

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



**Bc. Gabriela Lotová**

**Míra oxidativního stresu jako marker stresové paměti u vybraných genotypů rostlin  
bramboru *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* a ssp. *andigena***

**Oxidative stress level as a marker of stress memory in selected genotypes of potato  
*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* and ssp. *andigena***

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Petra Mašková, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

### **Poděkování**

Chtěla bych zejména poděkovat RNDr. Petře Maškové, Ph.D., za odborné vedení, pomoc a cenné rady při zpracování této práce. Další velké poděkování patří doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D., a Mgr. Monice Kofroňové, Ph.D., za pomoc a odborné rady. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu a trpělivost.

## Abstrakt:

Rostliny jsou během celého svého života vystavovány stresovému působení vnějšího okolí. Musely si proto vyvinout důmyslné mechanismy, jak stresu předejít nebo ho tolerovat. U některých rostlin dochází při opakovaném působení stresu ke zvýšení tolerance, což je známo jako stresová paměť. Cílem této diplomové práce je posouzení stresové paměti z hlediska míry oxidativního stresu. Jako marker oxidativního stresu byl zvolen obsah malondialdehydu (MDA), reaktivních forem kyslíku (ROS) a míra úniku elektrolytů. Hodnocena byla také čerstvá hmotnost, výška rostlin a obsah vody. Míra oxidativního stresu byla posuzována u několika genotypů *Solanum tuberosum* poddruhů Andigena a Tuberosum. Kultivace *in vitro* se pro hodnocení stresové paměti neosvědčila, *ex vitro* částečně ano. Obsah MDA byl u 66B výrazně nižší než u cv. Lada (Tuberosum) v kořeni (*in vitro*) i prýtu (*ex vitro*) při nedostatku vody i u kontrol. Působení aklimačního chladu před stresovým chladem mělo proměnlivý efekt na růst a míru úniku elektrolytů podle kultivačních podmínek. V *in vitro* mělo působení na míru úniku elektrolytů pozitivní vliv u kořenů cv. Lada a negativní na listy 66B (Andigena). V *ex vitro* byl zjištěn pozitivní vliv na míru úniku elektrolytů v listech 66B, zároveň však negativně ovlivnil výšku prýtu. Působení opakovaného nedostatku vody pozitivně ovlivnilo výšku rostlin obou genotypů a u genotypu Lada také obsah vody a míru úniku elektrolytů v listech. Hladina MDA a ROS nebyla suchem výrazně ovlivněna. Výsledky naznačují, že analýza míry úniku elektrolytů by mohla být vhodným markerem stresové paměti.

**Klíčová slova:** abiotický stres, kultivace *in vitro*, *Solanum tuberosum*, oxidativní stres, aklimace, stresová paměť

## Abstract:

Plants are exposed to the stress of the environment throughout their entire live. They therefore had to develop sophisticated mechanisms to avoid or tolerate stress. In some plants, repeated exposure to stress increases tolerance, which is known as stress memory. The aim of this study is to assess stress memory in terms of oxidative stress level. Content of malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS) and the electrolyte leakage were chosen as markers of oxidative stress. Fresh weight, plant height and water content were also evaluated. The level of oxidative stress was assessed in several genotypes of *Solanum tuberosum* subspecies, Andigena and Tuberosum. *In vitro* culture did not work well for the evaluation of stress memory, *ex vitro* partially did. The content of MDA in 66B was significantly lower than in cv. Lada (Tuberosum) in root (*in vitro*) and shoot (*ex vitro*) in control groups as well as during water shortage. Treatment of acclimation-inducing cold before the stress-inducing cold had a variable effect on growth and electrolyte leakage according to the culture conditions. *In vitro*, the effect on electrolyte leakage in roots of cv. Lada was positive, in leaves of 66B (Andigena) it was negative. In *ex vitro*, a positive effect was found on electrolyte leakage in 66B leaves, but at the same time it negatively affected the shoot height. The effect of repeated water shortage was positive on the height of plants of both genotypes and, in the case of cv. Lada, also on the water content and electrolyte leakage in leaves. MDA and ROS levels were not significantly affected by the drought. The results suggest that electrolyte leakage could be a suitable marker of stress memory.

**Key words:** abiotic stress, *in vitro* cultivation, *Solanum tuberosum*, oxidative stress, acclimation, stress memory

## Seznam použitých zkratek:

ABA	kyselina abscisová
APX	askorbátperoxidáza
CAT	kataláza
CBF	cold responsive binding factors
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
DREB	dehydration responsive element binding proteins
GA	kyselina gibberelinová
GPX	glutathionperoxidáza
GSH	glutathion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HCl	kyselina chlorovodíková
KOH	hydroxid draselný
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDA	malodialdehyd
MPK	mitogen-activated protein kinase
MS	(Murashige and Skoog) médium
NAD(P)H	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid(fosfát)
NO	oxid dusnatý
O <sub>2</sub>	kyslík
PEG	polyethylenglykol
POD	peroxidáza
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RWC	relativní obsah vody
SAA	systémová získaná aklimace
SAR	systémová získaná rezistence
SOD	superoxiddismutáza

# Obsah:

<b>1.</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1	CÍL PRÁCE.....	2
<b>2.</b>	<b>LITERÁRNÍ ÚVOD.....</b>	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>13</b>
3.1	MATERIÁL .....	13
3.2	KULTIVACE ROSTLIN .....	13
3.2.1	<i>Kultivace in vitro .....</i>	<i>13</i>
3.2.2	<i>Kultivace ex vitro.....</i>	<i>15</i>
3.2.3	<i>Stanovení obsahu malondialdehydu .....</i>	<i>17</i>
3.2.4	<i>Stanovení míry úniku elektrolytů z pletiv.....</i>	<i>18</i>
3.2.5	<i>Stanovení hladiny reaktivních forem kyslíku.....</i>	<i>19</i>
3.3	ZPRACOVÁNÍ DAT .....	20
<b>4.</b>	<b>EXPERIMENTY .....</b>	<b>22</b>
4.1	PŘEHLED PROVEDENÝCH EXPERIMENTŮ .....	22
4.1.1	<i>Experimenty prováděné in vitro .....</i>	<i>22</i>
4.1.2	<i>Experimenty prováděné ex vitro .....</i>	<i>22</i>
4.1.3	<i>Experimentální design .....</i>	<i>23</i>
4.1.4	<i>Přehled odběrů vzorků a provedených analýz u jednotlivých experimentů .....</i>	<i>25</i>
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>25</b>
5.1	SIMULACE NEDOSTATKU VODY APLIKACÍ POLYETYLENGLYKOLU .....	25
5.1.1	<i>Jednorázové působení PEG .....</i>	<i>25</i>
5.1.2	<i>Opakované působení PEG.....</i>	<i>32</i>
5.2	PŮSOBNÍ SUCHA PŘERUŠENÍM ZÁLIVKY .....	40
5.3	PŮSOBNÍ CHLADU .....	50
5.3.1	<i>Působení chladu na rostliny in vitro .....</i>	<i>50</i>
5.3.2	<i>Působení chladu na rostliny ex vitro.....</i>	<i>55</i>
5.4	DISKUZE.....	59
5.4.1	<i>Simulace nedostatku vody aplikací polyethylenglykolu.....</i>	<i>60</i>
5.4.2	<i>Působení sucha přerušením zálivky.....</i>	<i>63</i>
5.4.3	<i>Působení chladu.....</i>	<i>64</i>
<b>6.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>70</b>

# 1. Úvod

Rostliny se během života neustále potýkají s nepříznivými vlivy okolí, které mají negativní dopad na jejich růst a fyziologii. K významným abiotickým stresům omezujícím růst rostlin patří např. sucho a extrémní teplota, jejichž intenzita se bude s ohledem na klimatické změny dále zvyšovat. Zároveň s tím roste lidská populace, a tedy i nároky na vypěstované množství potravy. Je proto snaha o vyšlechtění plodin, které mají nejenom velký výnos, ale zároveň jsou odolné vůči stresům. Divoké genotypy vůči stresu mnohdy vykazují vyšší odolnost. Jednou z možností, jak při šlechtění nových druhů rozšířit genetickou výbavu rostlin, je využití alel genů právě divokých příbuzných pěstovaných kultivarů.

U rostlin dochází během stresu ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku, které mohou v případě nedostatečného zhášení způsobit výrazné poškození makromolekul buňky a rostlina zažívá oxidativní stres. Stresové působení iniciuje signální dráhy, které mohou vést k produkci protektivních látek, jako jsou např. flavonoidy, antokyany, chaperony, dehydriny, osmoticky aktivní látky (např. prolin, glycinbetain, nízkomolekulární sacharidy, cukerné alkoholy ad.). Efektivní aktivace antioxidantního systému a akumulace ochranných látek umožňují rostlině udržet metabolické procesy aktivní a zabránit výraznému poškození. Rostliny se dokáží po setkání s mírnějším stresem aklimovat, krátkodobě zvýšit svou odolnost. Proces zachování informace o proběhlém stresu a zlepšení odpovědi na jeho opakované působení se označuje jako stresová paměť. Ta může být krátkodobá (v řádu dní) ale i dlouhodobá (může být i přenesena na potomstvo).

*Solanum tuberosum* patří k nejvýznamnějším plodinám pěstovaných pro lidskou konzumaci. V historii šlechtění záhy došlo k oddělení poddruhu Andigena od předchůdce poddruhu Tuberosum (většina dnes kultivovaných brambor). Předmětem mé experimentální práce je posouzení míry oxidativního stresu jako markeru stresové paměti a porovnání odpovědi genotypů poddruhu Andigena a Tuberosum.



## 1.1 Cíl práce

Cílem této práce bylo posoudit míru oxidativního stresu a případného poškození rostlin vystavených jednorázovému a opakovanému stresu nedostatku vody a nízkých teplot u vybraných genotypů rostlin *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* a *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* a rozhodnout, zda tento parametr může sloužit jako vhodný marker stresové paměti.

Hypotézy:

- 1) Vystavení rostlin bramboru aklimačnímu (mírnějšímu) stresu má benefiční vliv na následující stresové působení (tzv. priming či stresová paměť).
- 2) Priming se projeví ve snížení míry oxidativního stresu/poškození a minimalizaci negativních efektů na růst rostlin.
- 3) Reakce rostlin bramboru při vystavení stresu chladu a nedostatku vody bude u daného genotypu podobná.
- 4) Schopnost zapamatování si předchozího stresového působení bude odlišná u vybraných genotypů dvou poddruhů *Solanum tuberosum*.
- 5) Míra oxidativního stresu je vhodný marker pro testování stresové paměti u rostlin.

Dílčí cíle:

- Vypracovat experimentální design vhodný pro testování odpovědi fotoautotrofních rostlin bramboru kultivovaných *in vitro* na stresové působení.
- Nalézt aklimační a subletální míru stresu pro jednorázové a opakované působení.
- Na základě růstových parametrů a míry oxidativního stresu/poškození posoudit potenciální paměť rostlin na prožitý stres.
- Porovnat odpověď vybraných poddruhů bramboru z hlediska stresové paměti.

## 2. Literární úvod

### Rostlina a stres

Rostliny jako sesilní organismy čelí nejrůznějším nepříznivým vlivům okolí bez možnosti úniku. Musejí se tedy umět přizpůsobit a efektivně reagovat na změny a působení nejrůznějších stresů, které se navíc velmi často kombinují. Stres způsobuje fyziologické změny, které mohou vést k poškození rostliny. Stres může být abiotický – např. sucho, nadměrná ozářenost, extrémní teplota, zasolení, hypoxie, znečištění těžkými kovy či pesticidy atd., nebo biotický – napadení patogeny, herbivory či jinými rostlinami. Výrazný stres prostředí limituje růst a produktivitu rostlin, což každoročně způsobuje výrazné ekonomické ztráty (Arvin & Donnelly, 2008; Kerchev et al., 2020). Zpomalení růstu je obecným mechanismem odpovědi na stres a doprovází ho integrované změny ve vodní, uhlíkové a hormonální bilanci (Chapin, 1991). Stres lze rozdělit na tzv. eu-stress, který má pozitivní, stimulační vliv a dis-stress, který je naopak negativní a vede k poškození (Yordanov et al., 2000). Stres není ojedinělou událostí, není proto překvapující, že u rostlin vznikla schopnost krátkodobého zvýšení odolnosti po předchozí epizodě mírného stresu, tzv. aklimace. Tento proces vzniká přizpůsobením rostliny na nový homeostatický stav. Rozhoduje o něm trvání a míra působícího stresu, prostředí a reakce samotného jedince (Banik et al., 2016; Dobrota, 2006). Rostliny mohou v odpovědi na stres zvolit strategii tolerance nebo avoidance. Rostliny tolerující stres vykazují redukci metabolické aktivity až při výrazném stresovém působení, mechanismus avoidance se projevuje utlumením aktivity a dormancí (Osmond et al., 1987). Stresová tolerance zahrnuje přizpůsobení se stresu změnami v expresi genů a metabolických drah, které vedou ke opravení či zmírnění poškození (Zhang et al., 2018). V případě, že je odolnost k stresoru geneticky vázaná, označuje se jako adaptace. Stresová paměť (známá také jako priming), je důležitou součástí behaviorální ekologie rostlin (Fleta-Soriano et al., 2015) a její podstatou je uchování informace o prožitém stresu a zlepšení odpovědi, a tedy i odolnosti, při opětovném setkání se stresorem (Bruce et al., 2007; Friedrich et al., 2019). Dochází tedy k udržení stavu aklimace po delší časový úsek. Stresová paměť může přetrvávat několik dní, ale i po celý život rostliny (Lämke & Bäurle, 2017).

Některé rostliny jsou stresu přizpůsobené lépe a vykazují vyšší úroveň tolerance, k velmi odolné skupině patří např. lišejníky, které vydrží velmi dlouhou dobu bez vody utlumením metabolické aktivity, toleranci zvyšují např. akumulací velkého množství ochranných organických látek (Dobrota, 2006). Známé svojí extrémní tolerancí vůči vyschnutí

jsou tzv. *resurrection plants*, které se dokáží zotavit i po vyschnutí až na 5 % relativního obsahu vody (RWC) (Farrant, 2000). Značně odolné mohou být i některé trávy, např. kvetoucí *Deschampsia antarctica* rostoucí na západním pobřeží Antarktického poloostrova (Byun et al., 2015).

### **Stres z nedostatku vody**

Mnoho abiotických stresů souvisí s nedostupností vody, zejm. stres ze samotného sucha a stres z nízké teploty, kdy je nedostatek vody následkem působení chladu. Proto se i mechanismy odpovědi na tyto stresy v lecčem překrývají.

Při stresu ze nedostatku vody dochází k expresi a akumulaci kyseliny abscisové (ABA), fytohormonu, který má významnou funkci v signalizaci při odpovědi na abiotické stresy. Výraznou úlohu hraje zejm. v reakci na sucho, úlohu má ale i v odpovědi na chlad. ABA spouští signalizační dráhu vedoucí k expresi geny odpovědi na stres. V této dráze jsou významné transkripční faktory CBF (cold responsive binding factors), DREB (dehydration responsive element binding proteins) či bZIP, které aktivují např. ABRE (*abscisic acid responsive*) elementy (Beck et al., 2007). Tyto signální dráhy vedou ke zvýšení exprese genů pro ochranné proteiny, jako jsou např. dehydriny (Oufir et al., 2008; Schafleitner et al., 2007), které jsou velmi hydrofilní (váží velké množství vody) a zvyšují tak toleranci. Vyskytují se také v maturujících semenech, kde se označují jako Late Embryogenesis Abundant proteiny (Beck et al., 2007). Velmi častou odpovědí na nedostatek vody je akumulace osmolytů (osmoticky aktivních látek), které pomáhají vodu zadržovat, jako je např. prolin a glycinbetain (Li et al., 2014), nebo nízkomolekulárních sacharidů. Při nedostatku vody sacharidy chrání integritu biomembrán částečným nahrazením molekul vody na membránovém povrchu, a to přímou interakcí přes vodíkové můstky (Caffrey et al., 1988; Pereira et al., 2004; Sin'kevich et al., 2008). Tento proces se označuje jako osmotické přizpůsobení (Habib et al., 2020).

Rostliny se proti stresu z nedostatku vody chrání mnohými mechanismy, přičemž hlavním cílem je zvýšení příjmu vody a omezení jejich ztrát (Banik et al., 2016). Toho lze dosáhnout např. změnou rozdělování biomasy, tedy zvýšením poměru kořene vůči prýtu, zesílením kutikuly a uzavřením průduchů (Schafleitner et al., 2007) nebo snížením relativního obsahu vody (Oufir et al., 2008), což jsou mechanismy avoidance pomáhající rostlinám předejít ztrátě vody. V reakci na stres se mohou akumulovat také cukerné alkoholy inositol, manitol (při vysoké teplotě) či galaktinol (při suchu) (Demirel et al., 2020). V reakci na sucho se zvyšuje exprese genů např. pro chaperony, které brání poškozeným proteinům agregovat, nebo genů spojených s produkcí flavonoidů a antokyanů (Watkinson et al., 2006).

Stres z nízké teploty negativně limituje rychlost růstu zejm. zpomalením toku vodivými pletivy a inhibicí příjmu vody a živin, čemuž se musí přizpůsobit fotochemické procesy. Chlad např. zvyšuje rigiditu membrán, což může zpomalovat difuzi plastochinonu a následkem je přesycení fotosystémů a vznik reaktivních forem kyslíku (ROS) (Ensminger et al., 2006). Jedním z mechanismů, které pomáhají rostlinám aklimovat se na nízkou teplotu (a také na stres z nedostatku vody), je akumulace již zmíněných osmolytů, např. glukóza, fruktóza, sacharóza či trehalóza (Caffrey et al., 1988; Neves et al., 2018; Sin'kevich et al., 2008). V reakci na chlad může stejně jako v reakci na nedostatek vody docházet ke zvýšené expresi a akumulaci prolinu (van Swaaij et al., 1985) či dehydrinů (Pino et al., 2013).

### **Oxidativní stres**

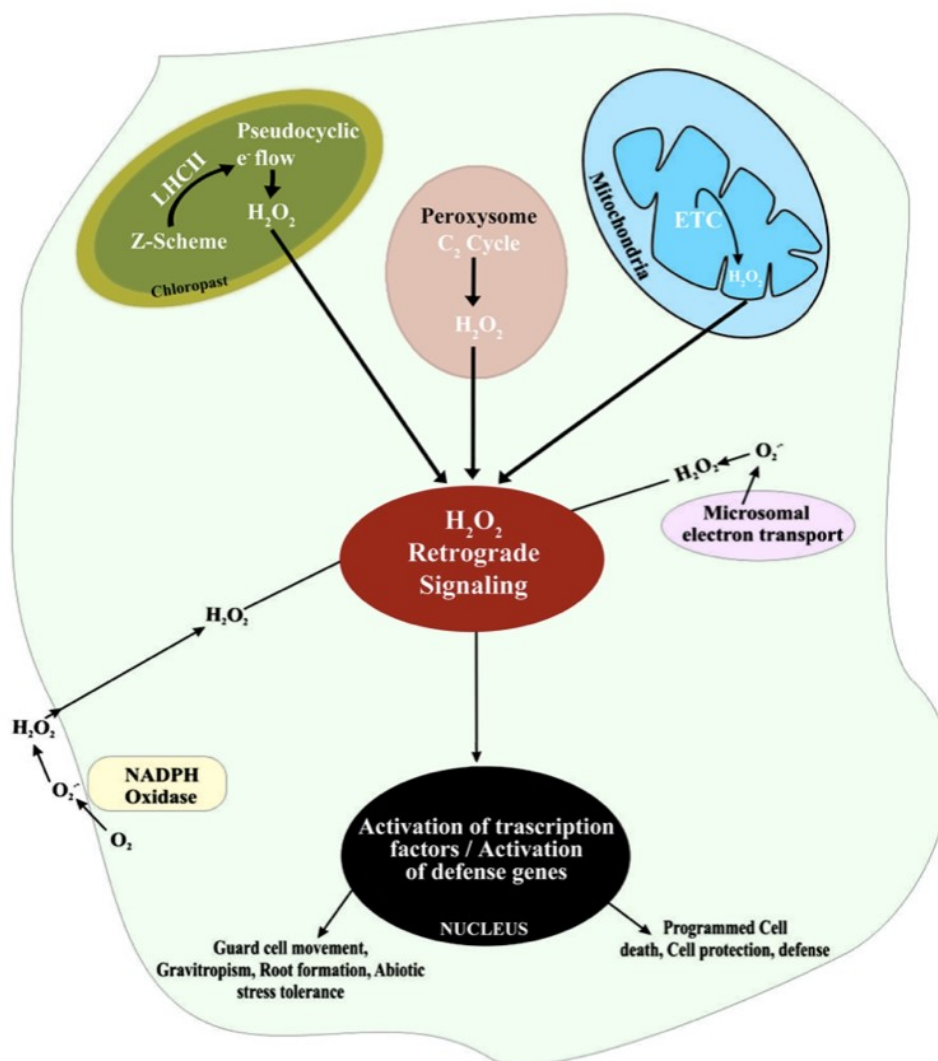
Během stresu dochází ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které vznikají redukcí kyslíku ( $O_2$ ) produkovaného během metabolických procesů, např. fotosyntézy (Saxena et al., 2016). Mezi ROS patří např. superoxidový radikál ( $\cdot O_2^-$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ ), singletový kyslík ( $^1O_2$ ) atd. Rostliny si vyvinuly nejrůznější mechanismy obrany, tzv. zhášení ROS. Mezi obranné mechanismy patří zejména detoxifikace prostřednictvím antioxidantních enzymů, jako je např. askorbátperoxidáza (APX), glutathionperoxidáza (GPX), kataláza (CAT) či superoxiddismutáza (SOD), nebo neenzymatických antioxidantů, jak je např. kyselina askorbová a redukovaný glutathion (Mittler et al., 2004). V případě nerovnováhy mezi tvorbou ROS a jejich zhášením dochází k oxidativnímu stresu a ROS mohou způsobit oxidativní poškození buněčných makromolekul (nukleových kyselin, proteinů, lipidů). Superoxidové a hydroxylové radikály jsou vysoce reaktivní, tzv. „volné radikály“, a iniciují produkci dalších ROS. Superoxidový radikál je záhy po vzniku zhášen SOD nebo neenzymaticky na  $H_2O_2$  (Sharma et al., 2012).  $H_2O_2$  je méně reaktivní a na rozdíl od ostatních ROS poměrně stabilní v přítomnosti  $Fe^{2+}$  však dochází k Fentonově reakci a  $H_2O_2$  dává vzniknout reaktivnímu hydroxylovému radikálu (Sharma et al., 2012).

Přílišný oxidativní stres může vyústit v programovanou buněčnou smrt až odumření celé rostliny (Singh et al., 2016; Tripathy & Oelmüller, 2012). Během stresu může dojít k poškození membrán až k narušení jejich integrity, což se projeví únikem elektrolytů (Arvin & Donnelly, 2008). Jedním z častých poškození při nadměrném stresu je lipidová peroxidace, během níž dochází ke změnám membránové struktury a poškození polynenasycených mastných kyselin, což má za následek vznik malondialdehydu (Posmyk et al., 2005). V případě efektivní mobilizace antioxidantního systému může dojít k nápravě poškození a snížení produkce

malondialdehydu (MDA). MDA tedy slouží jako vhodný indikátor poškození oxidativním stresem (Jouve et al., 1993).

ROS však nejsou pouze škodlivé odpadní produkty aerobního metabolismu, mají také významnou signalizační úlohu při růstu a vývoji rostliny (obr. 1). ROS např. aktivují otevření  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů umožňujících buněčný růst (Foreman et al., 2003) nebo uzavírání průduchů (Pel et al., 2000). Významnou signalizační roli hrají také v obranné reakci na abiotický i biotický stres (Mittler, 2017). Pro optimální fungování rostliny tedy musí docházet k efektivní regulaci produkce a zhášení ROS.

Molekuly  $\text{H}_2\text{O}_2$  mají mezi ROS v signalizaci stěžejní roli, a to zejm. díky nejdelšímu poločasu rozpadu (1 ms), malé velikosti a schopnosti volně prostupovat membránami (Hossain et al., 2015; Willekens et al., 1997). Jelikož je produkce ROS, zejména  $\text{H}_2\text{O}_2$ , v určitých případech žádoucí, rostliny si vyvinuly různé mechanismy jejich aktivní tvorby. Vzniká např. ze superoxidových radikálů produkovaných NAD(P)H oxidázami lokalizovanými na plasmatické membráně, tyto oxidázy jsou také označovány jako RBOHs (z angl. *respiratory burst oxidase homologues*) (Sagi & Fluhr, 2006). V posledních letech jsou NADPH oxidázy intenzivně studovány, vzhledem k jejich významné úloze v signalizaci (Marino et al., 2012) (Wang et al., 2016).  $\text{H}_2\text{O}_2$  dále produkují např. stěnové peroxidázy (Elstner & Heupel, 1976), oxalátové oxidázy nebo aminové oxidázy obsahující měď (Bolwell & Wojtaszek, 1997). Kromě  $\text{H}_2\text{O}_2$  má signalizační roli během stresu také oxid dusnatý (NO), vysoce reaktivní forma dusíku (RNS) (Bowler & Fluhr, 2000; Del Río, 2015; Umbreen et al., 2018).

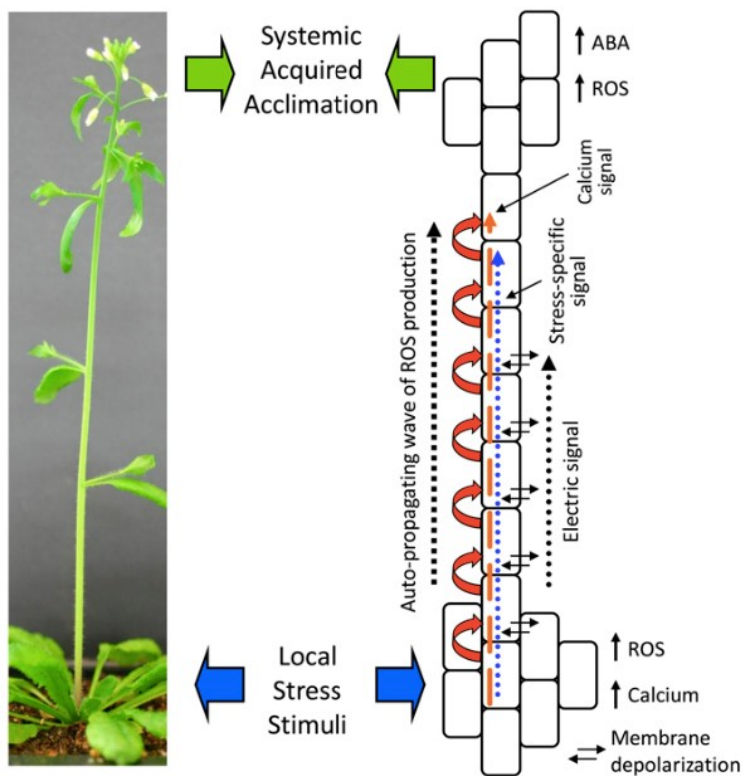


Obrázek 1 – Místa produkce peroxidu vodíku v rostlinné buňce a jeho funkce ve stresové signalizaci (Hossain et al., 2015).

## Signalizace ROS

Po přijetí stresového signálu dochází k jeho zpracování a iniciaci odpovědi. Aktivují se signální dráhy, které odpovídají na ROS indukované stresem, zároveň však aktivují i jeho další produkci, tyto ROS mají významnou signalizační funkci a aktivují transkripci genů odpovídajících na stres (Hossain et al., 2015). Součástí odpovědi jsou také fytohormony, zejm. kyselina abscisová (ABA), auxin, k. salicylová, k. giberelinová (GA) ad. (Bartoli et al., 2013; Dahal et al., 2019; Hossain et al., 2015). Při stresu např. dochází ke zvýšení poměru ABA/GA, což má za následek snížení exprese pro DELLA proteiny stimulující růst (Finkelstein et al., 2008). Fytohormony mohou aktivovat (např. prostřednictvím Mitogen-activated protein kináz MAPK) expresi genů odpovídajících na stres (Dahal et al., 2019) či aktivovat antioxidantní enzymy (Hossain et al., 2015).

Rostlina v reakci na stres spouští aklimační nebo obranné mechanismy, které pomohou zabránit jejímu rozsáhlejšímu poškození (Suzuki et al., 2013). Jedním z těchto mechanismů je tzv. systémově získaná aklimace (SAA), jejíž podstatou je předání signálu (součástí něhož může být  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) z poškozených buněk do nepoškozených částí rostliny, kde dojde ke včasné aktivaci ochranných mechanismů a aklimaci (Karpinski et al., 1999). V reakci na nejrůznější abiotické stresy dochází v zasažených buňkách k explozi ROS iniciujících kaskádu, při níž se ROS šíří ve „vlnách“ (tzv. ROS wave) dále rostlinou, jak v rámci samotné buňky mezi organelami, tak na dlouhou vzdálenost do ostatních pletiv (Mittler et al., 2011). Tento rychlý systémový signál (až  $8,4 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$ ) hraje významnou úlohu v obraně a aklimaci vůči biotickým a abiotickým stresům, jako je nízká či vysoká teplota, poranění, vysoká ozářenost nebo salinita (Miller et al., 2009). Součástí dráhy je elektrický signál (depolarizace membrány) spřažený se signálem přenášeným  $\text{Ca}^{2+}$ . Za hlavní ROS systémového signálu je považován  $\text{H}_2\text{O}_2$  vznikající dismutací superoxidového radikálu vytvořeného membránovou NADPH oxidázou (Miller et al., 2009). ROS wave (obr. 2) je součástí SAA a obecným mechanismem primingu (Suzuki, 2013).



Obrázek 2 – model šíření ROS vedoucí k systémové získané aklimaci (Suzuki et al., 2013).

Mechanismy rostlinné paměti jsou různorodé (fyziologické, biochemické, fenologické) a způsobují změny od chromatinu po morfologii rostlin (Fleta-Soriano, 2015). Priming je také

spjat s tzv. systémově získanou rezistencí (SAR), která se stejně jako SAA účastní odpovědi na biotický i abiotický stres a vede k rychlé aktivaci obranných mechanismů vedoucí k rezistenci (Baxter et al., 2014; Beckers et al., 2009). Součástí primingu důležitého v budování SAR jsou důležité např. MPK3 (MAPK) a částečně také MPK6, jejichž vyšší akumulace indukuje obrannou odpověď vůči různým stresům (Beckers et al., 2009). Mezi aklimační mechanismy patří také posttranslační modifikace proteinů, které mohou v dalším stresu měnit polohu, aktivitu a funkci cílových proteinů, nebo změny v sacharidovém spektru či zvýšení aktivit antioxidantních enzymů (Neves et al., 2018). Významné jsou také epigenetické změny. Stres indukuje transkripční faktory (např. bZIP), které dále aktivují komplexy modifikující histony. Často dochází k methyloaci histonů, s primingem souvisí např. H3K4me2, H3K4me3 či H3K27me3. Kromě methyloace dochází také k acetylaci, ubikvitinaci a fosforylaci histonů (přehledně v review Lämke & Bäurle, 2017). Součástí aklimace a adaptace může být i umlčování genů pomocí histon deacetyláz HDACs, které odstraňují acetylové skupiny, čímž umožňují těsné sbalení histonu (Watkinson et al., 2006).

