOHLEB et al. 2014). ABA pôsobí nepriamo na indukciu hľúz a to skrz jej antagonistický vplyv na GA (XU et. al 1998). V listoch rastlín, u ktorých dochádza k indukcii hľúz, sa zvyšuje obsah proteínu PHOR1. Transgénné rastliny so zníženou expresiou génu *PHOR1* sa preukazujú zníženou dĺžkou stonky a skoršou tuberizáciou, čo súvisí s nízkou hladinou GA. PHOR1 je nová zložka signálnej dráhy GA, ktorá má funkciu vo vnímaní odozvy na GA (HANNAPPEL 2007).

### 3.3.2 Účinok auxínov

Koncentrácia auxínov, konkrétne IAA, bola zvýšená počas prvých dní od začatia tuberizácie v apexe stolonov. Zvýšená bola taktiež transkripcia génu *StYUC*, ktorý sa uplatňuje v biosyntéze IAA (ROUMELIOTIS et al. 2012). Zvýšená koncentrácia auxínov môže podporovať expanziu a delenie buniek v rámci stolonu. Zmena bunkového delenia v stolone býva pripočítaná hlavne ku klesajúcemu obsahu GA. Preto rozdiel pomerov medzi GA a IAA môže taktiež hrať úlohu v indukcii tvorby hľúz (KLOOSTERMAN a BACHEM 2014).

Vysoké hladiny auxínov v stolonoch pri začiatku tuberizácie nasvedčujú ich možnej podpornej úlohe pri zakladaní hľúz. Je však zrejmé, že musia

byť v interakcii s ďalšími fytohormónmi alebo génmi, ktoré majú hlavnú rolu v indukcii tuberizácie.

### 3.3.3 Účinok cytokinínov

Cytokiníny (CK) podporujú bunkové delenie, a preto môžu byť potrebné pri počiatku indukcii hľúz a hrubnutí stolonov. MAUK a LANGILLE (1978) vo svojej štúdii potvrdili stimulačný charakter zeatín ribozidu na tuberizáciu. Tuberizácia dosahovala 75 % oproti kontrole s 0 %. Vplyv CK môže byť aj nepriamy, tým že aktivujú škrob syntetizujúce enzýmy na podporu ukladania škrobu do sinku (OBATA-SASAMOTO a SUZUKI 1979). Nepriamy vplyv CK môže nastať aj po indukcii bunkového delenia a podpory tvorby sinku, regulácii expresie génov, ktoré sa zúčastňujú rozdelenia asimilátov (ROITSCH a EHNEß 2000).

CK sa zúčastňujú na indukcii tvorby hľúz svojím skôr sekundárnym pôsobením. Zohrávajú úlohu v bunkovom delení, v rozdelení asimilátov, v akumulácii škrobu, v signálnych dráhach a tým podporujú zakladanie hľúz. Pomer cytokinínov a auxínov má význam v bunkovom delení, a preto je možné predpokladať podobný význam aj pri tvorbe hľúz (KLOOSTERMAN a BACHEM 2014).

### 3.3.4 Ostatné hormóny

ABA zohráva úlohu v indukcii tuberizácie hlavne cez antagonistický vplyv na GA. Kyselina jasmonová (JA) a jej príbuzné kyseliny sa podieľajú na indukcii tuberizácie a počte vytvorených hľúz na stolone (PELACHO a MINGO-CASTEL 1991). Gén *POTLX-1* sa zúčastňuje na tvorbe prekursorov JA. Potlačenie expresie *POTLX-1* viedlo k významnému zníženiu výnosu hľúz a narušenie tuberizácie (KOLOMIETS et al. 2001). Rastliny ošetrené JA produkovali viac koreňov aj mikrohľúz. JA zlepšuje výťažnosť a veľkosť minihľúz v skleníkoch, ktoré sú produkované z mikrohľúz (PRUSKI et al. 2003). JA taktiež spôsobuje expanziu buniek, ktorá je nevyhnutná pri

tuberizácii (TAKAHASHI et al. 1994). Metabolity odvodené od JA ako sú kyselina tuberová a jej glukozid sa zúčastňujú na indukcii hľúz. CENZANO et al. (2007) navrhli, že tieto deriváty JA fungujú ako signály, ktoré sú syntetizované v listoch. Odtiaľ sú transportované cez celú rastlinu do stolonu, kde stimulujú zvýšenie obsahu JA, ktorá indukuje tuberizáciu vyvolaním expanzie buniek.

**Tabuľka 1** Účinok fytohormónov počas jednotlivých fáz tuberizácie (upravené podľa AKSENOVA et al. 2012)

Fázy tuberizácie	Fytohormóny	Fyziologický efekt
<b>formovanie a rast stolonu</b>	GA	stimulácia
	etylén	spomalenie predlžovacieho rastu, zhusťovanie stolonu
	ABA	spomalenie predlžovacieho rastu, antagonistický účinok na GA
<b>indukcia tuberizácie</b>	GA	inhibícia
	jasmonáty	pravdepodobné zapojenie v signalizácii
	ABA	stimuluje, pôsobenie proti GA
<b>iniciácia hľúz</b>	GA	inhibícia
	CK	stimulácia
	jasmonáty	stimulácia
	ABA	nepatrná stimulácia
<b>rast hľúz</b>	GA	inhibícia
	IAA	stimulácia
	jasmonáty	stimulácia
	CK	zvýšenie kapacity sinku rastúcich hľúz

### **3.4 Dormancia**

Dormancia je považovaná za obdobie vegetačného pokoja. Je to spomalenie, až zastavenie vývojových a metabolických procesov. Toto obdobie slúži hlavne ako obrana proti nepriaznivým podmienkam prostredia. Obdobie vegetačného pokoja môžeme pozorovať od najmenších jednobunkových organizmov až po mnohobunkové. Dormancia je vyvolaná vplyvom vnútorných alebo vonkajších faktorov, ale aj geneticky. U rastlín, semien alebo cibúľ mierneho pásma je to hlavne ochrana proti chladu a mrazu, ktoré by inak pre ne boli letálne. U nás je počiatok vegetačného pokoja spájaný s opadom listov listnatých stromov, ktoré sa takto bránia voči nedostatku vody počas zimy. Priebeh dormancie je rôzny v závislosti na orgáne, v ktorom prebieha.

#### **3.4.1 Dormancia semien**

Vegetačný pokoj semien môžeme popísať ako neschopnosť semien klíčiť v priaznivých podmienkach pre rast. U jednotlivých druhov rastlín sa dormancia semien môže byť mierne odlišná.

BOLINQUE et al. (2010) popisujú fyzickú a fyziologickú dormanciu semien strukovín. Fyzická môže byť charakterizovaná ako neschopnosť vody preniknúť do pletiva semena vzhľadom k usporiadaniu palisádovej vrstvy. Fyziologická dormancia závisí od vnútorných faktorov a slúži k prispôsobeniu sa okolitému prostrediu a životným stratégiám rastlín. Hĺbka dormancie je rozdielna medzi druhmi rastlín a ich genotypmi. Teplota je dôležitý faktor pre výstup z dormancie a klíčenie semien (BOLINQUE et al. 2010). Taktiež je závislá na druhu rastliny, ale všeobecne prechod z nízkej teploty na vyššiu podporuje klíčenie. Hormonálna regulácia v dormancii semien je vysoko riadený mechanizmus. Všeobecne je u rastlín pozorované, že ABA pôsobí indukčne a udržiava dormanciu a GA uvoľňujú semená z vegetačného pokoja. Ide teda hlavne o pomer týchto fytohormónov, avšak aj iných (NONOGAKI 2015).

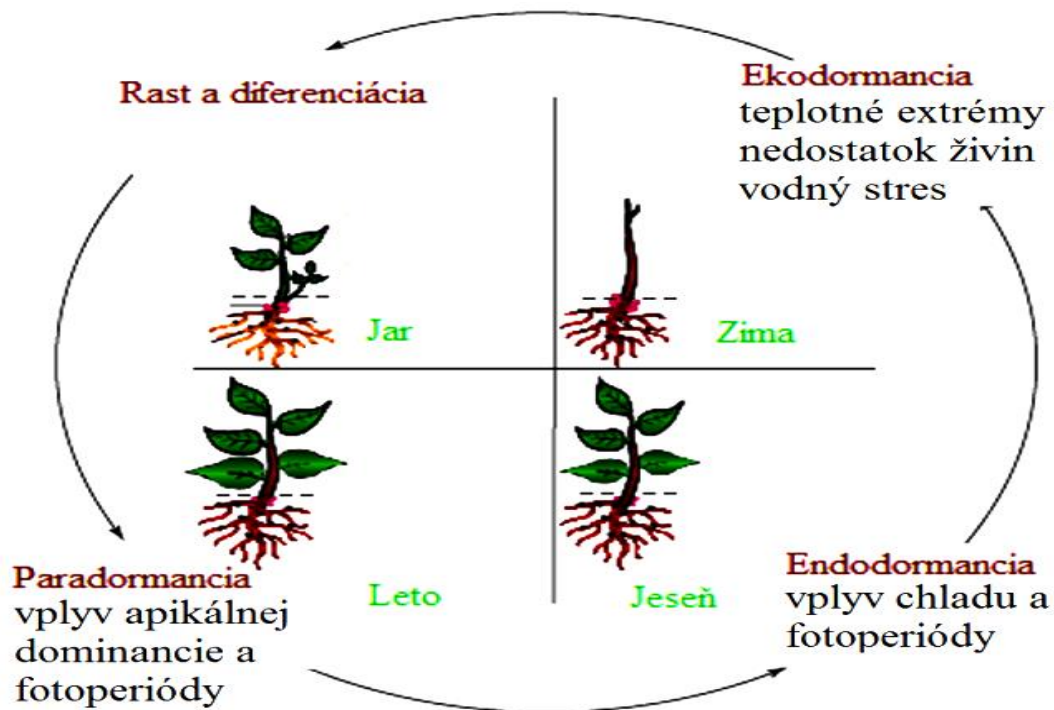


ADKINS et al. (2002) popísali dva mechanizmy dormancie u semien tráv, a to dormanciu embrya a osemenia. Dormancia embrya zahŕňa nezrelé alebo nevyvinuté embryo, expresiu niektorých génov alebo inhibítory klíčenia, ktoré sú obsiahnuté v zárodku. Patria sem napríklad: kumarín, katechíny, ABA a iné. Osemenie zabraňuje klíčeniu cez nízku priepustnosť pre vodu a plyny. Jeho mechanické bariéry bránia expanzii embrya a taktiež sa v nich nachádzajú inhibítory klíčenia.

### **3.4.2 Dormancia pupeňov**

Rastliny si vytvorili komplikované mechanizmy na prežitie v nepriaznivých podmienkach prírody. Nepriaznivé podmienky ako sucho, chlad, mráz alebo veľké teplo sú letálne pre aktívne rastúce meristémy pupeňov. V takom období je pre rastliny dôležitá tvorba dormantných pupeňov ako orgánov pre opätovný rast a reprodukciu (HORVATH et al. 2003).

Niektorí autori popisujú tri fázy dormancie pupeňov: paradormanciu, endodormanciu a ekodormanciu (CHAO et al. 2007, HORVATH et al. 2003). Paradormancia je spájaná s apikálnou dominanciou alebo aj korelačnou inhibíciou na axilárne pupene. Významnú úlohu tu zastáva auxín cieleným odbúravaním špecifických proteínov a reguláciou CK (SHIMIZU-SATO a MORI 2001). Endodormancia je výsledkom fyziologických zmien vo vnútri pupeňov, ktoré bránia predčasnému rastu v nepriaznivých alebo kolísavých podmienkach pre rast (HORVATH et al. 2003). Etylén a fytochróm majú významnú úlohu v tejto fáze. Ekodormancia je riadená hlavne nepriaznivými vonkajšími faktormi, ako je chlad alebo teplo. ABA, GA a CK sú neoddeliteľnou súčasťou všetkých troch fáz. Uplatňujú sa hlavne svojimi antagonistickými vzťahmi medzi sebou (HORVATH et al. 2003).



**Obrázok 2** Cyklus troch typov dormancie počas roka, ktoré súvisia s dormanciou vytrvalých burín, drevín a pupeňov hľúz (upravené podľa HORVATH et al. 2003).

ŠEBÁNEK (1998) popisuje endogénnu a exogénnu dormanciu pupeňov. Endogénnu dormanciu obsahuje tri fázy: predormancia, vlastná dormancia a postdormancia. Je odlišná pre každý druh rastlín. Predormancia zahŕňa pokles GA a vzostup ABA, postupnú inhibíciu rastu pupeňov. Vlastná dormancia je riadená hlavne vnútornými faktormi, čo zahŕňa vysoké koncentrácie inhibítorov hlavne ABA a maximálne spomalenie fyziologických procesov. Postdormancia zahŕňa pokles hladiny inhibítorov pôsobením chladu. V tejto fáze je možné umelými zásahmi prebudiť dormantné orgány z dormancie. Exogénnu dormanciu je vyvolaná pôsobením nepriaznivých podmienok prostredia (ŠEBÁNEK 1998).

### 3.4.3 Dormancia cibúľ

U zásobných orgánov cibúľ sa pozberové obdobie delí na dobu odpočinku, kedy cibule netvoria korene ani neklíčia v podmienkach priaznivých pre rast a na dormantné obdobie plné vnútorných zmien, kedy

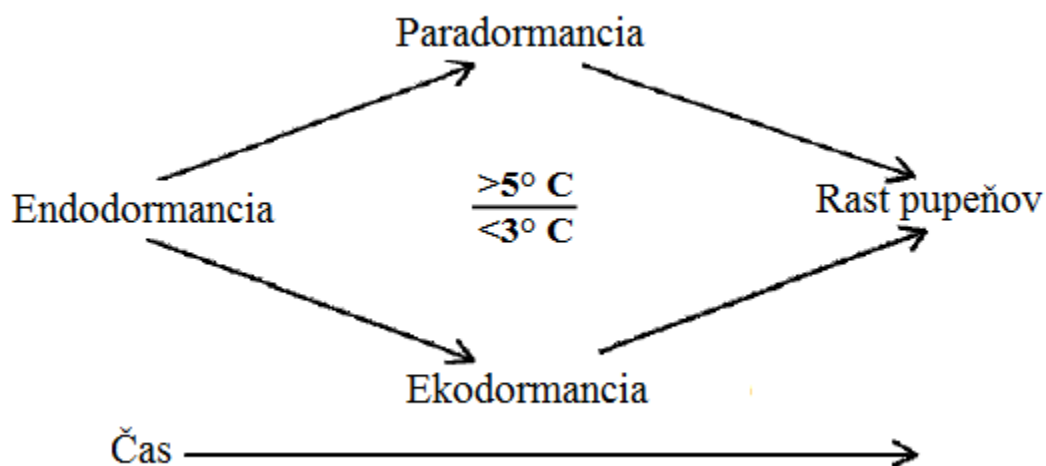
cibule môžu začať klíčiť v podmienkach priaznivých pre rast (THOMAS 1969). Medzi hlavné regulátory dormancie cibúľ patrí ABA. Je to hlavný inhibítor rastu cibule. Jej koncentrácia postupne klesala počas doby skladovania až do začiatku pučania (CHOPE et al. 2006). Ďalším regulátorom je teplota (BENKEBLIA a SHIOMI 2004) a zrejme aj koncentrácia auxínov (THOMAS 1969).

#### **3.4.4 Dormancia a skladovanie hl'úz**

Dormanciou hl'úz sa rozumie obdobie potlačeného rastu pupeňov v podmienkach priaznivých pre rast (SONNEWALD 2001). Dormancia je v súvislosti so zníženým metabolizmom spojená so zvýšenou odolnosťou voči patogénom a chorobám (LADYZHENSKAYA a PROTSENKO 2002).

Dĺžka dormancie hl'úz jednotlivých druhov a ich kultivarov je pomerne variabilná, pohybuje sa v rozmedzí od 0 do viac ako 9 mesiacov. Väčšina kultivarov pestovaných na spracovanie má relatívne krátke obdobia vegetačného pokoja. Pre úspešné dlhodobé skladovanie je potrebné použitie chemikálií, ktoré inhibujú pučanie hl'úz. Dormancia hl'úz je ovplyvnená genotypom a činiteľmi okolitého prostredia (SUTTLE 2007).

Dormancia hl'úz je podobne ako dormancia pupeňov rozdelená na paradormanciu, endodormanciu a ekodormanciu (CHAO et al. 2007, SUTTLE 2007) ako je naznačené na obr. 3. Paradormancia sa vyznačuje pučaním jedného apikálneho pupeňa, ktorý inhibuje ostatné meristémové pupene (očká) a práve tie sa nachádzajú v paradormancii. Endodormancia nastáva hneď po vytvorení hl'úzy a je ovplyvňovaná hlavne hladinou rastových regulátorov. Pučanie očiek je v tejto fáze potlačené. Ekodormancia zahŕňa vplyv nepriaznivých faktorov prostredia, hlavne vplyv veľmi nízkych teplôt. V tejto fáze by hl'úzy za priaznivých podmienok už mohli začať pučať (SUTTLE 2007).



**Obrázok 3** Znárodnenie troch fáz dormancie v závislosti na čase a teplote (upravené podľa SUTTLE 2007).

V mnohých štúdiách sa dĺžka dormancie hľúz určuje od dátumu zberu. V poľných podmienkach sa dátum zberu môže značne líšiť a závisí na mnohých parametroch. Činiteľmi môžu byť napríklad termín výsadby, počasie a poľné podmienky (SUTTLE 2007). Termín zberu ako východiskový bod pre meranie dĺžky dormancie nemá fyziologický význam. BURTON (1978) navrhol, že najlogickejšim fyziologickým alebo biochemickým obdobím, od ktorého by sa mal merať začiatok vegetačného pokoja, je obdobie začiatku iniciácie hľúz. To znamená, že obdobie pokoja rovnako ako iniciácia hľúz, by mohlo byť ovplyvnené faktormi životného prostredia, ktoré vplývajú na nadzemné časti rastlín v priebehu rastu. Východiskovým bodom pre začatie dormancie môže byť aj ukončenie rastu hľúz (CLAASSENS a VREUGDENHIL 2000).

Dormancia umožňuje dlhšie skladovanie zásobných orgánov. Správne skladovanie je nevyhnutné pre udržanie kvality a životaschopnosti sadbových hľúz (BETHKE 2014). Zemiaky sú pestované na celom svete. Spôsob, akým sú zemiaky uskladnené sa odvíja hlavne od požadovanej doby skladovania, od miestnych podmienok životného prostredia a od požadovanej kvality hľúz na konci skladovania. Spôsoby uskladnenia sú teda veľmi rozmanité a odvíjajú sa od produkčných oblastí (BETHKE 2014).

Skrátenie dormancie je využívané pri rýchlej produkcii sadbového materiálu a pri rôznych výskumoch. Predĺženie dormancie je zase dôležité pre dlhšiu ponuku plodiny na trhu. Predčasné pučanie hľúz nie je vyhovujúce ani pri domácom pestovaní zemiakov. Dochádza k strate nutričnej hodnoty a k zvýšeniu obsahu redukujúcich cukrov, čo nie je vhodné pre priemysel. Primárnym záujmom priemyslu je potlačenie pučania skladovaných hľúz (HAINES et al. 2003). Od spôsobu skladovania a dĺžky dormancie závisí aj kvalita hľúz, ktoré plánujeme využiť v ďalšom roku. Preto sa štúdium regulácie dormancie uplatňuje aj z praktického hľadiska. Z mirkohľúz sa v skleníkoch produkujú minihľuzy a tie sa následne používajú v poľných podmienkach. Vďaka svojim malým rozmerom, ľahkej manipulácii a jednoduchému skladovaniu sa mikrohľuzy najviac uplatňujú v štúdiách regulácie dormancie.

Dormancia je vysoko regulovaná fáza vývoja, ktorá je rozhodujúca pre prežitie rastlín. Úspešný priebeh aktívneho rastu, ktorý prechádza do dormancie a následného pučania sa týka všetkých pletív hľúz, a preto vyžaduje fyziologickú koordináciu. Integrácia rastlinných vývojových fáz je závislá na syntéze a pôsobení rastových regulátorov alebo fytohormónov (SUTTLE 2007).