### **Stres z nedostatku vody a stresová paměť**

Pro signální vlastnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> byl zkoumán efekt jeho exogenního podání semenům rostlin (1 mM, 24 h), které byly po vyklíčení vystaveny stresu. Vnější aplikací H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je možné omezit růstové ztráty způsobené stresem z nedostatku vody, díky schopnosti této molekuly stimulovat antioxidantní systém (Habib et al., 2020). Podobný efekt byl objeven i po exogenním podání NO při stresu ze zasolení (Shi et al., 2007). Je zajímavé, že vystavení semenům H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> snížilo kromě MDA také hladinu samotného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a to díky aktivaci antioxidantních enzymů CAT, peroxidázy (POD) a SOD (Habib, 2020). Tento fakt posiluje představu o duálním charakteru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – toxické, avšak významné signální molekule (Mittler, 2017). Úloha H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> při stresu ze sucha byla zkoumána např. na keři *Cistus albidus* během léta (Jubany-Marí et al., 2009). Sucho v tomto případě vyvolalo zvýšení hladiny k. abscisové (ABA), která indukovala zvýšenou produkci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v listech. Jeho vyšší hladina poté iniciovala zvýšení produkce k. askorbové. ABA může prostřednictvím Ca<sup>2+</sup> regulovat tvorbu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> přes NAD(P)H oxidázu (Jiang & Zhang, 2002). Přestože byla hladina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> během stresu velmi vysoká (10 μmol. g<sup>-1</sup> sušiny), nedošlo k oxidativnímu poškození a hladina MDA zůstala během stresu velmi nízká (<12 nmol. g<sup>-1</sup> sušiny). Efektivní zhášení zajistilo velmi nízkou akumulaci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uvnitř buněk mezofylu a k akumulaci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> docházelo zejm. v buněčných stěnách, sklerenchymu a xylému (Jubany-Marí et al., 2009). Aklimace na stres ze sucha byla zkoumána na rostlinách *Solanum tuberosum* pěstovaných ve skleníku. Rostliny byly dvakrát vystaveny postupnému vysychání



před samotným stresovým působením (0% vlhkost v půdě). Oproti rostlinám vystaveným stresovému působení bez aklimace měly tyto rostliny méně zvadlé listy, více otevřené průduchy a silnější kutikulu. Právě silnější kutikula a více otevřené průduchy zajistily u aklimovaných rostlin přísun CO<sub>2</sub> a zároveň omezení ztráty vody. Ve studii byla také prokázána významná úloha stonku jako rezervoáru vody v odolnosti vůči suchu (Banik et al., 2016).

### **Stres z nízké teploty a stresová paměť**

Vliv chladového primingu byl sledován např. na dvou kultivarech pšenice s různou citlivostí k nízké teplotě (Li et al., 2014). Rostliny vystavené mírnějšímu chladu (4,8 °C, 7 dní), zotavení (14 dní) a dalšímu působení chladu (5,7 °C, 5 dní) akumulovaly více H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (avšak méně než rostliny bez fáze primingu) a zvýšila se u nich aktivita SOD, CAT a APX, což zabránilo oxidačnímu vzplanutí. Při zotavení (14 dní) se hladina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vracela k normálu pomaleji než aktivita těchto enzymů. U odolné varianty nedošlo v průběhu zotavení k navrácení aktivity APX k původnímu stavu, tak jako u kontroly. U této varianty došlo také k výraznější aktivitě SOD při primingu a i během zotavení zůstávala aktivita zvýšená (Li et al., 2014). Udržení aktivity antioxidantních enzymů i přes zotavovací fázi je tedy jedním z možných mechanismů primingu. Ke zvýšené toleranci vůči chladu po předchozím primingu přispívá rovněž efektivní fotosyntéza, modifikace lipidového metabolismu a signálních drah (např. navýšení genů pro Ca<sup>2+</sup> dependentní protein kinázy, ERF/AP2 transkripční faktory) či obranné proteiny (dehydriny) exprimované v průběhu prvního stresu (Byun et al., 2015). Rozlišná odpověď na nízkou teplotu byla sledována také u druhů *Solanum tuberosum* cv. Desirée (citlivé na chlad), dihaploidní *S. tuberosum* PS3 a *Solanum phureja* (odolnější vůči chladu). Druhy vykazovaly odlišnou odpověď k chladu na metabolické a molekulární úrovni. Druh *S. phureja* akumuloval více cukerných metabolitů souvisejících se stabilizací membrán a osmoregulací, vyšší byla i jejich konstitutivní hladina. Při chladu došlo také ke zvýšené expresi genů metabolismu aminokyselin (Oufir et al., 2008).

### ***Solanum tuberosum***

Lilek brambor patří mezi nejdůležitější plodiny pro lidskou výživu s produkcí přes 360 milionů tun v posledních letech (<http://www.fao.org/faostat>). Tetraploidní druh *Solanum tuberosum* byl vyšlechtěn z divokého diploidního předka pocházejícího z And. Během kultivace došlo k autopolyloidizaci a vzniku poddruhu *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. Plodina byla dále šířena a byl vyšlechtěn druh adaptovaný na dlouhý den, *Solanum chilotanum*, z něhož byl vyšlechtěn *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (Hardigan et al., 2017). Rostliny bramboru jsou

citlivé na stres z nedostatku vody a k zachování výnosů potřebují dostatečné množství závlahy (Pino et al., 2013; Watkinson et al., 2008). Vzhledem k aktuálním klimatickým změnám bude potřeba vyšlechtit a pěstovat rostliny odolné vůči stresu zejm. ze sucha a extrémním výkyvům teplot, které ohrožují zemědělskou produkci (Dahal et al., 2019). S rostoucí populací vzrůstají i požadavky na vyšší výnos potravin, nové odrůdy tak budou muset vyhovět požadavkům na výnos i odolnost. Během šlechtění došlo k zúžení genového poolu, pro vytvoření nového odolného genotypu je možné jako zdroj alel využít divokých příbuzných bramboru (Hardigan et al., 2017). Poddruh *Andigena* je obecně považován za odolnější vůči nedostatku vody než poddruh *Solanum*. To ovšem neplatí absolutně, tolerance často závisí na genotypu (Mane et al., 2008). U *S. tuberosum* ssp. *andigena* byla prokázána schopnost aklimace (krátkodobé osmotické přizpůsobení) i adaptace (konstantě vysoká konc. kompatibilních solutů) na sucho po jeho opakovaném působení. Adaptované rostliny měly zvýšenou bazální hladinu exprese genů dráhy biosyntézy flavonoidů (antioxidantů). Důležitá byla také indukce genů pro chaperony sHSP (*small heat shock proteins*) a metallothioneiny, malé proteiny detoxifikující ROS (Watkinson et al., 2006). Aklimace na sucho bylo testována a prokázána také u hlíz *S. tuberosum* ssp. *andigena*. Hlízy udržují silný sink rychlou přeměnou dopravených cukrů na škrob. Po první epizodě sucha došlo v hlízách k inhibici jejich vývoje a iniciaci tvorby cukrů, čímž byly chráněny před poškozením způsobeným ztrátou vody (Watkinson et al., 2008). Součástí aklimace na sucho byla exprese genů trehalózového metabolismu a thioredoxinu (zhášeče ROS). Trehalóza chrání integritu membrán během nedostatku vody částečným nahrazením molekul vody (Pereira et al., 2004). Během dalšího setkání *Andigeny* s působením sucha byl již obnoven normální vývoj hlíz a obnovena síla sinku (Watkinson et al., 2008).

Úspěšné otužení bramboru opakovaným vystavením stresu ze sucha zvýšilo toleranci semenáčků vůči stresu také u *S. tuberosum* cv. *Atlantic*. Tyto rostliny měly nižší míru úniku elektrolytů, hladinu MDA, menší pokles chlorofylu, vyšší RWC a déle udržely zvýšenou aktivitu antioxidantních enzymů SOD, POD a CAT oproti rostlinám, které nebyly přípravnému suchu vystaveny (Zhang et al., 2018). U několika genotypů bramboru *S. tuberosum* byla potvrzena také dlouhodobá epigenetická paměť (udržovaná v průběhu života rostliny), zlepšující aklimační odpověď na sucho (Ramírez et al., 2015). Autoři porovnávali rostliny z hlíz, jejichž mateřská rostlina prošla stresem ze sucha, s rostlinami z hlíz nestresovaných rostlin. Priming v tomto případě vedl ke zvýšené antioxidantní aktivitě u genotypu *Desirée* a *Sarnav*. Rostliny vykazující vyšší odolnost udržely vysokou vodivost průduchů (stanoveno na základě diskriminace  $^{13}\text{C}$ ) a fotosyntetickou aktivitu. Podle autorů by mohla dlouhodobá paměť souviset s kapacitou daného genotypu tolerovat daný stres (Ramírez et al., 2015).

Existuje mnoho prací zabývajících se fyziologickou reakcí na abiotický stres u kultivarů s různou mírou odolnosti vůči tomuto stresu, zpravidla jsou však vybírány velmi kontrastní genotypy (tolerantní a citlivý). Např. vliv vysoké teploty u citlivého a odolného kultivar bramboru na vodivost membrány a obsah glykoalkaloidů (Coria et al. 1998), vliv nízké teploty na citlivý a odolnější druh bramboru (Oufir et al., 2008), vliv salinity na odolný kultivar bramboru Desirée a citlivý Mozart (Jaarsma & de Boer, 2018), odpověď na vysokou teplotu a sucho u citlivého genotypu Russet Burbank a Agria a odolných genotypů Desiree a Unica (Demirel et al., 2020), odolnost k suchu u poddruhu Andigena a Tuberusom (Vasquez-Robinet et al., 2008) ad. Vasquez-Robinet et al. (2008) se věnovali pouze jednorázovému stresu ze sucha a hodnotili zejm. změny v expresi genů, hladině metabolitů a fotosyntéze.

V této práci jsou porovnány odpovědi na opakovaný stres z nedostatku vody a nízké teploty u dvou kultivarů *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* a dvou genotypů *S. tuberosum* ssp. *Andigena* s cílem odhalení potenciální stresové paměti prostřednictvím stanovení míry oxidativního stresu.

## 3. Materiál a metody

### 3.1 Materiál

Jako experimentální materiál jsem použila 4 genotypy rostlin lilku bramboru *Solanum tuberosum*: 2 odrůdy kulturního poddruhu *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, cv. Lada a cv. Desirée (sbírka kultur *in vitro*, Katedra experimentální biologie rostlin UK Praha) a 2 genotypy divokého poddruhu *S. tuberosum* ssp. *andigena*, genotyp 66 (evidenční číslo 03 00066 7270, dále jako 66B) a genotyp 235 (evidenční číslo 03 00235 SLO, dále jako 235E) (genobanka kultur *in vitro* VÚB Havlíčkův Brod).

### 3.2 Kultivace rostlin

#### 3.2.1 Kultivace *in vitro*

##### 3.2.1.1 Kultivační médium

Rostliny kultivované *in vitro* jsem pěstovala na klasickém MS médiu (Murashige and Skoog, 1962). Pro přípravu 1 l média jsem na magnetické míchačce v cca 800 ml destilované vody (dH<sub>2</sub>O) rozmíchala 4,3 g základního MS média (Sigma-Aldrich Murashige and Skoog Basal Medium, uchovávaného při 4-6 °C) spolu s 5 ml roztoku s vitamíny, předem připraveného podle tabulky 1 a uloženého v -20 °C. V případě udržovací mixotrofní kultivace jsem do média přidala také 30 g sacharózy (Lach-Ner), experimentální rostliny byly kultivovány fotoautotrofně, bez sacharózy. Při simulaci nedostatku vody jsem do média přidala 15 – 60 g polyethylenglykolu 4000 (Sigma-Aldrich).

Tabulka 1 – Složení roztoku s vitamíny

	Konc. v zásobním roztoku (g/l)
glycin	0,4
inositol	20
k. nikotinová	0,1
pyridoxin-HCl	0,1
thiamin-HCl	0,1

Po rozpuštění složek jsem upravila pH pomocí 0,2M nebo 1M roztoku KOH, případně pomocí 0,2M roztoku HCl na hodnotu 5,75 – 5,8. Hodnotu pH jsem měřila pH metrem Orion 410 A+. Do média jsem následně přidala 7,5 g/l agaru (Sigma-Aldrich, plant cell culture tested), roztok jsem krátce promíchala a v odměrném válci ho doplnila dH<sub>2</sub>O do 1 l. Médium

jsem nechala v mikrovlnné troubě dvakrát projít varem, promíchala ho a rozlila do 100ml Erlenmayerových baněk po cca 35 ml. Sterilizace baněk uzavřených alobalem probíhala v autoklávu (Systec DX-23, PS 20 A nebo Tuttnauer 2540 EK) po dobu 20 minut při tlaku 1,44 MPa a teplotě 121 °C. Média byla připravena k použití po ztuhnutí a vychladnutí.

### **3.2.1.2 Výroba víček pro fotoautotrofní kultivaci**

Fotoautotrofní kultivace vyžadovala nahrazení alobalu speciálním víčkem umožňujícím výměnu plynů. Víčka jsem vyrobila z průhledné PP folie nastříhané na čtverce o hraně cca 10 cm. Doprostřed jsem pomocí korkovrtu vyřízla dva otvory (o průměru cca 1 cm). Přes ně jsem přelepila filtry Sun cap (Sigma-Aldrich) o průměru 1,8 cm s póry o vel. 0,04  $\mu\text{m}$ . Tyto filtry jsem později nahradila prodyšnou páskou Leukopor, kterou jsem přelepila vyříznuté otvory. Víčka s filtry Sun cap jsem po zaschnutí sterilizovala v autoklávu uzavřené v Petriho miskách, oddělené namočeným ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) filtračním papírem. Víčka s páskou jsem před klávováním neoddělovala, ale vrstvila je na sebe tak, aby se otvory nepřekrývaly. Na baňku jsem víčka upevnila pomocí pruženky.

### **3.2.1.3 Práce za aseptických podmínek**

Pasážování rostlin a další manipulace s nimi jsem prováděla za sterilních podmínek v laminárním boxu. Uzavřené nástroje a Petriho misky byly sterilizovány 3 h v horkovzdušné sušárně (Binder) při 150 °C. Před manipulací s rostlinami (a v průběhu práce) jsem nástroje sterilizovala namáčením do 96% etanolu a opálením nad kahanem. Před použitím jsem nechávala nástroje vychladnout na sterilní Petriho misce.

### **3.2.1.4 Kultivace a množení rostlin**

Rostliny jsem množila vegetativně, reprodukcí z nodálních segmentů. Rostliny staré 3 až 5 týdnů jsem vyjmula z baňky a vyřízla z nich segmenty. Do každé baňky s novým médiem jsem pinzetou umístila tři nodální segmenty. Hrdlo baňky a víčko z alobalu (u mixotrofních kultur) jsem krátce opálila nad kahanem. Baňku jsem opatrně zakryla sterilním víčkem či alobalem a upevnila ho kolem hrdla baňky pruženkou. V rámci jednoho experimentu jsem používala víčko buď s filtrem Sun cap nebo s páskou, kromě experimentu III.

Udržovací kultury a experimentální kultury *in vitro* (u experimentu IV pouze po dobu předpěstování) jsem kultivovala v kultivační místnosti s fotoperiodou 16/8 h (světlo/tma), teplotou  $22\pm 2$  °C a ozářeností cca 100  $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (dále jako „kultivační místnost“). Časové rozvržení kultivace se u jednotlivých experimentů lišilo a je rozepsáno v kapitole 4.1.3. Část

experimentu IV. a VII. byla provedena v kultivačním boxu s fotoperiodou 16/8 h, teplotou 22/18 °C a ozářeností cca 300  $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Experiment VI byl proveden v kultivačním boxu s fotoperiodou 16/8 h a teplotou 21/18 °C a vlhkostí cca 70 %.

### **3.2.1.5 Odběr vzorků**

V rámci experimentů jsem na jednotlivé analýzy odebírala vzorky listů a kořenů. Z baňky jsem pinzetou vyjmula rostlinu, kořeny jsem v případě potřeby očistila dH<sub>2</sub>O od zbytků média a osušila je buničinou. Od původního segmentu jsem odřízla prýt a kořen a oba orgány jsem zvažila na analytických vahách. Další postup se lišil podle jednotlivých analýz.

#### **Stanovení obsahu vody ve vzorku**

Obsah vody (W%) jsem vypočítala podle vzorce:  $W\% = 1 - \frac{\text{suchá hmotnost vzorku (g)}}{\text{čerstvá hmotnost vzorku (g)}}$ .

#### **Stanovení míry úniku elektrolytů**

Vzorek listů nebo kořenů jsem hned po navážení opláchla v dH<sub>2</sub>O a umístila do 15ml centrifugační zkumavky s 15 ml dH<sub>2</sub>O.

#### **Stanovení hladiny malondialdehydu (MDA) a reaktivních forem kyslíku (ROS)**

Do mikrozkuavky Eppendorf (dále jako mikrozkuavka E.) jsem navážila potřebné množství celých listů nebo kořenů z každé rostliny. Každý vzorek jsem hned poté ponořila do tekutého dusíku. Vzorky na měření hladiny ROS jsem odebírala do mikrozkuavek E. s kulatým dnem spolu se dvěma nerezovými homogenizačními kuličkami. Před provedením analýz jsem vzorky uchovávala při teplotě -80 °C.

## **3.2.2 Kultivace *ex vitro***

Některé experimenty byly provedeny s rostlinami genotypů Lada a 66B předpěstovanými *in vitro* a následně aklimatizovanými *ex vitro*. Kultury byly předpěstovány fotoautotrofně po dobu 3 týdnů v kultivační místnosti. Po převedení *ex vitro* probíhala kultivace v kontrolovaných podmínkách v kultivačních boxech.

#### **Převedení *ex vitro***

Vysterilizovanou lehkou zeminu jsem promíchala s dH<sub>2</sub>O do nasycení. Označené květináče jsem naplnila do cca tří čtvrtin zeminou a vytvořila prohlubeň. Z baňky jsem pinzetou opatrně vyjmula rostlinu a z kořenů odstranila zbytky agaru. Rostlinu jsem umístila do prohlubně v zemině a kořeny spolu s původním nodálním segmentem jsem zasypala zeminou. Hned poté

jsem umístila květináč do misky s vodou a zakryla jej plastovým krytem. Do plastového boxu jsem umístila čistou misku s  $\text{dH}_2\text{O}$  a co nejdříve do něj květináče přesunula, hned poté jsem plastový box uzavřela víkem. V každém boxu bylo umístěno 8 rostlin.

### **Kultivace rostlin vystavených suchu (experiment V)**

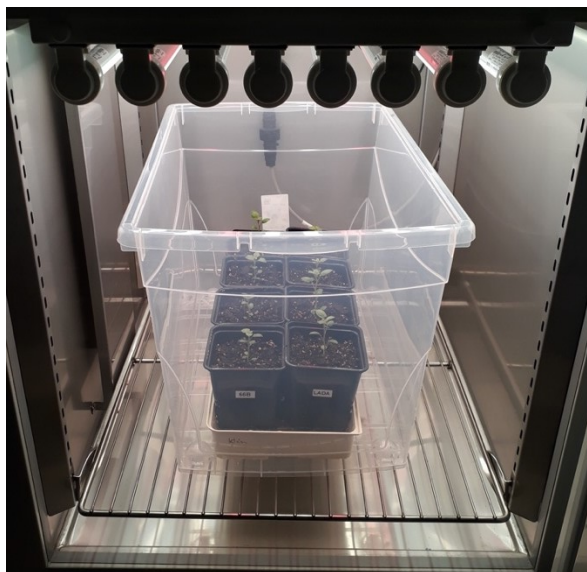
Do každého patra kultivačního boxu jsem umístila dva plastové boxy pro jeden genotyp, každý s 8 rostlinami (obr. 3). Po 5 dnech jsem víka sundala a zakryla jimi jen polovinu každého boxu, aby do něj mohl proudit vzduch a rostliny si začaly přivykat na nižší vzdušnou vlhkost. Pravidelně jsem do misky dolévala  $\text{dH}_2\text{O}$ , aby květináče vždy stály ve vodě. Po 9 dnech od převedení *ex vitro* jsem zahájila působení nedostatku vody – rostliny v jednom ze dvou boxů daného genotypu jsem přestala zalévat a odstranila přebytek zálivky v misce. Z prostorových důvodů jsem nejdříve testovala dvojnásobné působení (dvě epizody sucha proložené zalitím), následně jednorázové (pouze druhá epizoda sucha); design experimentu je popsán v kapitole 4.1.3. Relativní vlhkost zeminy jsem měřila u varianty s opakovaným působením sucha pomocí vlhkoměru Mini-Logger (PlantCare), frekvence měření byla nastavena na 6 h. Senzor vlhkoměru jsem umístila cca do střední části květináče, tedy v blízkosti kořenů.



Obrázek 3 – rozmístění v kultivačním boxu

### **Kultivace rostlin vystavených chladu (experiment VI)**

Do plastového boxu jsem umístila misku s  $\text{dH}_2\text{O}$  a květináče s rostlinami obou genotypů (střídavě), viz obr. 4. Po 4 dnech jsem víko pootevřela a následující den sejmula. Po celou dobu experimentu jsem do misky doplňovala  $\text{dH}_2\text{O}$ . Design experimentu je uveden v kapitole 4.1.3.



Obrázek 4 – kultivační chladicí box

### 3.2.3 Stanovení obsahu malondialdehydu

Obsah malondialdehydu (MDA), produktu lipidové peroxidace, byl stanoven spektrofotometricky na základě zvýšení absorbance po reakci MDA s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Jelikož v 532 nm mohou absorbovat i jiné sloučeniny, měří se absorbance téhož vzorku jak s TBA, tak bez ní (Hodges et al., 1999). Nejdříve jsem připravila 1% butylovaný hydroxytoluen (BHT) v 80% EtOH, poté jsem do borosilikátových lahví připravila roztoky 20% TCA podle tabulky 2.

Tabulka 2

20% TCA - TBA	20% TCA + TBA
20 g TCA	20 g TCA
10 $\mu$ l 1% BHT	10 $\mu$ l 1% BHT
80 ml dH <sub>2</sub> O	79,35 ml dH <sub>2</sub> O
	0,65 g TBA

Roztok s TBA jsem promíchávala na míchadle s ohřevem (nastaveném na cca 50 °C), jelikož se TBA špatně rozpouští. Před každým použitím bylo proto nutné roztok znovu zahřát.

Na každý vzorek pro stanovení obsahu MDA jsem navažovala 0,06 – 0,1 g čerstvé hmotnosti kořenů nebo listů (u materiálu kultivovaného *in vitro* připadlo na jeden vzorek několik celých listů). Vzorky byly uloženy v mikrozkuvkách E. při -80 °C. Před samotným zpracováním jsem vzorky přemístila do tekutého dusíku. Podle hmotnosti nachystaných vzorků jsem si připravila tabulku s objemy etanolu, který byl potřeba pro homogenizaci vzorku, v poměru 1 g FW: 25 ml EtOH. Do vychlazené misky s tloučkem jsem nalila tekutý dusík, z mikrozkuvky E. jsem do misky vyklepla vzorek a tloučkem ho při vytékání dusíku rozemlela na jemný prášek. Přidala jsem odpovídající objem vychlazeného 80% EtOH a směs rozetřela. Pomocí pipety jsem



suspenze přenesla do nové mikrozkušavky E. a uložila je na led. Vzorky jsem na ledu nechala 20 min sedimentovat, poté jsem je přesunula do vychlazené centrifugy. Centrifugace probíhala 20 min při 4 °C a zrychlení 3000 x g.

Supernatant (vždy stejný objem, podle nejmenšího vzorku) jsem přepipetovala do čisté mikrozkušavky E. a vytvořila jsem z něho dva aliquotey (A, B), taktéž o stejném objemu. V digestoři jsem do aliquotu A přidala roztok kyseliny trichloroctové s TBA (20% TCA + TBA) v poměru 1:1 (vzorek, roztok), do aliquotu B jsem přidala roztok TCA bez TBA (20% TCA – TBA) také v poměru 1:1. Mikrozkušavky E. jsem uzavřela, zvortexovala, v digestoři je znovu otevřela a inkubovala v termobloku při 95 °C po dobu 25 min. Následovalo zchlazení v ledu na 2-3 minuty a centrifugace (20 min, 4 °C, 3000 x g). Supernatanty jsem napipetovala do čistých mikrozkušavek E. Na spektrofotometru (Evolution 201, program Thermo insight) jsem ve skleněné kyvetě (1 ml) změřila blank (dH<sub>2</sub>O) při vlnových délkách 440, 532 a 600 nm. Poté jsem změřila jednotlivé vzorky (o stejném objemu). Mezi jednotlivými vzorky jsem kyvetu vyplachovala dH<sub>2</sub>O a EtOH. Na základě rozdílu absorbancí aliquoteů daného vzorku jsem vypočítala obsah MDA (nmol.ml<sup>-1</sup>) podle následujícího vzorce:

$$C_{\text{MDA}} = 10^6 * [(A - B) / 157\ 000]$$

$$A = [(Abs\ 532_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) - (Abs\ 532_{-TBA} - Abs\ 600_{-TBA})]$$

$$B = [(Abs\ 440_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) * 0,0571]$$

kde: Abs 532<sub>+TBA</sub> – Abs 600<sub>+TBA</sub> = absorbance komplexů TBA-MDA při 532 nm korigovaná na nespecifickou absorbanci při 600 nm; Abs 532<sub>-TBA</sub> – Abs 600<sub>-TBA</sub> = absorbance sloučenin v extrakčním roztoku bez TBA při 532 nm korigovaná na nespecifickou absorbanci při 600 nm; [(Abs 440<sub>+TBA</sub> – Abs 600<sub>+TBA</sub>) \* 0,0571] = oprava nespecifických komplexů TBA-cukr (Hodges 1999).

### 3.2.4 Stanovení míry úniku elektrolytů z pletiv

Míru úniku elektrolytů (EC) jsem stanovovala na čerstvě odebraných vzorcích prýtu a kořene o známé navážce. Do scintilační lahvičky jsem napipetovala 15 ml dH<sub>2</sub>O. Při měření vzorků z rostlin kultivovaných *in vitro* jsem v případě potřeby opláchla kořen dH<sub>2</sub>O a osušila ho buničinou. Z každé rostliny jsem odebrala vzorek kořene (zpravidla celý kořen) a vzorek několika listů o hmotnosti cca 0,01-0,1 g. Při měření vzorků z rostlin kultivovaných *ex vitro* byl vzorkem typicky 1 list s vyříznutou střední žilkou. Každý vzorek jsem vložila do kádinky a stříčkou s dH<sub>2</sub>O jej opláchla. Vzorek jsem v dH<sub>2</sub>O krátce ponechala, aby se vymyly elektrolyty vyplavené po odříznutí vzorku. Vzorek jsem pinzetou opatrně vytáhla, nechala okapat a přesunula ho do připravené lahvičky s 15 ml dH<sub>2</sub>O. Lahvičku jsem poté uzavřela parafilmem nebo plastovým víčkem. Listy a kořeny se ve vodě louhovaly 6 až 16 hodin při pokojové teplotě (doba byla v rámci jednoho experimentu fixní). Sondu multimetru Edge

HI2020 jsem opláchla dH<sub>2</sub>O a jemně ji osušila buničinou. Roztok v lahvičce jsem promíchala a odpipetovala z něj 8 ml do čisté centrifugační zkumavky. Sondu jsem ponořila do roztoku ve zkumavce, poklepala na sondu, aby se uvolnily vzduchové bubliny a uložila hodnotu EC<sub>0</sub>. Zbylý roztok s listy či kořeny jsem nalila do zkumavky k právě změřenému vzorku a víčko zkumavky jsem nechala mírně pootevřené. Vzorky jsem v hliníkových stojanech vyklávovala při standartním klávacím cyklu v autoklávu s pomalým vyrovnáním tlaku. Vzorek jsem po vychladnutí přelila ze zkumavky do čisté nádoby, odpipetovala 8 ml roztoku a změřila konečnou konduktivitu (EC<sub>kon.</sub>). Naměřené hodnoty jsem poté přepočítala na 0,1 g čerstvé hmotnosti. Výslednou míru úniku elektrolytů z celkového množství elektrolytů v pletivech jsem stanovila podle vzorce:

$$EC = \left( \frac{EC_0}{EC_{kon.}} * 100 \right) \%,$$

kde EC<sub>0</sub> = množství elektrolytů uniklých z pletiv za stanovený čas, EC<sub>kon.</sub> = celkové množství elektrolytů v pletivech (Si et al., 2019).

### 3.2.5 Stanovení hladiny reaktivních forem kyslíku

Pro detekci množství reaktivních forem kyslíku (ROS) jsem použila metodiku používanou v laboratoři, jejímž principem je oxidace 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátu (H<sub>2</sub>DCFDA) na fluorescenční 2',7'-dichlorofluorescein v přítomnosti ROS.

Pro stanovení obsahu ROS jsem používala 0,005% H<sub>2</sub>DCFDA (dále jako sonda). Sondu jsem připravila rozpuštěním 5 mg H<sub>2</sub>DCFDA (Sigma) ve 100 ml dimethylsulfoxidu, rozdělila ji po 1,5 ml do mikrozkušavek E. a ty uložila do -20 °C. Před samotným měřením jsem sondu nechávala roztát při pokojové teplotě, ve tmě. Do borosilikátové lahve jsem připravila 20 mM Na-fosfátový pufr (pH 6,4) a uložila ho do lednice (4-6 °C). Jako pozitivní kontrolu jsem použila 3% peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), jako negativní kontrolu glutathion (GSH).

Navážila jsem přesně okolo 0,1 g vzorku listů nebo kořenů do mikrozkušavek E. s kulatým dnem spolu s nerezovými homogenizačními kuličkami (o průměru 5 mm) a uložila je do -80 °C. Vzorky jsem v tekutém dusíku přenesla ke kulovému mlýnu. Držáky na zkumavky jsem před použitím vymrazila v tekutém dusíku, vložila do nich vzorky a upevnila je na mlýn. Homogenizace probíhala 3 minuty při vibrační frekvenci 30 Hz. Zhomogenizované vzorky jsem uložila na led a přidala k nim 20mM fosfátový pufr o objemu přesně odpovídajícímu 0,5 ml na 0,1 g čerstvé hmotnosti. Vzorky jsem zvortexovala a přesunula je do předem vychlazené centrifugy. Centrifugace probíhala 10 minut při 4 °C a zrychlení 4000 x g. Vzorky jsem

přemístila na led a do nových zkumavek z nich odebrala 350  $\mu$ l supernatantu. Ten jsem následně doplnila fosfátovým pufrům do finálního objemu 1 ml.

Hladinu ROS jsem stanovovala v 96 jamkové destičce v technických triplikátech. Před měřením jsem pro každý triplikát připravila premix o 3,5 násobku požadovaného objemu (350  $\mu$ l). Pro premix vzorku (10%) jsem do mikrozkušavky E. napipetovala připravený vzorek (35  $\mu$ l), pufr (280  $\mu$ l) a sonda (35  $\mu$ l). Sonda jsem promíchala špičkou a do triplikátů ji přidávala jako poslední, těsně před plněním destičky. Předtím byla uchovávána ve tmě. Kromě samotných vzorků jsem stanovovala hladinu ROS také u kontrol: pufru, sondy a konc. vzorku (90%). Kromě toho jsem připravila kontrolní vzorek s  $H_2O_2$  a vzorek s glutathionem (3  $\mu$ M), s očekávaným maximem a minimem. Při dalších měřeních jsem již měřila pouze vzorky a kontrolu sondy. Objemy složek připravovaných premixů jsou uvedeny v tabulce 3.

V rámci testování metodiky jsem připravila také kontrolní koncentrační řadu vybraných vzorků (10%, 30%, 50%, 70% a 90%) pro zhodnocení spolehlivosti metodiky. Pro stanovení hladiny ROS byla nejvhodnější konc. 10 % (35  $\mu$ l) vzorku v premixu.

*Tabulka 3 – Objemy jednotlivých složek premixů*

	<b>GS/<math>H_2O_2</math></b> <b>(<math>\mu</math>l)</b>	<b>vzorek (<math>\mu</math>l)</b>	<b>sonda (<math>\mu</math>l)</b>	<b>pufr (<math>\mu</math>l)</b>
<b>Vzorek 10%</b>	0	35	35	280
<b>Konc. vzorek 90%</b>	0	315	35	0
<b>Sonda (kontrola)</b>	0	0	35	315
<b>Blank vzorek</b>	0	35	0	315
<b>Pufr (kontrola)</b>	0	0	0	350
<b><math>H_2O_2</math> (kontrola)</b>	10,5	35	35	269,5
<b>GSH (kontrola)</b>	87,5	35	35	192,5

Z premixů (350  $\mu$ l) jsem naplnila vždy 3 jamky destičky 100  $\mu$ l. Hladinu ROS vzorků jsem stanovila spektrofluorometrem CLARIOstar (BMG LABTECH) který počítá průměrnou hodnotu ze tří sousedních jamek. Excitační a emisní vlnové délky byly stanoveny na 485 nm a 552 nm s filtry: 490SP a 510LP. Vzorky byly měřeny 40 min s intervalem záznamu 1 min.

### 3.3 Zpracování dat

Tabulky jsem vytvářela v programu Microsoft Office Excel 2019. Pro tvorbu grafů a statistické vyhodnocení experimentů jsem použila programovací jazyk R v prostředí RStudio (verze 1.2.5033). Při porovnání více než dvou skupin jsem data testovala jednocestnou analýzou variance (ANOVA), pomocí funkcí aov a anova nebo summary. Jako post-hoc test jsem použila Tukey's range test, funkce TukeyHSD. Normální rozložení dat jsem testovala pomocí funkce

shapiro.test. V případě odchylek od normality jsem provedla logaritmickou transformaci (funkce log) a použila již zmíněný parametrický test. V případě, že bylo rozložení dat stále výrazně nenormální, použila jsem neparametrický Kruskal-Wallis test, funkce kruskal.test, a jako post-hoc Dunn's test, funkce dunn.test. Pro korekci p-hodnoty jsem zvolila metodu Holm. Při porovnání dvou skupin jsem použila Welch's t-test, funkce t.test, a v případě nenormálního rozložení dat jsem použila neparametrický Wilcoxon test, funkce wilcox.test.

## **4. Experimenty**

### **4.1 Přehled provedených experimentů**

#### **4.1.1 Experimenty prováděné in vitro**

##### **1. Experiment I.**

Materiál: 4 genotypy (235E, 66B, Desirée, Lada)

Experimentální design: A1

Ošetření: 0, 3 a 6 % PEG 4000

##### **2. Experiment II.**

Materiál: 4 genotypy (235E, 66B, Desirée, Lada)

Experimentální design: A2

Ošetření: 0, 1,5 a 3 % PEG 4000

##### **3. Experiment III.**

Materiál: 4 genotypy (235E, 66B, Desirée, Lada)

Experimentální design: B

Ošetření: 0, 1,5, 3 a 6 % PEG 4000

##### **4. Experiment IV.**

Materiál: 2 genotypy (66B, Lada)

Experimentální design: D1

Ošetření: aklimaační chlad 12 °C, stresový chlad 6 °C

#### **4.1.2 Experimenty prováděné ex vitro**

Rostliny byly předpěstovány *in vitro* a převedeny *ex vitro* do kontrolovaných podmínek v kultivačním boxu.

##### **5. Experiment V.**

Materiál: 2 genotypy (66B, Lada)

Experimentální design: C

Ošetření: přerušení zálivky

## 6. Experiment VI.

Materiál: 2 genotypy (66B, Lada)

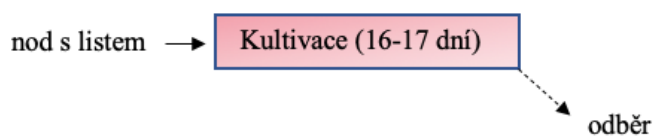
Experimentální design: D2

Ošetření: aklimační chlad 12 °C, stresový chlad 6 °C

### 4.1.3 Experimentální design

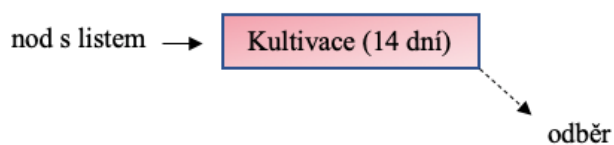
#### A) Simulace nedostatku vody: jednorázové působení

A1)



Ošetření (% PEG):	0	3	6
-------------------	---	---	---

A2)

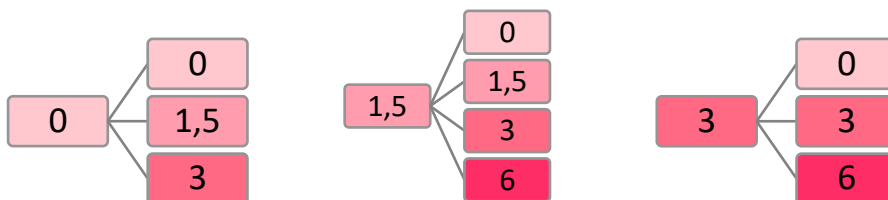


Ošetření (% PEG):	0	1,5	3
-------------------	---	-----	---

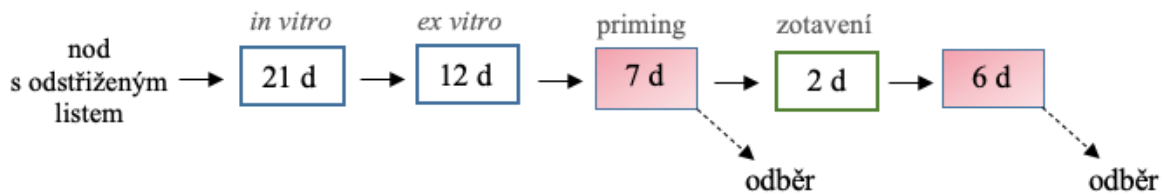
#### B) Simulace nedostatku vody: opakované působení



Ošetření (% PEG), 1. působení – 2. působení:

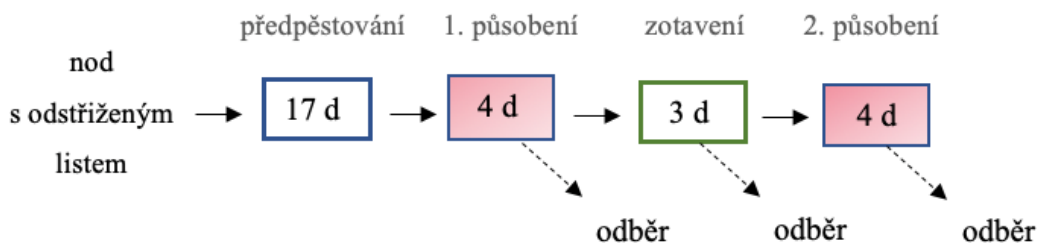


#### C) Simulace sucha (přerušáním závlivky) *ex vitro*: opakované působení

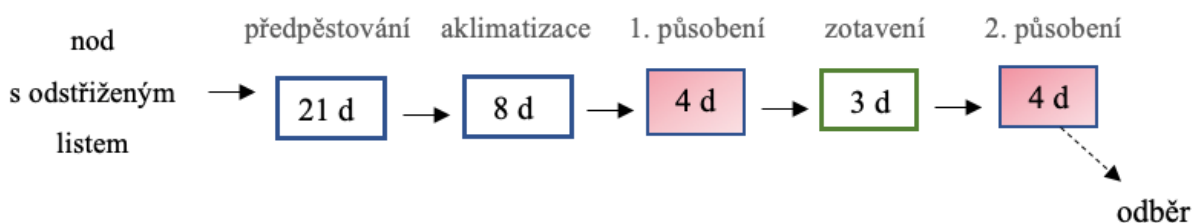


## D) Chlad: opakované působení

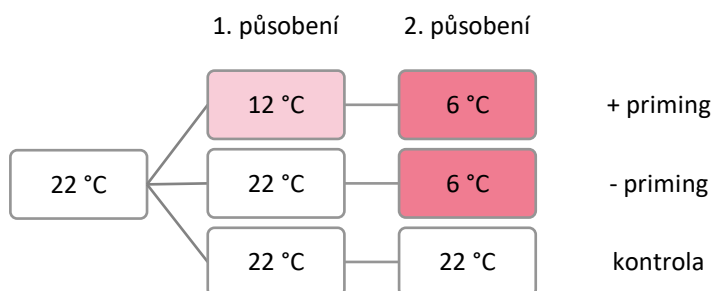
### 1. in vitro



### 2. ex vitro



Ošetření (platí pro D1 i D2):



Vysvětlivky:

*d* - počet dní

nod bez listu – list byl z nodálního segmentu při pasážování odříznut

nod s odštířeným listem – list byl z nodálního segmentu odštířnut několik dní po pasážování

předpěstování – fotoautotrofní kultivace na médiu bez PEG in vitro (2. předpěstování - po pasážování)

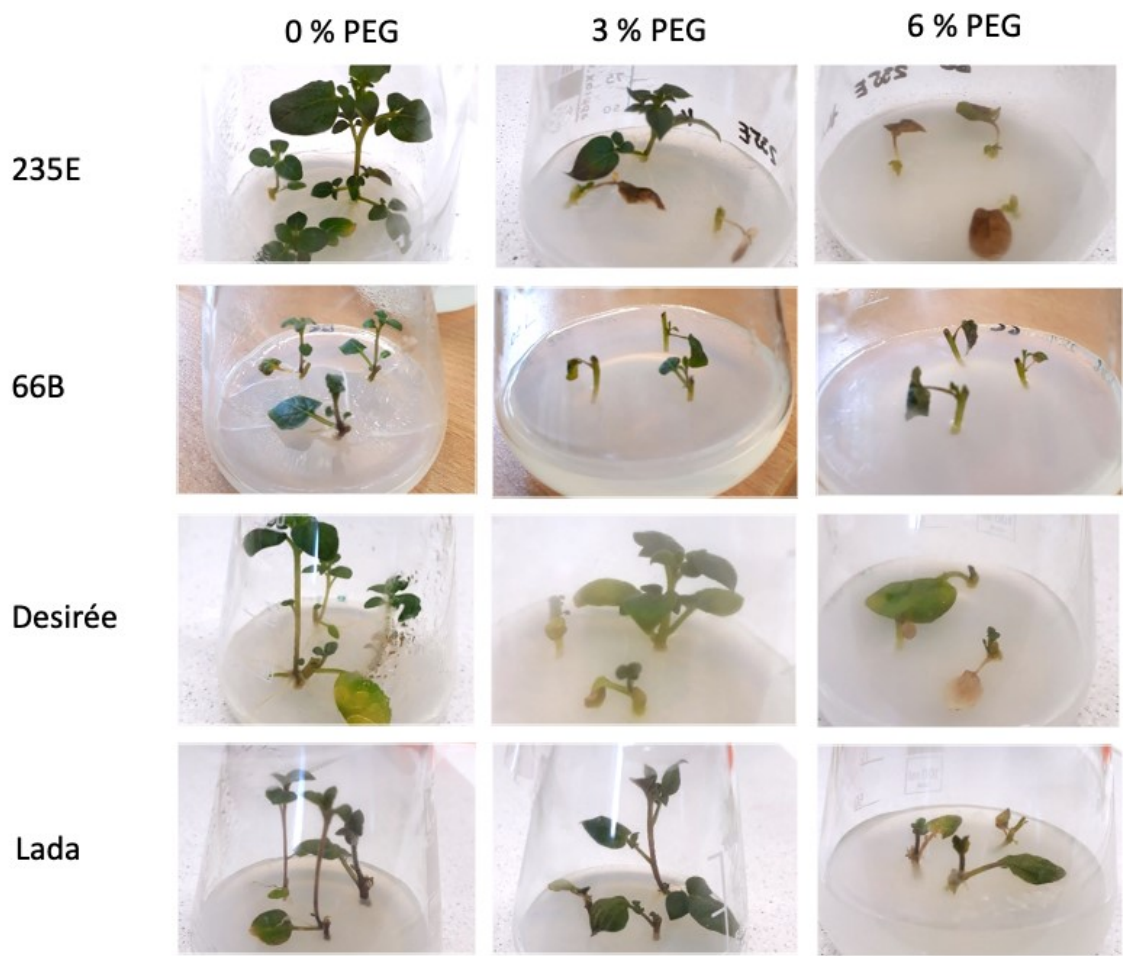
zotavení – přesun rostliny do podmínek bez stresového faktoru (přesun na médium bez PEG/přesun do kontrolní teploty/zahájení závlivky)

aklimatizace – přivykání rostlin na nové prostředí po převedení ex vitro

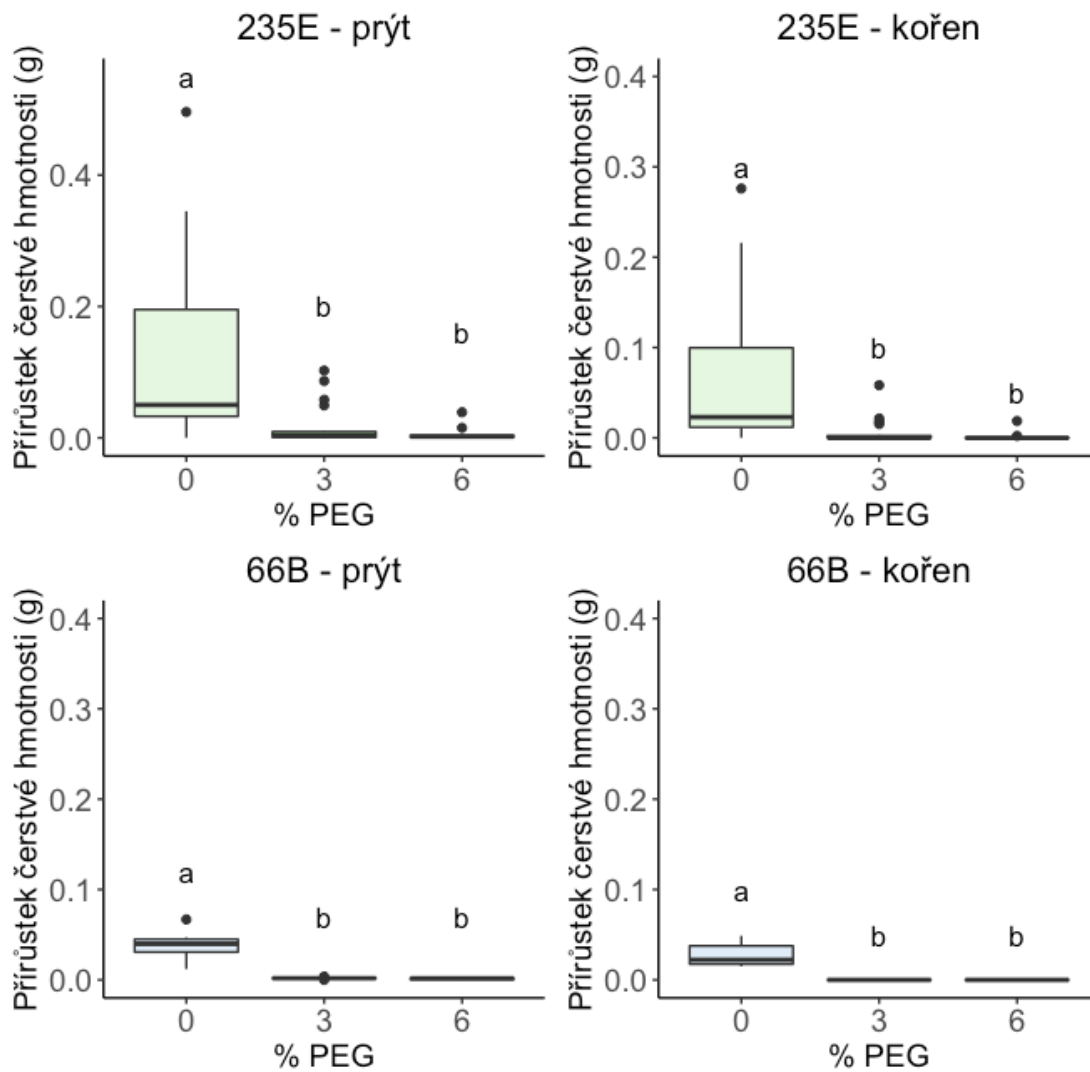




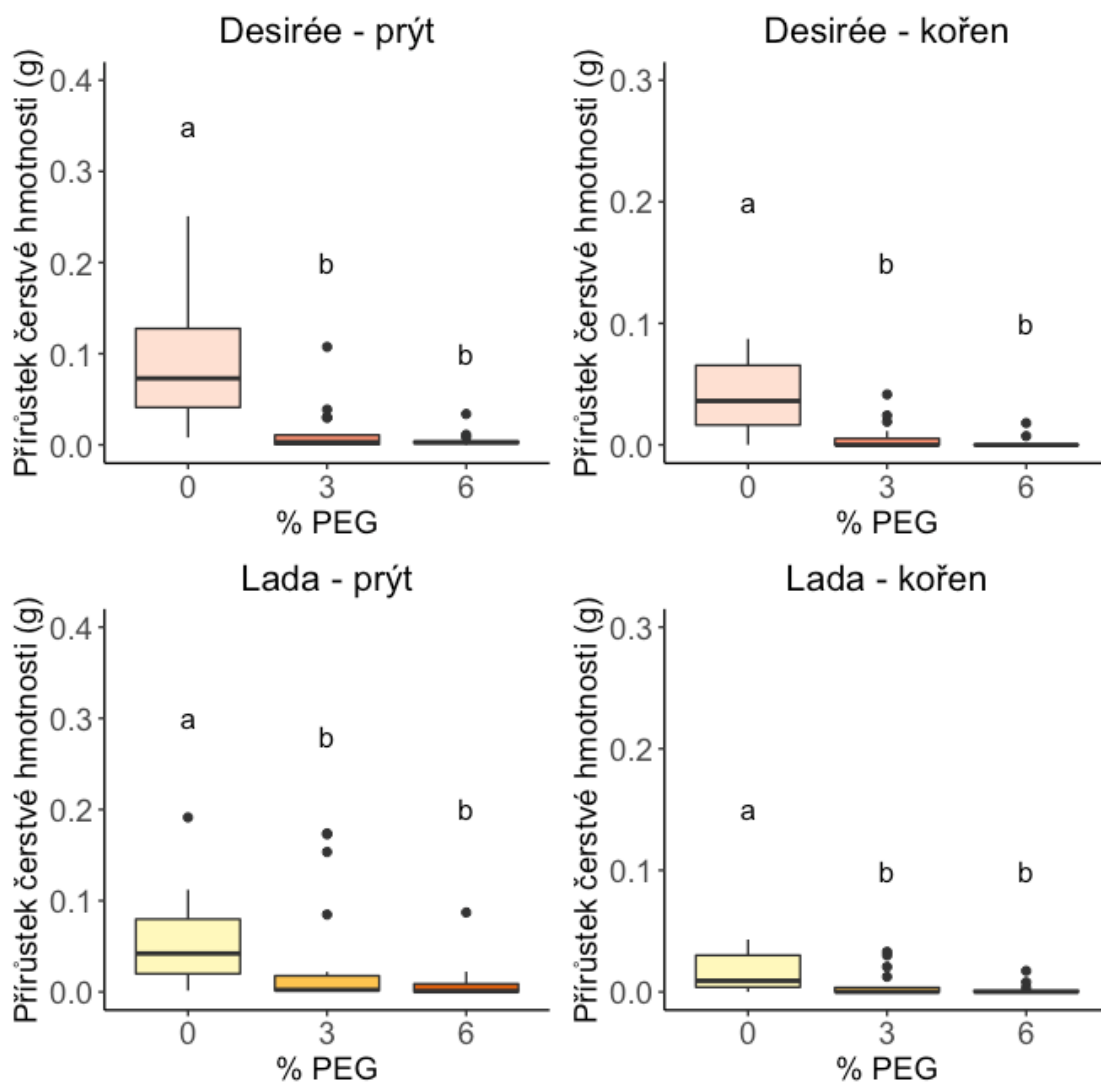
PEG (jedna u každého genotypu kromě 66B). Jedná se rostliny odvozené ze vzrostných vrcholů, což vzhledem k rychlému růstu zvýšilo variabilitu v datech přírůstků čerstvé hmotnosti. Linie 66B a rostliny všech následujících experimentů již byly odvozené pouze z nodálních segmentů. Na konci experimentu jsem odřízla prorůstající prýty a kořeny a zvažila je. Rozdíl mezi přírůstkem hmotností prýtu i kořene mezi stresovanými a kontrolními rostlinami byl statisticky průkazný u všech genotypů (viz graf 1 a 2). Přírůstky obou částí rostliny byly na médiu s PEG velice nízké. Mezi přírůstkem kořenů kontrolních a stresovaných rostlin genotypů 235E, 66B a Desirée byl nalezen rozdíl při  $p \leq 0,0001$ , jelikož kořen málokdy prorůstal. Cv. Lada byl jediný, u něhož byl nalezen trend poklesu přírůstku prýtu mezi variantami pěstovanými na médiu s 3 % a 6 % PEG ( $p = 0,054$ , Dunn's test). U zbylých genotypů nebyl mezi těmito variantami průkazný rozdíl. Kontroly všech genotypů rostly však dobře (viz obrázek 5). U několika vzorků prýtu cv. Desirée a Lada jsem stanovila hladinu malondialdehydu (MDA), na jejímž základě se odhaduje míru peroxidace lipidů. MDA jsem měřila u rostlin pěstovaných na médiu s 0 % (kontrola) a 3 % PEG, viz tabulka 4. Vzhledem k velmi malým navážkám jsem spojovala více prýtů dohromady, u vzorku označeného \* dokonce osm, výsledná konc. však byla neobvykle nízká, důvodem byla pravděpodobně chyba v přípravě vzorku. Přírůstky hmotnosti u stresovaných variant byly velice nízké, často nulové, proto jsem neprováděla další analýzy.



Obrázek 5 – Fotografie rostlin *S. tuberosum* ssp. *andigena* (genotyp 235E a 66B) a *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (cv. Desirée a Lada) kultivovaných 15-17 dní na médiu s různou koncentrací PEG.



Graf 1 – Vliv kultivace na médiu s PEG na přírůstky čerstvé hmotnosti prýtu a kořene *S. tuberosum* ssp. *andigena* genotypů 235E a 66B, 15 až 17 denní kultivace *in vitro* (exp. design A1);  $n = 9 - 18$ , odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Dunn's test,  $\alpha = 0,05$ ),

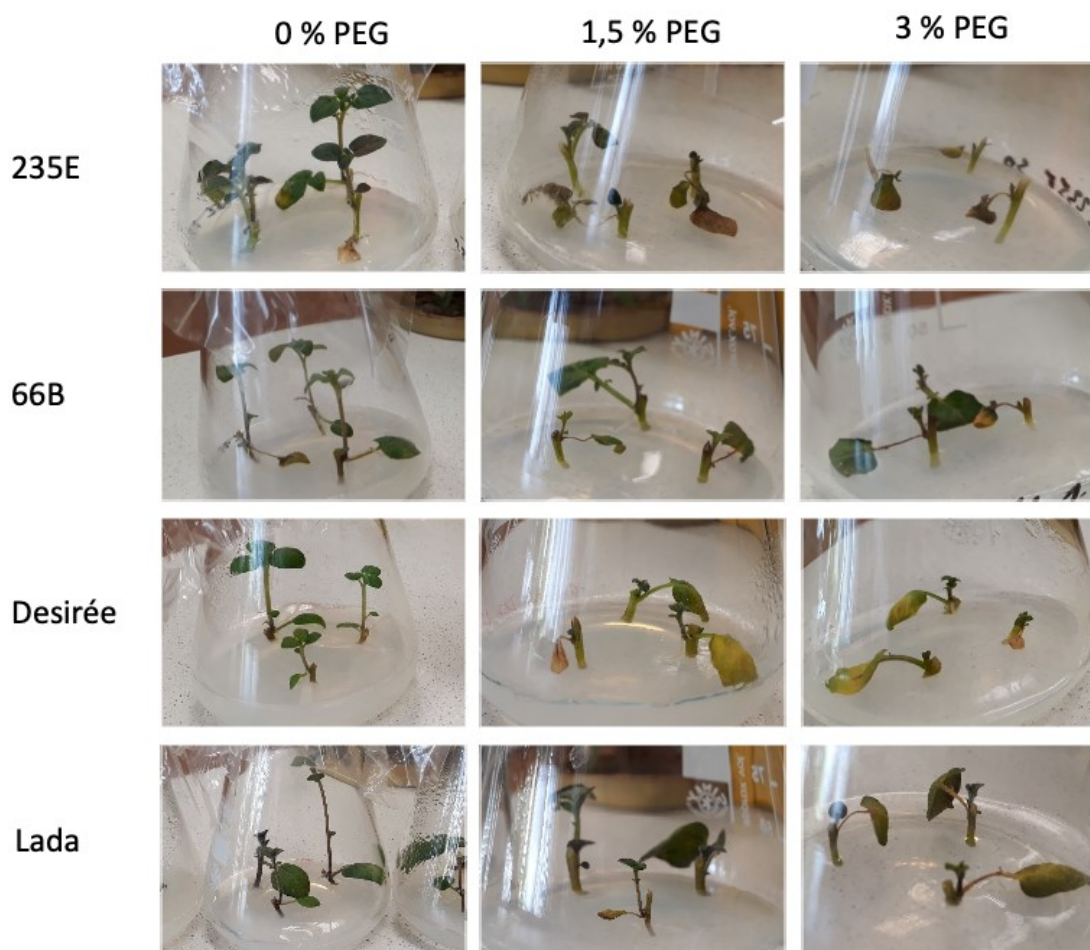


Graf 2 – Vliv kultivace na médiu s PEG na přírůstky čerstvé hmotnosti prýtu a kořene *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. *Desirée* a *Lada*, 15denní kultivace *in vitro* (exp. design A1);  $n = 18$ , odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Dunn's test,  $\alpha = 0,05$ ).

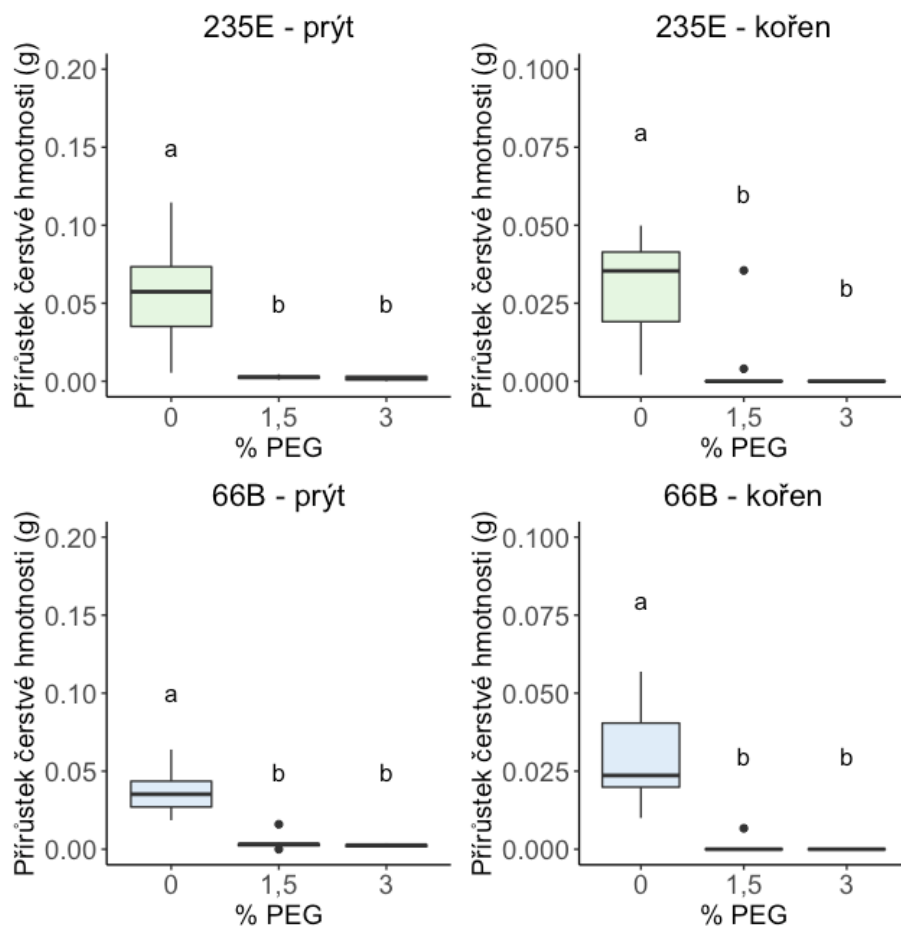
Tabulka 4 – Obsah MDA ( $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) v prýtu *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. *Desirée* a *Lada* po 15denní kultivaci *in vitro* na médiích s různou konc. PEG (exp. design A1), \* označuje chybnou hodnotu.

genotyp	PEG (%)	MDA
Desirée	0	0,348
		0,297
	3	0,434
		0,394
Lada	0	0,386
		0,21
	3	0,032*
		0,269

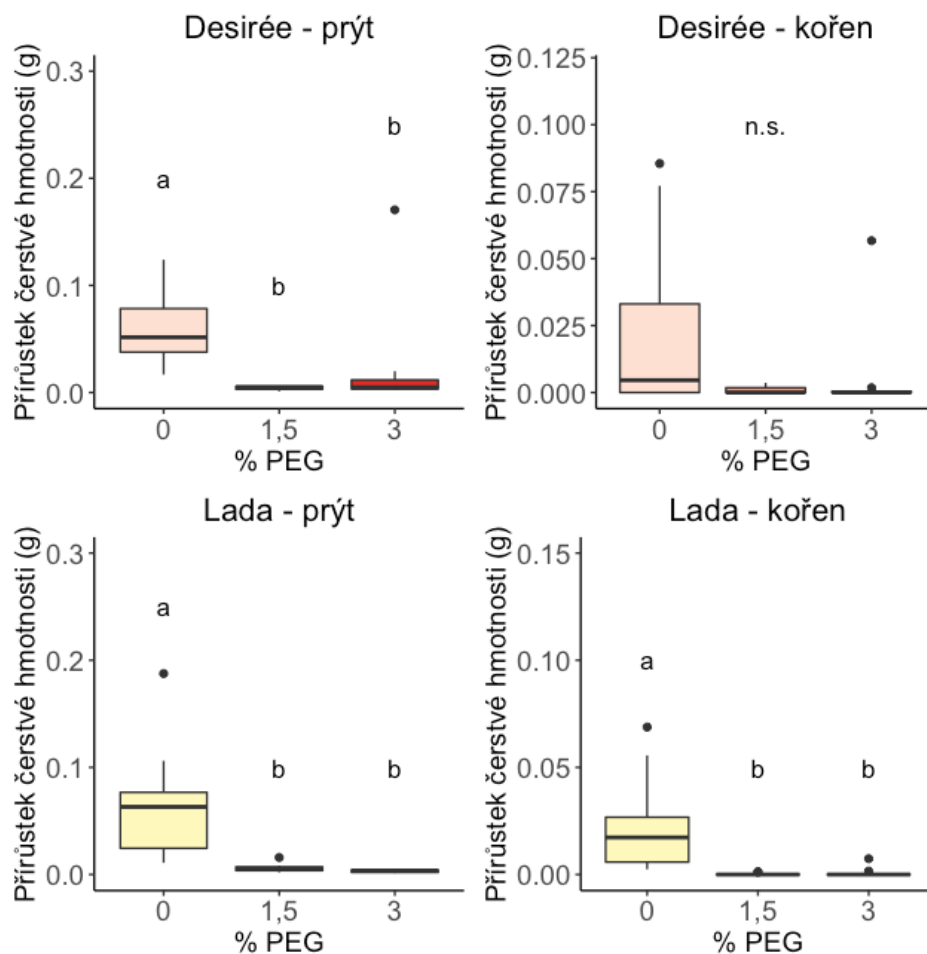
Jelikož byly přírůstky čerstvých hmotností stresovaných rostlin velmi malé či nulové, rozhodla jsem se v následujícím experimentu snížit konc. PEG (viz exp. design A2). Tato úprava nevedla ke zlepšení růstových charakteristik rostlin (obr. 6). Genotypy andigena (235E a 66B) měly na médiích s PEG velmi nízké přírůstky a kořen téměř neprorůstal (graf 3). Mezi přírůstky kontrolních a stresovaných rostlin obou genotypů byl nalezen rozdíl při  $p \leq 0,0001$ . Mezi přírůstky čerstvé hmotnosti (graf 4) prýtu na 0 % a 1,5 % PEG byl u cv. Lada nalezen rozdíl při  $p \leq 0,0006$ , u Desirée při  $p = 0,011$ . U varianty 1,5 % PEG Desirée byly hodnoceny pouze 3 rostliny, jelikož zbylé baňky s rostlinami zkontaminovaly. U kořene Desirée nebyl nalezen mezi variantami signifikantní rozdíl. Z důvodu velmi nízké biomasy jsem neprováděla jiné analýzy. Kultivace nodálních segmentů rovnou na médiu s PEG se tedy neosvědčila ani při nízké konc. PEG.