### **3.5 Vplyv vonkajších podmienok na dormanciu hľúz**

#### **3.5.1 Vplyv teploty a ovzdušia**

Predzberové a pozberové environmentálne faktory môžu mať vplyv na dormanciu hľúz. Skladovanie po dobu asi jedného mesiaca pri teplote  $-1^{\circ}\text{C}$ , čo je teplota tesne nad bodom mrazu zemiakov, môže viesť k predĺženiu dormancie alebo môže trvalo narušiť schopnosť pučania hľúz (BURTON 1978).

Na dĺžku dormancie môže mať vplyv aj počasie počas sezóny, hlavne krátko pred zberom. Studené a vlhké vegetačné obdobie pred zberom má za

následok predĺženie dormancie približne o mesiac. Naopak suché a teplé počasie znižuje vegetačný pokoj zhruba o 9 týždňov (BURTON 1978).

V závislosti od kultivaru môže extrémne horúce počasie nad 35° C spôsobiť okamžité ukončenie vegetačného pokoja a podporiť sekundárny rast (VAN DEN BERG et al. 1990). Tento fenomén popisujú ako fyziologickú poruchu známu ako tepelné pučanie alebo pučanie pri vysokej teplote. K podobnému výsledku dospeli aj VAN ITTERSUM a SCHOLTE (1992). Vysoká teplota 32° C v závislosti od kultivaru spôsobovala pučanie hľúz, a taktiež na ne pôsobila škodlivo. Dochádzalo k hnednutiu pupeňov a strate životaschopnosti. Skladovanie v teplých podmienkach pri 28° C a následné premiestnenie do 18° C skrátilo obdobie pokoja priemerne o 2 až 3 týždne u všetkých sledovaných kultivarov. Taktiež skladovanie pri chladných teplotách 2° C a následné premiestnenie do 18° C skracovalo dormanciu priemerne o 2 týždne (VAN ITTERSUM a SCHOLTE 1992). TABORI et al. (1999) sledovali taktiež vplyv chladu na dormanciu. Hľuzy skladované pri 5° C preukazovali zvýšenú dobu vegetačného pokoja oproti hľuzám, ktoré boli uskladnené pri 10-20° C. Títo autori došli k záveru, že účinky nízkych teplôt sú výraznejšie pri odrodách, ktoré sa preukazujú dlhšou dobou dormancie.

Nižšie teploty môžu napomáhať výstupu z dormancie, avšak až po určitej dobe. Po prekonaní endodormancie sú hľuzy vplyvom chladu udržiavané v ekodormancii. Nízka teplota zrejme pôsobí aj na zníženie koncentrácie rastových inhibítorov. Pučanie hľúz, ktoré sú prenesené z chladu do indukčných podmienok je preto vyrovnannejšie a rýchlejšie. Dlhodobejšie vystavenie nízkym alebo vysokým teplotám má za následok ukončenie dormancie a ich urýchlené pučanie nasleduje po prenesení do miernych teplôt.

U hľúz uskladnených pri zvýšenom obsahu kyslíka O<sub>2</sub> (40 %) a oxidu uhličitého CO<sub>2</sub> (20 %) sa skrátila doba dormancie (COLEMAN 1998). BURTON (1978) popisuje aj vplyv nízkej koncentrácie O<sub>2</sub> ako optimálnej pre začatie pučania a rastu a skrátenie dormancie. Skrátenie dormancie možno čiastočne vysvetliť interakciou plynov a fytohormónov. Dochádza

k poklesu koncentrácie ABA v dormantných hľuzách a k rýchlejšiemu začiatku pučania (COLEMAN 1998).

Predĺženie dormantného obdobia dosiahneme buď skladovaním hľúz pri nízkych teplotách alebo pomocou rastových inhibítorov. Avšak nízke teploty spôsobujú degradáciu škrobu a redukujú cukrov. Toto znižuje ich kvalitu, najmä keď sú určené pre priemyselné využitie. Skracovanie dormancie môžeme dosiahnuť rôznymi spôsobmi, napríklad skladovaním v ochrannej atmosfére s nízkou koncentráciou kyslíka alebo poškodením hľúz mechanicky, prípadne v kombinácii s ošetrením chemickými látkami podporujúcich skrátenie dormancie (SONNEWALD 2001).

### **3.5.2 Vplyv svetla a sacharózy**

Dormancia môže byť ovplyvňovaná aj počas tuberizácie a následného rozvoja hľúz. COLEMAN a COLEMAN (2000) uvádzajú, že pri skladovaní hľúz pri 8 h fotoperióde oproti kontinuálnej tme došlo k výraznému zníženiu času vegetačného pokoja. Doba skrátenia bola odlišná v závislosti od kultivaru. K účinnejšiemu skráteniu dormancie dochádzalo pridaním sacharózy do indukčného média s kombináciou 8h svetla. Vyššie koncentrácie sacharózy v indukčnom médiu (12-16 %) skracovali dormanciu u rastlín kultivovaných pri 8 h svetle, ale aj v kontinuálnej tme. Naopak nižšia koncentrácia (4 %) mala vplyv na jej predĺženie. Vplyv zvýšenej sacharózy bol taktiež v závislosti od použitého kultivaru (COLEMAN a COLEMAN 2000).

Všeobecne platí, že dĺžka fotoperiódou preukazuje len mierny vplyv na vegetačný pokoj. Hľuzy držané v tme mali mierne predĺžené obdobie pokoja v porovnaní s hľuzami, ktoré boli uskladnené pri fotoperióde krátkych dní (TABORI et al. 1999). Cytokinín 6-benzylaminopurin (BA) je schopný urýchliť tvorbu hľúz (HUSSEY a STACEY 1984). BA v spojení s 8h fotoperiódou počas indukcie hľúz mal za následok skrátenie dormancie, ale len pri určitom kultivare (COLEMAN a COLEMAN 2000).

Vplyv svetla na skrátenie dormancie sa odvíja hlavne od jednotlivých genotypov. Popríklad teplota, koncentrácia sacharózy alebo rastové regulátory v spojení s fotoperiódou krátkeho dňa môžu znásobovať účinok svetla na skrátenie dormancie. V priebehu skladovania má prítomnosť alebo neprítomnosť svetla len malý vplyv na dobu vegetačného pokoja, ale výrazne ovplyvňuje morfológiu vznikajúcich pupeňov (SUTTLE 2007).

### **3.6 Vplyv vnútorných faktorov ovplyvňujúcich dormanciu**

Koncentrácia fytohormónov v dormantných hľuzách sa mení v priebehu vegetačného pokoja. Preto ich vzájomné interakcie zohrávajú úlohu v regulácii dormancie. Vnútorné faktory zahrňujú vplyv mnohých génov, ktoré sú exprimované jednotlivo počas vegetačného pokoja. Interakcie vnútorných faktorov sa odvíjajú od daného genotypu. Medzi hlavné fytohormóny ovplyvňujúce dormanciu patria auxíny, cytokiníny, giberelíny, kyselina abscisová a etylén. Z ďalších s môžu uplatniť brassinosteroidy, kyselina jasmonová a fenolové zlúčeniny. Každý z fytohormónov ovplyvňuje viacero odlišných procesov. Sú syntetizované vo viacerých miestach rastlín a nie sú tak špecifické ako živočíšne hormóny.

#### **3.6.1 Účinok auxínov**

Auxíny patria medzi prvé objavené fytohormóny. Ako prvá bola identifikovaná kyselina indolyl-3-octová (IAA) v ľudskom moči a neskôr bola potvrdená aj vo vyšších rastlinách (MACHÁČKOVÁ 1998). Medzi ďalšie prirodzené auxíny patria indolyl-3-maslová kyselina, kyselina fenylactová, 4-chlor-indolylactová kyselina. V rastlinách sa najčastejšie vyskytuje IAA, jej koncentrácia závisí na druhu a veku rastliny, ale aj od obdobia a podmienok, za ktorých rastie (GASPAR et al. 1996). Syntetickými auxínmi nazývame látky podobného účinku IAA. Sú to 1-naftylactová kyselina (NAA), picloram, kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová (2,4-D). Auxíny sú syntetizované hlavne v apikálnych meristémoch



a transportované bazipetálne (MACHÁČKOVÁ 1998). Auxíny tvoria konjugáty aj s malými molekulami (monosacharidov, aminokyselín). Zdá sa, že takýto mechanizmus na ukladanie auxínov v bunkách slúži k stabilizácii úrovne voľného auxínu. Auxín v konjugovanej molekule je chránený pred oxidačným zničením a v prípade potreby môže byť enzymaticky uvoľnený (GASPAR et al. 1996).

Auxíny v rastlinách stimulujú apikálnu dominanciu, potláčajú rast axilárnych pupeňov a stimulujú tvorbu bočných koreňov. Ďalej podporujú gravitropizmus a fototropizmus, stimulujú delenie buniek (ovplyvňujú DNA replikáciu) a majú vplyv na diferenciáciu cievnych zväzkov. Sú v antagonistickej vzťahu s CK a ich rôznych pomer v médiu má fyziologickú odozvu napríklad na zakoreňovanie.

Z praktického hľadiska majú auxíny silný vplyv na procesy ako je rast a expanzia buniek, okysľovanie bunkovej steny, iniciáciu bunkového delenia a zúčastňujú sa dediferenciácie pletív na kalus alebo definovaných orgánov (spravidla koreňov) a tak podporujú zakoreňovanie (GASPAR et al. 1996).

Auxíny patria medzi hlavné, rast stimulujúce hormóny. Ich úloha v dormancii hľúz a následnom pučaní nie je veľmi jasná. Pomocou plynovej chromatografie spolu s hmotnostnou spektrometriou SORCE et al. (2009) zistili, že koncentrácia auxínu (IAA a konjugovaných foriem) bola všeobecne najvyššia v ranných fázach dormancie (po zbere). Čerstvo zozbierané hľuzy akumulujú hormón prevažne v apikálnom meristéme, v axilárnych pupeňoch a vo vodivých pletivách, ktoré ležia pod apikálnym meristémom. Na konci dormancie len axilárne pupene vykazovali výraznejšie úrovne auxínov. Expresia génu z *Agrobacterium rhizogenes* *rol C* má za následok zvýšenie obsahu IAA a zmenu morfológie hľúz, čo zrejme súvisí s nižšími koncentraciami ostatných fytohormónov. Žiadne účinky na dormanciu neboli zaznamenané (SCHMÜLLING et al. 1993). Hladina transkriptov kódujúcich enzýmy súvisiacich so syntézou auxínov vzrástla počas ranných fáz pučania pupeňov. Došlo k aktivácii niekoľkých primárnych génov pre syntézu auxínov a taktiež génov pre PIN1 proteíny, ktoré slúžia na ich transport (HARTMAN et al. 2011).

Exogénne dodané syntetické auxíny (2,4-D, NAA) vyvolávajú výraznejšiu inhibíciu rastu pupeňov a zdĺhavejšiu dormanciu (SUTTLE 2003). IAA v nízkych koncentráciách neinhibuje pučanie pupeňov, naopak, u niektorých kultivarov pôsobila stimulačne (HEMBERG 1949). K podobnému záveru dospeli aj RAPPAPORT et al. (1965). Vyššia koncentrácia exogénnych auxínov potlačovala pučanie a nižšia koncentrácia sa prejavovala ako mierny stimulant.

Auxíny môžu mierne skrátiť obdobie pokoja, a to stimuláciou skorých rastových procesov, aj to v závislosti na kultivare (SORCE et al. 2009). Endogénne auxíny zrejme nepatria medzi dôležité regulátory dormancie hlúz. Ich úloha sa prejavuje hlavne v následnej regulácii rastových výhonov. Ich možné primárne zapojenie v regulácii dormacie treba jasne preukázať, dovedy budú len v roli sekundárnych regulátorov.

### 3.6.2 Účinok cytokinínov

CK sa vyskytujú ako voľné zlúčeniny alebo viazané vo forme glukozidov alebo ribozidov. Najčastejšie aplikované CK v rastlinných explantátových kultúrach sú zeatin, kinetin, 6-benzyladenin (BA), dihydro-zeatin (DHZ), dihydro-zeatin ribozid (DHZR), izopentyladenín (iP), meta-topolin (mT) a zeatin ribozidu (ZR). Cytokiníny obsahujú izoprenoidný postranný reťazec pripojený k N-6 polohe adenínu. Táto konfigurácia je základom pre ich biologickú aktivitu. Ich štruktúra teda pochádza z adenínu. BA patrí medzi aromatické CK. Niektoré substituované močoviny vykazujú podobnú aktivitu ako CK. Regulácia aktivity a hladiny CK prebieha tvorbou konjugátov O-glukozidov a N-glukozidov. O-glukozidy vykazujú, narozdiel od N-glukozidov, biologickú aktivitu. Odštiepenie bočného reťazca za tvorby adenínu sa deje pomocou cytokinínoxidázi/dehydrogenázy (CKX) (GASPAR et al. 1996, MACHÁČKOVÁ 1998).

CK regulujú bunkové delenie pri spoločnom pôsobení auxínov. Každý má vplyv v inej fáze bunkového cyklu. Podporujú laterálny rast pupeňov, potlačujú apikálnu dominanciu a podporujú expanziu listu. Tiež spomaľujú

senescenciu listov, stimulujú syntézu chlorofylu a chloroplastový rozvoj. Biosyntéza CK prebieha v koreňoch rastlín a hlavne v plastidoch.

Mnoho aspektov bunkového rastu, diferenciácie buniek a organogenézy v explantátových kultúrach a v orgánoch je kontrolovaných interakciou medzi CK a auxínmi. Potrebný pomer fytohormónov sa líši v závislosti na druhu rastliny, kultúrnych podmienkach a aj formy aplikácie hormónov. Auxín aj CK sú zvyčajne nutné pre rast a morfogénu. Auxín môže inhibovať akumuláciu CK, zatiaľ čo CK môžu inhibovať aspoň niektoré prejavy auxínu (GASPAR et al. 1996).

CK sú účinnými regulátormi vegetačného pokoja hľúz. Uľahčujú prechod z dormancie na následný aktívny rast pupeňov. Bioaktívne CK majú nízky obsah v spiacich hľuzách. Následné vystupovanie z dormancie a začiatok pučania je sprevádzané zvyšovaním obsahu aktívnych CK (KODA 1982). K podobnému záveru došli aj TURNBULL A HANKE (1985). Počas hlbokého spánku bol obsah CK v hľuzách nízky. Postupne sa však zvyšoval a najvyššie hodnoty dosahoval pred pučaním a počas pučania pupeňov. Konečná fáza dormancie bola sprevádzaná zvýšením koncentrácie CK v hľuzách alebo zvýšením citlivosti na CK. Zvýšená úroveň citlivosti hľúz na CK umožňuje endogénnym CK ich účinok a aktivitu.

Použitie prírodných a syntetických CK na dormantné hľuzy preruší obdobie vegetačného pokoja a to vedie k pučaniu mnohých pupeňov (HEMBERG 1970). Aplikovaním CK izomérov (*trans-Z* a *cis-Z*) bola dormancia včasne prerušená. To naznačuje potenciálnu úlohu týchto izomérov v regulácii vegetačného pokoja (SUTTLE a BANOWETZ 2000). Ukázalo sa, že syntetické deriváty CK, fenylnitroimidazol alebo nitroguanidín, boli účinnejšie v prerušení vegetačného pokoja mikrohľúz ako tie prírodné. To by mohlo súvisieť s väčšou odolnosťou syntetických CK voči enzymatickej degradácii (SUTTLE 2008).

Bezprostredne po zbere a počas počiatkového obdobia skladovania a dormancie, exogénne aplikované CK nemali žiadny vplyv na dormantné hľuzy (SUTTLE 2001). Po čase, dormantné hľuzy vykazujú postupný nárast citlivosti na CK. Citlivosť aj naďalej narastala počas skladovania a

dormancia tak mohla byť oslabená vplyvom exogénne dodaných CK. Dĺžka skladovania nemá žiadny zjavný vplyv na metabolizmus CK. Zmeny v účinnosti cytokinínov počas dormancie, nie sú výsledkom ich katabolizmu, ale skôr hormonálnej citlivosti alebo transdukcie signálu (SUTTLE 2001).

Dôležitá úloha endogénnych CK v období dormancie bola potvrdená na rastlinách transgénnych zemiakov, ktoré obsahovali gén *CKX* pre tvorbu cytokininoxidázi/dehydrogenázy. Takéto hľuzy teda vykazovali zvýšenú expresiu a syntézu enzýmu, ktorá je zodpovedná za inaktiváciu CK. Vplyv tohto génu mal za následok oneskorenie pučania a rastu pupeňov o 5 až 8 týždňov. Ošetrením týchto hľúz s BA sa obnovil normálny priebeh dormancie a pučanie hľúz. Oproti tomu, transgénne hľuzy so zvýšenou biosyntézou CK mali výrazne skrátenú dobu vegetačného pokoja (HARTMAN 2011).

Úloha CK v regulácii dormancie môže súvisieť so stimuláciou delenia buniek. Zmeny v obsahu CK počas pokoja a schopnosť exogénnych CK skracovať alebo ukončovať obdobia pokoja, naznačuje podstatnú úlohu CK ako regulátorov vegetačného pokoja zemiakových hľúz (SUTTLE 2007).

### 3.6.3 Účinok giberelínov

Giberelíny dostali svoj názov po hube *Gibberella fujikuroi*, ktorá spôsobovala chorobu ryže. Tá urýchlňovala predlžovací rast a spôsobovala poliehanie ryže (MACHÁČKOVÁ 1998). Dnes poznáme viac ako 90 prirodzene sa vyskytujúcich GA. Najznámejšia je kyselina giberelová ( $GA_3$ ). Základnú štruktúru tvorí *ent*-giberelánový skelet. GA sú syntetizované vo všetkých miestach aktívneho rastu. Natívne konjugáty GA O-glukozidy sú považované za potenciálny zdroj voľných GA (GASPAR et al. 1996).

GA môžu podporovať kvitnutie, najmä v druhoch, ktoré vyžadujú dlhé dni alebo jarovizáciu. Podporujú klíčenie semien a predlžovací rast stonku (zvyšovaním bunkového delenia). Ak sú GA pridané do kultivačného média, často znižujú alebo zabraňujú tvorbe koreňov, výhonov, alebo somatických

embryí. GA môžu tiež zmeniť dostupnosť endogénneho auxínu (GASPAR et al. 1996).

GA majú početné interakcie s inými hormónmi. GA indukovaná  $\alpha$ -amyláza je inhibovaná pôsobením ABA. Etylén podporuje schopnosť stoniek reagovať na GA. GA inhibujú starnutie v listoch a okvetných lístkoch, ktoré je vyvolávané účinkami ABA a etylénu. Existuje mnoho chemikálií, ktoré účinne inhibujú biosyntézu GA. Tieto inhibítory môžu niekedy podporovať tvorbu koreňov (GASPAR et al. 1996, MACHÁČKOVÁ 1998).

BRIAN et al. (1955) medzi prvými uviedli skrátenie dormancie vplyvom GA. RAPPAPORT et al. (1958) uviedli, že aplikovanie GA vo forme postreku na vňať pred zberom výrazne podporovalo skoré pučanie hlúz. Ošetrovanie dormantných hlúz s GA stimuluje predčasné pučanie hlúz zemiakov a bolo schválené pre komerčné použitie (CLAASSENS a VREUGDENHIL 2000). V Iráne je  $GA_3$  veľmi často používaná na prerušenie vegetačného pokoja mikrohlúz (SALIMI et al. 2010).

$GA_3$  účinne skrátila obdobie pokoja, ale jej účinnosť bola závislá od kultivaru. Pupene z ošetrovaných hlúz majú tendenciu byť dlhé, tenké, krehké a náchylné k poškodeniu pri manipulácii a výsadbe. To môže obmedziť komerčné použitie  $GA_3$  (SALIMI et al. 2010).