Obrázek 6 – Fotografie prýtu rostlin *S. tuberosum* ssp. *andigena* (genotyp 235E a 66B) a *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (cv Desirée a Lada) kultivovaných podle exp. designu A2 14 dní.



Graf 3 – Vliv kultivace na médiu s PEG na přírůstky čerstvé hmotnosti prýtu a kořene *S. tuberosum* ssp. *andigena* genotypů 235E a 66B, 14 denní kultivace *in vitro* (exp. design A2);  $n = 12$ , odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Dunn's test,  $\alpha = 0,05$ ).



Graf 4 – Vliv kultivace na médiu s PEG na přírůstky čerstvé hmotnosti prýtu a kořene *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. *Desirée* a *Lada*, 14denní kultivace *in vitro* (exp. design A2);  $n = 3-12$ , odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Dunn's test,  $\alpha = 0,05$ ).

### 5.1.2 Opakované působení PEG

Při optimalizaci designu se ukázalo jako důležité nechat úžlabní pupen prorůst před vystavením stresovému působení (fáze předpěstování). Pro snížení variability byl při pasážování z nodálního segmentu odstraněn list. V experimentu III jsem testovala vliv prvního působení stresu na působení následující a možný benefiční efekt předchozího vystavení osmotickému stresu (PEG v médiu) při dalším setkání s tímto stresem. Rostliny jsem kultivovala podle designu B a testovala jsem různé kombinace 1. a 2. působení: opakovaný stres, jednorázový stres a kontroly (podrobněji v kapitole 4.1.3). Vzhledem k pokračujícímu problému s kontaminacemi nebyly provedeny všechny plánované varianty. V průběhu práce na experimentu III. jsem musela nahradit již nedostupné filtry Sun Cap páskou Leukopor, kterou jsem pro větší bezpečnost proti kontaminacím nalepila ve dvou vrstvách. Po zhodnocení přírůstků čerstvých hmotností se však ukázalo, že byl rozdíl v propustnosti plynů mezi těmito dvěma typy víček mnohdy výrazný. Rostliny kultivované v baňkách uzavřených víčkem

s páskou byly menšího vzrůstu než rostliny zakryté víčkem s filtrem (viz tabulka 5). U cv. Desirée (graf 5) byl nalezen výrazný vliv víčka při  $p=1,32 \cdot 10^{-6}$  (dvoucestná ANOVA). U genotypů 235E, 66B a Desirée proběhla kultivace s oběma typy víček, u cv. Lada byl použit pouze Sun cap. Grafy 6 až 9 zobrazují přírůstky čerstvých hmotností prýtlů a kořenů všech genotypů kultivovaných s jedním typem víčka (s větším počtem variant a rostlin).

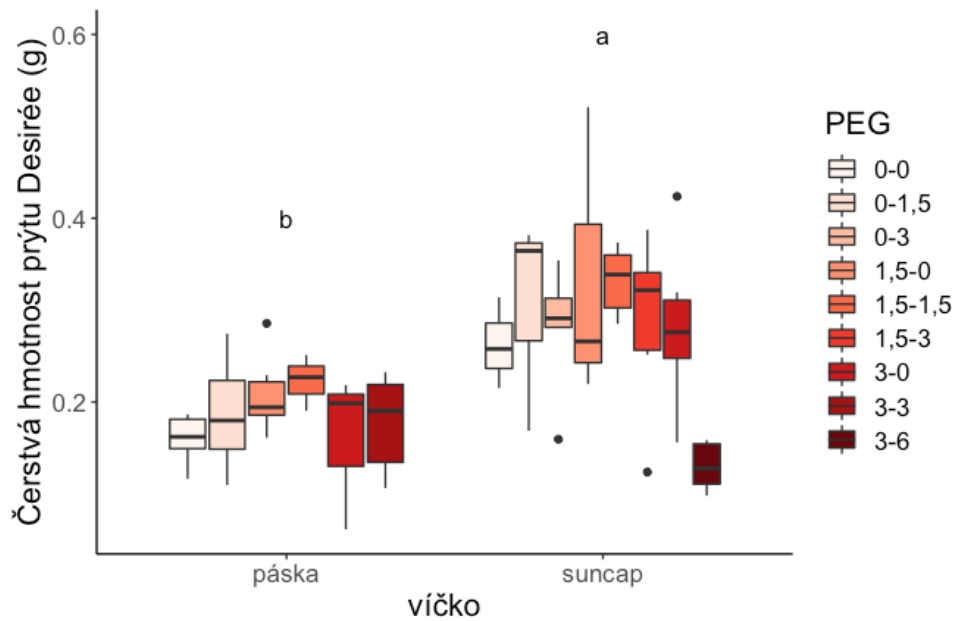
Přírůstky čerstvých hmotností se mezi jednotlivými variantami genotypů většinou výrazně nelišily. Systematickým rozdílem mezi variantami byl nižší přírůstek prýtlů na médiu s 6 % PEG (2. působení), u kořene cv. Desirée (graf 8) a prýtlů cv. Lada (graf 9, obr. 10). Varianty s vyššími konc. PEG však kvůli kontaminacím chybí u genotypů andigen (235E, 66B), odpověď kulturních a divokých genotypů proto nelze dobře porovnat. Mezi přírůstky čerstvé hmotnosti prýtlů i kořene genotypu 235E (graf 6, obr. 7) a kořene 235E nebyly u jednotlivých variant (kombinací působení) nalezeny signifikantní rozdíly. Výjimkou byl prýtl genotypu 66B (graf 7, obr. 8), u něhož byl nalezen signifikantní rozdíl mezi variantou 1,5-0 (1. působení 1,5 % PEG, 2. působení bez PEG) a kontrolou. U genotypu Desirée (obr. 9) byl testován poměrně velký počet rostlin i u variant kultivovaných s víčkem s páskou, rozdíly mezi variantami však nebyly signifikantní (Tukey's test,  $\alpha = 0,05$ ).

Jak je vidět v tabulce 5 s hodnotami přírůstků čerstvých hmotností prýtlů, médium s 3 % PEG nebylo pro růst příliš limitující. Na růst rostlin měl kromě způsobu kultivace vliv také stav nodálního segmentu. Silnější a větší nodální segmenty často prorůstaly lépe a dříve zakořenily, což mělo na další růst značný vliv. Tento efekt byl dosti patrný u cv. Lada, jenž se vysokou heterogenitou růstu vyznačoval ve všech experimentech.

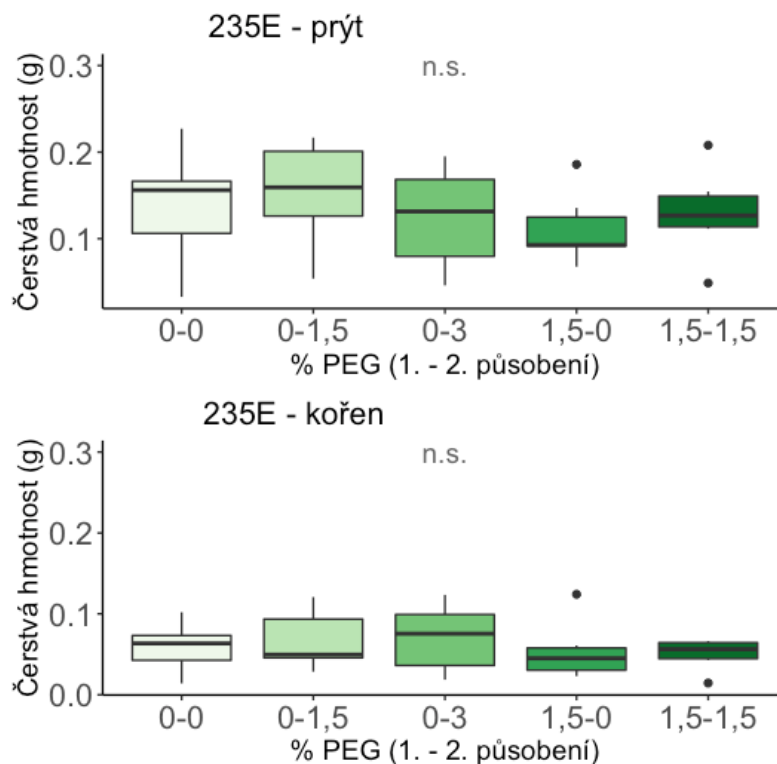
Tabulka 5 – Průměrná hmotnost prýtlů (g) *S. tuberosum* 4 genotypů po 24denní kultivaci na médiu s různou konc. PEG (exp. design B), vliv dvou typů víček - s filtrem Sun cap (sc) nebo páskou (p), n = počet rostlin ve variantě.

varianta	<b>235E<sub>sc</sub></b>	<b>235E<sub>p</sub></b>	<b>66B<sub>sc</sub></b>	<b>66B<sub>p</sub></b>	<b>Desirée<sub>sc</sub></b>	<b>Desirée<sub>p</sub></b>	<b>Lada<sub>sc</sub></b>
0-0	0,2498	0,1343	0,355	0,2299	0,3011	0,1739	0,2721
0-1,5	0,1175	0,1532	0,3661		0,3628	0,2071	
0-3		0,1245	0,3325		0,3287		0,2146
0-6							0,1585
1,5-0	0,2252	0,1109	0,3069		0,4113	0,2326	0,1805
1,5-1,5	0,2133	0,1294	0,3237	0,2044	0,3949	0,2501	
1,5-3			0,3683		0,3444		
1,5-6							0,0918
3-0					0,3303	0,1758	0,2566
3-3						0,1955	0,2882
3-6					0,1394		0,0973
	n=3	n=6-9	n=3-9	n=3	n=3-9	n=3-6	n=6-9

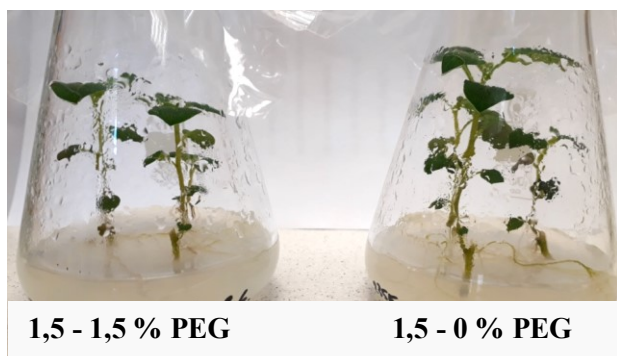




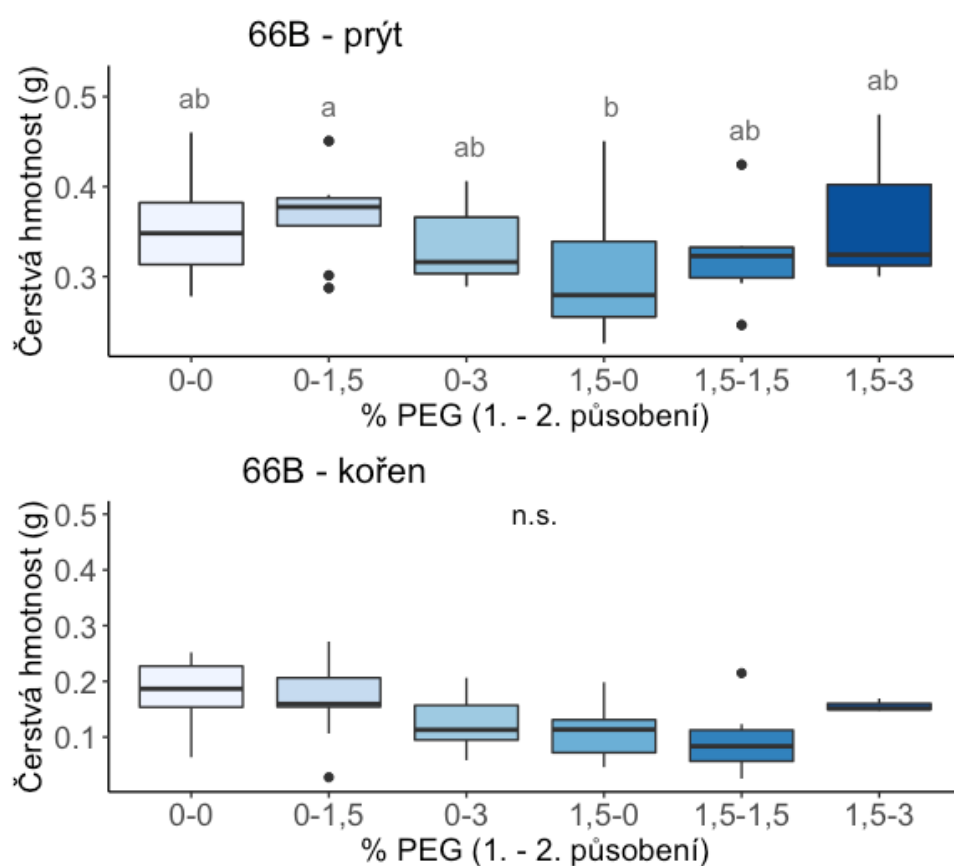
Graf 5 – Přírůstky čerstvé hmotnosti prýtu *S. tuberosum ssp. tuberosum* cv. *Desirée* po 2. působení stresu (22 dni) po logaritmické transformaci, kultivace *in vitro* s dvěma typy víček propouštějících plyny,  $n = 3-9$ , odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (dvoucestná ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ).



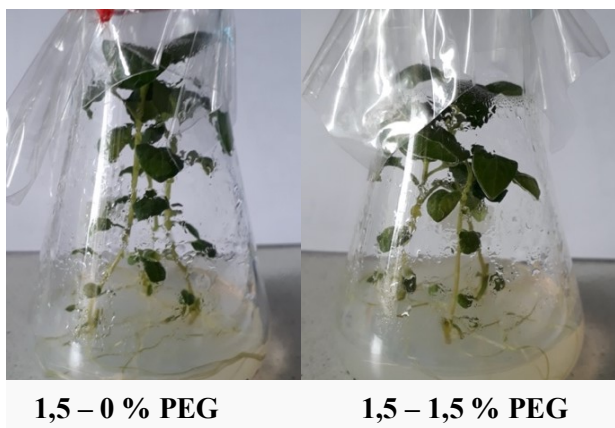
Graf 6 – Přírůstky čerstvé hmotnosti prýtu a kořene *S. tuberosum ssp. andigena* genotypu 235E po 2. působení stresu (21 dni), kultivace *in vitro* na médiích s různou konc. PEG (exp. design B), víčka s páskou;  $n = 6-9$ , n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami (Tukey's test,  $\alpha = 0,05$ ).



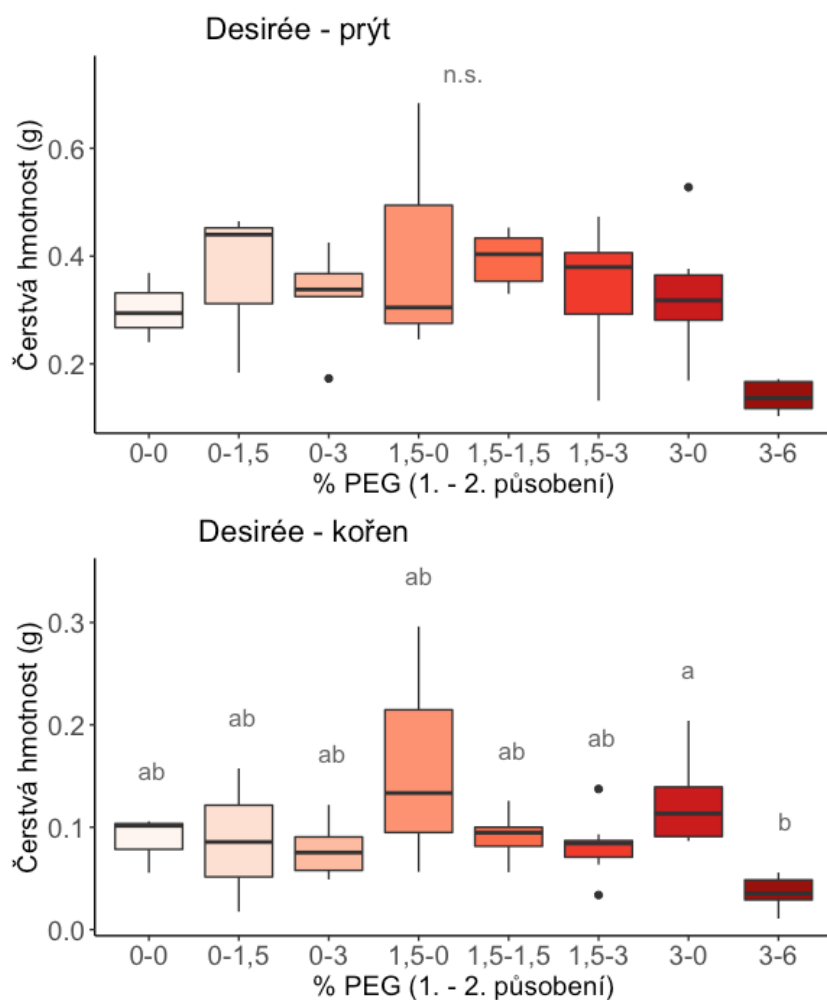
Obr. 7 – *S. tuberosum ssp. andigena* genotyp 235E, kultivovaný podle exp. designu B 24 dní na médiu s různou koncentrací PEG, baňky uzavřeny víčkem s páskou.



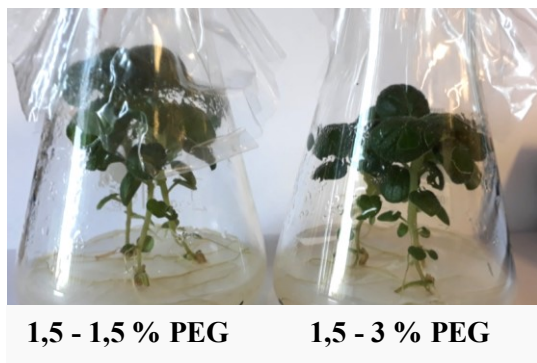
Graf 7 – Přírůstky čerstvé hmotnosti prýtu a kořene *S. tuberosum ssp. andigena* genotypu 66B po 2. působení stresu (21 dní), kultivace *in vitro* na médiích s různou konc. PEG (exp. design B), víčko Sun cap;  $n = 3-9$ , odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Tukey's test,  $\alpha = 0,05$ ), n.s. = nesignifikantní rozdíl mezi variantami.



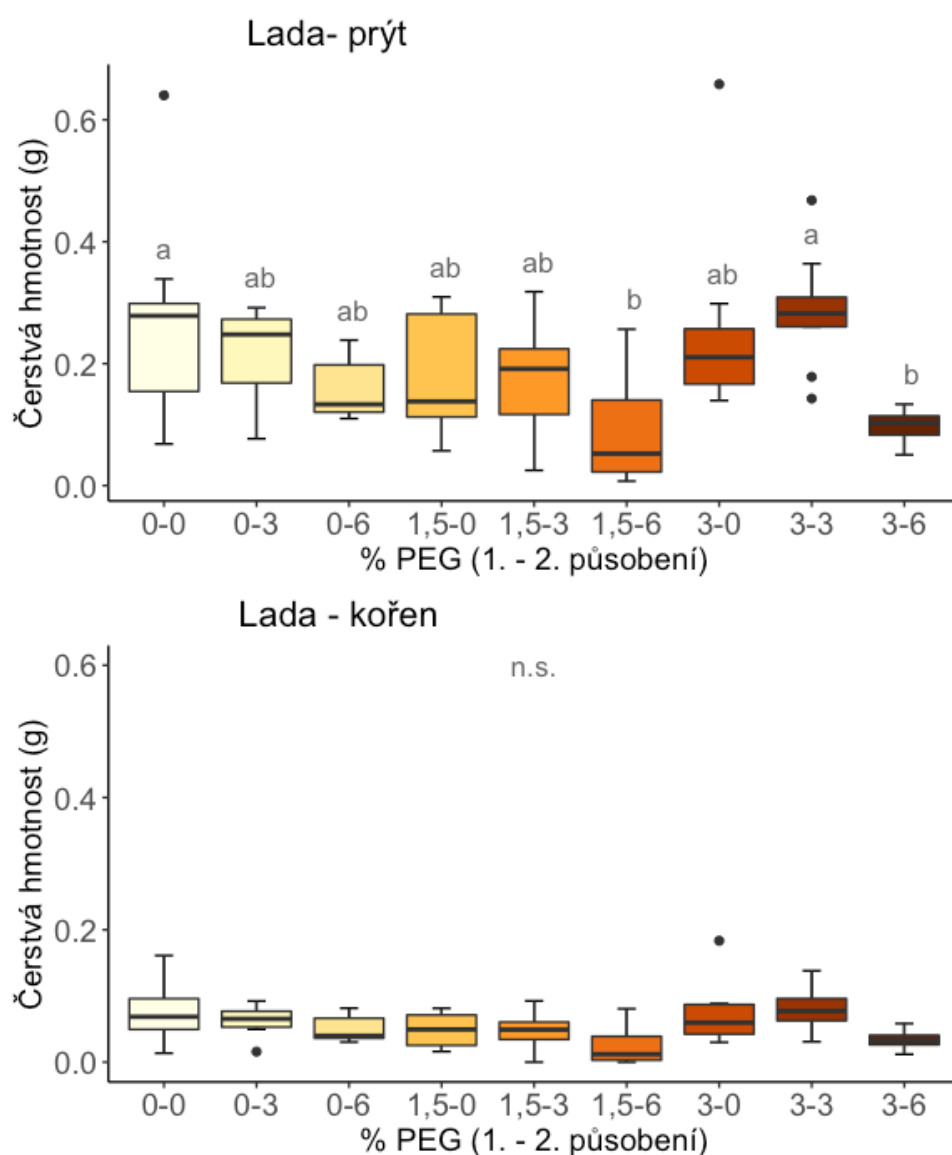
Obr. 8 – *S. tuberosum* ssp. *andigena* genotyp 66B, kultivovaný podle exp. designu B 24 dní na médiu s různou koncentrací PEG, baňky uzavřeny víčkem s páskou.



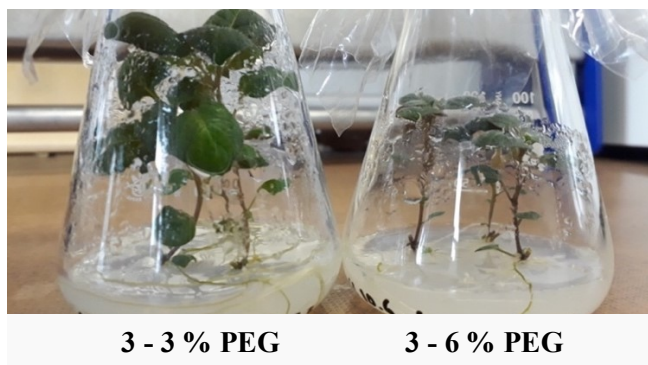
Graf 8 – Přírůstky čerstvé hmotnosti prýtu a kořene *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. *Desirée* po 2. působení stresu (22 dní), kultivace in vitro na médiích s různou konc. PEG (exp. design B), víčko Sun cap; n = 3-9, odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Tukey's test,  $\alpha = 0,05$  u prýtu; Dunn's test,  $\alpha = 0,05$  u kořene).



Obr. 9 – *S. tuberosum ssp. tuberosum* cv. *Desirée*, kultivované podle exp. designu B 24 dní na médiu s různou koncentrací PEG, baňky uzavřeny víčkem s filtrem Sun cap.



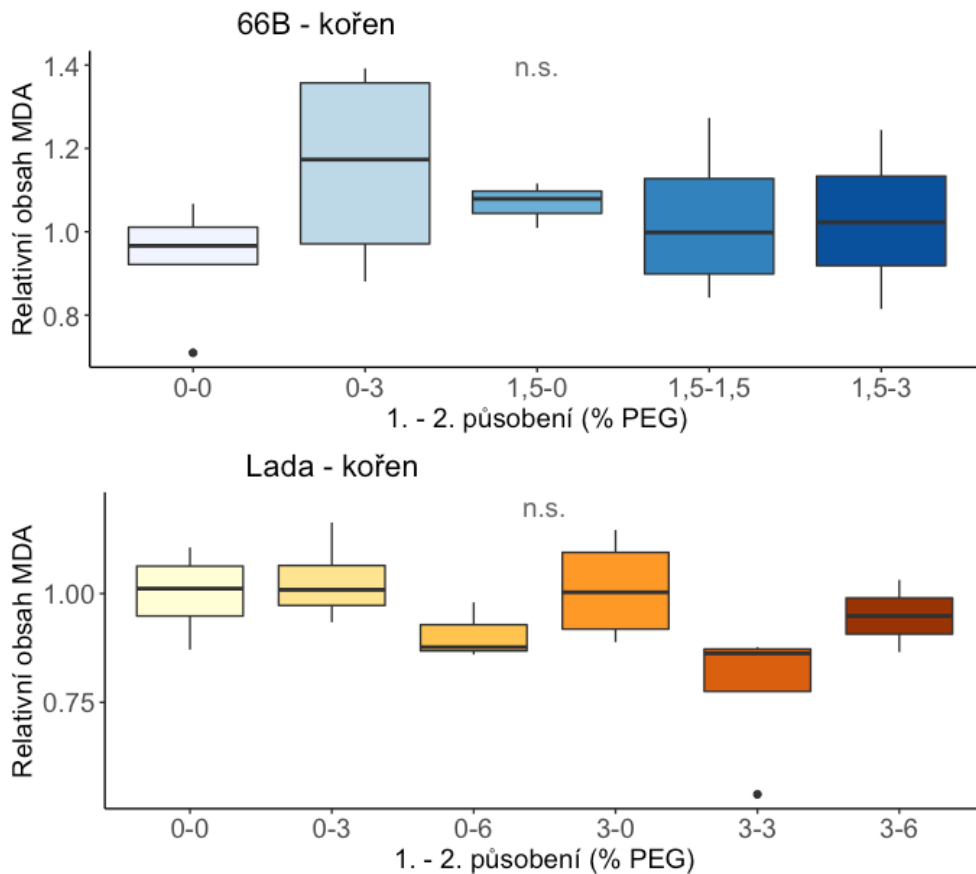
Graf 9 – Přírůstky čerstvé hmotnosti prýtu a kořene *S. tuberosum ssp. tuberosum* cv. *Lada* po 2. působení stresu (21 dní), kultivace in vitro na médiích s různou konc. PEG (exp. design B), víčko Sun cap;  $n = 6-9$ , odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Dunn's test,  $\alpha = 0,05$ ).



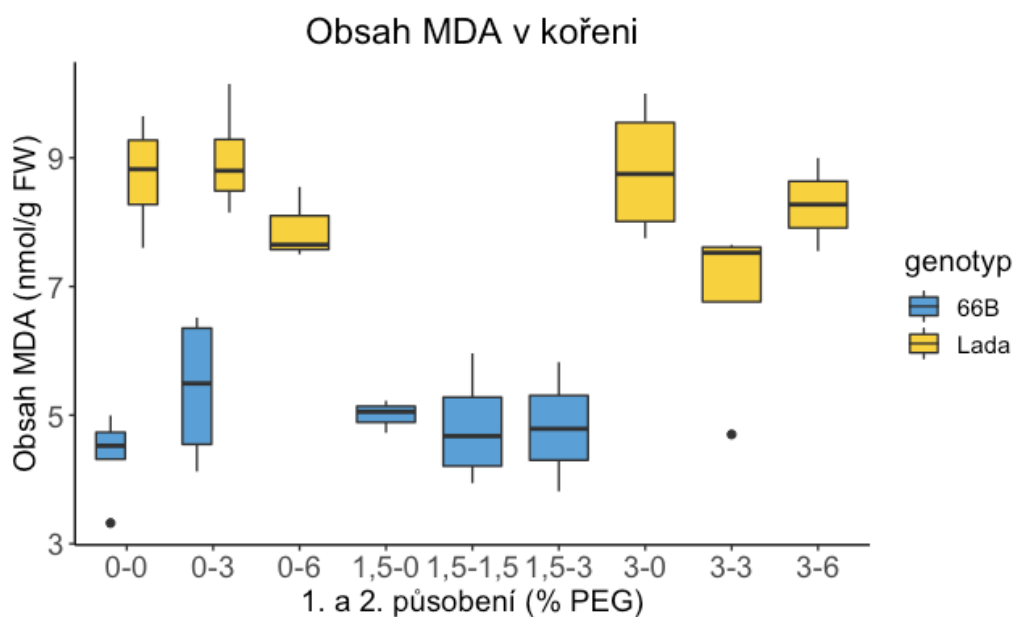
Obr. 10 – *S. tuberosum ssp. tuberosum* cv. Lada, kultivované podle exp. designu B 24 dní na médiu s různou koncentrací PEG, baňky uzavřeny víčkem s filtrem Sun cap.