Obsah endogénnych GA ako  $GA_{19}$ ,  $GA_{20}$  a  $GA_1$  je relatívne vysoký ihneď po zbere. Klesá počas skladovania a najvyšších hodnôt dosahuje v období silného rastu (SUTTLE 2004). Je zaujímavé, že v čase prvotného pučania vnútorné hladiny niektorých skúmaných GA boli nižšie ako tie v hlboko dormantných hlúzach. Trpasličie mutanty zemiakov neobsahovali žiadne zistiteľné množstvo  $GA_1$ . Napriek tomu ich vývoj bol rovnaký v ktorejkoľvek fáze pokoja ako u ich normálneho fenotypu. Umelé zníženie obsahu endogénneho  $GA_{20}$  a  $GA_1$  metódou „antisense“ na expresiu génu *GA20ox1*, ktorý je zodpovedný za biosyntézu GA, neovplyvňovalo trvanie vegetačného pokoja, ale spomaľovalo následný rast výhonov (CARRERA et al. 2000). Použitie rôznych inhibítorov biosyntézy GA v mikrohlúzach malo za následok stimuláciu predčasného pučania (SUTTLE 2004).

Po ukončení dormancie, pred viditeľným rastom výhonov, dochádza k mobilizácii redukujúcich cukrov. Nárast redukujúcich cukrov je zrejme vyvolaný stimulom vo forme GA (BAILEY et al. 1978). GA môžu ovplyvňovať metabolizmus sacharidov ale taktiež môžu uľahčovať pohyb CK k pupeňom. To môže úzko súvisieť so zvýšeným bunkovým delením v okolí pupeňov. Tieto nové bunky môžu pôsobiť ako sinky sacharidov, a tak vyvolávajú ďalšie delenie škrobu. Výsledné cukry môžu byť prevedené do pupeňov a tak zodpovedať za ich nárast (ALEXOPOULOS et al. 2007).

Transgénne rastliny so zníženým obsahom endogénnych CK nereagovali na ošetrovanie pomocou externe aplikovanej GA<sub>3</sub>. Tento výsledok viedol k záveru, že GA vyžadujú prítomnosť CK na indukciu pučania hľúz a CK sú nevyhnutné pre počiatok dormancie. V súlade s tým, transgénne rastliny nesúce gén pre izopentenyl transferázu, na zvýšenie endogénneho obsahu CK, podporovali GA sprostredkované pučanie hľúz *in vitro* (HARTMAN 2011).

Prirodzene vyskytujúce sa endogénne GA nemajú výrazný vplyv na reguláciu dormancie sami o sebe, ale skôr podporujú následný rast. Zvýšenie endogénnych GA môže byť skôr dôsledok ukončenia dormancie ako jej príčina.

Naopak exogénne dodávané GA mali vplyv na skrátenie dormancie. Jednotlivé odrody reagujú odlišne na ošetrovanie GA, väčšinou v závislosti na hĺbke a trvaní dormancie. Vplyv GA sa môže taktiež prejavovať ovplyvňovaním redukujúcich cukrov alebo podporou účinnosti CK.

#### **3.6.4 Účinok kyseliny abscisovej**

ABA patrí medzi látky inhibujúce rast a vývoj rastlín. V rastlinách sa ABA najbežnejšie vyskytuje vo forme S-(+)-izomer, často nazývaný cis izomér alebo jednoducho ABA. Na rýchle reakcie sa uplatňuje aktívna forma cis-izomér, ale na pomalé reakcie sa môže uplatňovať aj málo aktívny trans-izomér. Syntéza ABA prebieha v dormantných orgánoch, ale aj

v mladých listoch a koreňoch a najviac v chloroplastoch (GASPAR et al. 1996).

ABA je teda často považovaná za inhibítor. Reguluje dormanciu pupeňov a semien, inhibuje auxínom vyvolané okysľovanie bunkovej steny, spomaľuje bunkové predlžovanie. ABA má kľúčovú úlohu pri uzatváraní prieduchov (zníženie transpirácie), kontroluje príjem vody a iónov koreňmi. Spolu s ďalšími fytohormónmi, stimuluje opad listu a starnutie. ABA indukuje syntézu zásobných proteínov v rozvíjajúcich semenách. ABA spolu s etylénom a JA pomáha pri obrane proti hmyzu. Etylén a ABA sú hlavné faktory obrany rastlín voči stresu. V meristémových kultúrach, externe aplikovaná ABA môže ovplyvniť (pozitívne pri nízkych koncentráciách a negatívne pri vysokých koncentráciách) rast kalusu a organogézu (GASPAR et al. 1996, MACHÁČKOVÁ 1998).

Pôsobí antagonisticky na GA v mnohých systémoch. Môže modifikovať syntézu alebo aktivitu CK. V inom prípade môže sa zvýšiť oxidáciu IAA (GASPAR et al. 1996).

Priamy prekurzor ABA je xantoxín, ktorý vychádza z karotenoidov. Fluridon (FLD) a norfurazon blokujú syntézu ABA, ale ich činnosť nie je špecifická, pretože pôsobia ako inhibítory biosyntézy karotenoidov (GASPAR et al. 1996, MACHÁČKOVÁ 1998, GAMBLE a MULLET 1986).

ABA je jedným z hlavných hormonálnych regulátorov dormancie. Je potrebná pre začatie a udržovanie dormancie. Ukázalo sa, že obsah ABA v pupeňoch a v parenchýme sa zvýšil po nástupe vegetačného pokoja. Najvyššiu koncentráciu dosahovala počas hlbkej dormancie a prudko klesla na konci vegetačného pokoja (SUTTLE 1995). Obsah ABA v hľuzách bol taktiež znížený po umelom prerušení dormancie (SUTTLE 2007).

Umelé zníženie obsahu ABA pomocou inhibítora ABA biosyntézy FLD, malo za následok predčasné vystúpenie z dormancie (SUTTLE 1995). Po 9 týždňoch rastu boli vytvorené hľuzy pozbierané a zostali nečinné po dobu nasledujúcich 15 až 20 týždňov (SUTTLE a HULTSTRAND 1994). Dlhodobé pôsobenie FLD počas dormancie malo za následok predčasné pučanie už po 3 až 6 týždňoch kultivácie. Aplikovanie ABA na hľuzy

ošetrené FLD obnovilo endogénny obsah ABA a potlačilo pučanie hľúz. Okrem toho, použitie FLD na hlboko dormantné hľuzy malo rovnako za následok predčasné pučanie hľúz. Tieto výsledky sú v súlade s kľúčovou úlohou endogénneho obsahu ABA, ktorá je vyžadovaná pri navodení a udržiavaní dormancie hľúz (SUTTLE a HULTSTRAND 1994).

Analýzy vykonané na molekulárnej úrovni taktiež potvrdili významnú úlohu ABA v regulácii dormancie hľúz. Pomocou QTL mapovania génov sa určili aspoň dva lokusy, ktoré boli spojené s dormanciou a reguláciou hladiny ABA (SIMKO et al. 1997).

Hladina expresie génov *StNCED*, ktoré sa podieľajú na biosyntéze ABA, korelovala s obsahom ABA v priebehu vegetačného pokoja v meristémoch. Ukončenie dormancie buď prirodzene počas skladovania alebo umelo, prostredníctvom chemického ošetrenia je sprevádzané zvýšenou expresiou génov *StCYP707A*, ktoré sa uplatňujú v katabolizme ABA (DESTEFANO-BELTRÁN et al. 2006 a,b). Tieto pozorovania naznačujú, že pokles obsahu endogénnej ABA je predpokladom pre výstup z vegetačného pokoja.

Exogénne aplikovaná ABA nemá podstatný vplyv na dobu vegetačného pokoja, čo môže byť zapríčinené rýchlym metabolizmom ABA v tkanivách hľúz (SUTTLE a HULTSTRAND 1994, DESTEFANO-BELTRÁN et al. 2006b).

Trvalé zvýšenie endogénneho obsahu ABA nemalo žiadny vplyv na dĺžku trvania pokoja mikrohľúz. Hoci pokles obsahu ABA charakterizuje priebeh vegetačného pokoja v hľuzách, zdá sa, že nie je nevyhnutným predpokladom pre ukončenie vegetačného pokoja (SUTTLE et al. 2012).

ABA zohráva zásadnú úlohu v iniciácii a udržiavaní dormantného stavu hľúz. Pri ukončení dormancie a následnom pučaní hľúz je už jej úloha menej jasná. Pre ukončenie dormancie zrejme neexistuje žiadna prahová koncentrácia ABA (SUTTLE 1995). Ukončenie dormancie je skôr pôsobenie viacerých faktorov. Ani trvalé zvýšenie obsahu ABA nemá vplyv na dobu vegetačného pokoja (SUTTLE et al 2012).



### 3.6.5 Účinok etylénu

Etylén je jediný známy plynný hormón rastlín. Tento plyn podporuje dozrievanie ovocia, starnutie a opad listu. Potláča predlžovací rast a : zvyšuje tvorbu obranných látok. Pôsobí teda ako obranný faktor (GASPAR et al. 1996, MACHÁČKOVÁ 1998).

Vplyv auxínov na rastliny môže byť ovplyvňovaný zvýšenou syntézou etylénu. Auxíny zvyčajne stimulujú produkciu etylénu a CK zase inhibujú. Pri vyšších koncentráciách etylénu sa môže meniť orientácia mikrotubulov a mikrofibríl, čo vedie k zníženiu bunkového predĺženia a k zvýšeniu expanzie buniek (GASPAR et al. 1996).

Etylén ovplyvňuje rast kalusu a suspenzných kultúr. Vplýva na embryogenézu, zakoreňovanie a na predlžovanie stonky a koreňa. Účinky etylénu sa odlišujú od vývojovej etapy rastliny. Pri nízkych koncentráciách môže pôsobiť stimulačne ale niekedy tiež inhibične. Vyššie koncentrácie tohto plynu pôsobia presne opačne (GASPAR et al. 1996).

Biosyntéza etylénu vychádza z metionínu. Medziproduktom je S-adenozylmetionín a ten pomocou ACC-syntázy sa premieňa na etylénový prekurzor kyseliny 1-aminocyklopropan-1-karboxylovú (ACC). ACC je často limitujúcim faktorom pre etylén. Niektoré chemikálie môžu inhibovať účinok etylénu tým, že bránia tvorbe väzby etylénu s aktívnym miestom. Patria sem 2,5-norbornadien, ióny striebra (tiosíran alebo  $\text{AgNO}_3$ ), chelátory a vysoké koncentrácie oxidu uhličitého (GASPAR et al. 1996, MACHÁČKOVÁ 1998).

Etylén podporuje začiatok dormancie. Avšak jeho úloha v tomto a následných procesoch nie je úplne objasnená. Účinky exogénne dodávaného etylénu sú závislé od kultivaru a trvaní liečby. RYLSKY et al. (1974) preukázali, že 72-hodinové ošetrenie etylénom spôsobilo skrátenie dĺžky dormancie, ale kontinuálna expozícia potlačovala rast pupeňov.

Zníženie koncentrácie etylénu počas skladovania zvýšilo trvanie dormancie a znížilo celkový počet pupeňov po 35 dňoch (WILLS et al.

2004). Produkcia etylénu v neporušených dormantých hľuzách bola veľmi nízka, ale stúpala s rastom a pučaním pupeňov (OKAZAWA 1974).

Transgénne rastliny obsahujúce *ETR1* gén pre produkciu etylénu, preukazovali veľké zmeny fenotypu. Skladovanie pri teplote 20° C nespôsobilo žiadnu zmenu v trvaní dormancie. Transgenné hľuzy skladované pri teplote 4° C boli nečinné počas 2 rokov (HAINES et al. 2003). Nie je jasné, či to naznačuje zmenu v trvaní vegetačného pokoja, alebo to odráža prehnanú citlivosť voči nízkym teplotám.

Produkcia etylénu bola najvyššia počas počiatkovej fázy dormancie a potom prudko klesala (SUTTLE 1998). Počiatkové prechodné zvýšenie produkcie etylénu môže byť odpoveďou na namáhanie a poškodenie tkaniva, ktoré sprevádzajú zber (SUTTLE 2007). Použitie dusičnanu strieborného (AgNO<sub>3</sub>) alebo 2,5-norbornadien, ktoré inhibujú účinky etylénu, viedlo k predčasnému pučaniu hľúz. Použitie exogénne dodaného etylénu na takéto hľuzy, inhibovalo predčasné pučanie (SUTTLE 1998). Je zaujímavé, že doba citlivosti na etylén bola pozorovaná iba počas počiatkovej fázy dormancie.

Bolo preukázané, že endogénny etylén hrá zásadnú úlohu v indukcii dormancie hľúz a priamo vyvoláva endodormanciu mikrohľúz (SUTTLE 1998). Jeho ďalší účinok je formou štúdií.

Exogénne aplikovaný etylén v určitej miere, môže ovplyvňovať dĺžku dormancie. Jeho účinok bude zrejme tiež závislý od kultivaru, kultivačných podmienok a dĺžky expozície.

Etylén spolu s ABA spoluúčinkujú v udržiavaní dormancie. Ich vzájomné interakcie sú známe vo viacerých fyziologických procesoch (DE BRUXELLES a ROBERTS 2001).

### **3.6.6 Vplyv ostatných rastových regulátorov**

Brassinosteroidy (BS) sú aktívne regulátory rastu rastlín. Ich názov je odvodený od repky (*Brassica napus*). Úloha BS v dormancii hľúz je málo študovaná. KORABLEVA et al. (2002) aplikovali na hľuzy v hlbokaj

dormancii 2,4-epibrasinolid. Ošetrované hľuzy vykazovali predĺženie dormancie a oneskorenie pučania hľúz viac ako jeden mesiac. Toto taktiež viedlo k zvýšenej tvorbe etylénu a akumulácie voľnej a viazanej ABA v pupeňoch. Účinok BS bol sprevádzaný znížením veľkosti buniek v jednotlivých meristémoch. Taktiež dochádzalo k zvýšeniu počtu vakuol a zníženiu ich objemu (KORABLEVA et al. 2002).

Kyselina jasmonová a jej deriváty, ako už bolo popísané, sú zlúčeniny podporujúce zakladanie hľúz. Obsah jasmonátov v rastlinách ľuľka zemiakového sa mení počas doby rastu. Prekvapivo najvyššie hodnoty sa vyskytujú v hľuzách s nástupom hlbokého spánku (ABDALA et al. 2000).

Podrobnú analýzu JA a jej derivátov vykonali SUTTLE et al. (2011). V dormantných hľuzách obsah JA zostával nízky. Zvýšil sa s nástupom rastu pupeňov a potom opäť poklesol. Obsah kyseliny tuberónovej počas vegetačného pokoja bol oproti JA vysoký a zostal zvýšený počas celej doby vegetačného pokoja. Obsah jasmonyl-iso-leucinu bol veľmi variabilný a v jednotlivých rokoch sa veľmi líšil.

JA potlačovala alebo stimulovala pučanie hľúz v závislosti na použitej koncentrácii. Aplikácia JA na dormantné hľuzy spôsobovala výrazne štrukturálne zmeny buniek v apikálnom meristéme pupeňov a potom aj počas ich následného rastu (PLATONOVA et al. 2010).

Za účelom narúšania dormancie sú často používané aj chemické látky. Použitie sulfidu uhličitého ( $CS_2$ ) účinne skracovalo dormanciu, ale jeho účinnosť bola závislá od kultivaru. Použitím  $CS_2$  na mikrohľuzy vznikali krátke, silné a vitálne pupene s vysokým obsahom sušiny. V porovnaní s GA, kedy vznikajú dlhé a tenké pupene náchylné k poškodeniu sa  $CS_2$  javí ako lepšia alternatíva (SALIMI et al. 2010). Chemické látky poškodzujú hľuzy a tým skracujú dormanciu. Chemické prípravky Rindit a  $CS_2$  boli účinne použité k prerušeniu dormantného obdobia hľúz. Hlavnou nevýhodou týchto dvoch zlúčenín je ich toxicita pre človeka (CLAASSENS a VREUGDENHIL 2000). Obzvlášť vysoká toxicita a karcinogenita komponentov prípravku Rindit robí z tejto zmesi neprijateľný prípravok pre bežné použitie (KIM et al. 1999, COLEMAN a COLEMAN 2000)

### 3.7 Interakcie fytohormónov

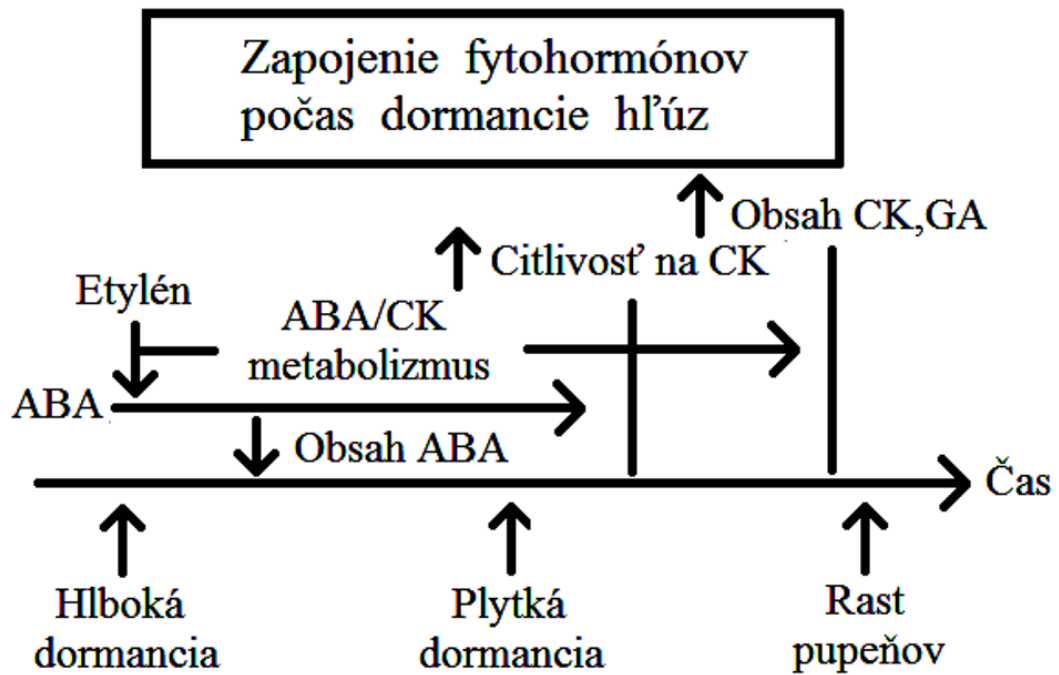
Ako bolo popísané vyššie existuje úzke pôsobenie medzi GA a CK v oblasti regulácie dormancie. Skrátenie dormancie bolo oveľa rýchlejšie ak boli dormantné hľuzy ošetrené zmesou GA<sub>3</sub> a BA, ako keď boli použité samostatne (ALEXOPOULOS et al. 2007). Tento vplyv bol taktiež potvrdený na hľuzách transgénnych rastlín zemiaku, ktoré majú výrazne znížený obsah endogénnych CK. Tieto hľuzy nemohli reagovať na ošetrovanie GA. Tento blok účinku GA bol odstránený aplikovaním BA, ktorý patrí medzi CK (HARTMANN et al. 2011).

ABA a etylén zohrávajú úlohu v indukcii dormancie, ale len ABA je nevyhnutná počas jej priebehu. Počas vystupovania hľúz z dormancie obsah etylénu bol znížený a súčasne prvky súvisiace s aktiváciou IAA sa zvýšili (HARTMANN et al. 2011).

Účinok fytohormónov je taktiež zrejme v interakcii s vonkajšími podmienkami alebo podmienkami skladovania. COLEMAN a COLEMAN (2000) sledovali účinok svetla, konkrétne 8-hodinovej fotoperiody a indukčného média s BA na dĺžku dormancie. Obe tieto komponenty boli účinnejšie pri spoločnom použití ako ich samostatné použitie.

Regulácia dormancie a prerušenie dormancie hľúz je proces, v ktorom sa uplatňuje celý komplex fytohormónov, z ktorých každý plní svoju špecifickú funkciu. Interakcia medzi rôznymi skupinami fytohormónov je koordinovaná v čase. Jednotlivé mechanizmy, koordinujúce obsah, zapojenie a interakcie medzi fytohormónmi sú stále predmetom výskumu.

Regulácia dormancie hľúz ľuľka zemiakového je v záujme spoločnosti. Vytvorenie hľúz s veľmi dlhou dormanciou, alebo naopak krátkou dormanciou až hľúz bez dormancie je v záujme priemyslu. Používanie rastlinných hormónov je zdraviu viac prospešné ako používanie rôznych chemických látok. Hľuzy, ktoré sú v dormantnom stave sú odolnejšie proti chorobám a nestrácajú na nutričnej hodnote, čo je výhodné pre obchod a priemysel, ale aj pre menších pestovateľov.



**Obrázok 4** Schematické znázornenie hormonálnej regulácie v priebehu dormancie (upravené podľa SUTTLE 2007).

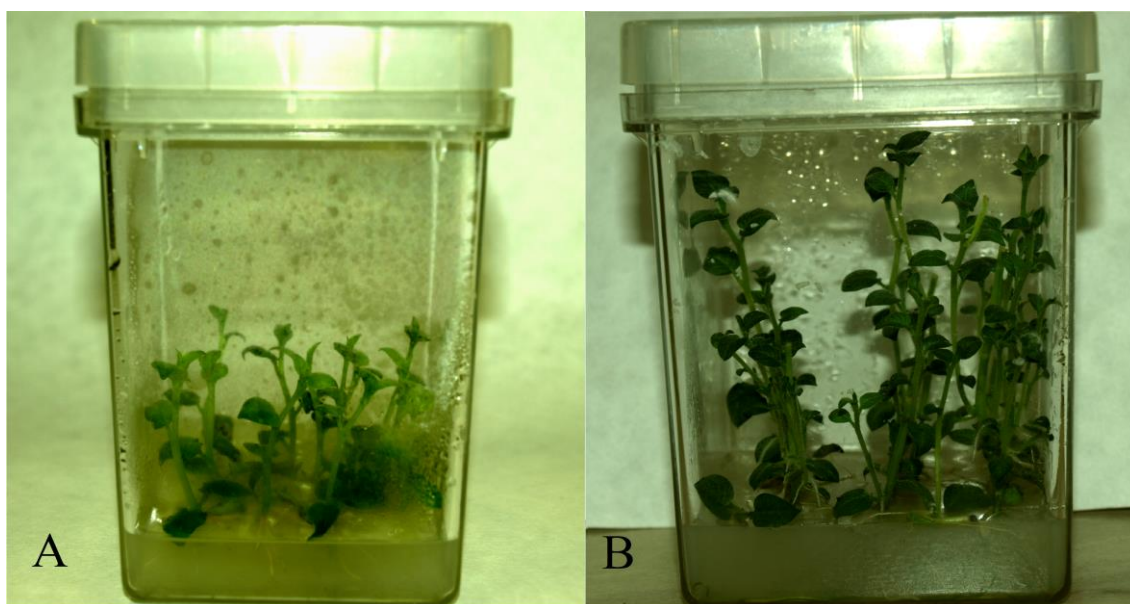
Ako je naznačené na obr. č. 5 etylén a ABA sú uplatňované v indukcii dormancie a ABA aj v následnom udržovaní dormantného stavu. Obsah ABA v priebehu dormancie klesá. V priebehu dormancie sa zvyšuje citlivosť na CK. Dochádza k aktivite CK a zvýšeniu ich obsahu. S prvým viditeľným rastom pupeňov sa zvyšuje aj obsah GA a IAA.

## 4 MATERIÁL A METÓDY

### 4.1 Rastlinný materiál a kultivácia

Na experiment vedený v *in vitro* podmienkach sa použili rastliny ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum L.*) odrody Karin, ktorá patrí medzi skoré odrody a vyznačuje sa aj kratšou dobou vegetačného pokoja.

Rastliny ľuľka zemiakového boli udržiavané v kultivačných nádobách typu Magenta GA-7. Na kultiváciu sme použili MS médium (Murashige a Skoog 1962) s prídavkom sacharózy a agaru. Vysterilizované média v magentách boli uskladnené v chladničke pre ďalšie použitie. Pasážovanie rastlín na udržanie a rozmnoženie kultúry sa uskutočňovalo dekapitáciou apexu a jeho prenesením do nového média. Rastliny boli udržiavané pri 24 h fotoperióde a teplote cca 22° C.



**Obrázok 5** Kultivácia rastlín ľuľka zemiakového v *in vitro* (A-rastliny 10 dní po subkultivácii, B-rastliny pred subkultiváciou a založením pokusu)

Na produkciu hľúz sme použili jednonodálne segmenty rastlín. K podpore tvorby hľúz bola použitá modifikácia MS média so zníženým obsahom dusíku a s prídavkom BA (10mg/l) a sacharózy (80 g/l). Štandardný obsah dusíku 43  $\mu\text{M}$  bol znížený na 20  $\mu\text{M}$ . Po prenesení na indukčné médium

boli rastliny na 3dni ponechané v termostate pri 18° C a v absolútnej tme. Následne boli prenesené pod 8h dĺžku umelého osvetlenia pri teplote 22-23° C. Vytvorené mikrohľuzy boli pozbierané a uskladnené v chladničke pri 5° C a použité v jednotlivých experimentoch. Doba od vytvorenia hľúz, cez skladovanie a začatie experimentu bola cca 7 týždňov.



**Obrázok 6** Indukcia hľúz ľuľka zemiaku v *in vitro* kultúre



**Obrázok 7** Mikrohľuzy ľuľka zemiakového získané po zbere z *in vitro* kultúry

## 4.2 Pokusné varianty

Pre jednotlivé experimenty bolo vytvorených celkom 5 pokusných variant. Boli pripravené roztoky s obsahom jednotlivých látok a veľké množstvo mikrohlúz. Použité mikrohlúzy boli jemne namočené v týchto roztokoch. Jeden z variantov bol kontrolný, čiže neobsahoval žiadnu ďalšiu pridanú látku, iba vodu. Ďalší variant obsahoval FLD s koncentráciou 10  $\mu\text{M}$ , ktorý pôsobí ako inhibítor tvorby karotenoidov a v konečnom dôsledku bráni biosyntéze ABA. Ďalšou použitou látkou bol dusičnan strieborný ( $\text{AgNO}_3$ ) s koncentráciou 10  $\mu\text{M}$ .  $\text{AgNO}_3$  sa viaže na väzbové miesta etylénu a tak potláča jeho fyziologický prejav. Posledná použitá látka bola ABA s koncentráciou 5  $\mu\text{M}$ , ktorá sa podieľa na regulácii dormancie. Jednotlivé varianty boli založené s piatimi opakovaniami.

Jednotlivé varianty boli založené viackrát pre jednotlivé pokusy. V prvom experimente sa sledoval obsah ACC ako prekurzor etylénu, produkcia  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  a tvorba etánu. V ďalšom experimente bol sledovaný obsah CK v hľuzách v priebehu dormancie, taktiež bol stanovovaný ich obsah pred začatím experimentu vo variante s označením Zk. Tretí experiment zahrňoval obsah ABA v priebehu dormancie a k tomuto pokusu bol pridaný variant s obsahom BA (5  $\mu\text{M}$ ) a variant (Zb), ktorý obsahoval čerstvo pozbierané hľuzy a slúžil iba k orientačnému porovnaniu obsahu ABA v čerstvo pozbieraných hľuzách.

## 4.3 Stanovenie ACC, $\text{CO}_2$ , $\text{O}_2$ , etánu a etylénu

Navážka vzoriek z jednotlivých variant sa pohybovala od 0.3-0,5g. Meranie produkcie ACC sa uskutočnilo v 1. a 8. dni od začatia prebiehajúceho experimentu. V 1. dni boli hodnoty všetkých variant rovnaké. Produkcia  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ , etánu a etylénu bola meraná v 1., 2., 3., 5. a 8. dni.



Vzorky používané na stanovenie ACC boli analyzované metódou plynovej chromatografie s detektorom ionizujúcho plameňa (FID), (výrobca FISSONS INSTRUMENT, 50 m kapilárna kolóna Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> "S" 15 um, ID 0,53 mm). Teplota nástreku bola 230° C, kolóny 40° C a teplota detektora 200° C (FIŠEROVÁ et al. 2001).

Produkcii etánu a etylénu sme stanovovali v 1 ml sledovanej atmosféry, ktorá bola odobraná striekačkou, na plynovom chromatografe firmy FISSONS INSTRUMENT, s kapilárnou 24 m dlhou kolónou HP-PLOT/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Detektor dosahoval teplotu 200 °C, nástrek 230° C a teplota kolóny bola 40° C (FIŠEROVÁ a HRADILÍK 1994).

Na stanovenie koncentrácie CO<sub>2</sub> sme použili plynový chromatograf CHROM 5, s katharometrom a 1,5 m dlhou náplňovou kolónou plnenou PORAPAK-om Q (PROKEŠ et al. 2006). Po odbere plynu, ktorý bol určený na analýzu plynovým chromatografom, bol kyslíkovým detektorom digitálneho oxymetru GMH 3691 firmy Dreisinger stanovený percentuálny obsah O<sub>2</sub> v kultivačnej nádobe.

Štatistické hodnotenie bolo realizované po prepočte na štandard etylénu, ACC, CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> v 1 ml ovzdušia, z ktorého bol nástrek odobraný. To zodpovedalo koncentrácii v skúmavke. Na produkciu plynu rastlinného pletiva sa kvôli stanoveniu musela koncentrácia plynu prepočítať podľa hmotnosti vzorku. Stredné chyby a priemery boli spracované graficky. Pri stanovení ACC vznikali veľmi malé stredné chyby a preto nie sú uvádzané.

#### **4.3.1 Postup pri stanovení ACC**

1. Pripravili sa jednotlivé varianty. Navážka sa pohybovala od 0.3-0,5g skúmaných hľúz. Jednotlivé varianty sa zamrazili a skladovali pri teplote cca -18° C.
2. Zhomogenizoval sa materiál v 70% etanole a cez noc sa ponechal v mrazničke.

3. Nasledovala centrifugácia pri 8000 g, ktorá trvala 10 min, ďalej rehomogenizácia a znovu centrifugácia.
4. Spojili sa supernatanty a odparili pri 40° C na vodnú fázu (do cca 1 ml).
5. Prebehla sonikácia ultrazvukom a vzorky sa previedli do mikroskúmaviek „ependorf“
6. Vzorky sa preniesli do 10 ml tuby s vhodným tesnením.
7. Pridalo sa 5  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  a vzorky sa ponechali v ľade. Konverzia ACC k etylénu sa vykonáva za použitia metódy, ktorú popísali CONCEPCION et al. (1979). V tomto kroku, ACC bola oxidovaná v prítomnosti  $\text{HgCl}_2$  k etylénu s použitím chlórnanu sodného podľa rovnice. Účinnosť tejto oxidácie je zvyčajne vyššia ako 80 %.
8. Do tuby sa injekciou pridalo 250  $\mu\text{l}$  vychladeného 5%  $\text{NaOCl}$ :saturovaného v  $\text{NaOH}$  (2: 1).
9. Komplex sa zvortexoval a uložil do ľadu na cca 10 min.
10. Nasledovalo premiešanie a odber 1 ml na plynnú chromatografiu.

#### **4.4 Stanovenie CK**

Na stanovenie endogénnych hladín CK boli odobrané vždy dva vzorky z každého variantu a z každého vzorku sa stanovovali dve opakovania. Vzorky jednotlivých variant boli odobrané na začiatku experimentu pre stanovenie počiatočného obsahu endogénnych CK, ktoré bolo pre všetky varianty spoločné a po 14. a 21. dni vplyvu jednotlivých regulátorov. Stanovenie CK zhŕňa viacero fáz ako extrakcia, purifikácia, stanovenie pomocou HPLC a ELISA.

#### **4.4.1 Extrakcia CK**

Po homogenizácii lyofilizovaného rastlinného materiálu sa pomocou Bieleskiho fixáže odstráni lipidy a lipofilné farbivá centrifugáciou homogenátu pri 2000 g (BIELESKI 1964). Tým sa dosiahne oddelenie supernatantu obsahujúceho CK od chloroformu.

#### **4.4.2 Purifikácia CK**

Po odparení metanolu do vodného zvyšku nasleduje štiepenie ribotidov CK kyselou fosfatázou v 0,04 M acetátamonnom pufri s pH 6,5. Iontomeničová chromatografia za použitia P-celulózy pri pH 3,00 oddelí cytokininový extrakt CK od látok s negatívnym nábojom.

CK a ich ribozidy s parciálnym kladným nábojom sa zachytia na P-celulóze a potom sú z kolóny P-celulózy eluované 0,2 M amoniakom. Po úprave pH na 6,5 pokračuje purifikácia ako chromatografia na reverznej fáze, na DEAE-celulóze spojením s C18 kolónkou (Sep-Pak). CK sa v tomto kroku čistenia zachytia na C18 sorbente. Po elúcii prečistenej CK frakcie metanolom sa vykonáva skoncentrovanie vzoriek odparením metanolu. Potom sú vzorky rozpustené a pred nástrekom na HPLC filtrované.

#### **4.4.3 HPLC separácia**

HPLC separácia bola prevedená na prístroji firmy Ecom. Separácia CK báz a ich ribozidov, prebieha na kolóne Nucloeosil 5 s C18 sorbentom s 250 x 4,6  $\mu\text{m}$  I. D. s veľkosťou pórov 5  $\mu\text{m}$  a prietokom mobilnej fázy 1000  $\mu\text{l}/\text{min}$ . so zložením mobilnej fázy A: metanol, B: 0,05% TFA.

Gradient mobilnej fázy zahŕňa 0-3 min 15% A, 3-11 min 40% A, 11-16 min 60% A. UV signál je detekovaný pri 260 nm a jednotlivé frakcie po sebe nasledujúcich CK sa zbierajú podľa príslušných retenčných časov. Frakcie sa odparujú do sucha a pre ELISA kvantifikáciu sa rozpúšťa v TBS pufri (900  $\mu\text{l}$ ).

#### **4.4.4 ELISA stanovenie**

Na stanovenie CK sa používajú polyklonálne protilátky voči jednotlivým frakciám cytokinínov (STRNAD 1996). Do jamiek mikrotitračnej doštičky sa napipetuje protilátka v roztoku uhličitanového pufru (pH 9,6) a nechá sa inkubovať cez noc. Po premytí doštičky destilovanou vodou sa steny potiahnu roztokom BSA v TBS pufri a nasleduje hodinová inkubácia pri laboratórnej teplote a po premytí destilovanou vodou sa do jamiek napipetuje TBS pufor, štandardy a vzorky, ďalej do všetkých jamiek s výnimkou blanku konjugát alkalickéj fosfatázy a stanovovaného CKR v BSA. Na záver sa napipetuje substrát para-paranitrofenylfosfát rozpustený v uhličitanovom pufri: 1 mg/ml. Po hodinovej inkubácii sa farebná reakcia zastaví 5M KOH.

ELISA sa vyhodnocuje fotometricky pri vlnovej dĺžke 405 nm: obsah CK je nepriamo úmerný absorbancii nameranej v roztokoch jednotlivých jamiek mikrotitračnej doštičky v porovnaní s radom štandardov, minimálne a maximálne väzbou protilátky. Príslušné absorbancie vzoriek sa odpočítajú z kalibračnej krivky.

#### **4.5 Stanovenie obsahu ABA v hľuzách**

Vzorky na stanovenie ABA z rastlinného materiálu RIA metódou sa extrahujú do vody. Navážka rastlinného materiálu sa pohybovala medzi 0,2-0,3g čerstvej hmotnosti. Vzorky z rôznych variant boli odobrané v dvoch opakovaniach a každá vzorka bola taktiež meraná v dvoch opakovaniach.

Po zväžení boli vzorky umiestnené do mrazničky. Po 14 dňoch boli homogenizované v trecej miske pomocou morského piesku a vody. Pomer čerstvej hmotnosti vzorky a destilovanej vody bol 1:10 (na 0,2 g vzorky 2 ml vody). Homogenizované vzorky boli opäť umiestnené do mraziaceho boxu. Homogenizované vzorky sa dali 2-3x rozmraziť, kvôli vymrazeniu chlorofylu a rôznych farbív.

Po ďalších 14 dňoch bola vykonaná extrakcia ABA do vody vytrepáním vzoriek na trepačke. Vytrepávanie prebiehalo v tme pri teplote okolo 5° C po dobu cca 12 hodín. Vzniknutý extrakt bol centrifugovaný pri 2000 g po dobu 5 minút. Tým sa dosiahlo oddelenie supernatantu obsahujúceho ABA od morského piesku, vysokomolekulárnych frakcií a bunecných fragmentov. Obsah ABA bol potom stanovený pomocou metódy RIA.

#### **4.5.1 Princíp radioimunoanalytického stanovenia ABA**

Radioimunoanalytické stanovenie (RIA) ABA je vysoko citlivá kvantitatívne imunochemická metóda (detekčný limit v pg), využívajúca schopnosť rozpoznania molekuly ABA monoklonálnou protilátkou MAC 252 (Quarrie et al. 1988) s veľmi vysokou špecifitou. Princípom metódy je kompetitívna reakcia medzi natívnou molekulou ABA (haptén) a rádioaktívne značenou <sup>3</sup>H-ABA (radioligand) o väzbové miesto protilátky MAC 252. Pri konštantnom množstve tejto protilátky potom dochádza k vytesňovaniu značenej <sup>3</sup>H-ABA z väzby natívnou molekulou ABA. Výsledkom tejto reakcie je vznik dvoch komplexov haptén-protilátka a radioligand-protilátka. Voľné haptény a radioligandy sa vyzrážajú v sírane amónnom a po následnej centrifugácii zostanú v supernatante, ktorý je odstranенý ako radioaktívny odpad. <sup>3</sup>H-aktivita sedimentu je potom meraná technikou kvapalnej scintilácie na oscilačnom spektrofotometri PACKARD 2900 TR. Výsledky sú prepočítané na obsah ABA v analyte v "pg" pomocou programu Securia PACKARD. Kalibračná krivka je zostrojená za použitia štandardnej ABA (+/- cis, trans-ABA, Sigma).

#### **4.5.2 Postup RIA**

Základné komponenty RIA sú špecifické monoklonálne protilátky MAC 252, značený radioligand <sup>3</sup>H-ABA, natívna ABA v analyzovaných vzorkách a štandardy známej koncentrácie ABA pre zostavenie kalibračnej krivky.

1. Príprava štandardov a vzoriek, pripravuje sa B0 (minimálna väzba), BM (maximálna väzba), štandardy a vzorky,
2. pridať 100  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -ABA,
3. pridať 200  $\mu\text{l}$  protilátky MAC 252,
4. pridať 200  $\mu\text{l}$  50% PBS,
5. inkubácia 45 minút v chladničke pri teplote 4° C,
6. pridať 500  $\mu\text{l}$  100%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,
7. inkubácia 30 minút pri laboratórnej teplote,
8. centrifugovať cca 10 minút pri 15 000 g a 4 ° C,
9. odstrániť supernatant odsávačkou,
10. pridať 1 ml 50%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,
11. vortexovať tzn. roztrepať zrazeninu,
12. centrifúgovať cca 8 minút pri 11 000 ot/min a 4° C,
13. odstrániť supernatant odsávačkou,
14. pridať 100  $\mu\text{l}$  destilovanej  $\text{H}_2\text{O}$
15. vortexovať
16. pridať 1 ml dioxanového scintilátoru,
17. pevne uzavrieť, odstrihnúť "uško" eppendorfky vložiť do meracích ampúl, meranie na Packard TRI-CARB 2900TR.

krok č.	symbol ependorfky	B0	BM	S1	S2	S3	S4	S5	vzorka 1 - n
1	redest. H <sub>2</sub> O	50 µl	50 µl	25 µl	-----	-----	30 µl	10 µl	-----
	štandardy	-----	-----	25 µl C <sub>1</sub>	50 µl C <sub>1</sub>	100 µl C <sub>1</sub>	20 µl C <sub>2</sub>	40 µl C <sub>2</sub>	-----
	vzorky	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	50 µl
2	<sup>3</sup> H-ABA	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
3	protilátka MAC	-----	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
4	50% PBS	300 µl	200 µl	200 µl	200 µl	150 µl	200 µl	200 µl	200 µl
6	100% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
10	50% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
14	dest. H <sub>2</sub> O	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
16	diox. scintilátor	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

**Obrázok 8** Pipetovacia tabuľka na postup RIA analýzy zahŕňa jednotlivé dávky roztokov, vzoriek a štandardov.

#### 4.6 Štatistické spracovanie dát

Výsledky jednotlivých parametroch sú vždy aritmetickým priemerom ( $\bar{x}$ ) všetkých hodnôt zo všetkých hodnotených materiálov a ich opakovaní. Získané dáta boli spracované pomocou programu Microsoft Office Excel 2010 a vyhodnotené do grafov. U každého výsledku bola následne určená stredná chyba vo forme chybových úsečiek. Testovanie preukázateľnosti rozdielov medzi variantmi bolo prevedené jednofaktorovou analýzou variácie (ANOVA).