U dvou vybraných genotypů (66B, Lada) byla dále stanovena hladina MDA, markeru peroxidace membránových lipidů. U žádného ošetření nedošlo ke zvýšení hladiny MDA v kořeni, dokonce ani u opakovaného silnějšího stresu (3-6) u cv. Lada (graf 10). V hladině MDA u stresovaných variant oproti kontrole ani u jednoho genotypu. Mezi variantami 0-3 a 3-3 cv. Lada však byl nalezen trend poklesu ( $p=0,07$ , Dunn's test). Zajímavé výsledky přineslo také porovnání hodnot MDA (graf 11) mezi genotypy 66B a Lada. Jelikož byly u 66B dopěstovány převážně jen rostliny vystavené mírnějšímu stresu, porovnávala jsem jen varianty 0-0 a 0-3, které byly společné oběma genotypům. U kontroly byl nalezen signifikantní rozdíl mezi genotypy při  $p=5,85 \cdot 10^{-5}$  a u varianty 0-3 při  $p=0,0027$  (Welch's t-test). V kořenech cv. Lada byla tedy zaznamenána výrazně vyšší hladina MDA než v kořenech 66B, a to i u kontrolní varianty.

Kvůli velké míře kontaminací, vysokému počtu genotypů i kombinací různých stresových působení se nepodařilo napěstovat dostatečný počet rostlin pro všechny plánované analýzy. Provedená optimalizace designu experimentu ani v tomto případě nevedla k výraznějšímu snížení variability dat pro jednotlivé varianty. Nehledě na ztížené hodnocení díky použití různých typů víček nebylo u žádného genotypu při opakovaném vystavení rostliny osmotickému stresu zaznamenáno signifikantní zvýšení biomasy oproti jednorázovému vystavení stresu a u genotypů 66B a Lada nebyly nalezeny změny v míře lipidové peroxidace.



Graf 10 – Relativní obsah MDA (vztaženo na průměrnou hodnotu kontroly) v kořeni *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 2. působení, kultivace *in vitro* na médiích s různou konc. PEG (experimentální design B);  $n = 2-5$ ; n.s. = nesignifikantní rozdíl mezi variantami (Tukey's test,  $\alpha = 0,05$ ).



Graf 11 – Obsah MDA v kořeni *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 2. působení, kultivace *in vitro* na médiích s různou konc. PEG (exp. design B);  $n = 2-5$ ; mezi genotypy byl nalezen signifikantní rozdíl u variant 0-0 a 0-3 (Welch's *t*-test,  $\alpha = 0,05$ ).

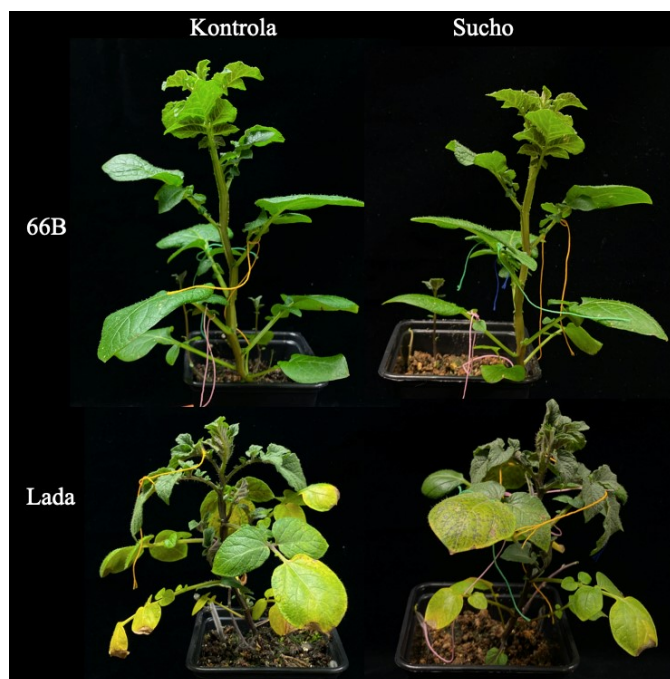
## 5.2 Působení sucha přerušením záливky

V experimentu V. jsem testovala odpověď rostlin *S. tuberosum* ssp. *andigena* (66B) a *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (Lada) na opakované a jednorázové působení sucha (design experimentu C). Rostliny jsem předpěstovala *in vitro* a ve 3 týdnech je převedla *ex vitro*. Působení sucha bylo realizováno vysušením misky pod květináči a přerušením záливky. U opakovaného působení proběhly dvě epizody sucha a byly proloženy 1-2 dny se záливkou (zotavení). Odběry proběhly dva, jeden po každém ošetření. Experiment byl jednou zopakován, přičemž v druhém opakování přibyla varianta jednorázového působení sucha. Rostliny této varianty byly zalévány až do chvíle druhého přerušení záливky u varianty opakovaného sucha. U prvního pokusu (dále jako Sucho 1), trvalo 2. působení sucha pouze 6 dní. V plánu bylo 2. působení prodloužit (oproti přípravnému 1. působení), experiment však musel být ukončen předčasně, kvůli rychlému stárnutí rostlin (listy žloutly a usychaly, viz obr. 11). Když jsem experiment opakovala (Sucho 2), zkrátila jsem aklimatizační fázi (z 12 na 8 dní) i zotavovací fázi (rostliny měly přístup k vodě pouze jeden den místo dvou). Druhé působení mohlo být díky tomu prodlouženo na 12 dní, kdy rostliny zejm. cv. Lada začaly žloutnout, jejich stav byl však na pohled lepší než v exp. Sucho 1 (obr. 12).

Převedení *ex vitro* bylo úspěšné (všechny rostliny se aklimatizovaly) a heterogenita poměrně nízká. Průběžně byla měřena vlhkost v květináči varianty opakovaného působení sucha. Při pravidelné záливce se vlhkost pohybovala kolem 98-100 %, po přerušení záливky a vysušení misky pozvolna klesala až na 47 % (v den 1. odběru). Po zalití rychle vystoupala k 98 %. Po 6 dnech bez záливky klesla až na 42 % (Sucho 1), po 12 dnech bez záливky na 33 % (Sucho 2).

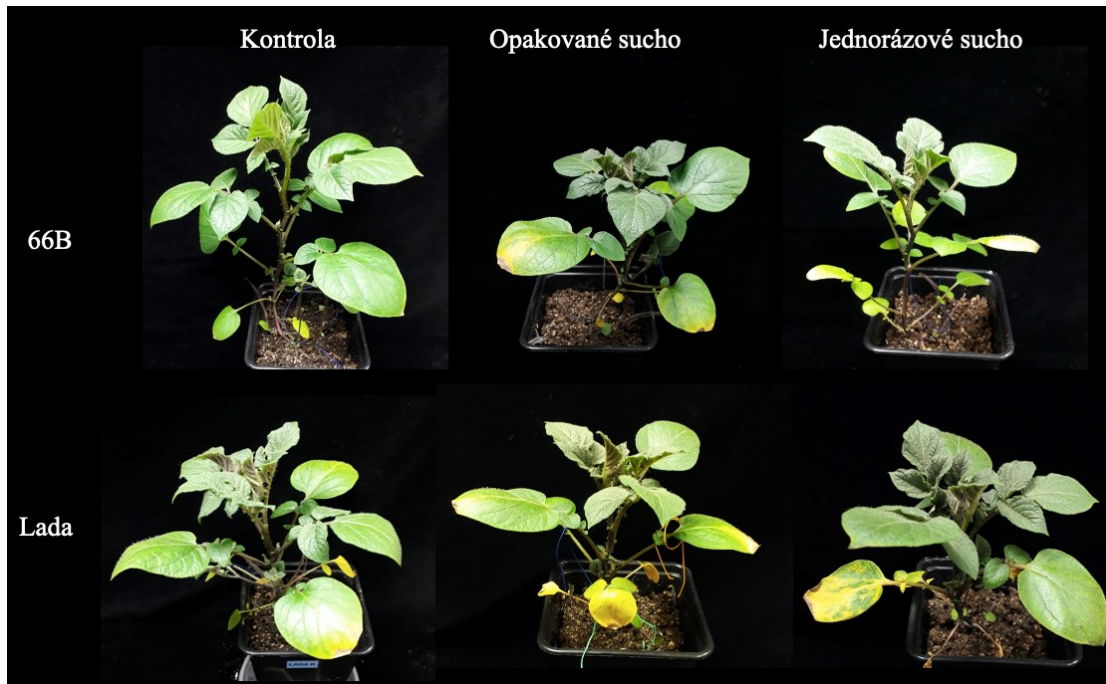
V experimentu Sucho 1 nebyl mezi variantami ani genotypy rozdíl v čerstvé hmotnosti prýtu po 1. i 2. ošetření (graf 12). U výšky prýtu (graf 13) byl signifikantní vliv genotypu při 1. odběru,  $p=0,037$ , i 2. odběru,  $p=3,9 \cdot 10^{-7}$  (dvoucestná ANOVA). Po druhém působení sucha byla výška prýtu u genotypu 66B průkazně nižší, než u kontrol. Při hodnocení rozdílů mezi variantami byla nalezena průkazná interakce mezi faktorem genotypu a ošetření suchem (viz tabulka 10), výška rostlin v reakci na sucho byla tedy výrazně ovlivněna genotypem (u 66B došlo k poklesu, u cv. Lada nikoliv). To mohlo být způsobeno senescencí u cv. Lada. V exp. Sucho 2 byly po 1. ošetření odebrány pouze 2 rostliny, uvádím proto jen průměrné hodnoty čerstvé hmotnosti a výšky rostlin v tabulce 6. Na 2. ošetření (12denní přerušení záливky) genotypy reagovaly výrazně odlišně v čerstvé hmotnosti i míře úniku elektrolytů z listu (interakce mezi vlivem genotypu a sucha byla průkazná, viz tabulka 10). U obou genotypů

sucho vyvolalo nižší čerstvou hmotnost prýtu (graf 14), mezi opakovaným a jednorázovým suchem nebyl signifikantní rozdíl, u cv. Lada však byl trend poklesu při  $p=0,093$  (Tukey's test). Výška rostlin byla průkazně nižší u varianty jednorázového sucha u obou genotypů (graf 14), výška varianty opakovaného sucha u cv. Lada výrazně omezena nebyla, u 66B byl však nalezen trend poklesu ( $p=0,06$ ) mezi opakovaným suchem a kontrolou.

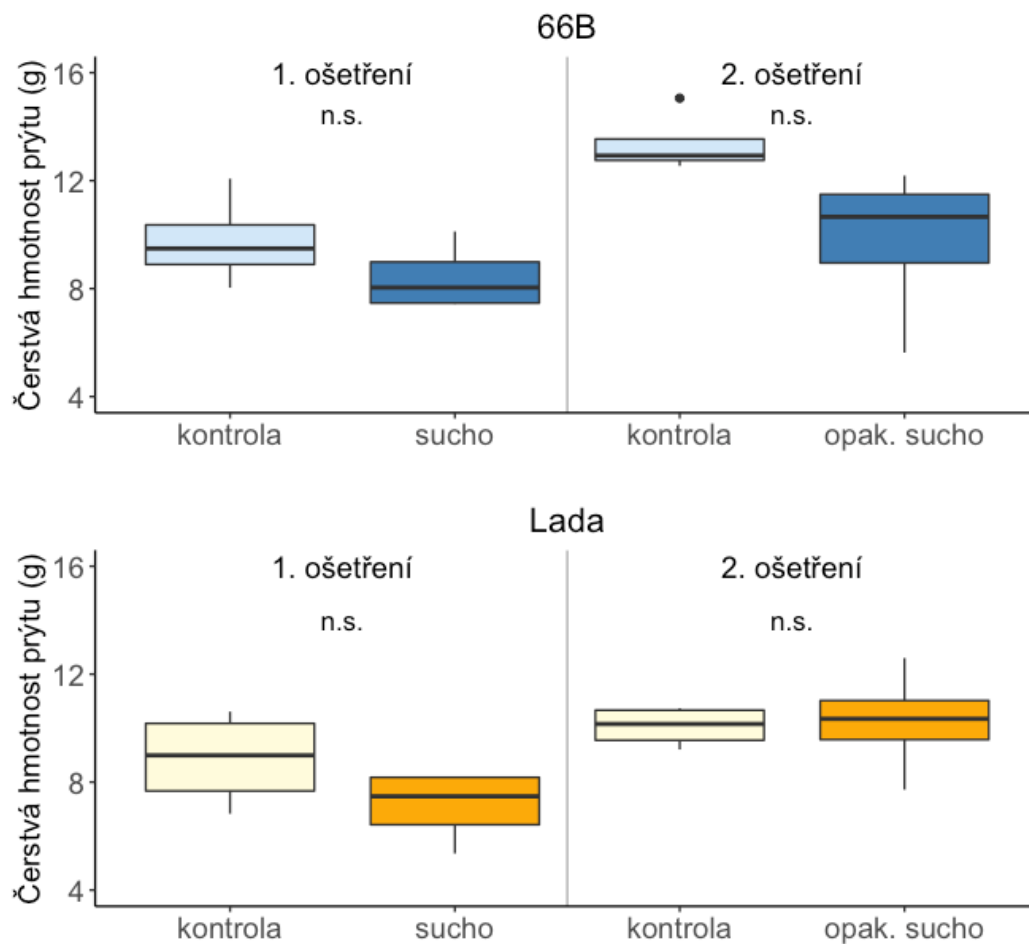


Obrázek 11 – Fotografie rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* exp. Sucho 1 po 2. ošetření, kultivace podle exp. designu C (1.ošetření/zotavení/2.ošetření, 7/2/6 dní)

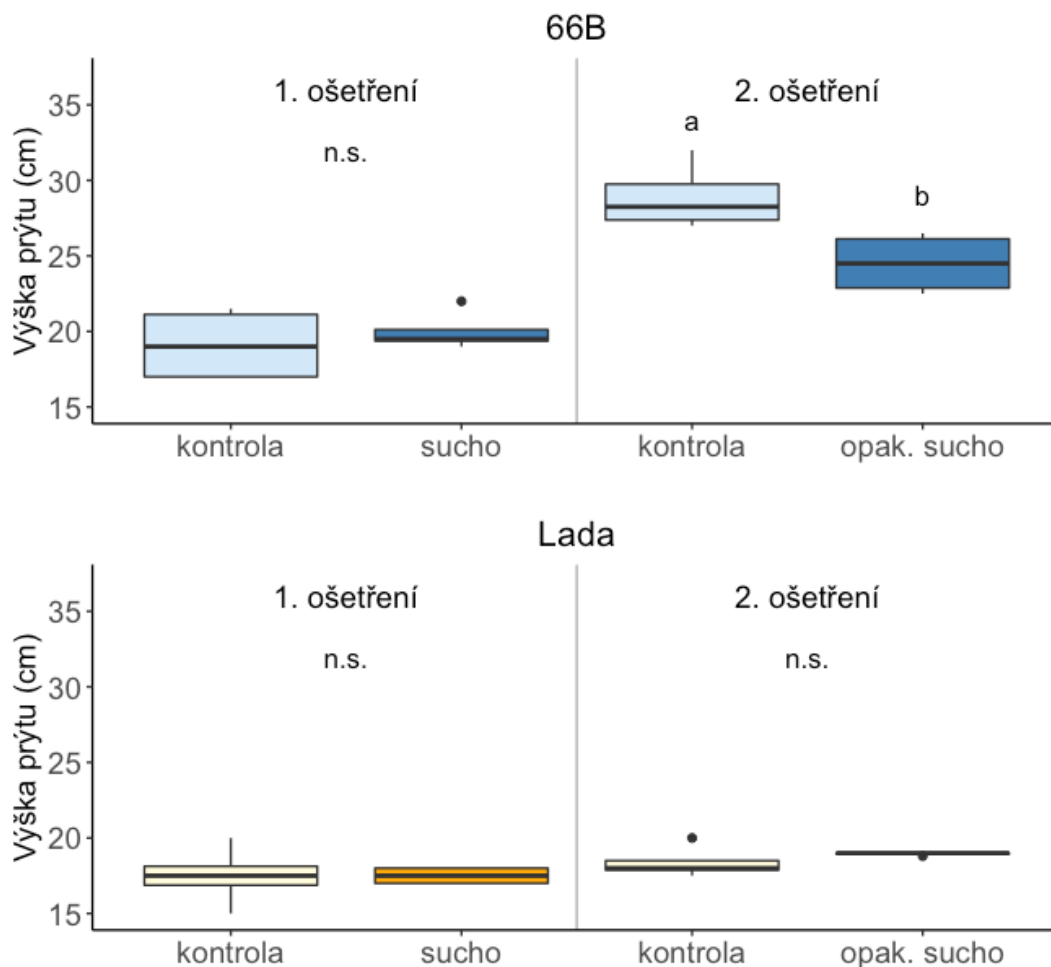




Obrázek 12 – Fotografie rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* exp. Sucho 2 po 2. ošetření, kultivace podle exp. designu C (1.ošetření/zotavení/2.ošetření, 7/1/12 dní).



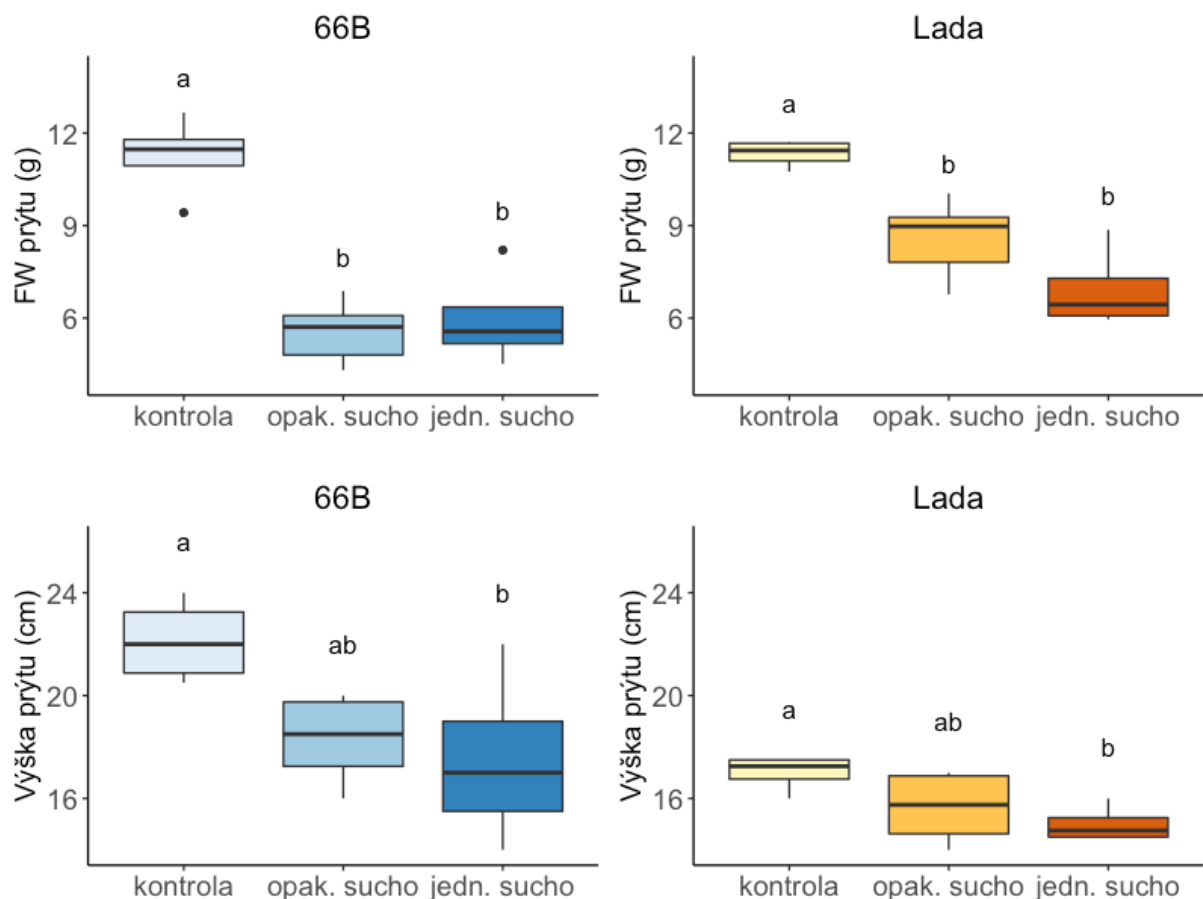
Graf 12 – Čerstvá hmotnost prýtu rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 1. a 2. působení přerušení závlivky (Sucho 1), kultivace podle experimentálního designu C (1.ošetření/zotavení/2.ošetření, 7/2/6 dní), n = 4, n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.



Graf 13 – Výška prýtu rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 1. a 2. působení přerušení závlivky (Sucho 1), kultivace podle experimentálního designu C (1.ošetření/zotavení/2.ošetření, 7/2/6 dní), n = 4, odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Welch's t-test,  $\alpha = 0,05$ ), n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.

Tabulka 6 – Průměrná čerstvá hmotnost (FW) a výška rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 1. přerušení závlivky na 7 dní (Sucho 2), kultivace podle exp. designu C, n=2.

genotyp	varianta	výška (cm)	FW prýtu (g)
Lada	sucho	10	2,71
	kontrola	10,25	3,11
66B	sucho	12,25	2,37
	kontrola	11,25	2,00

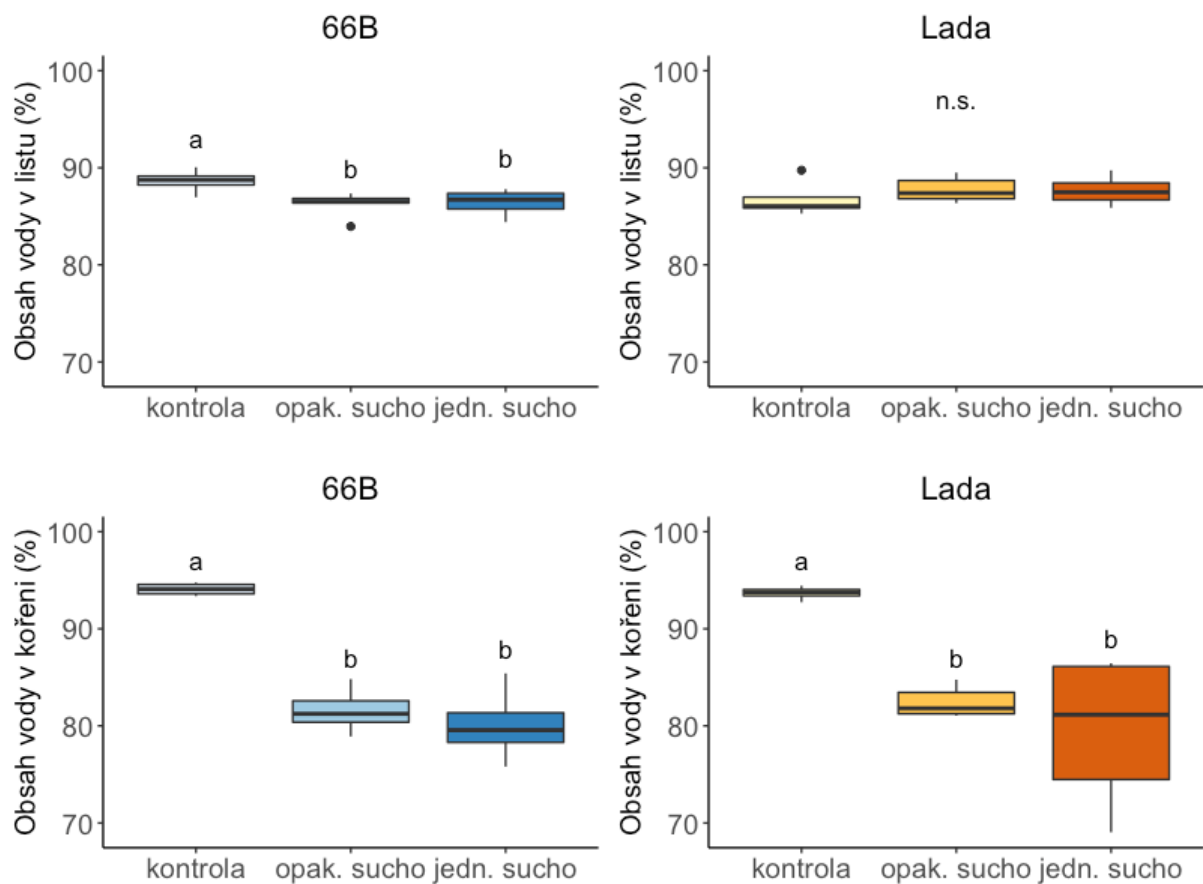


Graf 14 – Čerstvá hmotnost (FW) a výška prýtu rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 2. působení přerušení závlivky (Sucho 2), kultivace podle exp. designu C (1.ošetření/zotavení/2.ošetření, 7/1/12 dní),  $n = 4-6$ , odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Tukey's test,  $\alpha = 0,05$ ).

Průměrný obsah vody v listu a kořeni po prvním ošetření exp. Sucho 2 je uveden v tabulce 7. Obsah vody v kořeni genotypů 66B i Lada se při 2. odběru exp. Sucho 2 (graf 15) signifikantně lišil mezi kontrolními rostlinami a rostlinami vystavenými suchu (opakovaně i jednorázově) při  $p < 0,01$  (Tukey's test). Obsah vody v listu nebyl u cv. Lada suchem ovlivněn, u 66B byl obsah vody u kontrol vyšší než u stresovaných variant (Kruskal-Wallis test,  $p = 0,05$ ).

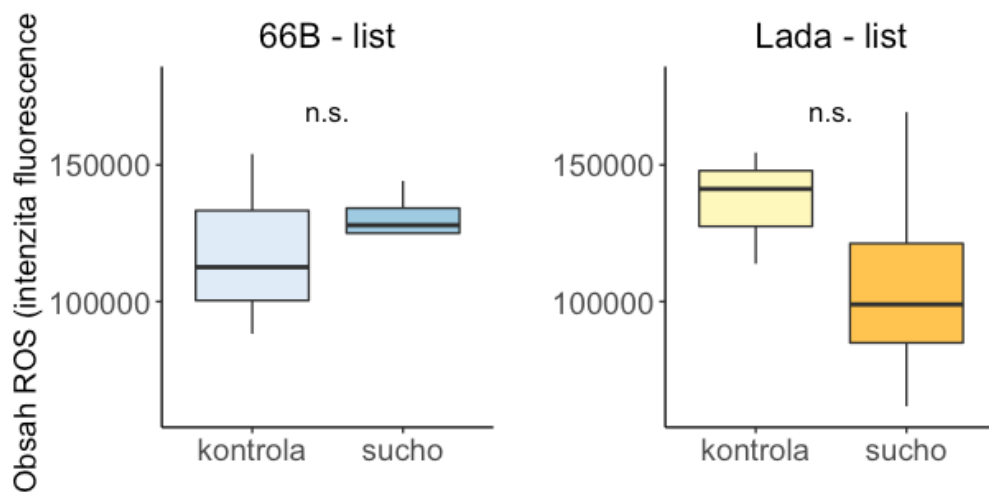
Tabulka 7 – Průměrný obsah vody  $W$  (%) v listech a kořenech rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 1. přerušení závlivky na 7 dní (Sucho 2), kultivace podle exp. designu C,  $n = 2$ .

	W - list (%)		W - kořen (%)	
	66B	Lada	66B	Lada
kontrola	89,94	89,62	91,43	92,33
sucho	89,52	89,07	71,94	71,31

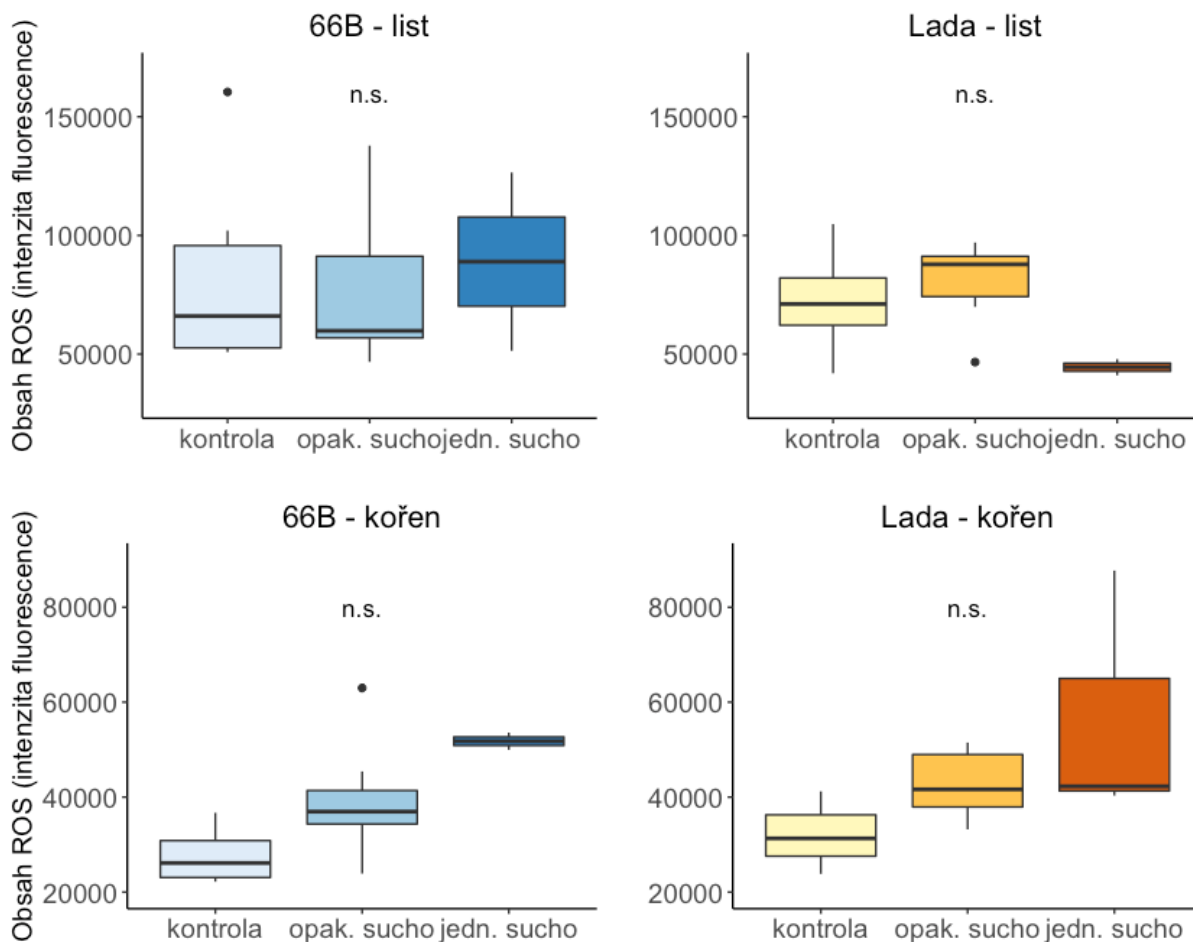


Graf 15 – Obsah vody ( $W=(1-DW/FW)*100$ ) v kořenech a listech *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 2. působení přerušení závlivky (Sucho 2), kultivace podle exp. designu C (1.ošetření/zotavení/2.ošetření, 7/1/12 dní),  $n = 4-6$ , odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Tukey's test, Dunn's test,  $\alpha = 0,05$ ), n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.

Obsah reaktivních forem kyslíku se v exp. Sucho 1 po 1. epizodě sucha v listu nezměnil ani u jednoho genotypu (graf 16). Po 2. ošetření v exp. Sucho 2 se mezi variantami obsah ROS signifikantně nelišil ani v listech ani kořenech (graf 17). Mezi obsahem ROS v kořeni kontrolních rostlin a rostlin vystavených jednorázovému suchu byl nalezen trend poklesu ( $p=0,0513$ , Tukey's test). Vzhledem k počtu vzorků by pro ověření trendu či nalezení pozitivního vlivu opakovaného působení chladu bylo potřeba analýzu zopakovat.

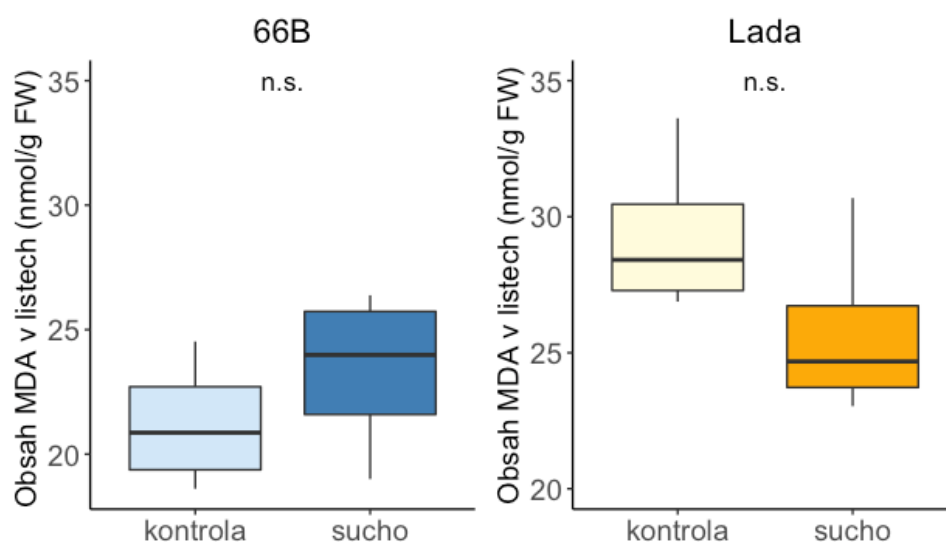


Graf 16 – Obsah reaktivních forem kyslíku (ROS) v listech *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 1. působení přerušení závlivky (Sucho 1), kultivace podle exp. designu C (1.ošetření/zotavení/2.ošetření, 7/2/6 dní),  $n = 4$ , n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.



Graf 17 – Obsah reaktivních forem kyslíku (ROS) v listech a kořenech *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 2. působení přerušení závlivky (Sucho 2), kultivace podle exp. designu C (1.ošetření/zotavení/2.ošetření, 7/1/12 dní),  $n = 2-6$ , n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.

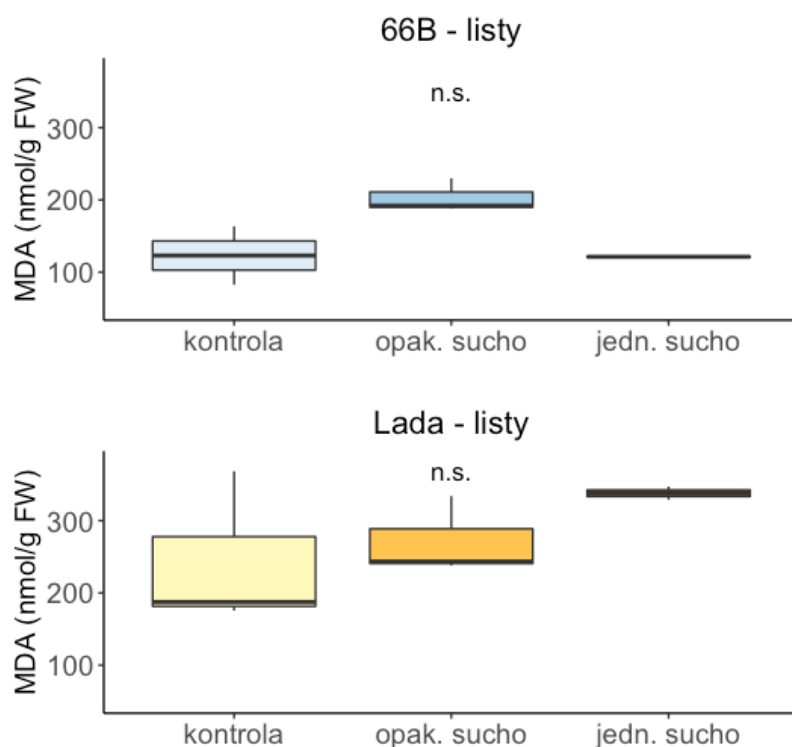
Obsah MDA v listech genotypů 66B i Lada exp. Sucho 1 se mezi variantami neliší (viz graf 18), v reakci na sucho genotypy však reagovaly odlišně ( $p=0,0056$ , dvoucestná ANOVA). Obsah MDA v listech kontrolních rostlin genotypu 66B byl výrazně nižší než u kontrolních rostlin cv. Lada ( $p=0,007$ , jednocestná ANOVA). Výrazně nižší obsah MDA u genotypu 66B byl nalezen rovněž v kořenech *in vitro* rostlin (experiment IV, graf 11). Po 1. působení sucha v exp. Sucho 2 (tabulka 8) byl obsah MDA v kořeni 66B více než dvojnásobný oproti kontrole. Také v listech došlo k vyššímu nárůstu MDA v listech než u cv. Lada. Hladina MDA byla měřena také u rostlin druhého ošetření (graf 19) a mezi variantami nebylo nalezeno signifikantní zvýšení. Vzhledem k velmi vysokým hodnotám však výsledky nejsou příliš spolehlivé. Opakování analýzy se bohužel nezdařilo (pravděpodobně nedošlo ke správnému průběhu kolorimetrické reakce).



Graf 18 – Obsah malondialdehydu ( $\text{nmol.g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti) v listech rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 1. působení přerušení zálivky na 7 dní, kultivace podle exp. designu C (Sucho 1),  $n = 4$ , n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.

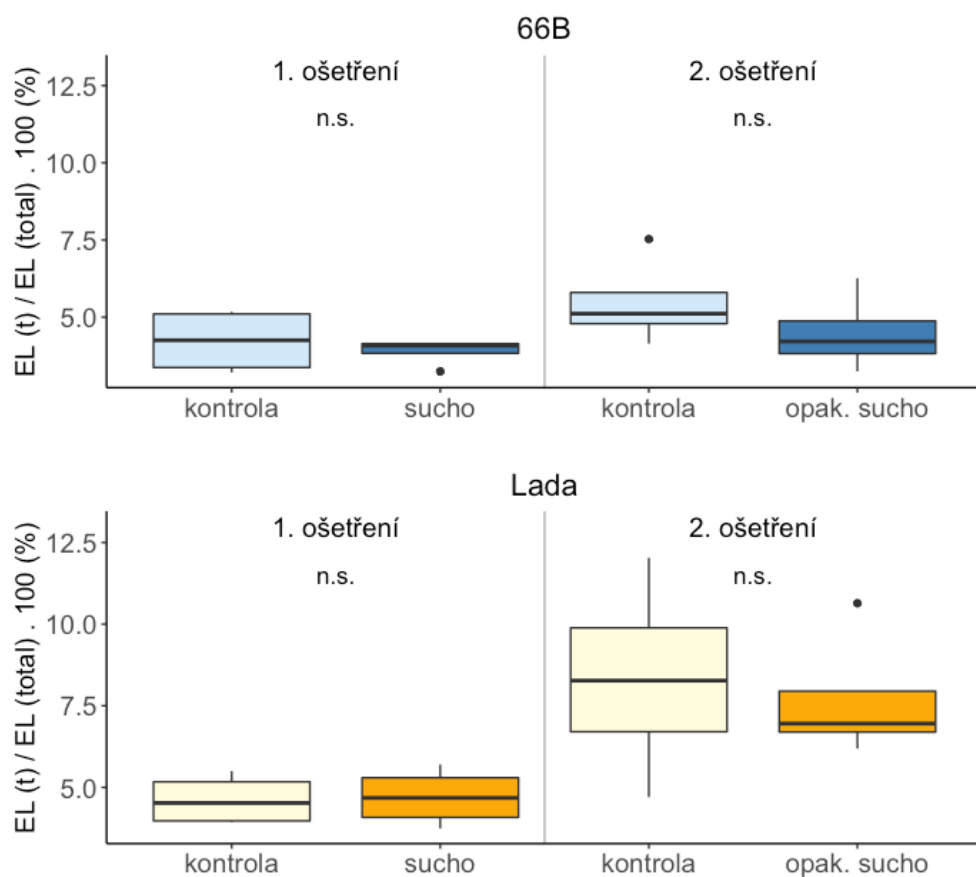
Tabulka 8 – Průměrný obsah malondialdehydu ( $\text{nmol.g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti) v listech a kořenech *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 1. působení přerušení zálivky na 7 dní, kultivace podle exp. designu C (Sucho 2),  $n = 2$ .

	List		Kořen	
	66B	Lada	66B	Lada
kontrola	102,769682	121,01	26,781258	54,7037261
sucho	135,419331	130,899841	58,5895064	47,7253503



Graf 19 – Obsah malondialdehydu ( $\text{nmol.g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti) v listech rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 2. působení přerušení závlivky (Sucho 2), kultivace podle exp. designu C (1.ošetření/zotavení/2.ošetření, 7/1/12 dní),  $n = 2-3$ , n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.

Při zpracování dat z analýzy míry úniku elektrolytů z pletiv (EL) jsem pracovala s průměrnou hodnotou EL z dvou vzorků odebraných z jedné rostliny. Vzorky byly odebírány pouze z listů. U 1. i 2. odběru exp. Sucho 1 nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi variantami (graf 20). U kontrolní varianty cv. Lada 1. a 2. působení byl nalezen trend navýšení EL ( $p=0,09$ , Welch's t-test), u genotypu 66B nikoliv ( $p=0,21$ , Welch's t-test), což je v souladu s rychlejším stárnutím cv. Lada. Průměrné hodnoty EL z rostlin odebraných po 1. ošetření exp. Sucho 2 jsou uvedeny v tabulce 9. Je zajímavé, že byly hodnoty EL obou genotypů u rostlin s přerušenou závlivkou nižší, vzhledem k počtu vzorků však nebyla provedena statistika. Po 2. ošetření v exp. Sucho 2 (graf 21) byla nalezena výrazně vyšší EL u rostlin vystavených pouze druhé epizodě sucha než u rostlin vystavených suchu opakovaně ( $p=0,006$ , Tukey's test).

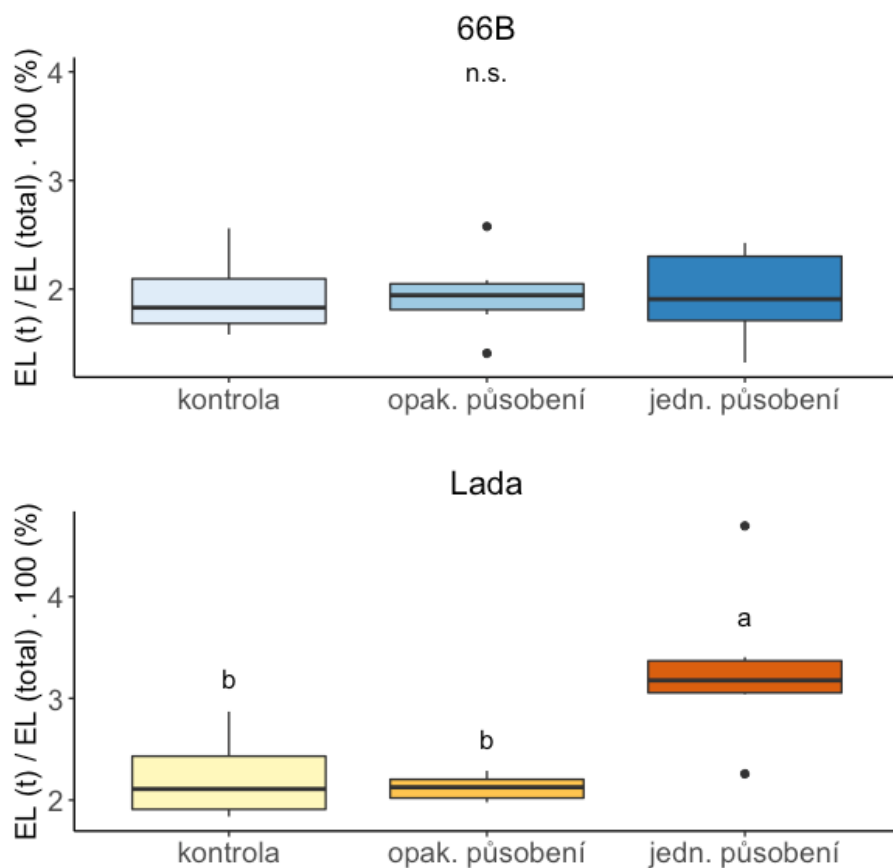


Graf 20 – Míra úniku elektrolytů z listu (EL) vztažená na celkový obsah elektrolytů v listu u rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 1. a 2. přerušení závlivky (Sucho 1), kultivace podle exp. designu C (1.ošetření/zotavení/2.ošetření, 7/2/6 dní),  $n = 4$ , n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.

Tabulka 9 – Průměrná míra úniku elektrolytů (EL) za 3 h vztažená na celkový obsah elektrolytů z listů *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 1. působení přerušení závlivky na 7 dní, kultivace podle exp. designu C (Sucho 2),  $n = 2$ .

genotyp	varianta	EL (%)
Lada	sucho	5,83
	kontrola	8,53
66B	sucho	3,81
	kontrola	6,34





Graf 21 – Míra úniku elektrolytů (EL) z listu za 3 h vztažená na celkový obsah elektrolytů v listu u rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po 2. působení přerušení závlivky (Sucho 2), kultivace podle exp. designu C (1.ošetření/zotavení/2.ošetření, 7/1/12 dní),  $n = 4-6$ , odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Tukey's test,  $\alpha = 0,05$ ), n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.

Tabulka 10 – průkazné interakce genotypu a varianty (působení sucha) na jednotlivé analýzy (dvoucestná ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ).

experiment	analýza	p (varianta)	p (genotyp)	p (varianta:genotyp)
Sucho 1, 2. odběr	výška prýtu	0,0368	3,90E-07	0,0099
	čerstvá hmot. prýtu	3,81E-08	0,0018	0,0302
Sucho 2, 2. odběr	EL z listů	0,0147	0,0009	0,0126

## 5.3 Působení chladu

### 5.3.1 Působení chladu na rostliny *in vitro*

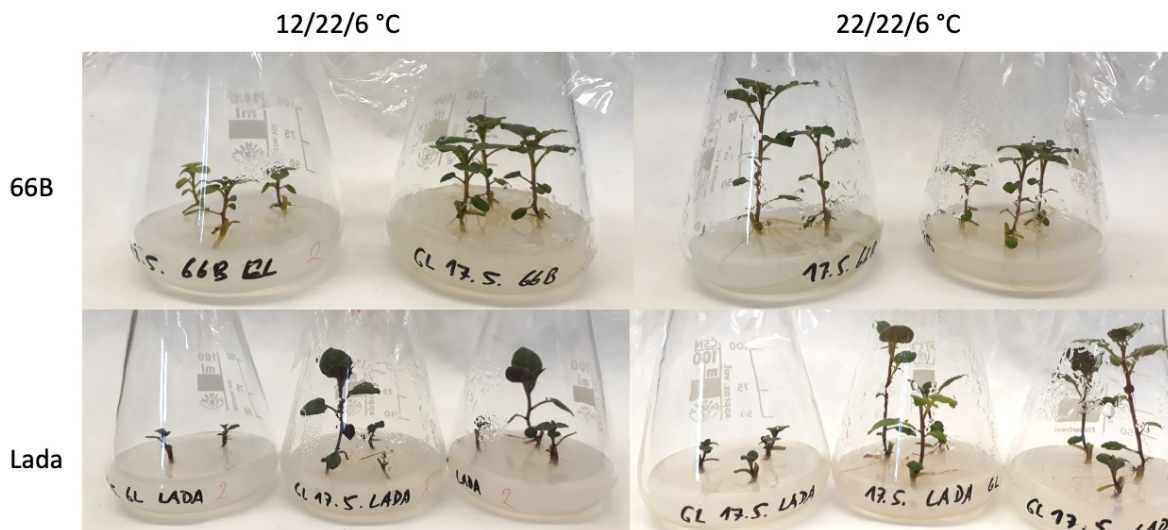
Rostliny *S. tuberosum* ssp. *andigena* (genotyp 66B) a ssp. *tuberosum* (kultivar Lada) pěstované fotoautotrofně v podmínkách *in vitro* jsem pro chladové experimenty kultivovala, obdobně jako

u experimentů simulujících nedostatek vody (kap. 5.1.2.), z předpěstovaných nodálních segmentů s odstraněným listem.

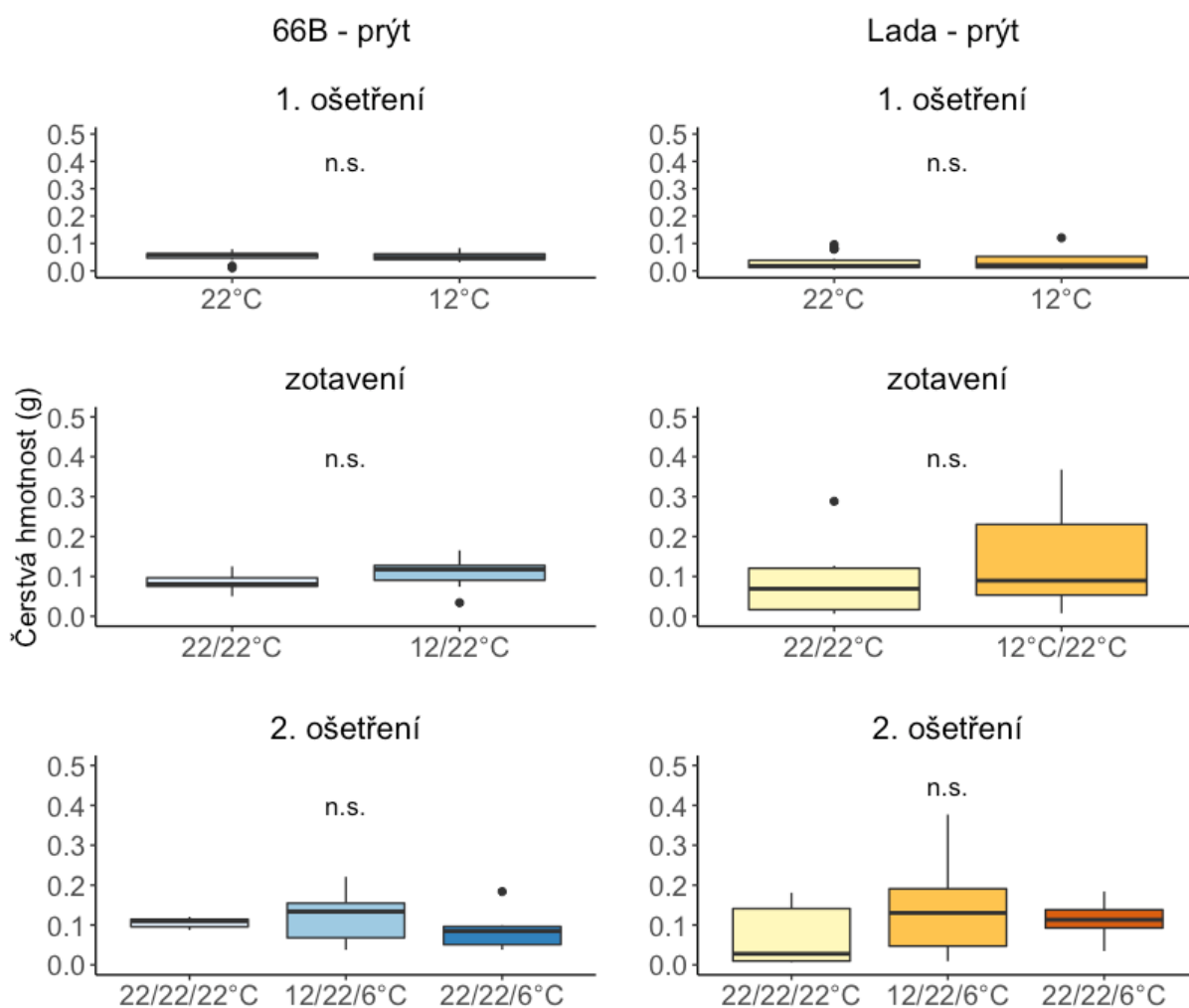
V průběhu práce na experimentu IV. jsem kvůli problémům s neprorůstajícími nodálními segmenty provedla krátký pokus s cílem vyřešení tohoto problému. Vyzkoušela jsem, jestli bude mít pozitivní vliv odštíhnutí listu ze segmentu až po 3 či 7 dnech proti odříznutí listu při pasážování. Tři týdny staré rostliny obou genotypů všech tří variant prorůstaly a nebyly mezi nimi příliš velké rozdíly. U rostlin cv. Lada byla velká heterogenita v růstu, rozdíl v časování odštíhnutí listu se však nezdál být rozhodující. Hlavní překážkou prorůstání úžlabního pupene se po tomto pokusu zdálo být vysychání nodálního segmentu. Vzhledem k tomu, že při odstranění listu při pasážování toto hrozí nejvíce, v následujících experimentech (i s *ex vitro* rostlinami) jsem list ze segmentu odštíhávala až po několika dnech kultivace na médiu.

Po předpěstování byly rostliny umístěny do chladového boxu, kde probíhala dva dny aklimatizace na odlišné světelné podmínky (viz kapitola 3.3.1.4) a poté byly vystaveny aklimačnímu a stresovému chladu s mezifází zotavení s cílem zjistit, zda předchozí působení aklimačním chladem (tzv. otužování) povede k menší stresové zátěži a lepší růstové charakteristice. Další cíl bylo zjistit, zda se odpověď daných genotypů bude při chladovém ošetření lišit od stresu nedostatku vody. V tomto experimentu (exp. IV.) jsem pracovala se třemi variantami: kontrolní rostliny, rostliny vystavené stresovému i aklimačnímu chladu a rostliny vystavené pouze stresovému chladu. Z technických důvodů (pouze jeden chladový box s danými světelnými podmínkami) nebylo možné experiment provést najednou, jednotlivé varianty jsem proto kultivovala s časovým odstupem.

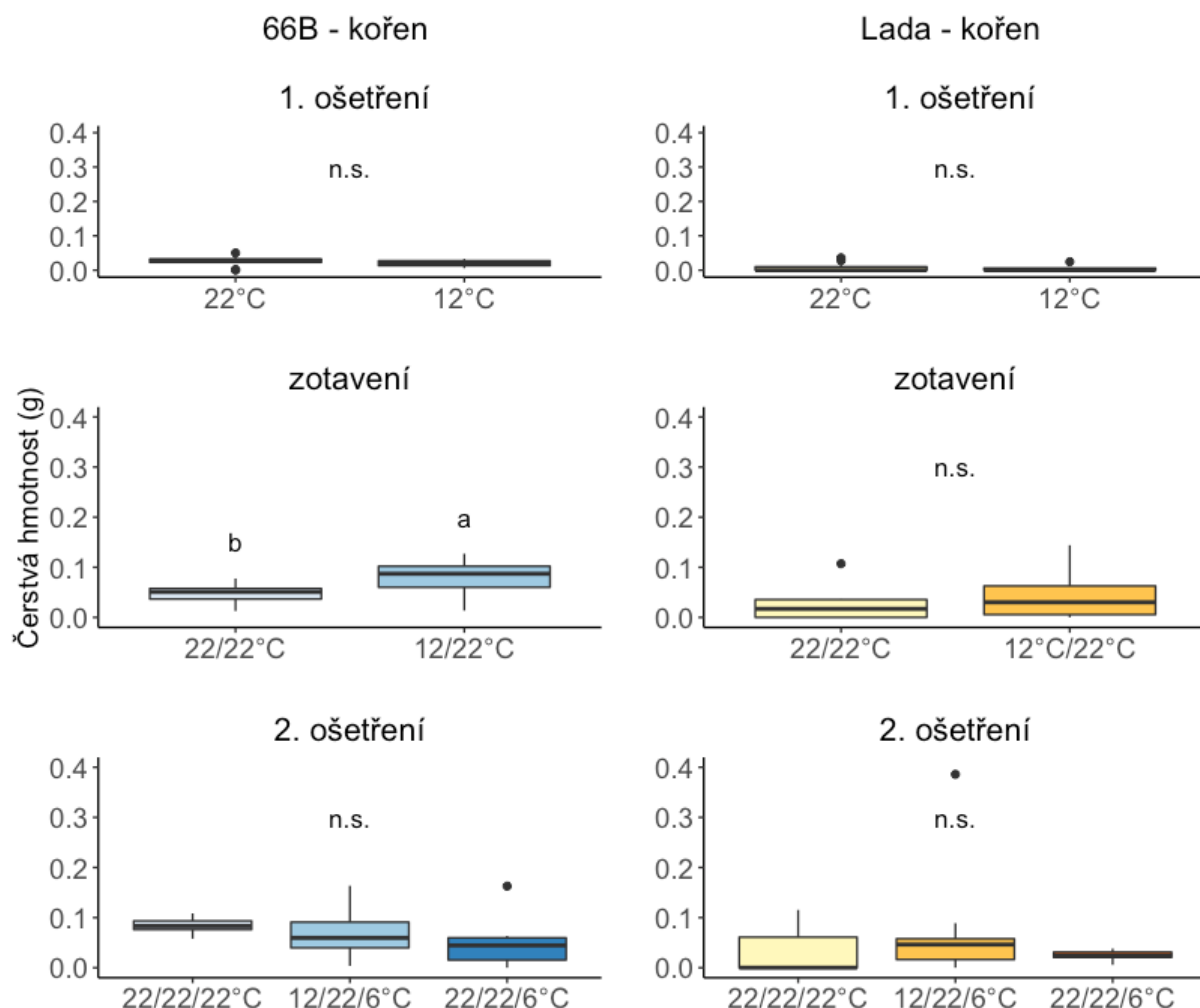
Hodnocení přírůstku čerstvé hmotnosti prýtu neukázalo signifikantní rozdíly mezi jednotlivými variantami ošetření, a to po 1. ošetření, zotavení ani po 2. ošetření (jednocestná ANOVA, graf 22, obr. 13). V přírůstku čerstvé hmotnosti kořene (graf 23) byl nalezen významný nárůst pouze u rostlin genotypu 66B vystavených aklimačnímu chladu po zotavovací fázi ( $p=0,023$ , Welch's t-test). Po 1. ošetření u prýtu a 1. a 2. ošetření u kořene byl nalezen signifikantní vliv genotypu na čerstvou hmotnost (dvoucestná ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ). Během 2. ošetření rostliny vystavené chladu příliš nerostly, přírůstek byl někdy i nižší než ve fázi zotavení (graf 22).



Obrázek 13 – Fotografie rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* po vystavení aklimačnímu chladu, zotavení a stresovému chladu (12/22/6 °C, 4/3/4 dny) nebo stresovému chladu bez aklimace (exp. design D1).



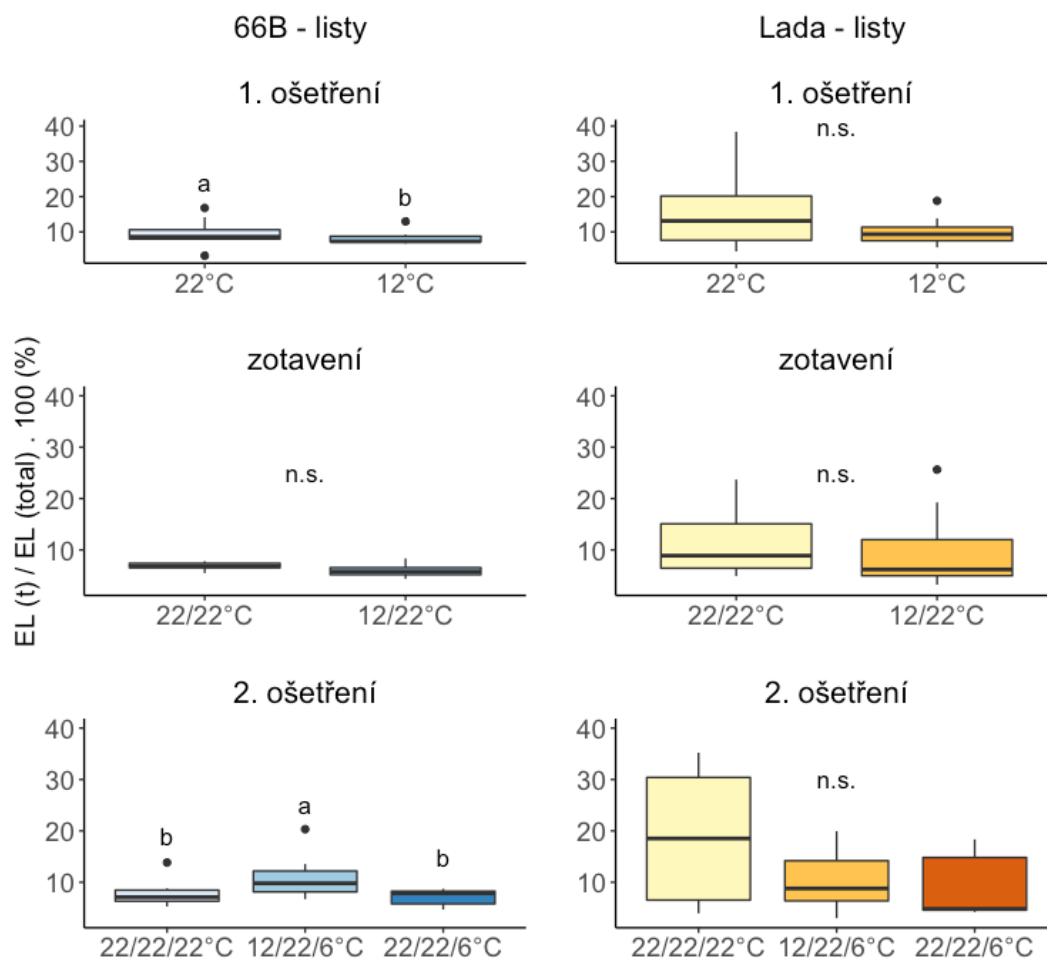
Graf 22 – Čerstvá hmotnost (FW) prýtu rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada *in vitro* po vystavení aklimačnickému chladu (12 °C), zotavení a stresovému chladu 6 °C (4/3/4 dny), exp. design D1, n = 4-14, n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.