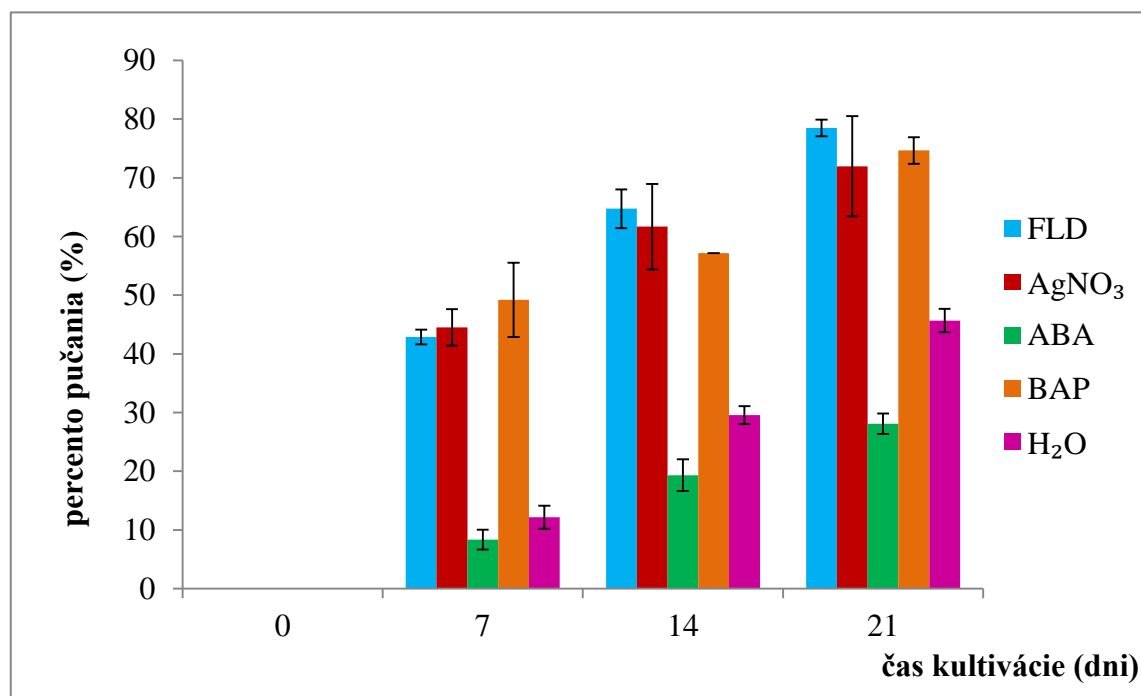
#### 4.7 Fotodokumentácia

Na zhotovenie fotiek sme používali digitálny Olympus FE 4030. Niektoré snímky boli zhotovené pomocou režimu makro.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Dĺžka dormancie u jednotlivých variant

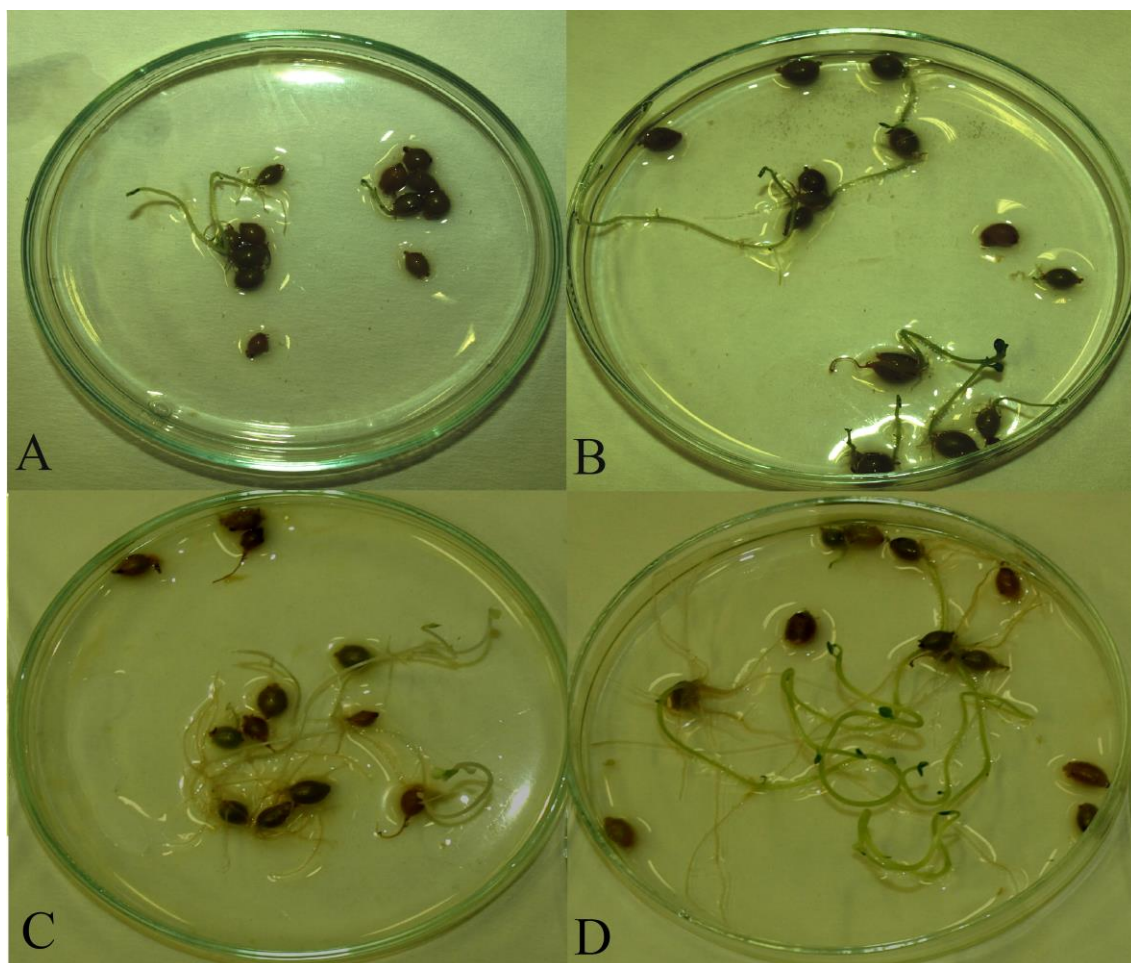
Hľuzy ľuľka zemiakového boli ošetrované pomocou jednotlivých látok (FLD, AgNO<sub>3</sub>, BA a ABA) a sledované po dobu 21 dní. Dĺžka dormancie bola sledovaná v závislosti od použitej látky a jej vplyvu na priebeh dormancie. Ako je naznačené v grafe č. 1., hľuzy ošetrované FLD, AgNO<sub>3</sub> a BA mali značne skrátenú dormanciu a vyznačovali sa skorším pučaním hľúz. Už počas prvých dní sa začal objavovať rast prvých pupeňov. Rozdiel medzi týmito tromi látkami nie je štatisticky významný, ale oproti kontrole a variantom ABA je ich účinok preukázateľný. Najvyššieho rozdielu dosahovali v prvých dňoch sledovania, ale ich vplyv bol významný aj počas ďalších dní. Variant s BA a FLD dosahovali najvyšších hodnôt po 21 dňoch a to 75-80 % pučiacich hľúz. FLD, AgNO<sub>3</sub> a BA sa preukázali ako regulátory dormancie a ako látky stimulujúce pučanie hľúz .



**Graf 1** Regulácia dormancie vplyvom jednotlivých látok v závislosti na čase



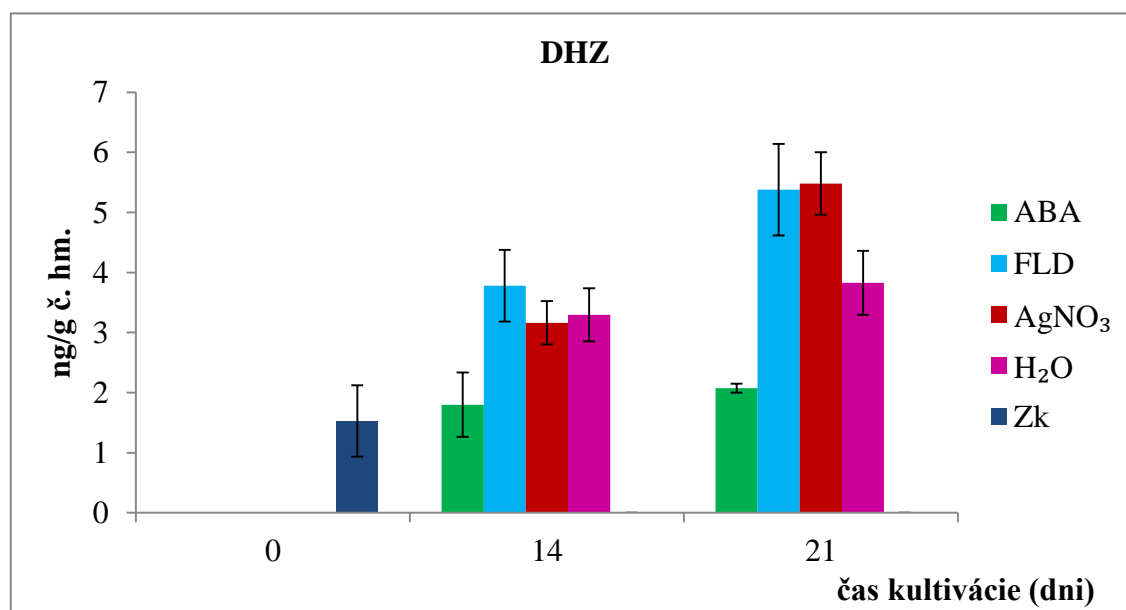
Zvýšená koncentrácia ABA spôsobovala mierne predĺženie dormancie oproti kontrole s H<sub>2</sub>O. Po 21 dňoch dosahuje len niečo pod 30 % napučaných hľúz. ABA mala vplyv aj na pomalý rast pupeňov. Kontrolný variant s vodou sa s percentom napučaných hľúz udržiaval vždy medzi látkami stimulujúcich pučanie (FLD, AgNO<sub>3</sub> a BA) a látkou inhibujúcou pučanie ABA.



**Obrázok 9** Vybrané petriho misky s pučiacimi hľuzami jednotlivých variant po 21 dňoch (A- hľuzy ošetrené pomocou ABA; B- hľuzy ošetrené pomocou AgNO<sub>3</sub>; C- hľuzy ošetrené pomocou FLD; D- hľuzy ošetrené pomocou BA).

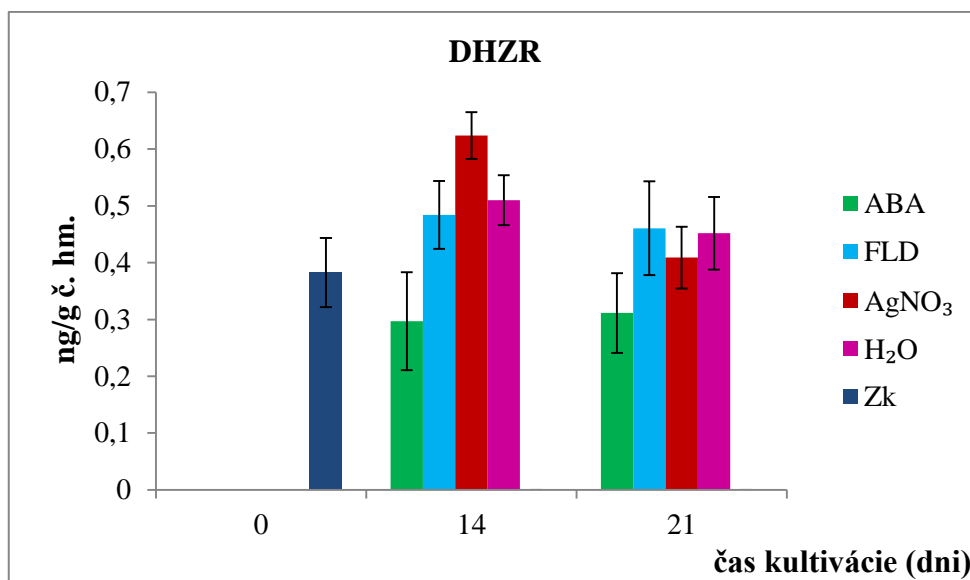
## 5.2 Vplyv jednotlivých variant na obsah endogénnych CK

Obsah jednotlivých endogénnych CK koreluje s pučaním hľúz ,čo je demonštrované na grafe č.1. Koncentrácia CK je vyjadrená v nanogramoch na gram čerstvej hmotnosti (ng/g č.hm). Obsah endogénnych CK bol stanovovaný aj pred začatím experimentu, čo znázorňuje variant s označením Zk.



**Graf 2** Obsah endogénneho DHZ v priebehu pučania hľúz

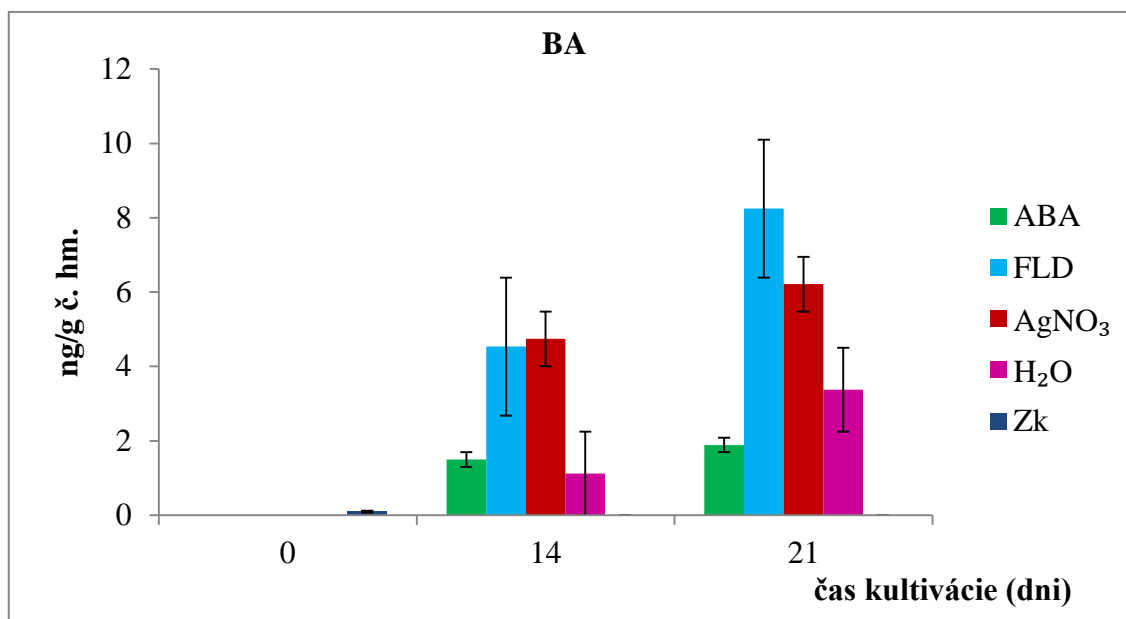
Obsah DHZ sa pred viditeľným pučaním hľúz pohybuje okolo hodnoty 1,5 ng/g. V priebehu pučania dochádza len k miernym nárastom DHZ v závislosti na variante, čo je zobrazené v grafe č. 2. FLD a AgNO<sub>3</sub> dosahujú preukázateľné zvýšenie až po 21 dňoch oproti kontrolnej variante. Obsah DHZ sa mierne navýši pri viditeľnom pučaní hľúz u všetkých variant.



**Graf 3** Obsah endogénneho DHZR v priebehu pučania hl'úz

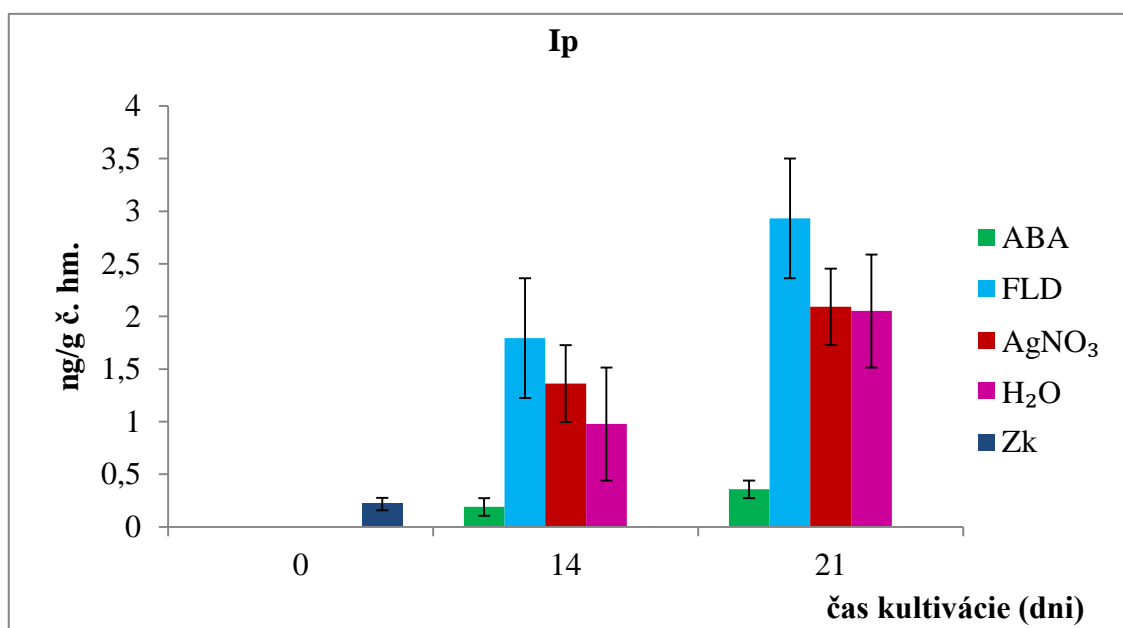
V grafe č. 3 je vidieť, že obsah DHZR je zhruba 10x nižší ako DHZ a je v podstate rovnaký na začiatku a konci experimentu. Zvýšenie alebo zníženie obsahu DHZR v jednotlivých variantoch nie je štatisticky preukázateľné. Štatisticky významnejšie zvýšenie dosahuje AgNO<sub>3</sub> v 14. dni, ale neskôr obsah DHZR klesá. Obsah DHZR je na začiatku a konci sledovania priebehu dormancie takmer zhodný.

Koncentrácia BA v pučiach hl'úz sa v našom experimente preukázateľne zvýšila počas rastu pupeňov (graf č. 4). FLD a AgNO<sub>3</sub> po 21 dňoch dosahujú obsah približne 8 ng/g č. hm. Najvyššie hodnoty BA v týchto variantoch korelujú aj s najvyšším percentom pučiach hl'úz (graf č. 1). ABA a kontrolný variant majú po 14 dňoch preukázateľne nižšiu úroveň BA (cca 1,5ng/g č. hm.). V kontrolnej variante sa jeho obsah zvyšuje, ale u variantu s ABA zostáva jeho obsah nižší aj napriek prvému viditeľnému pučaniu hl'úz.