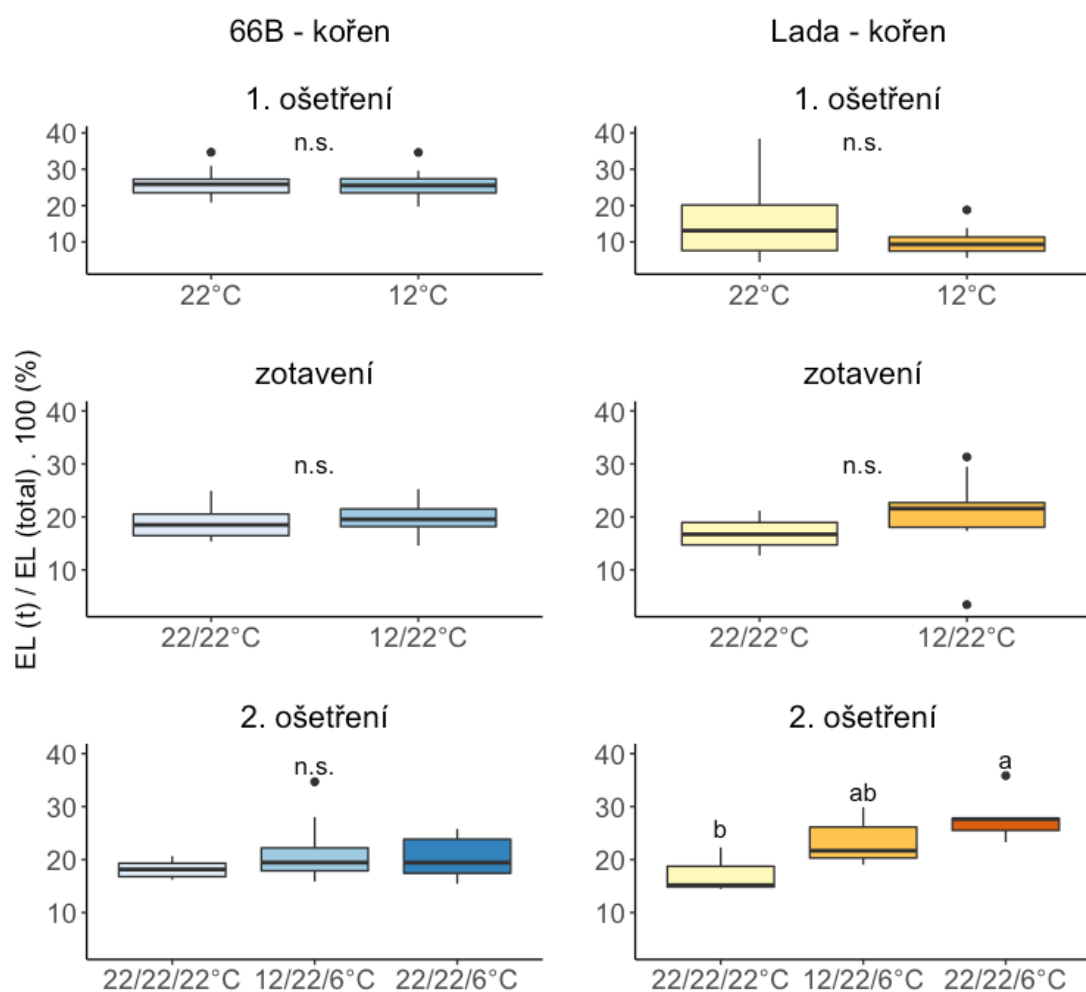
Graf 23 – Čerstvá hmotnost (FW) kořene rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada *in vitro* po vystavení aklimačnickému chladu (12 °C), zotavení a stresovému chladu 6 °C (4/3/4 dny), exp. design D1, n = 4-14, n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.

Z důvodu malých přírůstků bylo možné u odebraných vzorků provést pouze hodnocení míry úniku elektrolytů (EL) z pletiv. U listů genotypu 66B (graf 24) byla po 1. ošetření nalezena vyšší míra EL u kontrolní varianty oproti variantě s aklimačnickým chladem. Po zotavení se však již míra EL nelišila a po 2. ošetření byla dokonce u rostlin vystavených aklimačnickému a následně stresovému chladu nejvyšší, od obou variant se lišila při  $p=0,03$  (Dunn's test). Míra EL z kořenů (graf 25) se mezi variantami 66B nelišila. U cv. Lada (graf 24) se míra EL mezi variantami

nelišila u prýtu, u kořenů (graf 25) však byla po 2. ošetření výrazně vyšší u rostlin vystavených stresovému chladu bez aklimační fáze oproti kontrolám ( $p=0,01$ , Tukey's test), rostliny vystaveny aklimačnímu chladu před stresovým chladem se od kontrol ani od jednorázově stresovaných rostlin průkazně nelišily.



Graf 24 – Míra úniku elektrolytů (EL) za 6 h vztažená na celkový obsah elektrolytů z listů rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada in vitro po vystavení aklimačnímu chladu (12 °C), zotavení a stresovému chladu 6 °C (4/3/4 dny), exp. design D1, n = 4-12, n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.

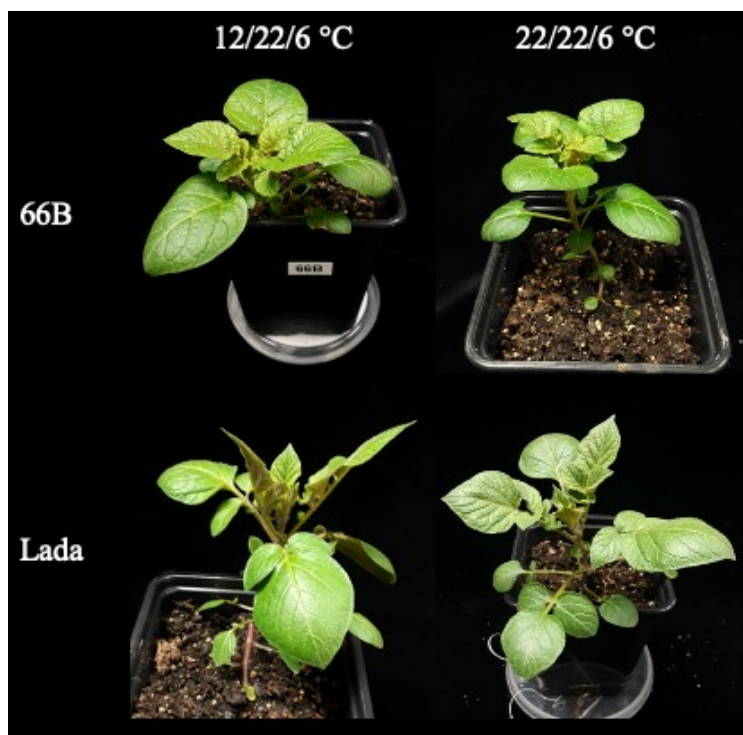


Graf 25 – Míra úniku elektrolytů (EL) za 6 h vztažená na celkový obsah elektrolytů z kořenů *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada *in vitro* po vystavení 12 °C, zotavení a 6 °C (4/3/4 dny), exp. design D1, n=3-12, odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Tukey's test,  $\alpha = 0,05$ ), n.s. = nesignifikantní rozdíl mezi variantami.

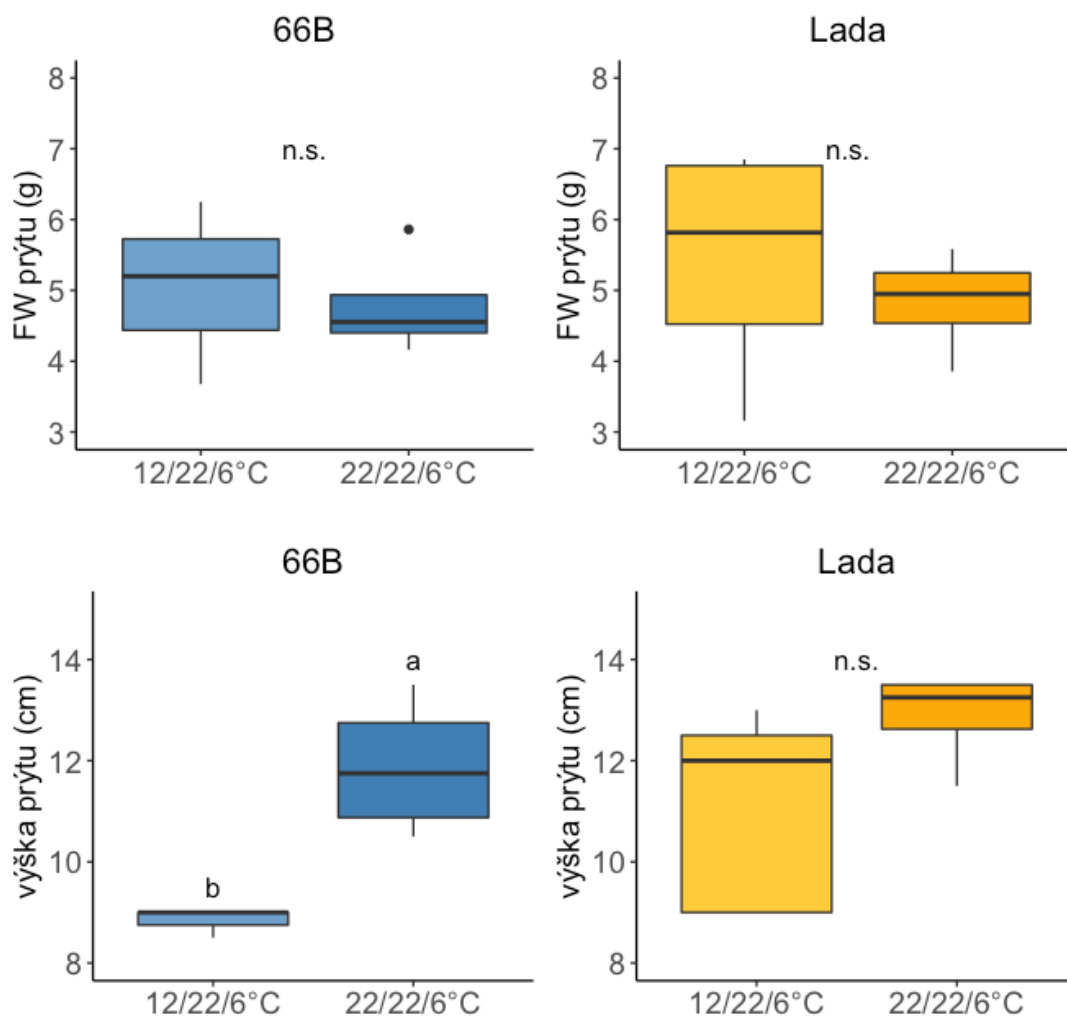
### 5.3.2 Působení chladu na rostliny *ex vitro*

V experimentu VI. jsem 3 týdny staré rostliny *S. tuberosum* genotypů 66B (ssp. *andigena*) a Lada (ssp. *tuberosum*) napěstované fotoautotrofně *in vitro* z nodálních segmentů převedla do podmínek *ex vitro* a po krátké aklimatizaci (7 dní) jsem je vystavila aklimačnímu a stresovému chladu s mezifází zotavení nebo jen stresovému chladu. Z technických důvodů, kdy kultivace jednotlivých variant ošetření musela probíhat postupně, nebylo bohužel možné kultivaci poslední (kontrolní) varianty, tj. bez stresového ošetření, dokončit do doby odevzdání práce. S ohledem na odlišné světelné podmínky v kultivačních boxech pro experimenty s nedostatkem vody a chladovým působením nebylo možné využít pro srovnání kontrolní variantu z exp. Sucho 1 či 2. Čerstvé hmotnosti ani výšky prýtu se mezi variantami ošetření nelišily u cv. Lada

(graf 26). U genotypu 66B vedlo otužení a následný stresový chlad k výrazné redukci výšky prýtu ( $p=0,019$ , Welch's t-test), biomasa se však od varianty vystavené pouze stresovému chladu  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  nelišila. Mezi genotypy stresovaných variant byly pozorovatelná rozdílná morfologie (obrázek 14). V obsah vody v listech i kořenech nebyl mezi variantami rozdíl (graf 27). Míra úniku elektrolytů (EL) byla u listů z rostlin 66B vystavených jen stresovému chladu výrazně vyšší než u rostlin s fází aklimačního chladu ( $p=0,047$ , Welch's t-test) (graf 28). U cv. Lada se však EL mezi variantami nelišila.

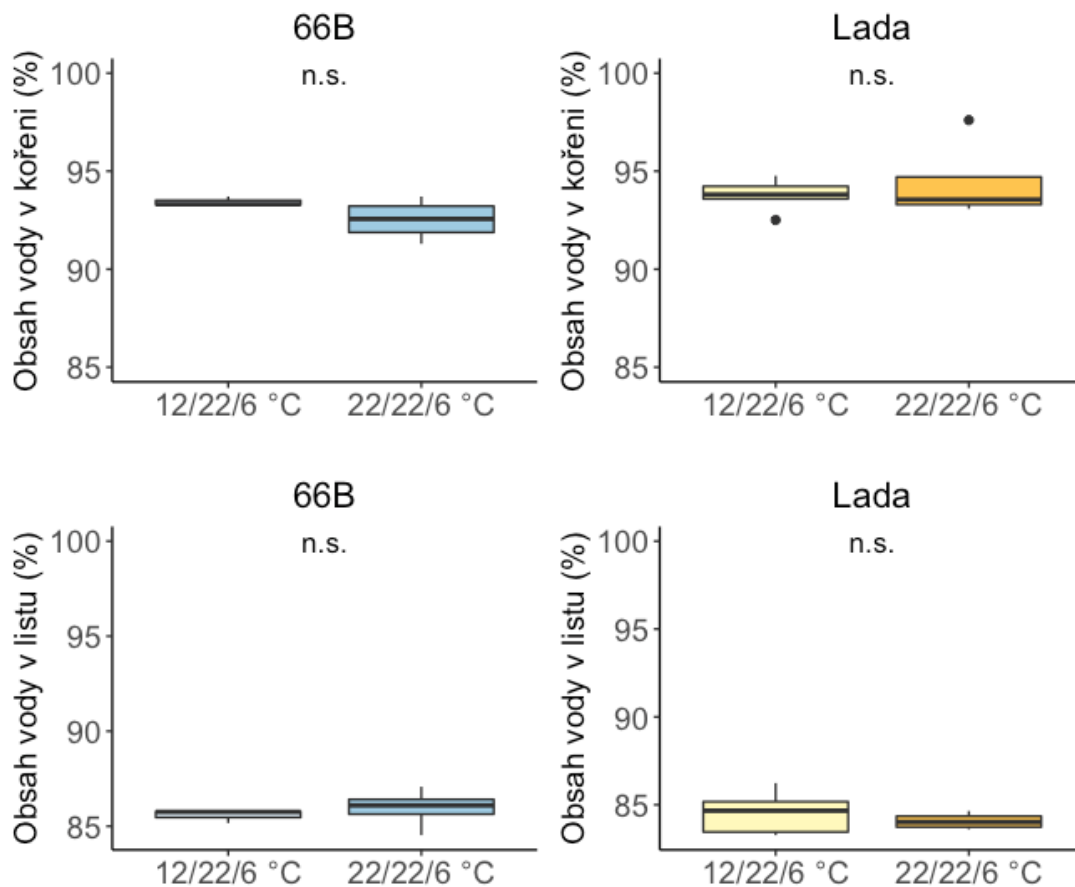


Obrázek 14 – fotografie rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po vystavení aklimačnímu chladu, zotavení a stresovému chladu ( $12/22/6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 4/3/4 dny) nebo stresovému chladu bez aklimace (exp. design D2).

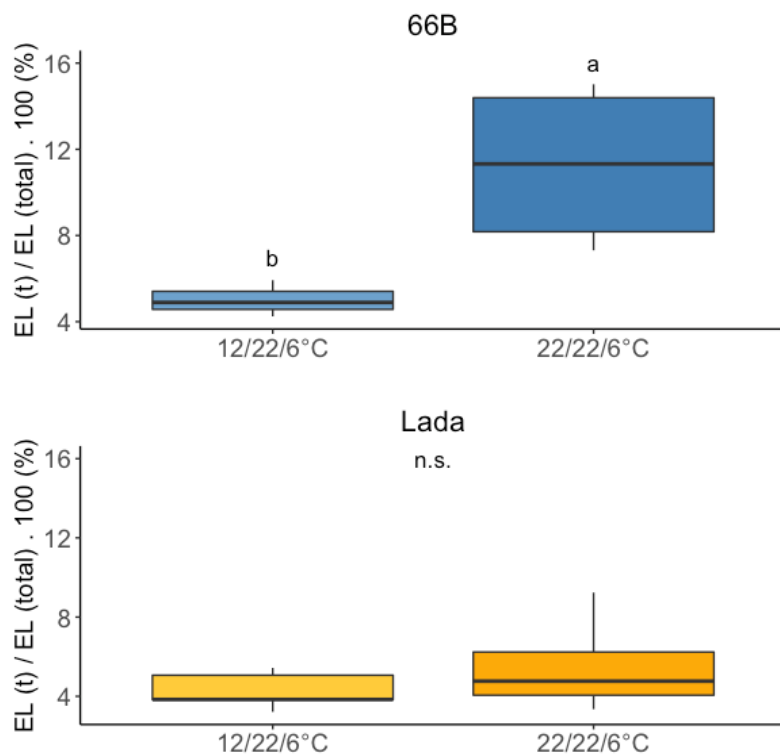


Graf 26 – Čerstvá hmotnost (FW) prýtu a výška rostlin *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada in vitro po vystavení aklimačnímu chladu (12 °C), zotavení a stresovému chladu 6 °C (4/3/4 dny) nebo stresovému chladu bez aklimace, exp. design D2, n = 3-5, odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Welch's t-test,  $\alpha = 0,05$ ), n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.





Graf 27 – Obsah vody ( $W=(1-DW/FW)*100$ ) v kořenech a listech *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada po vystavení aklimačnímu chladu (12 °C), zotavení a stresovému chladu 6 °C (4/3/4 dny) nebo stresovému chladu bez aklimace, exp. design D2, n = 3-5, n.s. = nesignifikanční rozdíly mezi variantami.



Graf 28 – Míra úniku elektrolytů (EL) za 3 h vztažená na celkový obsah elektrolytů z listů *S. t. andigena* 66B a *S. t. tuberosum* Lada *in vitro* po vystavení aklimačnímu chladu (12 °C), zotavení a stresovému chladu 6 °C (4/3/4 dny) nebo stresovému chladu bez aklimace, exp. design D2, n = 3-5, odlišná písmena nad grafy značí signifikantní rozdíl (Welch's t-test,  $\alpha = 0,05$ ), n.s. = nesignifikantní rozdíly mezi variantami.

Vystavení *ex vitro* rostlin aklimačnímu chladu nevedlo při dalším stresovém působení k výrazným změnám v čerstvé hmotnosti prýtu, obsahu vody v listech i kořenech a u cv. Lada ani ke změně výšky či míry úniku elektrolytů. U *in vitro* rostlin po 2. působení stresu také neměla aklimace vliv na čerstvou hmotnost prýtu. Rostliny genotypu 66B reagovaly na aklimační chlad po působení stresového chladu výraznou redukcí výšky, na druhou stranu došlo k nižšímu poškození pletiv listů než u varianty vystavené jen stresovému chladu. To je překvapující, vzhledem k tomu, že u *in vitro* rostlin byla po 2. ošetření míra EL zvýšená právě u varianty s fází aklimačního chladu proti kontrole i variantě jednorázového působení chladu.

## 5.4 Diskuze

Některé rostliny si dokáží uchovat informaci o prožitém stresovém působení, díky čemuž se dokáží lépe a rychleji připravit na opětovné setkání se stresem a zvýšit tak svoji toleranci (Bruce et al., 2007; Friedrich et al., 2019). Potenciální přítomnost této tzv. stresové paměti jsem zkoumala prostřednictvím hodnocení míry oxidativního stresu u rostlin dvou poddruhů

*Solanum tuberosum*, které představují jednu z nejdůležitějších plodin pro lidskou výživu. Růst a výnos této plodiny je značně redukován stresem ze sucha i nízké teploty pro jeho relativní citlivost k těmto stresům (Oufir et al., 2008; Watkinson et al., 2008), tyto abiotické stres byly proto ke studiu vybrány. Cílem práce je nalézt potenciální rozdíly v odpovědi na stres u poddruhu Andigena a poddruhu Tuberosum, vybrala jsem proto dva genotypy od každého z nich (66B a 235E, Desirée a Lada). Tyto dva poddruhy druhu *S. tuberosum* byly v historii kultivovány a šlechtěny ve značně odlišných podmínkách. Prostřednictvím polymorfismu délky restričních fragmentů bylo zjištěno, že se od sebe jaderné genomy těchto poddruhů výrazně liší (Sukhotu & Hosaka, 2006). Existuje tedy důvod se domnívat, že odpověď na stres a potenciální schopnost primingu u nich nebude shodná. U některých genotypů poddruhu Andigena byla objevena tolerance k suchu (Machida-Hirano, 2015; Watkinson et al., 2006), jednou z hypotéz je tedy zaznamenání efektu stresové paměti u genotypů Andigena.

Odpověď rostlin byla sledována v podmínkách *in vitro* i *ex vitro*. Kultivace *in vitro* umožňuje přísně kontrolované podmínky kultivace, což usnadňuje studium vybraného faktoru. U *S. tuberosum* lze navíc poměrně rychle napěstovat klony vybraných genotypů pomocí kultivace nodálních segmentů. Podmínky *in vivo* (*ex vitro*) se zase více přibližují reálným podmínkám, taktéž umožňují vyšší míru kontroly, navíc kultivace *ex vitro* zajišťuje vyšší uniformitu rostlin (z nodálních řízků pěstovaných *in vitro*).

### 5.4.1 Simulace nedostatku vody aplikací polyethylenglykolu

Nedostatek vody lze při kultivaci *in vitro* navodit přidáním nepenetrujícího vysokomolekulárního osmotika polyethylenglykolu (PEG) nebo cukerných alkoholů manitolu či sorbitolu do média (Lipavská & Vreugdenhil, 1996; Lutts et al., 1995). Manitol však způsobuje změny v metabolismu buněk (Roy et al., 2011) a bylo zjištěno, že je přijímán rostlinami *Solanum tuberosum* (Lipavská & Vreugdenhil, 1996). Stejný problém byl objeven i u sorbitolu (Bündig et al., 2016). Jako osmotika (látky snižující vodní potenciál) se proto v kultivaci rostlin nehodí. Vysokomolekulární PEG je považován za inertní, nepenetrující osmotikum (Lutts et al., 1995), a byl proto vybrán k simulaci nedostatku vody.

Důležitým cílem bylo nalézt subletální hladinu stresu, která bude umožňovat aktivaci obranných a ochranných mechanismů k překonání (a potenciálního zapamatování) tohoto stresu. Kultivace nodálních segmentů s PEG (mol. hmotnost 4000) o konc. 0, 4, 8 % se podle literatury zdála být efektivní pro testování odpovědi rostlin na stresové působení (Pino et al., 2013; Roy et al., 2011). Pro vlastní experiment jsem však vybrala o něco nižší konc. PEG 4000

(0, 3 a 6 %) z důvodu hledání subletální a otužovací hladiny stresu. Přesto úžlabní pupeny segmentů na médiu s PEG prorůstaly velice obtížně a velký problém činila iniciace kořenění (viz graf 1 a 2). Kontrolní rostliny všech genotypů rostly uspokojivě a kořeny prorůstaly, přírůstky však vykazovaly vysokou heterogenitu (viz obr. 5, 6). Možným vysvětlením obtížného prorůstání je odlišný způsob kultivace, pokus jsem neprováděla na mixotrofních rostlinách jako Pino et al. (2013), nýbrž na fotoautotrofních (MS médium bez sacharózy). Rostliny musely zajistit prorůstání pupene a získání cukrů fotosyntézou a zároveň se vypořádat se stresem z nedostatku vody. Tato kultivace byla vybrána z toho důvodu, že mixotrofní kultivace nereflexuje reálné podmínky (zejm. výměnu plynů s okolím, rychlost fotosyntézy aj.) a výsledky by byly zavádějící. Kromě toho vysoký obsah sacharózy v médiu zasahuje do fyziologických procesů rostlin, významně se podílí na stresu způsobeném *in vitro* kultivací (Desjardins et al., 2009) a/nebo naopak zvyhodňuje rostliny exogenní aplikací cukru.

V rámci tohoto přípravného experimentu jsem také stanovovala hladinu MDA na několika vzorcích prýtu cv. Lada a Desirée (tabulka 4). Obsah MDA je považován za vhodný marker oxidativního stresu. Jedná se o produkt peroxidace lipidů (zejm. membránových) a jeho obsah se při stresu zvyšuje, při úspěšné mobilizaci antioxidantního systému se zase vrací do normy (Jouve et al., 1993). Analýza byla vzhledem k počtu vzorků pouze orientační.

Z výsledků jasně vyplynulo, že stresové působení bylo příliš výrazné. Ani snížení konc. PEG v médiu na polovinu (graf 3, 4) nevedlo k požadovanému výsledku a přírůstky čerstvých hmotností byly stále velmi nízké, což znemožnilo odběry pro plánované analýzy.

K dosažení hlavního záměru práce, tedy posouzení stresové paměti rostlin, je potřeba vystavit rostliny stresovému působení opakovaně. V průběhu první fáze je potřeba pouze nastartovat obranné mechanismy a tomu by měla odpovídat i míra takového stresu. Při tvorbě nového designu experimentu jsem se proto snažila eliminovat sílu stresu, kterou nodální segment po pasážování zažívá, a před stresové působení jsem proto vložila fázi předpěstování na médiu bez PEG. Podobný způsob předpěstování (s delším předpěstováním a následnou vyšší konc. PEG) zvolili např. Rao & Ftz (2013), při selekci tolerantního kalusu. Přetrvávající variabilitu jsem se v tomto experimentu pokusila snížit odříznutím listu ze segmentu, a také selekcí podobných nodů při pasážování. Vzhledem k tomu, že listy obsahují zásobní látky a jsou hlavním zdrojem asimilátů z fotosyntézy, ovlivňují významně prorůstání úžlabního pupene, což bylo patrné u kontrolní varianty.

Tímto způsobem se podařilo rostliny dopěstovat až do konce experimentu (2. stresové ošetření), vyskytla se však řada dalších nesnází. V průběhu experimentu se opět vyskytovaly četné

kontaminace, tentokrát u všech genotypů, způsobené invazí hmyzu v kultivační místnosti. Z toho důvodu nebyl experiment sestaven přesně tak, jak byl původně zamýšlen. U některých genotypů nebyl dostatek rostlinného materiálu na kultivaci všech plánovaných variant ošetření, nebo byly kontaminované baňky z experimentu vyřazeny. Chyba nastala také u cv. Lada ve fázi 2. předpěstování, kdy rostliny přerostly a proběhl proto dodatečný předpěstovací cyklus (nodální segmenty na médiu bez PEG). Potenciální mechanismus stresové paměti by se tak musel zachovat přes dva pasážovací cykly, v tomto případě by se pravděpodobně jednalo o mechanismus epigenetický. Heterogenitu se v tomto experimentu podařilo snížit, ovšem stále se vyskytovaly případy, kdy pupen neprorůstal, nebo prorůstal příliš pomalu. U rostlin cv. Desirée mohlo být důvodem obtížné pasážování ze segmentů s velmi krátkými internodii, kdy hrozilo poškození meristému úžlabního pupene. U rostlin 235E naopak problém činila vyšší křehkost pletiv, kvůli níž místy docházelo k natržení báze řapíku při odříznutí listu. Možným řešením by bylo napěstování většího počtu rostlin a vyřazením rostlin vykazujících abnormality, což nebylo s daným počtem genotypů a variant proveditelné. Dílčí výsledky tohoto experimentu ukázaly, že všechny genotypy rostly na 3 % PEG (2. působení) překvapivě dobře a nelišily se od kontrol, mezi genotypy poddruhů Tuberosum a Andigena v tomto kontextu nebyl nalezen rozdíl. Jak jsem již popsala ve výsledcích, během pokusu jsem musela přejít na jiný typ víček pro autotrofní kultivaci. Ukázalo se, že tato změna je zásadní, jelikož typ víčka měl velký vliv na rychlost růstu rostlin (viz graf 5 a tabulka 5). Páska Leukopor zřejmě neumožňovala tak rychlou výměnu plynů jako filtry Sun cap, rostliny měly k dispozici méně CO<sub>2</sub> a přirůstaly pomaleji. Pouze u cv. Lada byl použit jen filtr Sun cap, výsledky proto lze považovat za spolehlivé. Rozdíly mezi variantami daného genotypu jsou více ovlivněny typem víčka než stresovým ošetřením (viz tabulka 5). Od opakování takového experimentu jsme opustili. Bylo by totiž nutné vybrat více kontrastní situace (3-3, 3-6 % PEG či vyšší) a testovat vyšší počet rostlin, což v daném uspořádání nebylo realizovatelné.

U jednoho genotypu obou poddruhů (66B, Lada) byla stanovena hladina MDA v kořeni, u žádného z nich nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi ošetřeními. Zajímavé ale je, že u kořenů genotypu 66B byla zjištěna výrazně nižší peroxidace lipidů než u cv. Lada (viz graf 11) a to i v kontrolních podmínkách. To je v souladu s představou, že poddruh Andigena je vůči suchu poměrně odolný a buď u něho nedochází k takovému poškození (avoidance), nebo má aktivnější antioxidantní systém i v nestresujících podmínkách (Watkinson et al., 2006).

Vzhledem k výše uvedeným nesnázím jsem se rozhodla opustit systém *in vitro* a další experiment zaměřený na nedostatek vody provádět na rostlinách *ex vitro* v kontrolovaných podmínkách kultivačního boxu. Tento způsob má také určité nevýhody, jako je např. omezený

počet pokusných rostlin, poměrně rychlé stárnutí rostlin či postupné (tedy hůře kontrolovatelné) vysychání zeminy. Na druhou stranu se tyto podmínky více blíží těm skutečným a vzhledem k tomu, že se jedná o *in vitro* předpěstované rostliny, je zde zaručena poměrně vysoká homogenita.

#### 5.4.2 Působení sucha přerušením závlivky

Z důvodu omezení počtu pokusných rostlin bylo nutné pro opakované působení sucha u rostlin pěstovaných v podmínkách *ex vitro* vybrat jen 2 genotypy. Rozhodla jsem se pro *S. tuberosum* ssp. *andigena* 66B a *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* Lada. Cv. Desirée jsem vyřadila vzhledem k jeho nižšímu vzrůstu a krátkým internodiím, 66B jsem vybrala pro růstové charakteristiky podobné cv. Lada. Odolnost vůči stresu ze sucha na *in vitro* předpěstovaných a *ex vitro* převedených rostlinách byla již u poddruhů Andigena a Tuberosum studovaná, jednalo se však o jednorázové působení, po kterém vykazoval vyšší odolnost poddruh Andigena (Vasquez-Robinet et al., 2008).

Experiment jsem provedla dvakrát, při opakování byl design lehce pozměněn. V experimentu Sucho 1 se neukázalo zvolené časování opakovaného stresového ošetření jako ideální, jelikož nebylo možné prodloužit druhé působení sucha oproti prvnímu (přípravnému), kvůli předčasné senescenci rostlin, zejm. cv. Lada. Fáze zotavení byla zvolena krátká (2 dny), pro zvýšení šance uchování potenciální paměti rostliny, byť je známo, že se somatická paměť sucha může uchovat 4 až 7 dní (Lämke & Bäurle, 2017). Prodloužení druhého sucha nebylo možné kvůli předčasné senescenci rostlin, zejm. cv. Lada. Ta se projevila ve žloutnutí listů a zpomalení růstu (obr. 11). Nárůst čerstvé hmotnosti (graf 12), větší výšku prýtu rostlin (graf 13) a vyšší míru EL (graf 20) po 2. ošetření oproti 1. nevykazovaly ani kontrolní (nestresované) rostliny, z tohoto důvodu nebyly provedeny všechny plánované analýzy po 2. ošetření. Úprava časového plánu u experimentu Sucho 2 byla efektivní a 2. ošetření mohlo být prodlouženo na 12 dní. Po 1. přerušení závlivky (Sucho 1) nedošlo k výrazné změně mezi nezalévanou a kontrolní variantou v obsahu ROS, MDA i EL v listech obou genotypů (grafy 17, 19, 21), týdenní přerušování závlivky se tedy neprojevovalo jako stresující, z tohoto hlediska se jako přípravné působení osvědčilo.