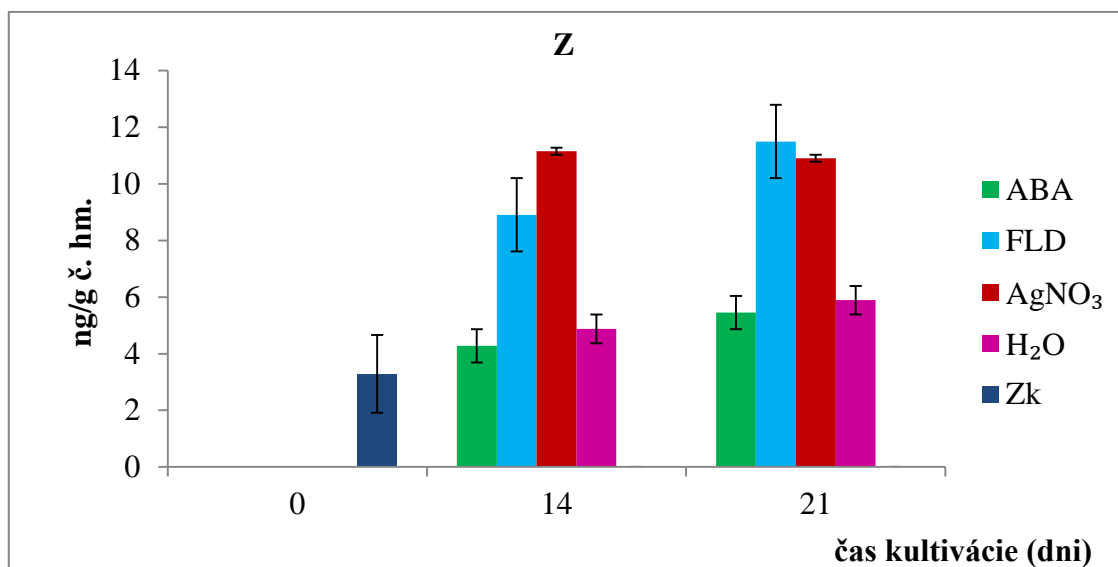


**Graf 4** Obsah endogénneho BA v priebehu pučania hľúz

Endogénny iP (graf č. 5) je preukázateľne zvýšený vo variante s FLD, AgNO<sub>3</sub> a kontrolnom. V týchto variantoch sa v priebehu dní aj naďalej zvyšuje. V 21. dni je zvýšenie v kontrolnom variante nepreukázateľné. Celkovo sa obsah iP pohybuje na nižších hodnotách. Maximum je cca 2,5 ng/g č. hm. vo variante FLD a AgNO<sub>3</sub>.



**Graf 5** Obsah endogénneho IP v priebehu pučania hľúz

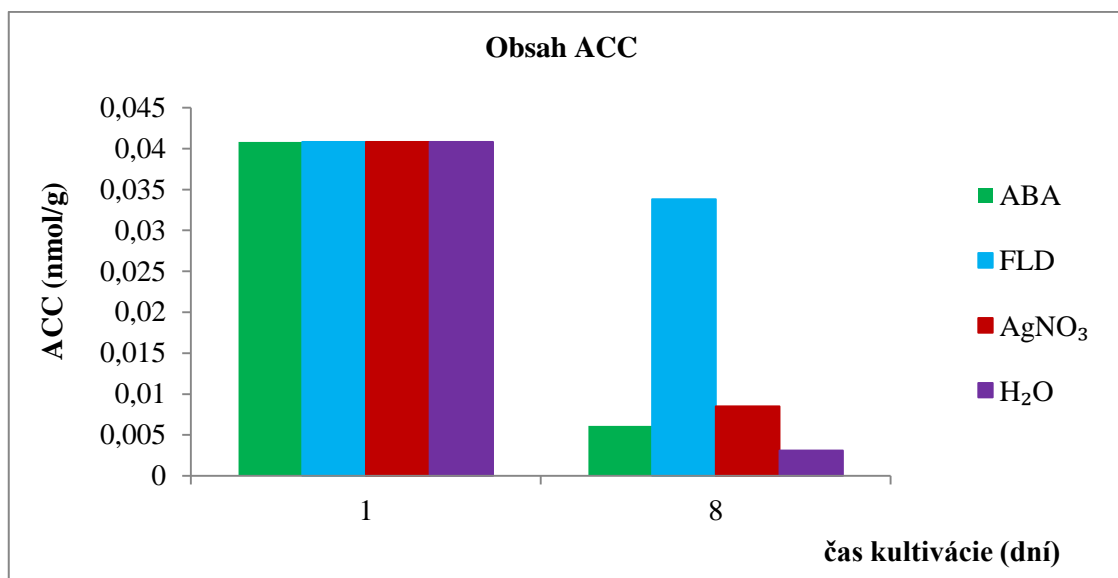


**Graf 6** Obsah endogénneho Z v priebehu pučania hlúč

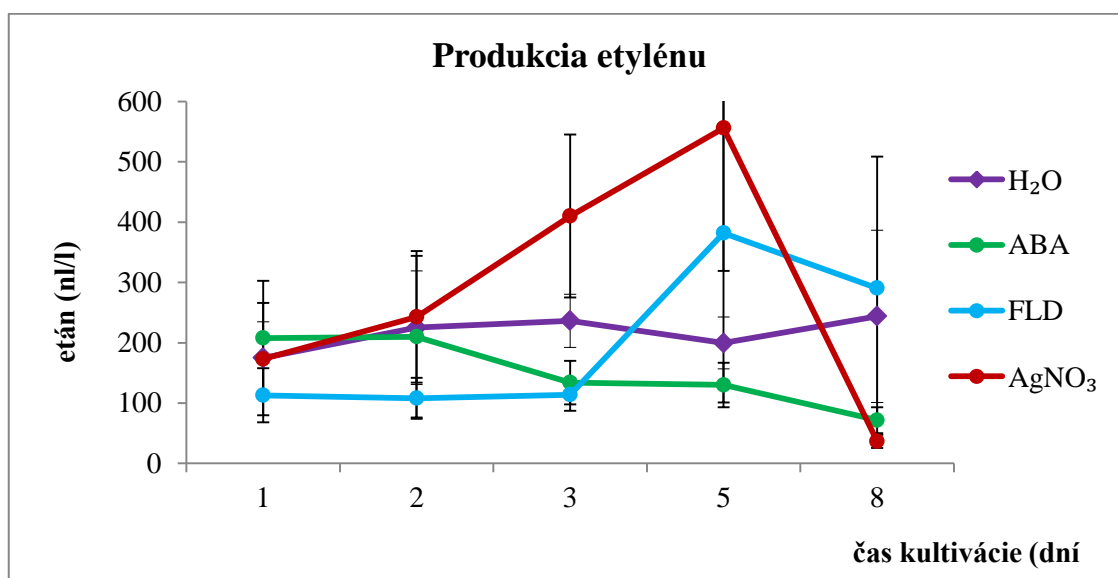
Najvyššie hodnoty v obsahu endogénnych CK dosahuje zeatín (graf č. 6). Varianty s FLD a AgNO<sub>3</sub> dosahujú preukázateľne vyšších hodnôt oproti kontrole po 14 dňoch. V 21. dni sa jeho koncentrácia už výrazne nemení ani so zvyšujúcim sa počtom pučiacich hlúč (graf č. 1). Všetky varianty majú zvýšenú úroveň Z už pred samotným začatím pučania (cca 3,2 ng/g č. hm.). V priebehu pučania hlúč sa obsah v kontrole a vo variante ABA výrazne nemení, ale zostáva na zvýšených hodnotách oproti ostatným CK.

### 5.3 Obsah ACC, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, etylénu a etánu v priebehu pučania hlúč

Obsah ACC (graf č. 7) dosahoval najvyšších hodnôt na začiatku experimentu, krátko pred viditeľným pučaním hlúč. Po 8 dňoch štatisticky preukázateľné najvyššie hodnoty dosahoval variant s FLD. Obsah ACC sa pohybuje v malých hodnotách pre všetky stanovované varianty. Oproti kontrole dosahujú všetky varianty preukázateľné zvýšenie obsahu ACC.

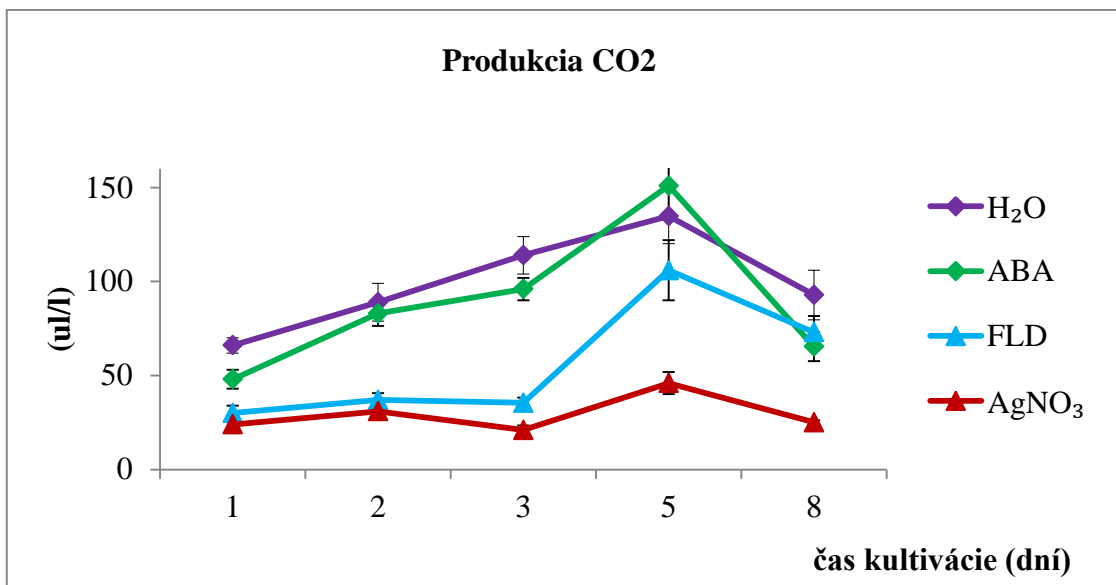


**Graf 7** Obsah ACC v priebehu pučania hľúz

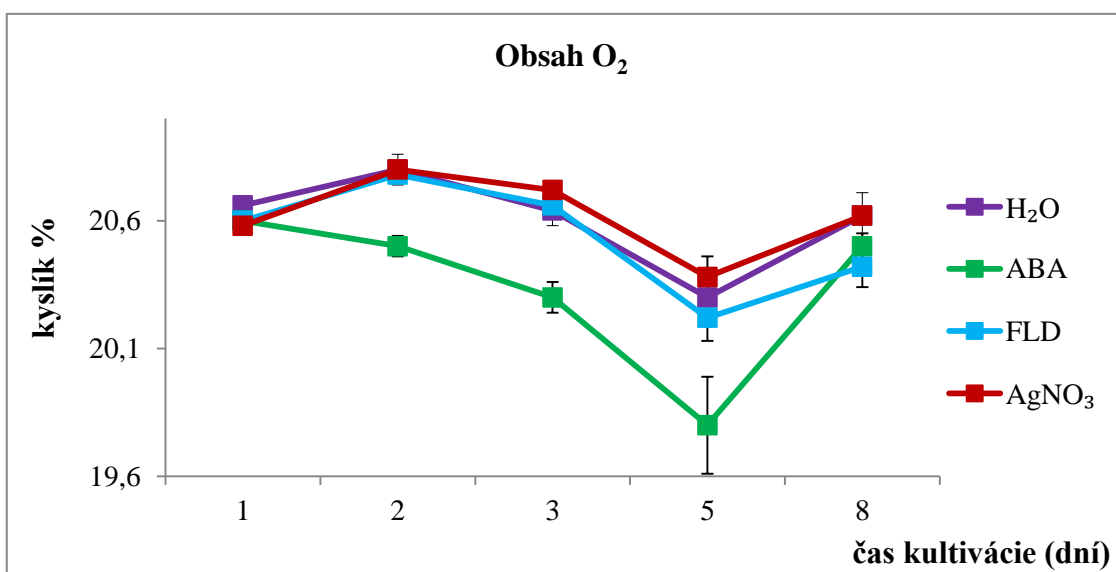


**Graf 8** Produkcia etylénu priebehu pučania hľúz

Pri stanovovaní produkcie etylénu vznikali hodnoty, ktoré neboli štatisticky preukázateľné (graf č. 8). Produkcia etylénu stúpa vo variante s FLD a AgNO<sub>3</sub> ale toto zvýšenie nie je preukázateľné. Kontrolný variant prebieha kontinuálne a produkcia etylénu ani nestúpa ani neklesá. Etylén klesá po 2. dni vo variante s ABA, a to až do ukončenia experimentu. Variant s AgNO<sub>3</sub> v 8. dni merania prudko klesol na nízke hodnoty.

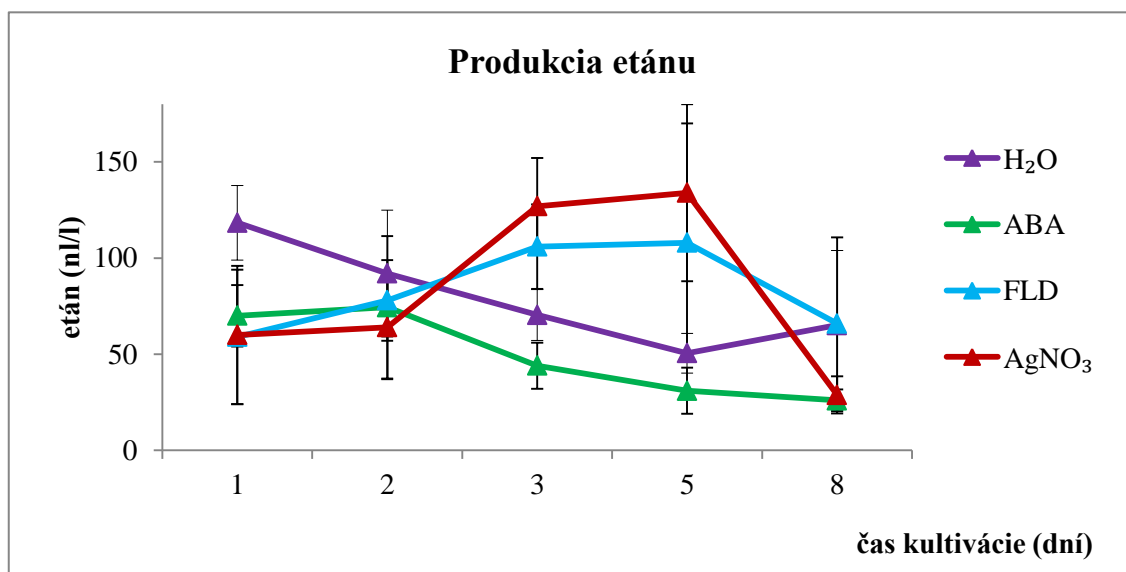


**Graf 9** Produkcia CO<sub>2</sub> priebehu pučania hl'úz



**Graf 10** Produkcia O<sub>2</sub> priebehu pučania hl'úz

Produkcia CO<sub>2</sub> (graf č. 9) je preukázateľne zvýšená v kontrolnom variante a vo variante s ABA. Od 3. dňa sa postupne zvyšuje aj v ostatných sledovaných variantoch. Obsah O<sub>2</sub> (graf č.10) je preukázateľne znížený vo variante s ABA, kde kontinuálne klesá až do 5. dňa. Obsah u ostatných troch variant je porovnateľný. Pokles v obsahu O<sub>2</sub> nastáva u všetkých variant počas 5. dňa, ale následne zase stúpa.



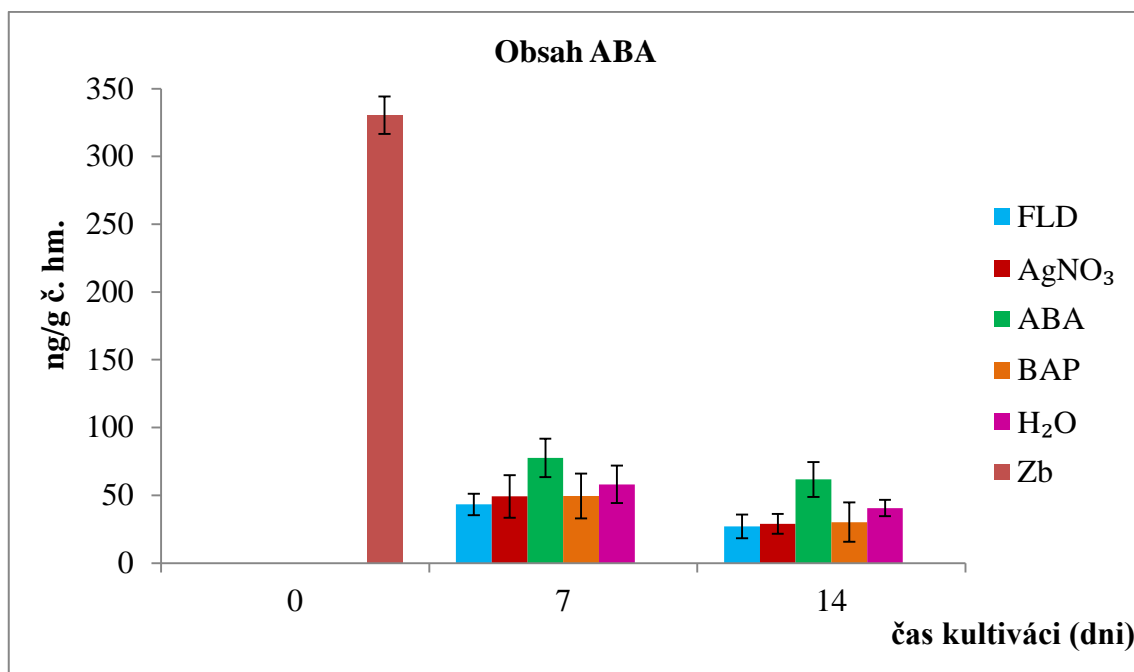
**Graf 11** Produkcia etánu priebehu pučania hľúz

Produkcia etánu sa pohybuje v malých hodnotách. Vo všetkých variantoch je porovnateľná. Variant s FLD a AgNO<sub>3</sub> sa vyznačuje miernym zvýšením produkcie, ale toto zvýšenie nie je preukázateľné. U kontrolného variantu a variantu s ABA dochádza k miernemu nepreukázateľnému poklesu produkcie.

#### 5.4 Obsah ABA v jednotlivých variantoch počas pučania hľúz

Obsah ABA koreloval s pučaním hľúz v grafe č. 1. Najnižšie hodnoty dosahovali varianty s FLD, AgNO<sub>3</sub> a BA, ktoré pôsobili stimulačne na pučanie hľúz a skracovali dormanciu. Variant s FLD dosahoval najnižších hodnôt po 7 dňoch. Variant s ABA dosahoval najvyšších hodnôt v 7. aj v 14. dni oproti variantom, ktoré boli vystavené indukčným podmienkam pre rast pupeňov. Variant s označením zb, ktorý obsahoval čerstvo pozbierané hľuzy a bol v hlbokjej dormancii dosahuje najvyššie štatisticky preukázateľné hodnoty. Tento variant bol analyzovaný pre zistenie obsahu ABA v čerstvo zozbieraných hľuzách.





**Graf 12** Obsah ABA v priebehu pučania hľúz

Obsah ABA sa znižoval aj v kontrolnom variante s vodou, čo síce korelovalo s výskytom pučiacych hľúz, ale nie tak výrazne ako u stimulačných variantov.

## 6 DISKUSIA

Významným problémom produkcie sadbových zemiakov z mikropropagačných biotechnológií je ich vyrovnanosť a homogenita pučania pupeňov. To súvisí s procesom dormancie, jej dĺžkou a následným pučaním pupeňov. Dormancia rastlín slúži na prekonanie nepriaznivých podmienok prostredia. Pri dormancii hľúz ide o potlačenie akéhokoľvek rastu aj pri priaznivých podmienkach pre rast (SONNEWALD 2001).

Skrátenie dormancie je využívané v šľachtiteľstve, pri rýchlej produkcii sadbového materiálu, pri rôznych výskumoch alebo pre dosiahnutie dvojitej úrody počas roka v priaznivých podmienkach. Dlhšia dormancia hľúz umožňuje dlhšie skladovanie hľúz, čo je výhodné pre obchod a priemysel. V dormantných hľuzách nedochádza k poklesu nutričnej hodnoty a poklesu odolnosti voči chorobám oproti pučiacim hľuzám (LADYZHENSKAYA a PROTSENKO 2002, HAINES et al. 2003). V súčasnej dobe sa využíva veľká škála chemických látok potlačujúcich pučanie, alebo naopak, látok stimulujúcich pučanie hľúz.

Táto práca bola zameraná na ovplyvnenie dĺžky dormancie hľúz ľuľka zemiakového aplikovaním rôznych exogénnych látok. Použitý bol fluridon (FLD), ktorý pôsobí ako inhibítor syntézy ABA (GAMBLE a MULLET 1986). Tiež bol aplikovaný dusičnan strieborný ( $\text{AgNO}_3$ ), ktorý sa viaže na väzbové miesta etylénu a tak bráni jeho fyziologickému prejavu (GASPAR et al. 1996). Ďalšia aplikovaná látka, kyselina abscisová (ABA), pôsobí stimulačne na indukciu dormancie a jej udržanie (SUTTLE 1995). Poslednou použitou látkou bol benzyladenín (BA), ktorý patrí medzi cytokiníny, ktoré sú inhibítormi dormancie (HARTMAN 2011, SUTTLE a BANOWETZ 2000).

FLD ako inhibítor biosyntézy ABA stimuloval pučanie hľúz. Výskyt pučiacich hľúz sa zvyšoval hneď od počiatku experimentu a v siedmom dni dosahoval 43 %. Inhibičný účinok FLD na obsah ABA a prerušenie dormancie tiež zaznamenali SUTTLE a HULTSTRAND (1994), ktorí tak potvrdili potrebu ABA pri navodení a udržiavaní dormantného stavu hľúz.

Použitie BA malo taktiež za následok prerušenie dormancie. Stimulácia rastu pupeňov prebiehala od prvých dní a po siedmych dňoch dosahovala takmer 50 % pučiacich hlúz. Vplyv CK na skrátenie dormancie bolo potvrdené vo viacerých štúdiách (SUTTLE a BANOWETZ 2000, SUTTLE 2008). Použitie ABA pôsobilo inhibične na rast pupeňov a predlžovalo dormanciu. Po 21 dňoch umožnila ABA iba 30% pučanie hlúz. To podporuje aj zistenia predchádzajúcich výskumov, že ABA zastáva dôležitú funkciu ako regulátor dormancie hlúz (SIMKO et al. 1997, SUTTLE a HULTSTRAND 1994). Stimulačné účinky na rast pupeňov a skrátenie dormancie bol zaznamenaný aj u  $\text{AgNO}_3$ . SUTTLE (1998) popisuje stimulačné účinky  $\text{AgNO}_3$  pri zvýšených koncentráciách, ale iba v začiatkových fázach pučania hlúz. V našom experimente sa stimulačný účinok  $\text{AgNO}_3$  prejavoval počas celého experimentu.

Obsah sledovaných endogénnych CK sa zvyšoval s viditeľným pučaním hlúz, pričom ich obsah bol rôzny v závislosti na použitej variante. Najvyššie hodnoty dosahovali hlúzy vystavené účinkom FLD a  $\text{AgNO}_3$ , čo korelovalo aj so stimuláciou pučania hlúz. Z výsledkov stanovenia CK vyplynulo, že ich obsah sa zvyšuje počas výstupu z dormancie a najviac sú zastúpené v pučiacich hlúzach. BA, Z a DHZ dosahovali najvyšších hodnôt vo všetkých použitých variantoch. Z a DHZ boli zvýšené oproti ostatným aj pred ošetrením jednotlivými látkami. Po 14 dňoch sa objavujú aj DHZR, iP a BA. Vyšší obsah Z pred viditeľným pučaním namerali aj SUTTLE a BANOWETZ (2000), ktorí dokonca potvrdili jeho nárast s výskytom pučiacich hlúz. V tomto experimente nebol vôbec nameraný ZR, mT a jeho ribozid. To, že sa nepodarilo stanoviť ZR môže byť spôsobené jeho príliš nízkym obsahom. V štúdiu SUTTLE a BANOWETZ (2000) sa podarilo namerať len nízke koncentrácie ZR a jeho obsah sa nezvyšoval ani v priebehu pučania hlúz. V hlúzach ošetrených ABA bol zaznamenaný len malý nárast obsahu CK. To môže byť spôsobené inhibičným vplyvom ABA na rast pupeňov alebo ovplyvňovaním aktivity CK. Nárast koncentrácie CK pred a počas pučania hlúz bol zaznamenaný aj v ďalších štúdiách (KODA 1982, TURNBULL a HANKE 1985). Zvyšujúci obsah CK môže súvisieť so stimuláciou bunkového delenia pri raste pupeňov (SUTTLE 2007).

Obsah ACC ako prekursora etylénu je zvýšený na počiatku merania a vo variante FLD po 8 dňoch, čo zrejme súvisí so zvyšujúcou sa produkciou etylénu od 3. dňa a s výskytom prvých pučiacich hľúz. Obsah ACC u variantu s ABA dosahuje v 8. dni veľmi nízke hodnoty, pričom produkcia etylénu taktiež klesá od počiatku merania. Tento pokles môže súvisieť s nízkym výskytom pučiacich hľúz. Produkcia etylénu je zvýšená taktiež u  $\text{AgNO}_3$ , ale jeho vplyv je inhibovaný iónmi striebra. V 8. dni dochádza k výraznejšiemu poklesu etylénu a obsah ACC je taktiež znížený. Produkcia  $\text{CO}_2$  je zvýšená v kontrolnom variante a vo variante ABA, čo je zaujímavé v porovnaní s FLD a  $\text{AgNO}_3$ , u ktorých je zvýšený počet pučiacich hľúz. Spotreba kyslíku je znižovaná u všetkých variant, čo môže korelovať s respiračnou aktivitou. Produkcia etánu je na nízkej úrovni a postupne klesá.

Obsah ABA v hľuzách klesá v závislosti od zvyšujúceho sa množstva pučiacich hľúz. Po 7 dňoch najnižšie hodnoty dosahuje variant s FLD, ktorý pôsobí ako jej inhibítor. SUTTLE a HULTSTRAND (1994) taktiež zaznamenali znížený obsah ABA po aplikácii FLD a výskytom pučiacich hľúz. Po 14 dňoch je koncentrácia ABA znížená a porovnateľná vo všetkých stimulačných látkach FLD,  $\text{AgNO}_3$  aj BA. Zvýšené hodnoty ABA boli zaznamenané u hľúz ošetrených externe aplikovanou ABA. Zvýšenie koncentrácie ABA síce potlačovalo rast pupeňov ale po 14. dni sa objavuje už 20 % pučiacich hľúz. Tieto výsledky by mohli viesť k záverom, že zníženie obsahu ABA nemusí byť nevyhnutným predpokladom pre výstup z dormancie (SUTTLE et al. 2012, SUTTLE 1995). Vysoké hodnoty ABA sa nachádzali vo variante s plne dormantnými čerstvo pozbieranými hľuzami.

Zo získaných výsledkov je vidieť, že dĺžka dormancie môže byť ovplyvňovaná rôznymi látkami. Zvyšujúce sa nároky ľudí a priemyslu na kvalitu a množstvo vyprodukovaných zemiakov súvisí aj s dĺžkou dormancie. Preto je štúdium regulácie dormancie rozsiahlou témou a poskytuje množstvo možností pre výskum. V budúcnosti by sa mohli uplatňovať aj transgéne rastliny ľuľka zemiakového, pri ktorých by vnesenie určitých génov rázne predlžovalo alebo skracovalo dormanciu bez

potreby špeciálneho skladovania hľúz alebo aplikácie chemických látok. Zemiaky sú pre ľudskú populáciu dôležitou plodinou, a preto nároky na ich rýchlu produkciu a kvalitu budú zvyšované vplyvom priemyslu a zvyšujúcej sa populácie ľudí.

## 7 ZÁVER

Táto diplomová práca sa zameriava na vplyv jednotlivých chemických látok na dĺžku dormancie. Boli popísané jednotlivé vonkajšie a vnútorné faktory vplyvajúce na dormanciu hľúz. Taktiež boli popísané skupiny fytohormónov vo vzťahu k regulácii dormancie. Látkami použitými v týchto experimentoch boli fluridon, kyselina abscisová, benzyladenín (iným názvom benzylaminopurin) a dusičnan strieborný. Kultivácia rastlín a produkcia hľúz ľuľka zemiakového prebiehala v *in vitro* podmienkach. Okrem vplyvu použitých látok na dormanciu bol sledovaný aj ich vplyv na obsah endogénnej ABA a CK ako aj vplyv na produkciu plynov. Obsah ABA bol stanovovaný pomocou RIA analýzy, obsah CK pomocou HPLC a produkcia plynov bola stanovovaná pomocou plynovej chromatografie.

FLD, AgNO<sub>3</sub> a BA pôsobili stimulačne na rast pupeňov hľúz a potláčali dormanciu. Najvyšší stimulačný účinok na rast pupeňov bol zaznamenaný u varianty FLD a BA. ABA pôsobila inhibične na rast pupeňov a mierne predlžovala dormanciu hľúz. Produkcia etylénu bola zvýšená v hľuzách ošetrovaných FLD a AgNO<sub>3</sub>, čo zrejme súvisí so zvýšeným výskytom pučiacich hľúz. Spotreba kyslíku bola postupne znižovaná v priebehu experimentu. Produkcia ACC bola najvyššia u FLD. Produkcia etánu je postupne znižovaná hlavne na konci merania. Koncentrácia endogénnych CK sa zvyšovala u všetkých variant pri vystupovaní z dormancie. Najvyššia koncentrácia bola zaznamenaná u BA a Z. Obsah ABA sa znižoval s ukončením dormancie a výskytom prvých pučiacich hľúz vo všetkých variantoch. Najvyššie hodnoty dosahoval kontrolný variant s plne dormantnými hľuzami.

Z uvedených výsledkov je vidieť, že dĺžka dormancie môže byť ovplyvňovaná rôznymi látkami. Dnes je známych veľa informácií o priebehu dormancie a látok uplatňujúcich sa v jej regulácii, avšak táto téma stále ponúka množstvo príležitostí na výskum. Preto je dormancia predmetom veľkého množstva štúdií, ktoré sú zamerané na rôzne interakcie procesov a látok uplatňujúcich sa v regulácii dormancie.

## 8 POUŽITÁ LITERATÚRA

- ABDALA G., CASTRO G., MIERSCH O. & PEARCE D. (2000): Changes in jasmonate and gibberellin levels during development of potato plants (*Solanum tuberosum*). *Plant Growth Regul.* 36 (2): 121-126. ISSN 0167-6903
- ADKINS S. W., BELLAIRS S. M. & LOCH D. S. (2002): Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. *Euphytica* 126 (1): 13-20. ISSN 0014-2336
- AKSENOVA N. P., KONSTANTINOVA T. N., GOLYANOVSKAYA S. A., SERGEEVA L. I. & ROMANOV G. A. (2012): Hormonal regulation of tuber formation in potato plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 59 (4): 451-466. ISSN 1021-4437
- ALEXOPOULOS A. A., AKOUMIANAKIS K. A., VEMMOS S. N. & PASSAM H. C. (2007): The effect of postharvest application of gibberellic acid and benzyl adenine on the duration of dormancy of potatoes produced by plants grown from TPS. *Postharvest Biol. technol.* 46 (1): 54-62. ISSN 0925-5214
- BAILEY K. M., PHILLIPS I. D. J. & PITT D. (1978): The role of buds and gibberellin in dormancy and the mobilization of reserve materials in potato tubers. *Ann. Bot.* 42 (3): 649-657. ISSN 0305-7364
- BENKEBLIA N. & SHIOMI N. (2004): Chilling effect on soluble sugars, respiration rate, total phenolics, peroxidase activity and dormancy of onion bulbs. *Sci. Agric.* 61 (3): 281-285. ISSN 0103-9016
- BETHKE P. C. (2014): Postharvest storage and physiology. In: Navarre R. & Pavek M. J. (eds.). *The potato: botany, production and uses*. Boston: Cabi, s. 255-271
- BIELESKI R. L. (1964): The problem of halting enzyme action when extracting plant tissue. *Anal. Biochem.* (9): 431-442. ISSN 0003-2697

- BOLINGUE W., VU B. L., LEPRINCE O. & BUITINK J. (2010): Characterization of dormancy behaviour in seeds of the model legume *Medicago truncatula*. *Seed Sci. Res.* 20 (2): 97-107. ISSN 0960-2585
- BRIAN P. W., HEMMING H. G. & RADLEY M. (1955): A physiological comparison of gibberellic acid with some auxins. *Physiol. Plant.* 8 (4): 899-912. ISSN 0031-9317
- BROADLEY M. R., WHITE P. J., BRYSON R. J., MEACHAM M. C., BOWEN H. C., JOHNSON S. E., HAWKESFORD M. J., MCGRATH S. P., ZHAO F. J., BREWARD N., HARRIMAN M. & TUCKER M. (2006): Biofortification of UK food crops with selenium. *Proc. Nutr. Soc.* 65 (2): 169-81. ISSN 0029-6651
- BROWN A HENFLING (2014): A History of the Potato. In: Navarre R. & Pavek M. J. (eds.). *The potato: botany, production and uses*. Boston: Cabi, s. 1-12.
- BURTON W. G. (1978): The physics and physiology of storage. In: Paul M. Harris (ed.). *The Potato crop: the scientific basis for improvement*. London: Springer-Science+Business Media, s. 545-606.
- CARRERA E., BOU J., GARCÍA-MARTÍNEZ J. L. & PRAT S. (2000): Changes in *GA 20-oxidase* gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *Plant J.* 22 (3): 247-256. ISSN 0960-7412
- CENZANO A., ABDALA G. & HAUSE B. (2007): Cytochemical immuno-localization of allene oxide cyclase, a jasmonic acid biosynthetic enzyme, in developing potato stolons. *J. Plant Physiol.* 164 (11): 1449-1456. ISSN 0176-1617
- CLAASSENS M. M. & VREUGDENHIL D. (2000): Is dormancy breaking of potato tubers the reverse of tuber initiation?. *Potato Res.* 43 (4): 347-369. ISSN 0014-3065
- COLEMAN W. K. (1998): Carbon dioxide, oxygen and ethylene effects on potato tuber dormancy release and sprout growth. *Ann. Bot.* 82 (1): 21-27. ISSN 0305-7364



- COLEMAN W. K. & COLEMAN S. E. (2000): Modification of potato microtuber dormancy during induction and growth *in vitro* or *ex vitro*. *Am. J. Potato Res.* 77 (2): 103-110. ISSN 1099-209X
- CONCEPCION M., LIZADA C., & YANG S. F. (1979): A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem.* 100 (1): 140-145. ISSN 0003-2697
- CUTTER E. G. (1978): Structure and development of the potato plant. In: Harris P. M. (ed.). *The Potato crop: the scientific basis for improvement*. London: Springer-Science+Business Media, s. 70-152
- DALE M. F. B., GRIFFITHS D. W. & TODD D. T. (2003): Effects of genotype, environment, and postharvest storage on the total ascorbate content of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *J. Agric. Food Chem.* 51 (1): 244-248. ISSN 0021-8561
- DEBERGH P. C. & READ P. E. (1991): Micropropagation. In Debergh P.C. & Zimmerman R.H (eds.) *Micropropagation technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, s. 1-13
- DE BRUXELLES G. L. & ROBERTS M. R. (2001): Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Crit. Rev. Plant Sci.* 20 (5): 487-521. ISSN 0735-2689
- DESTEFANO-BELTRÁN L., KNAUBER D., HUCKLE L. & SUTTLE J. (2006a): Chemically forced dormancy termination mimics natural dormancy progression in potato tuber meristems by reducing ABA content and modifying expression of genes involved in regulating ABA synthesis and metabolism. *J. Exp. Bot.* 57 (11): 2879-2886. ISSN 0022-0957
- DESTEFANO-BELTRÁN L., KNAUBER D., HUCKLE L. & SUTTLE J. C. (2006b): Effects of postharvest storage and dormancy status on ABA content, metabolism,

- and expression of genes involved in ABA biosynthesis and metabolism in potato tuber tissues. *Plant Mol. Biol.* 61 (4-5): 687-697. ISSN 0167-4412
- DONNELLY D. J., COLEMAN W. K. & COLEMAN S. E. (2003): Potato microtuber production and performance: a review. *Am. J. Potato Res.* 80 (2): 103-115. ISSN 1099-209X
- FARAH A., MONTEIRO M., DONANGELO C. M. & LAFAY, S. (2008): Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J. Nutr.* 138 (12): 2309-2315. ISSN 0022-3166
- FÍŠEROVÁ H. & HRADLÍK J. (1994): Produkce etylénu a etanu při tvorbě adventivních kořenů na stonkových segmentech révy vinné. (ethylene and ethane production during adventitious root formation on vine stem segments). *Rostlinná výroba* 40: 755–762. ISSN 0370-663X
- FÍŠEROVÁ H., KULA E., KLEMŠ M. & REINÖHL V. (2001): Phytohormones as indicators of the degree of damage in birch. *Biológia* 56 (4): 405-409. ISSN 0006-3088
- GAMBLE P. E. & MULLET J. E. (1986): Inhibition of carotenoid accumulation and abscisic acid biosynthesis in fluridone-treated dark-grown barley. *Eur. J. Biochem.* 160 (1): 117-121. ISSN 0014-2956
- GARNER N. & BLAKE J. (1989): The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. *Ann. Bot.* 63 (6): 663-674. ISSN 0305-7364
- GASPAR T., KEVERS C., PENEL C., GREPPIN H., REID D. M. & THORPE T. A. (1996): Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32 (4): 272-289. ISSN 1054-5476
- HABIB A. (1999): Microtuberization and dormancy breaking in potato (*Solanum tuberosum* L.) (Ph D. thesis, McGill University), s. 68

- HAINES M. M., SHIEL P. J., FELLMAN J. K. & BERGER P. H. (2003): Abnormalities in growth, development and physiological responses to biotic and abiotic stress in potato (*Solanum tuberosum*) transformed with *Arabidopsis ETR1*. *J. Agric. Sci.* 141 (3-4): 333-347. ISSN 0021-8596
- HANNAPPEL D. J. (2007). Signalling the induction of tuber formation. In: Vreugdenhil D. (ed.). *Potato biology and biotechnology advanced perspectives*, Amsterdam: Elsevier, s. 237-256
- HARTMANN A., SENNING M., HEDDEN P., SONNEWALD U. & SONNEWALD S. (2011): Reactivation of meristem activity and sprout growth in potato tubers require both cytokinin and gibberellin. *Plant Physiol.* 155 (2): 776-796. ISSN 0032-0889
- HAWKES J. G. (1978): History of the potato. In: Harris P. M. (ed.). *The Potato crop: the scientific basis for improvement*. London: Springer-Science+Business Media, s. 1-14
- HELDER J. (1994): Tuber formation in the wild potato species *Solanum demissum Lindl.* (Ph D. thesis, Wageningen University). s. 126
- HEMBERG T. (1949): Significance of growth-inhibiting substances and auxins for the rest-period of the potato tuber. *Physiol. Plant.* 2 (1): 24-36. ISSN 0031-9317
- HEMBERG T. (1970): The action of some cytokinins on the rest-period and the content of acid growth-inhibiting substances in potato. *Physiol. Plant.* 23 (4): 850-858. ISSN 0031-9317
- HORVATH D. P., ANDERSON J. V., CHAO W. S. & FOLEY M. E. (2003): Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci.* 8 (11): 534-540. ISSN 1360-1385
- HUSSEY G. & STACEY N. J. (1984): Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum L.*). *Ann. Bot.* 53 (4): 565-578. ISSN 0305-7364