Na opakované sucho trvající 12 dní (Sucho 2) reagovaly oba genotypy mírným zpomalením růstu do výšky, u jednorázového působení již bylo zpomalení výrazné (graf 14). U cv. Lada předchozí vystavení suchu vedlo k menšímu poškození membrán (míra EL) při stresu následujícím, což naznačuje jistou míru aklimace. Schopnost aklimace a snížení míry EL

bylo zaznamenáno např. u cv. Atlantic po opakovaném vystavení suchu (Zhang et al., 2018). Sucho se u genotypu 66B také projevilo limitovanou výškou i čerstvou hmotností prýtu (graf 14) a sníženým obsahem vody v kořeni (graf 15). Vzhledem k tomu, že nedošlo k signifikantnímu zvýšení obsahu ROS ani EL, redukce růstu byla pravděpodobně součástí stresové avoidance. Absence zvýšení obsahu ROS v kořenech i listech mohla být zajištěna efektivním zhášením antioxidantním systémem (Vasquez-Robinet et al., 2008), díky čemuž nedošlo k vyššímu poškození a dezintegraci membrán (EL). U genotypu 66B však byl nalezen trend navýšení ROS na jednorázovém suchu, bylo by vhodné analýzu zopakovat s větším počtem vzorků. Z výsledků lze uzavřít, že se genotyp 66B (Andigena) projevoval vůči suchu odolně, avšak nezávisle na předchozím vystavení méně výraznému suchu. Tolerance Andigen k jednorázovému působení sucha již byla prokázána např. u genotypu Sullu, který dokázal ochránit fotosyntetický aparát a při zotavení obnovit metabolismus (Mane et al., 2008).

### 5.4.3 Působení chladu

Rostliny *S. tuberosum* jsou citlivé vůči chladu a mraz způsobuje poškození výrazně redukující výnos (Arvin & Donnelly, 2008). Bylo zjištěno, že se některé kultivary *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (např. cv. Desirée (Oufir et al., 2008)) nedokáží aklimovat na chlad. U rostlin *S. tuberosum* cv. Red Pontiac nedochází ke zvýšení tolerance k mrazu po přechodném vystavení chladu, naopak např. u *S. commersonii* ano. Rozdíl mezi *S. commersonii* a *S. tuberosum* (cv. Umatilla) zkoumali Carvallo et al. (2011) a navrhují, že s rozdílnou schopností aklimovat se a zvýšit toleranci k mrazu souvisí odlišná evoluce signální dráhy CBF. Ne všechny kultivary *S. tuberosum* ale reagují shodně. Např. cv. Astarte mělo předchozí vystavení chladu pozitivní efekt na odolnost k mrazu, kdy došlo ke snížení letální teploty z -3,1 na -5,3 °C (van Swaaij et al., 1985). Aklimační chlad neměl výrazný vliv na přírůstek prýtu i kořene u obou genotypů *in vitro*, s výjimkou kořene 66B po zotavení, který byl po aklimačním chladu vyšší (graf 22). Po 2. ošetření nebyl u kontroly zaznamenán nárůst čerstvé hmotnosti rostlin jako mezi 1. ošetřením a zotavením, důvodem by mohla být vysoká variabilita rostlin spojená s nižším počtem testovaných rostlin.

Analýza stanovení míry EL se osvědčila pro hodnocení poškození u rostlin *in vitro* vystavených chladu a dalším abiotickým stresům (Arvin & Donnelly, 2008), ale nebyla zkoumána z hlediska opakovaného vystavení chladovému ošetření u bramboru. K testování stresové paměti při chladu byla vybrána aklimační teplota 12 °C a stresová teplota 6 °C, protože negativně ovlivňuje růst rostlin (Folgado et al., 2013).

Působení aklimačního chladu před samotným stresovým působením 6 °C u genotypu 66B kultivovaného *in vitro* způsobilo zvýšenou míru úniku elektrolytů z listů oproti kontrole i jednorázovému působení (graf 24), což bylo neočekávané, vzhledem k výrazně nižší EL z listů po 1. ošetření aklimačním chladem. Naproti tomu u cv. Lada měl aklimační chlad na integritu pletiv (tedy nízká hladina EL) pozitivní vliv, ovšem pouze u kořenů (graf 25). Tyto výsledky vykazují jistou podobnost s výsledky ze Sucha 2, kdy aklimační vystavení suchu vedlo k nižší míře EL z listů cv. Lada po opakovaném suchu. Malé přírůstky rostlin v podmínkách *in vitro* neumožnily provedení kompletního spektra analýz, proto jsem opět přešla k experimentům prováděným na rostlinách pěstovaných *ex vitro*.

Experiment provedený v podmínkách *ex vitro* přinesl z hlediska reakce genotypů 66B a Lada na chlad odlišné výsledky vůči výsledkům experimentu *in vitro*, ačkoli byl použit shodný experimentální design stresového ošetření. U cv. Lada nedošlo k odlišné reakci na stres z nízké teploty po vystavení aklimačnímu chladu oproti variantě opakovaného působení, čerstvá hmotnost a výška prýtu se nelišila mezi variantami ošetření a míra EL byla u obou stresovaných variant velmi podobná. Rozdíl v EL při chladové aklimaci byl zaznamenán u kořenů cv. Lada pěstovaného *in vitro*. Bohužel srovnatelné stanovení míry úniku elektrolytů v kořenech rostlin *ex vitro* nebylo možné s ohledem na použití kultivačního substrátu bohatého na živiny a nemožnosti jeho kvalitního odmytí při vzorkování. Kultivary poddruhu Tuberosum jsou považovány za citlivé vůči chladu, je tedy zajímavé, že opakované působení chladu nevedlo k omezení růstu ani poklesu obsahu vody. Nepřítomnost negativního vlivu stresu však může být dána zvolenou aklimační a stresovou teplotou. Chladová aklimace nebyla pozorována ani u jinak poměrně odolného cv. Desirée (Oufir et al., 2008), který se však dokáže aklimovat na suchu (Ramírez et al., 2015) a je odolný i vůči zasolení (Jaarsma & de Boer, 2018). Překvapivě, u genotypu 66B došlo po vystavení stresovému i aklimačnímu chladu k výrazné redukci výšky rostlin (graf 26), byla však zjištěna signifikantně nižší EL v listech oproti variantě vystavené jednorázovému stresovému chladu (graf 28). Je tedy možné spekulovat, že u genotypu 66B k chladové aklimaci došlo (vzhledem k nižší míře poškození), bylo ovšem doprovázené zpomalením růstu. Pokus by bylo vhodné zopakovat, a především provést i kontrolní variantu. Vzhledem k technickým omezením (1 kultivační box) bylo nutné varianty testovat v čase postupně za sebou a kultivace kontrolní varianty nebyla do odevzdání diplomové práce ukončena. Pro doplnění celkového obrazu by měly také být provedeny zbylé analýzy (ROS, MDA), k čemuž nedošlo z časových důvodů, všechny potřebné vzorky však byly odebrány. Ačkoliv byly rostliny při odběru srovnatelně dlouho kultivovány (v podmínkách *ex vitro*) jako rostliny po 1. ošetření v exp. Sucho 1, není možné je považovat za kontrolní i k chladovému



experimentu, zejména kvůli odlišným světelným podmínkám v kultivačním boxu, což je považováno za faktor, který může významně ovlivnit zejména růstové charakteristiky rostlin (Utsunomiya & Higuchi, 1996, Seabrook, 2005).

Výsledky z provedených analýz jak v podmínkách nedostatku vody, tak vystavení nízkým teplotám lze považovat pouze za dílčí, a tak bohužel nepřináší spolehlivou a jasnou odpověď na otázku o přítomnosti stresové paměti u vybraných genotypů zastupujících oba poddruhy bramboru *Solanum tuberosum* a vhodnosti využití markerů oxidativního stresu/poškození pro potvrzení přítomnosti stresové paměti. Experimenty provedené *in vitro*, jakkoli vylepšované, neposkytly dostatek materiálu pro provedení všech vybraných analýz a mezi rostlinami přetrvávala vysoká heterogenita, což znemožnilo hlubší zhodnocení. Aplikace PEG byla problematická a opakované ošetření s mezifází otužování při zachování celých rostlin bez poškození se ukázalo být víceméně nemožné. Původní koncept práce zaměřený pouze na testování rostlin *in vitro* proto musel být změněn. Kultivace *ex vitro* se u bramboru osvědčila, jelikož byla udržena poměrně vysoká homogenita a získání dostatečného množství materiálu pro analýzy, experimenty však byly provedeny jen jednou, navíc s malým (v dané situaci maximálním) počtem opakování a mnoho vzorků se navíc do odevzdání práce nestihlo zpracovat. Výsledky experimentů provedených *ex vitro* poskytly lepší představu o míře oxidativního stresu, avšak jedině z analýz míry úniku elektrolytů (EL) bylo možné pozorovat pozitivní efekt přípravného mírnějšího stresu na stres následující alespoň u jednoho genotypu. Tato metodika nebyla dosud v laboratoři zavedená, a bylo proto mým úkolem ji optimalizovat, což se podařilo. Tuto metodiku použili např. Arvin & Donnelly (2008) při testování odpovědi různých genotypů bramboru na abiotické stresy, Man et al. (2017) při hodnocení chladové aklimace u rýže. Míra EL z provedených analýz nejlépe popisuje míru stresu projevující se poškozením. Při stanovení hladiny ROS často dochází k artefaktům (z přípravy vzorku či samotné metodiky) a existují omezené možnosti jak odlišit jednotlivé ROS (Shulaev et al., 2006). Hladina celkových ROS také nemusí korelovat s mírou lipidové peroxidace, tedy potenciálním poškozením membrán, což potvrzují i výsledky naší laboratoře (Kofroňová et al., 2019; Kofroňová et al., 2020). Kolorimetrické stanovení obsahu MDA je sice cenově dostupné a hojně používané pro stanovení míry lipidové peroxidace, může však přinést zavádějící výsledky, jak bylo zjištěno při srovnání této metodiky s metodou založenou na UPLC (*ultra-high-performance liquid chromatography*) spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Yonny et al., 2017). Míra EL, jakožto snadno a rychle analyzovatelný parametr stresového poškození, by se tedy dala považovat za vhodnější marker pro stanovení míry oxidativního

stresu a lépe korelovat se stresovou pamětí u rostlin. Pro ověření spolehlivosti těchto tvrzení by však bylo třeba dokončit všechny původně plánované analýzy vybraných parametrů.

Je zajímavé, že zástupci obou poddruhů reagovali poněkud odlišně ve stresu sucha a chladu, ačkoli obě stresová působení jsou v literatuře spojována právě s oxidativním stresem (Demirel et al., 2020; Folgado et al., 2013). Výsledky z experimentů *ex vitro* naznačují možnou schopnost genotypu 66B aklimovat se na nízkou teplotu, jelikož byla míra EL v listech bez aklimační fáze výrazně vyšší, podobná reakce u 66B u sucha chyběla. Je známo, že se Andigeny na sucho dokáží aklimovat (Watkinson et al., 2006, 2008), avšak lze spekulovat o tom, že reakce bude pravděpodobně závislá na genotypu. Schopnost aklimovat se na chlad byla u Andigeny také potvrzena a projevila se ve zvýšení tolerance vůči mrazu a akumulaci prolinu (van Swaaij et al., 1985). Vzhledem k vyšší odolnosti k suchu by bylo zajímavé odhalit, jestli jsou mechanismy aklimace na tyto stresy obdobné a v čem se případně liší. Naproti tomu u cv. Lada bylo možné pozorovat jistou míru aklimace (z hlediska nižší míry EL) jen u rostlin vystavených opakovanému suchu, u chladu tento efekt pozorován nebyl. Z literatury vyplývá, že je schopnost aklimovat se na nízkou teplotu u poddruhu Tuberosum specifická pro jednotlivé genotypy (Oufir et al., 2008; van Swaaij et al., 1985).

Pro navazující pokusy spolehlivěji testující stresovou paměť a markery oxidativního stresu u bramboru by bylo vhodné zkoumat vyšší počet rostlin a upravit design experimentu tak, aby bylo možné zkoumat efekt výraznějšího stresu (delší doba bez závlivy a nižší teplota). Také testování vyššího množství genotypů od poddruhů Solanum a Andigena by pomohlo odhalit, zdali jsou mezi poddruhy v souvislosti stresové paměti rozdíly, nebo je odlišnost reakce na stres závislá pouze na daném genotypu. V budoucím experimentu by se také měly co nejlépe přizpůsobit podmínky zvoleným genotypům (nebo zvolit genotypy, kterým podmínky vyhovují), aby nedošlo např. k předčasné senescenci. Pro ucelenější představu o podstatě stresové paměti by bylo také žádoucí doplnit další analýzy, např. antioxidačních systémů (antioxidační enzymy a molekuly), fotosyntézy a obsahu a spektra nestrukturních sacharidů nebo epigenetických změn. Velmi užitečné z hlediska hodnocení míry oxidativního stresu a jeho promítnutí do stresové paměti rostlin by bylo stanovení aktivity NADPH oxidázy, která má významnou úlohu v signalizaci ROS a aklimaci, viz literární úvod (Suzuki et al., 2013; Baxter et al., 2014). Tato analýza byla od počátku plánovaná jako důležitý mezičlánek propojující míru oxidativního stresu a stresovou paměť. Metodiku jsem nastudovala, opatřila potřebné chemikálie, odebrala potřebné vzorky, ale z důvodu časově náročného ladění kultivačních podmínek nezbyl prostor na její optimalizaci a provedení analýz.



## Závěry:

- Experimentální design se podařilo částečně optimalizovat, avšak pouze v podmínkách *ex vitro*.
- Opakované přerušení zálivky vedlo ke snížení čerstvé hmotnosti prýtu, na výšku mělo pozitivní efekt u obou genotypů, na obsah vody nemělo vliv.
- U cv. Lada na rozdíl od genotypu 66B sucho nezpůsobilo snížení obsahu vody v listu a opakované působení mělo pozitivní vliv na míru úniku elektrolytů (poškození).
- Sucho u obou genotypů nezpůsobilo změny v hladině malondialdehydu i ROS.
- Aklimační chlad nezpůsobil změny v čerstvé hmotnosti prýtu a obsahu vody v prýtu i kořeni obou genotypů.
- U genotypu 66B měl aklimační chlad na rozdíl od cv. Lada pozitivní vliv na míru úniku elektrolytů z listů, avšak negativní na výšku rostlin.
- Hladina MDA byla u genotypu 66B výrazně nižší než u cv. Lada v *in vitro* i *ex vitro*.
- Výsledky z chladových experimentů *in vitro* nebyly vždy shodné s experimenty *ex vitro*. Aklimační chlad vedl u 66B ke zvýšení míry úniku elektrolytů z listů, u cv. Lada nikoliv (vedl však k nižšímu poškození kořenů).
- Výsledky nepotvrdily míru oxidativního stresu jako marker stresové paměti, pokud by tomu tak bylo, jako nejvhodnější marker ze stanovovaných analýz se jeví míra úniku elektrolytů.

## 6. Seznam použité literatury

- Arvin, M. J., & Donnelly, D. J. (2008). Screening potato cultivars and wild species to abiotic stresses using an electrolyte leakage bioassay. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 10(1), 33–42.
- Banik, P., Zeng, W., Tai, H., Bizimungu, B., & Tanino, K. (2016). Effects of drought acclimation on drought stress resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 126(February 2018), 76–89.
- Bartoli, C. G., Casalongué, C. A., Simontacchi, M., Marquez-Garcia, B., & Foyer, C. H. (2013). Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 73–88.
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1229–1240.
- Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., & Bhattarai, T. (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences*, 32(3), 501–510.
- Beckers, G. J. M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S., & Conrath, U. (2009). Mitogen-Activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 21(3), 944–953.
- Bolwell, G. P., & Wojtaszek, P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - A broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51(6), 347–366.
- Bowler, C., & Fluhr, R. (2000). The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science*, 5(6), 241–246.
- Bruce, T. J. A., Matthes, M. C., Napier, J. A., & Pickett, J. A. (2007). Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, 173(6), 603–608.
- Bündig, C., Blume, C., Peterhänsel, C., & Winkelmann, T. (2016). Changed composition of metabolites in *Solanum tuberosum* subjected to osmotic stress in vitro: Is sorbitol taken up? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127(1), 195–206.
- Byun, M. Y., Lee, J., Cui, L. H., Kang, Y., Oh, T. K., Park, H., Lee, H., & Kim, W. T. (2015). Constitutive expression of DaCBF7, an Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* CBF homolog, resulted in improved cold tolerance in transgenic rice plants. *Plant Science*, 236, 61–74.
- Caffrey, M., Fonseca, V., & Leopold, A. C. (1988). (*m.c.*); 754–758.
- Carvallo, M. A., Pino, M. T., Jeknić, Z., Zou, C., Doherty, C. J., Shiu, S. H., Chen, T. H. H., & Thomashow, M. F. (2011). A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance: *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*, and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3807–3819.
- Dahal, K., Li, X. Q., Tai, H., Creelman, A., & Bizimungu, B. (2019). Improving potato stress tolerance and tuber yield under a climate change scenario – a current overview. *Frontiers in Plant Science*, 10(May).
- Del Río, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2827–2837.
- Demirel, U., Morris, W. L., Ducreux, L. J. M., Yavuz, C., Asim, A., Tindas, I., Campbell, R., Morris, J. A., Verrall, S. R., Hedley, P. E., Gokce, Z. N. O., Caliskan, S., Aksoy, E., Caliskan, M. E., Taylor, M. A., & Hancock, R. D. (2020). Physiological, Biochemical, and Transcriptional Responses to Single and Combined Abiotic Stress in Stress-Tolerant and Stress-Sensitive Potato Genotypes. *Frontiers in Plant Science*, 11(February), 1–21.

- Desjardins, Y., Dubuc, J. F., & Badr, A. (2009). In vitro culture of plants: A stressful activity! *Acta Horticulturae*, 812, 29–50.
- Dobrota, C. (2006). Energy dependant plant stress acclimation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 5(2–3), 243–251.
- Elstner, E. F., & Heupel, A. (1976). Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: A simple assay for superoxide dismutase. *Analytical Biochemistry*, 70(2), 616–620.
- Ensminger, I., Busch, F., & Huner, N. P. A. (2006). *Ftbn\_Banner\_Blue\_Middle.Pdf*. 28–44.
- Chapin, F. S. III. (1991). Integrated responses of plants to stress. *BioScience*, 41(1), 29–36.
- Farrant, J. M. (2000). A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology*, 151(1), 29–39.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., & Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 387–415.
- Fleta-Soriano, E., Pintó-Marijuan, M., & Munné-Bosch, S. (2015). Evidence of drought stress memory in the facultative CAM, *Aptenia cordifolia*: Possible role of phytohormones. *PLoS ONE*, 10(8), 1–12.
- Folgado, R., Panis, B., Sergeant, K., Renaut, J., Swennen, R., & Hausman, J. F. (2013). Differential protein expression in response to abiotic stress in two potato species: *Solanum commersonii* Dun and *Solanum tuberosum* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4912–4933.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H. F., Mylona, P., Miedema, H., Angel Torres, M., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D. G., Davies, J. M., & Dolan, L. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422(6930), 442–446.
- Friedrich, T., Faivre, L., Bäurle, I., & Schubert, D. (2019). Chromatin-based mechanisms of temperature memory in plants. *Plant Cell and Environment*, 42(3), 762–770.
- Habib, N., Ali, Q., Ali, S., Javed, M. T., Zulqurnain Haider, M., Perveen, R., Shahid, M. R., Rizwan, M., Abdel-Daim, M. M., Elkelish, A., & Bin-Jumah, M. (2020). Use of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide for Better Yield of Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Water Deficit Conditions: Growth, Osmoregulation, and Antioxidative Defense Mechanism. *Plants*, 9(2), 285.
- Hardigan, M. A., Laimbeer, F. P. E., Newton, L., Crisovan, E., Hamilton, J. P., Vaillancourt, B., Wiegert-Rininger, K., Wood, J. C., Douches, D. S., Farré, E. M., Veilleux, R. E., & Buell, C. R. (2017). Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(46), E9999–E10008.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604–611.
- Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S. M., Qian, P., Xin, W., Li, H. Y., Burritt, D. J., Fujita, M., & Tran, L. S. P. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: Insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, 6(June), 1–19.
- Jaarsma, R., & de Boer, A. H. (2018). Salinity tolerance of two potato cultivars (*Solanum tuberosum*) correlates with differences in vacuolar transport activity. *Frontiers in Plant Science*, 9(June), 1–12.
- Jiang, M., & Zhang, J. (2002). Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta*,

- 215(6), 1022–1030.
- Jouve, L., Engelmann, F., Noirot, M., & Charrier, A. (1993). Evaluation of biochemical markers (sugar, proline, malonaldehyde and ethylene) for cold sensitivity in microcuttings of two coffee species. *Plant Science*, 91(1), 109–116.
- Jubany-Marí, T., Munné-Bosch, S., López-Carbonell, M., & Alegre, L. (2009). Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to summer drought. *Journal of Experimental Botany*, 60(1), 107–120.
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., & Mullineaux, P. (1999). Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*, 284(5414), 654–657.
- Kerchev, P., van der Meer, T., Sujeeth, N., Verlee, A., Stevens, C. V., Van Breusegem, F., & Gechev, T. (2020). Molecular priming as an approach to induce tolerance against abiotic and oxidative stresses in crop plants. *Biotechnology Advances*, 40(June 2019), 107503.
- Kofroňová, M., Hrdinová, A., Mašková, P., Soudek, P., Tremlová, J., Pinkas, D., & Lipavská, H. (2019). Strong antioxidant capacity of horseradish hairy root cultures under arsenic stress indicates the possible use of *A Armoracia rusticana* plants for phytoremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174(February), 295–304.
- Kofroňová, Monika, Hrdinová, A., Mašková, P., Tremlová, J., Soudek, P., Petrová, Š., Pinkas, D., & Lipavská, H. (2020). Multi-component antioxidative system and robust carbohydrate status, the essence of plant arsenic tolerance. *Antioxidants*, 9(4), 1–21.
- Lämke, J., & Bäurle, I. (2017). Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biology*, 18(1), 1–11.
- Li, X., Cai, J., Liu, F., Dai, T., Cao, W., & Jiang, D. (2014). Cold priming drives the sub-cellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 34–43.
- Lipavská, H., & Vreugdenhil, D. (1996). Uptake of mannitol from the media by in vitro grown plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45(2), 103–107.
- Lutts, S., Kinet, J. M., & Bouharmont, J. (1995). Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany*, 46(12), 1843–1852.
- Machida-Hirano, R. (2015). Diversity of potato genetic resources. *Breeding Science*, 65(1), 26–40.
- Man, L., Xiang, D., Wang, L., Zhang, W., Wang, X., & Qi, G. (2017). Stress-responsive gene *RsICE1* from *Raphanus sativus* increases cold tolerance in rice. *Protoplasma*, 254(2), 945–956.
- Mane, S. P., Robinet, C. V., Ulanov, A., Schafleitner, R., Tincopa, L., Gaudin, A., Nomberto, G., Alvarado, C., Solis, C., Bolivar, L. A., Blas, R., Ortega, O., Solis, J., Panta, A., Rivera, C., Samolski, I., Carbajulca, D. H., Bonierbale, M., Pati, A., ... Grene, R. (2008). Molecular and physiological adaptation to prolonged drought stress in the leaves of two Andean potato genotypes. *Functional Plant Biology*, 35(8), 669–688.
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., & Pauly, N. (2012). A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in Plant Science*, 17(1), 9–15.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., Dangl, J. L., & Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, 2(84).
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K.,

- Gollery, M., Shulaev, V., & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: The new wave? *Trends in Plant Science*, 16(6), 300–309.
- Neves, D. M., Santana-Vieira, D. D. S., Dória, M. S., Freschi, L., Ferreira, C. F., Soares Filho, W. dos S., Costa, M. G. C., Coelho Filho, M. A., Micheli, F., & Gesteira, A. da S. (2018). Recurrent water deficit causes alterations in the profile of redox proteins in citrus plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132(July), 497–507.
- Osmond, C. B., Austin, M. P., Berry, J. A., Billings, W. D., Boyer, J. S., Decey, J. W. H., Nobel, P. S., Smith, S. D., & Winner, W. E. (1987). Stress and the Physiology of Plants Distribution. The survival of plants in any ecosystem depends on their physiological reactions to various stresses of the environment. *BioScience*, 37(1), 37–48.
- Oufir, M., Legay, S., Nicot, N., Van Moer, K., Hoffmann, L., Renaut, J., Hausman, J. F., & Evers, D. (2008). Gene expression in potato during cold exposure: Changes in carbohydrate and polyamine metabolisms. *Plant Science*, 175(6), 839–852.
- Sagi, M., & Fluhr, R. (2006). Production of Reactive Oxygen Species by Plant. *Structure*, 141(June), 336–340.
- Pel, Z. M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G. J., Grill, E., & Schroeder, J. I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406(6797), 731–734.
- Pereira, C. S., Lins, R. D., Chandrasekhar, I., Freitas, L. C. G., & Hünenberger, P. H. (2004). Interaction of the Disaccharide Trehalose with a Phospholipid Bilayer: A Molecular Dynamics Study. *Biophysical Journal*, 86(4), 2273–2285.
- Pino, M. T., Ávila, A., Molina, A., Jeknic, Z., & Chen, T. H. H. (2013). Enhanced in vitro drought tolerance of *Solanum tuberosum* and *Solanum commersonii* plants overexpressing the ScCBF1 gene. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 40(1), 171–184.
- Posmyk, M. M., Bailly, C., Szafrńska, K., Janas, K. M., & Corbineau, F. (2005). Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 162(4), 403–412.
- Ramírez, D. A., Rolando, J. L., Yactayo, W., Monneveux, P., Mares, V., & Quiroz, R. (2015). Improving potato drought tolerance through the induction of long-term water stress memory. *Plant Science*, 238, 26–32.
- Rao, S., & Ftz, J. (2013). In vitro selection and characterization of polyethylene glycol (PEG) tolerant callus lines and regeneration of plantlets from the selected callus lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(2), 261–268.
- Roy, R., Agrawal, V., & Gupta, S. C. (2011). Mannitol, polyethylene glycol and NaCl induced polypeptide changes during in vitro culture of three tomato cultivars. *Biologia Plantarum*, 55(3), 591–595.
- Saxena, I., Srikanth, S., & Chen, Z. (2016). Cross talk between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and interacting signal molecules under plant stress response. *Frontiers in Plant Science*, 7(APR2016), 1–16.
- Schafleitner, R., Gutierrez Rosales, R. O., Gaudin, A., Alvarado Aliaga, C. A., Martinez, G. N., Tincopa Marca, L. R., Bolivar, L. A., Delgado, F. M., Simon, R., & Bonierbale, M. (2007). Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(9), 673–690.
- Seabrook, J. E. A. (2005). Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) in vitro: A review. *American Journal of Potato Research*, 82(5), 353–367.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26.
- Shi, Q., Ding, F., Wang, X., & Wei, M. (2007). Exogenous nitric oxide protect cucumber



- roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(8), 542–550.
- Shulaev, V., Oliver, D. J., & Virginia, V. S. (2006). *Metabolic and Proteomic Markers for Oxidative Stress. New Tools for Reactive Oxygen Species Research*. 141(June), 367–372.
- Si, T., Wang, X., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., & Jiang, D. (2019). Double benefits of mechanical wounding in enhancing chilling tolerance and lodging resistance in wheat plants. *Plant Biology*, 21(5), 813–824.
- Sin'kevich, M. S., Sabel'nikova, E. P., Deryabin, A. N., Astakhova, N. V., Dubinina, I. M., Burakhanova, E. A., & Trunova, T. I. (2008). The changes in invertase activity and the content of sugars in the course of adaptation of potato plants to hypothermia. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(4), 449–454.
- Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Mishra, R. K., Tripathi, D. K., Singh, V. P., Chauhan, D. K., & Prasad, S. M. (2016). Reactive oxygen species (ROS): Beneficial companions of plants' developmental processes. *Frontiers in Plant Science*, 7(September2016), 1–19.
- Sukhotu, T., & Hosaka, K. (2006). Origin and evolution of Andigena potatoes revealed by chloroplast and nuclear DNA markers. *Genome*, 49(6), 636–647.
- Suzuki, N., Miller, G., Salazar, C., Mondal, H. A., Shulaev, E., Cortes, D. F., Shuman, J. L., Luo, X., Shah, J., Schlauch, K., Shulaev, V., & Mittler, R. (2013). Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants. *Plant Cell*, 25(9), 3553–3569.
- Tripathy, B. C., & Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 7(12), 1621–1633.
- Umbreen, S., Lubega, J., Cui, B., Pan, Q., Jiang, J., & Loake, G. J. (2018). Specificity in nitric oxide signalling. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3439–3448.
- Utsunomiya, N., & Higuchi, H. (1996). Effects of Irradiance Level on the Growth and Photosynthesis of Cherimoya, Sugar Apple and Soursop Seedlings. *Environ. Control in Biol.*, 34(3), 201–207.
- van Swaaij, A. C., Jacobsen, E., & Feenstra, W. J. (1985). Effect of cold hardening, wilting and exogenously applied proline on leaf proline content and frost tolerance of several genotypes of *Solanum*. *Physiologia Plantarum*, 64(2), 230–236.
- Vasquez-Robinet, C., Mane, S. P., Ulanov, A. V., Watkinson, J. I., Stromberg, V. K., De Koeber, D., Schafleitner, R., Willmot, D. B., Bonierbale, M., Bohnert, H. J., & Grene, R. (2008). Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 59(8), 2109–2123.
- Wang, X., Zhang, M. M., Wang, Y. J., Gao, Y. T., Li, R., Wang, G. F., Li, W. Q., Liu, W. T., & Chen, K. M. (2016). The plasma membrane NADPH oxidase OsRbohA plays a crucial role in developmental regulation and drought-stress response in rice. *Physiologia Plantarum*, 156(4), 421–443.
- Watkinson, J. I., Hendricks, L., Sioson, A. A., Heath, L. S., Bohnert, H. J., & Grene, R. (2008). Tuber development phenotypes in adapted and acclimated, drought-stressed *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* have distinct expression profiles of genes associated with carbon metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(1), 34–45.
- Watkinson, J. I., Hendricks, L., Sioson, A. A., Vasquez-Robinet, C., Stromberg, V., Heath, L. S., Schuler, M., Bohnert, H. J., Bonierbale, M., & Grene, R. (2006). Accessions of *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* show differences in photosynthetic recovery after drought stress as reflected in gene expression profiles. *Plant Science*, 171(6), 745–758.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. *EMBO Journal*, 16(16), 4806–4816.
- Yonny, M. E., Torressi, A. R., Nazareno, M. A., & Cerutti, S. (2017). Development of a

Novel, Sensitive, Selective, and Fast Methodology to Determine Malondialdehyde in Leaves of Melon Plants by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017.

Yordanov, I., Velikova, V., & Tsonev, T. (2000). Plant response to drought, acclimation, and stress tolerance. In *Forest Science* (Vol. 24, Issue 4, pp. 171–186).

Zhang, S. han, XU, X. feng, Sun, Y. min, Zhang, J. lian, & LI, C. zhou. (2018). Influence of drought hardening on the resistance physiology of potato seedlings under drought stress. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(2), 336–347.