- CHAO W. S., FOLEY M. E., HORVATH D. P. & ANDERSON J. V. (2007): Signals regulating dormancy in vegetative buds. *Int. J. Dev. Biol.* (1): 49-56. ISSN 0214-6282
- CHAPMAN H. W. (1958): Tuberization in the potato plant. *Physiol. Plant.* 11 (2): 215-224. ISSN 0031-9317
- CHOPE G. A., TERRY L. A. & WHITE P. J. (2006): Effect of controlled atmosphere storage on abscisic acid concentration and other biochemical attributes of onion bulbs. *Postharvest Biol. Technol.* 39 (3): 233-242. ISSN 0925-5214
- JACKSON S. D. (1999): Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiol.* 119 (1): 1-8. ISSN 0032-0889
- JACKSON S. D., HEYER A., DIETZE J. & PRAT S. (1996): Phytochrome B mediates the photoperiodic control of tuber formation in potato. *Plant J.* 9 (2): 159-166. ISSN 0960-7412
- KIM H. S., JEON J. H., CHOI K. H., JOUNG Y. H. & JOUNG H. (1999): Effects of rindite on breaking dormancy of potato microtubers. *Am. J. Potato Res.* 76 (1): 5-8. ISSN 1099-209X
- KLOOSTERMAN B. & BACHEM C. (2014): Tuber development. In: Navarre R. & Pavek M. J. (eds.). *The potato: botany, production and uses*. Boston: Cabi, s. 45-63
- KODA Y. (1982): Effects of storage temperature and wounding on cytokinin levels in potato tubers. *Plant Cell Physiol.* 23 (5): 851-857. ISSN 0032-0781
- KOLOMIETS M. V., HANNAPPEL D. J., CHEN H., TYMESON M., & GLADON R. J. (2001): Lipxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* 13 (3): 613-626. ISSN 1040-4651

- KORABLEVA N.P., PLATONOVA T.A., DOGONADZE M.Z. & EVSUNINA A.S. (2002): Brassinolide effect on growth of apical meristems, ethylene production and abscisic acid content in potato tubers. *Biol. Plant* 45: 39-43. ISSN 0006-3134
- LADYZHENSKAYA E. P. & PROTSENKO M. A. (2002): Plasma membrane-bound mechanisms of signal transduction in the control of plant dormancy and resistance. *Biochemistry Mosc.* 67 (2): 151-160. ISSN 0006-2979
- LEE K. R., KOZUKUE N., HAN J. S., PARK J. H., CHANG E. Y., BAEK E. J., CHANG J. S. & Friedman M. (2004): Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *J. Agric. Food chem.* 52 (10): 2832-2839. ISSN 0021-8561
- LERICHE E. L., WANG-PRUSKI G. & ZHELJAZKOV V. D. (2009): Distribution of elements in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their relationship to after-cooking darkening. *HortScience* 44 (7): 1866-1873. ISSN 0018-5345
- LEWIS C. E., WALKER J. R., LANCASTER J. E. & SUTTON, K. H. (1998): Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: Coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *J. Sci. Food Agric.* 77 (1): 45-57. ISSN 0022-5142
- MACHÁČKOVÁ I. (1998): Růst a vývoj: Růstové regulátory. In: Procházka S, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J. (eds). *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, s. 226-285.
- MAUK C. S. & LANGILLE A. R. (1978): Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L. cis-zeatin riboside in the potato plant: Its identification and changes in endogenous levels as influenced by temperature and photoperiod. *Plant Physiol.* 62 (3): 438-442. ISSN 0032-0889
- MURASHIGE T. & SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 (3): 473-497. ISSN 0031-9317

- NAVARRE D., GOYER A., PAYYAVULA R. & HELLMANN H. (2014): Nutritional characteristics of potatoes. In: Navarre R. & Pavek M. J. (eds.). *The potato: botany, production and uses*. Boston: Cabi, s. 310-344.
- NAVARRO C., ABELENDA J. A., CRUZ-ORÓ E., CUÉLLAR C. A., TAMAKI S., SILVA J., SHIMAMOTO K. & PRAT S. (2011): Control of flowering and storage organ formation in potato by flowering locus T. *Nature* 478 (7367): 119-122. ISSN: 0028-0836
- NEAG C., MORAR G., VÂTCĂ S. & TODORAN C. (2009): Research regarding the influence of some biological factors upon potato tuberisation. *Agriculture* 66 (1): 411-418. ISSN 1843-5386
- NISTOR A., CAMPEANU G., ATANASIU N., CHIRU N. & KARÁSCONYI D. (2010): Influence of potato genotypes on “*in vitro*” production of microtubers. *Rom. Biotech. Lett.* 15 (3): 5317- 5324. ISSN 1224-5984
- NONOGAKI H. (2015): Seed dormancy and germination—emerging mechanisms and new hypotheses. *Front. Plant Sci.* 233 (5): 1-14. ISSN 1664-462X
- OBATA-SASAMOTO H. & H. SUZUKI (1979): Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolon tips during tuberization. *Physiol. Plant.* 45 (3): 320-324. ISSN 0031-9317
- OKAZAWA Y. (1967): Physiological studies on the tuberization of potato plants. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.* 55: 267-336. ISSN 0018-344X
- OKAZAWA Y. (1974): A relation between ethylene evolution and sprouting of potato tuber. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* 57 (4): 443-454. ISSN 0018-344X
- PELACHO A. M. & MINGO-CASTEL A. M. (1991): Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* 97 (3): 1253-1255. ISSN 0032-0889

- PIKKARD C. S., BRUSCA J. S., HANNAPEL D. J. & PARK, W. D. (1987): The two classes of genes for the major potato tuber protein, patatin, are differentially expressed in tubers and roots. *Nucleic Acids Res.* 15 (5): 1979-1994. ISSN 0305-1048
- PLATONOVA T. A., EVSYUNINA A. S. & KORABLEVA N. P. (2010): Changes in the plastid apparatus of apical meristem cells of potato tubers upon growth regulation with jasmonic acid. *Appl. Biochem. Microbiol.* 46 (3): 352-358. ISSN 0003-6838
- PROKEŠ J., FIŠEROVÁ H., HELÁNOVÁ A. & HARTMANN J. (2006): Význam oxidu uhličitého a ethylenu v procesu sladování. *Kvas. Prům.* 52: 11-12. ISSN 0023-5830
- PRUSKI K., ASTATKIE T., DUPLESSIS P., LEWIS T., NOWAK J. & STRUIK P. C. (2003): Use of jasmonate for conditioning of potato plantlets and microtubers in greenhouse production of minitubers. *Am. J. Potato Res.* 80 (3): 183-193. ISSN 1099-209X
- RANALLI P. (2007): The canon of potato science: 24. Microtubers. *Potato Res.* 50 (3): 301-304. ISSN 0014-3065
- RAPPAPORT L., BLUMENTHAL-GOLDSCHMIDT S., CLEGG M.D. & SMITH O.E. (1965): Regulation of bud rest in tubers of potato *Solanum tuberosum* L. I. Effect of growth substances on excised potato buds 1. *Plant Cell Physiol.* 6 (4): 587-599. ISSN 0032-0781
- RAPPAPORT L., TIMM H. & LIPPERT L. F. (1958): Gibberellin on white potatoes. *Calif. Agric.* 12 (2): 4-5. ISSN 0008-0845
- REDDIVARI L., VANAMALA J., CHINTHARLAPALLI S., SAFE S. H. & MILLER J. C. (2007): Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Carcinogenesis* 28 (10): 2227-2235. ISSN 0143-3334

- ROITSCH T. & EHNEß R. (2000): Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Reg.* 32 (2-3): 359-367. ISSN 0167-6903
- ROUMELIOTIS E., KLOOSTERMAN B., OORTWIJN M., KOHLEN W., BOUWMEESTER H. J., VISSER R. G. & BACHEM C. W. (2012): The effects of auxin and strigolactones on tuber initiation and stolon architecture in potato. *J. Exp Bot.* 63 (12): 4539-4547. ISSN 0022-0957
- RYLSKI I., RAPPAPORT L. & PRATT H. K. (1974): Dual effects of ethylene on potato dormancy and sprout growth. *Plant Physiol.* 53 (4): 658-662. ISSN 1021-4437
- RYMUZA K., RADZKA E. & LENARTOWICZ, T. (2015): Influence of precipitation and thermal conditions on starch content in potato tubers from medium-early cultivars group. *J. Ecol. Eng.* 16 (4): 176-179. ISSN 2299-8993
- SALIMI K., AFSHARI R. T., HOSSEINI M. B. & STRUIK P. C. (2010): Effects of gibberellic acid and carbon disulphide on sprouting of potato minitubers. *Sci. Hortic.* 124 (1): 14-18. ISSN 0304-4238
- SEABROOK J. E. (2005): Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) *in vitro*: a review. *Am. J. Potato Res.* 82 (5): 353-367. ISSN 1099-209X
- SHIMIZU-SATO S. & MORI H. (2001): Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiol.* 127 (4): 1405-1413. ISSN 0032-0889
- SCHMÜLLING T., FLADUNG M., GROSSMANN K. & SCHELL J. (1993): Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single rol genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant J.* 3 (3): 371-382. ISSN 0960-7412
- SIMKO I., MCMURRY S., YANG H. M., MANSCHOT A., DAVIES P. J. & EWING E. E. (1997): Evidence from polygene mapping for a causal relationship between



- potato tuber dormancy and abscisic acid content. *Plant Physiol.* 115 (4): 1453-1459. ISSN 1021-4437
- SONNEWALD U. (2001): Control of potato tuber sprouting. *Trends Plant Sci.* 6 (8): 333-335. ISSN 1360-1385
- SORCE C., LOMBARDI L., GIORGETTI L., PARISI B., RANALLI P. & LORENZI, R. (2009): Indoleacetic acid concentration and metabolism changes during bud development in tubers of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *J. Plant Physiol.* 166 (10): 1023-1033. ISSN 0176-1617
- STOREY R. M. J. (2007). The harvested crop. In: Vreugdenhil D. (ed.). *Potato biology and biotechnology advanced perspectives*, Amsterdam: Elsevier, s. 441-470.
- STRNAD M. (1996): Enzyme immunoassays of N 6-benzyladenine and N 6-(meta-hydroxybenzyl) adenine cytokinins. *J. Plant Growth Reg.* 15 (4): 179-188. ISSN 0167-6903
- STRUIK P. C. (2007): Above-ground and below-ground plant development. In: Vreugdenhil D. (ed.). *Potato biology and biotechnology advanced perspectives*, Amsterdam: Elsevier, s. 252-289.
- SUTTLE J. C. (1995): Postharvest changes in endogenous ABA levels and ABA metabolism in relation to dormancy in potato tubers. *Physiol. Plant.* 95 (2): 233-240. ISSN 0031-9317
- SUTTLE J. C. (1998): Involvement of ethylene in potato microtuber dormancy. *Plant Physiol.* 118 (3): 843-848. ISSN 1021-4437
- SUTTLE J. (2001): Dormancy-related changes in cytokinin efficacy and metabolism in potato tubers during postharvest storage. *Plant Growth Regul.* 35 (3): 199-206. ISSN 0167-6903

- SUTTLE J. C. (2003): Auxin-induced sprout growth inhibition: role of endogenous ethylene. *Am. J. Potato Res.* 80 (5): 303-309. ISSN 1099-209X
- SUTTLE J. C. (2004): Involvement of endogenous gibberellins in potato tuber dormancy and early sprout growth: a critical assessment. *J. Plant Physiol.* 161 (2): 157-164. ISSN 1021-4437
- SUTTLE J. C. (2007): Dormancy and sprouting. In: Vreugdenhil D. (ed.). *Potato biology and biotechnology advanced perspectives*. Amsterdam: Elsevier, s. 287-305.
- SUTTLE J. C. (2008): Effects of synthetic phenylurea and nitroguanidine cytokinins on dormancy break and sprout growth in Russet Burbank minitubers. *Am. J. Potato Res.* 85 (2): 121-128. ISSN 1099-209X
- SUTTLE J. C., ABRAMS S. R., DESTEFANO-BELTRÁN L. & HUCKLE L. L. (2012): Chemical inhibition of potato ABA-8'-hydroxylase activity alters *in vitro* and *in vivo* ABA metabolism and endogenous ABA levels but does not affect potato microtuber dormancy duration. *J. Exp. Bot.* 63 (15): 5717-5725. ISSN 0022-0957
- SUTTLE J. C. & BANOWETZ G. M. (2000): Changes in cis-zeatin and cis-zeatin riboside levels and biological activity during potato tuber dormancy. *Physiol. Plant.* 109 (1): 68-74. ISSN 0031-9317
- SUTTLE J. C., HUCKLE L. L. & LULAI E. C. (2011): The effects of dormancy status on the endogenous contents and biological activities of jasmonic acid, n-(jasmonoyl)-isoleucine, and tuberonic acid in potato tubers. *Am. J. Potato Res.* 88 (3): 283-293. ISSN 1099-209X
- SUTTLE J. C. & HULTSTRAND J. F. (1994): Role of endogenous abscisic acid in potato microtuber dormancy. *Plant Physiol.* 105 (3): 891-896. ISSN 1021-4437

- ŠEBÁNEK J (1998): Dormance a senescence. In: Procházka S, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J. (eds). *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, s. 388-400.
- ŠIMKOVÁ D., LACHMAN J., HAMOUZ K. & VOKÁL B. (2013): Effect of cultivar, location and year on total starch, amylose, phosphorus content and starch grain size of high starch potato cultivars for food and industrial processing. *Food chem.* 141 (4): 3872-3880. ISSN 0308-8146
- TABORI K. M., DOBRÁNSZKI J. & FERENCZY A. (1999): Some sprouting characteristics of microtubers. *Potato Res.* 42 (3-4): 611-617. ISSN 0014-3065.
- TAKAHASHI K., FUJINO K., KIKUTA Y. & KODA Y. (1994): Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Sci.* 100 (1): 3-8. ISSN 0168-9452
- THOMAS T. H. (1969): The role of growth substances in the regulation of onion bulb dormancy. *J. Exp. Bot.* 20 (1): 124-137. ISSN 0022-0957
- TURNBULL C. G. N. & HANKE D. E. (1985): The control of bud dormancy in potato tubers. *Planta* 165 (3): 359-365. ISSN 0032-0935
- VAN DEN BERG J. H., STRUICK P. C. & EWING E. E. (1990): One-leaf cuttings as a model to study second growth in the potato (*Solanum tuberosum*) plant. *Ann. Bot.* 66 (3): 273-280. ISSN 0305-7364
- VAN ITTERSUM M. K. & SCHOLTE K. (1992): Shortening dormancy of seed potatoes by storage temperature regimes. *Potato Res.* 35 (4): 389-401. ISSN 0014-3065.
- VREUGDENHIL D. & SERGEEVA L. I. (1999): Gibberellins and tuberization in potato. *Potato Res.* 42 (3-4): 471-481. ISSN 0014-3065
- VREUGDENHIL D. & STRUIK P. C. (1989): An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 75 (4): 525-531. ISSN 0031-9317

- VREUGDENHIL D., XU X., JUNG C. S., VAN LAMMEREN A. A. & EWING E. E. (1999): Initial anatomical changes associated with tuber formation on single-node potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings: a re-evaluation. *Ann. Bot.* 84 (5): 675-680. ISSN 0305-7364
- WAN W. Y., CAO W. & TIBBITTS T. W. (1994): Tuber initiation in hydroponically grown potatoes by alteration of solution pH. *HortScience* 29 (6): 621-623. ISSN 0018-5345
- WHITE P. J., BRADSHAW J. E., FINLAY M., DALE B., RAMSAY G., HAMMOND J. P. & BROADLEY M. R. (2009): Relationships between yield and mineral concentrations in potato tubers. *HortScience* 44 (1): 6-11. ISSN 0018-5345
- WILLS R. B. H., WARTON M. A. & KIM J. K. (2004): Effect of low levels of ethylene on sprouting of potatoes in storage. *HortScience* 39 (1): 136-137. ISSN 0018-5345
- WOHLEB C. H., KNOWLES N. R. & PAVEK M. J. (2014): Plant growth and development. In: Navarre R. & Pavek M. J. (eds.). *The potato: botany, production and uses*. Boston: Cabi, s. 64-82
- WOOLFE J. A. & POATS S. V. (1987): The potato in the human diet. London: *Cambridge University Press*. 242 s. ISBN 0-521-32669-9.
- XU X., VAN LAMMEREN A. A., VERMEER E. & VREUGDENHIL D. (1998): The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant Physiol.* 117 (2): 575-584. ISSN 1021-4437
- ZARRABEITIA A., LEJARCEGUI X., VERAMENDI J. & MINGO-CASTEL A. M. (1997): Influence of nitrogen supply on micropropagation and subsequent microtuberization of four potato cultivars. *Am. Potato J.* 74 (6): 369-378. ISSN 0003-0589

## 9 ZOZNAM GRAFOV

<b>Graf 1</b>	Regulácia dormancie vplyvom jednotlivých látok v závislosti na čase	56
<b>Graf 2</b>	Obsah endogénneho DHZ v priebehu pučania hľúz	58
<b>Graf 3</b>	Obsah endogénneho DHZR v priebehu pučania hľúz	59
<b>Graf 4</b>	Obsah endogénneho BA v priebehu pučania hľúz	60
<b>Graf 5</b>	Obsah endogénneho IP v priebehu pučania hľúz	60
<b>Graf 6</b>	Obsah endogénneho Z v priebehu pučania hľúz	61
<b>Graf 7</b>	Obsah ACC v priebehu pučania hľúz	62
<b>Graf 8</b>	Produkcia etylénu priebehu pučania hľúz	62
<b>Graf 9</b>	Produkcia CO <sub>2</sub> priebehu pučania hľúz	63
<b>Graf 10</b>	Obsah O <sub>2</sub> priebehu pučania hľúz	63
<b>Graf 11</b>	Produkcia etánu priebehu pučania hľúz	64
<b>Graf 12</b>	Obsah ABA v priebehu pučania hľúz	65

## 10 ZOZNAM OBRÁZKOV

<b>Obrázok 1</b>	Tradičný spôsob rozmnožovania a vývoj zemiakov	18
<b>Obrázok 2</b>	Cyklus troch typov dormancie počas roka	26
<b>Obrázok 3</b>	Znázornenie troch fáz dormancie	28
<b>Obrázok 4</b>	Schematické znázornenie hormonálnej regulácie v priebehu dormancie	45
<b>Obrázok 5</b>	Kultivácia rastlín ľuľka zemiakového v <i>in vitro</i>	46
<b>Obrázok 6</b>	Indukcia hľúz ľuľka zemiaku v <i>in vitro</i> kultúre	47
<b>Obrázok 7</b>	Mikrohľuzy ľuľka zemiakového získané po zbere z <i>in vitro</i>	47
<b>Obrázok 8</b>	Pipetovacia tabuľka na postup RIA analýzy	55
<b>Obrázok 9</b>	Vybrané petriho misky s pučiacimi hľuzami jednotlivých variant po 21 dňoch	57

## 11 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlórfenoxy octová
<sup>3</sup> H-ABA	rádioaktívne značená ABA (radioligand)
ABA	kyselina abscisová
ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
AgNO <sub>3</sub>	dusičnan strieborný
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	oxid hlinitý
BA	benzyladenín (skôr označovaný ako BAP)
BS	brassinosteroid
C18	alkán s 18 atomy uhlíku
CK	cytokiníny
CKX	cytokiníoxidáza/dehydrogenáza
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
CS <sub>2</sub>	sulfid uhličitý
č. hm.	čerstvá hmotnosť
DHZ	dihydro-zeatin
DHZR	dihydro-zeatin ribozid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (enzymová imunosorbentná analýza)
FLD	fluridon
GA	giberelíny
GA <sub>3</sub>	kyselina giberelová
HgCl <sub>2</sub>	chlorid ortuťnatý
HPLC	vysoko účinná kvapalinová chromatografia

IAA	indol-3-octová kyselina
iP	izopentyladenin
JA	kyselina jasmonová
MAC	monoclonal antibody Cambrifge (protilátka)
mT	meta-topolin
NAA	1-naftyloctová kyselina
O <sub>2</sub>	kyslík
TBS	tris pufor
TFA	trifluorooctová kyselina
Z	zeatín
ZR	zeatin ribozid