

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

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



**Bc. Andrea Zounková**

Změna v rovnováze BELL transkripčních faktorů jako nástroj posílení tuberizace u  
vybraných kultivarů bramboru

Modulation of BELL transcription factors balance as a tool for tuberisation strengthening in  
selected potato cultivars

Diplomová práce

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

Praha, 2019

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat především své školitelce RNDr. Petře Maškové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, odborné rady, vstřícnost, ochotu a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat mé konzultantce doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D za odborné konzultace, vstřícnost a podporu. Dále pak i ostatním členům laboratoří, kde byly prováděny experimenty, za různorodou pomoc, zejména RNDr. Miroslavu Srbovi, Ph.D za pomoc s transformací, RNDr. Tomáši Maškovi, Ph.D za pomoc s molekulárně-biologickými metodami a Mgr. Vojtěch Čermákovi za poskytnutí kompetentních buněk *A. tumefaciens*. Také bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu během studia.

Tato práce byla vypracována za podpory grantového projektu č. 1308119 Grantové agentury UK.

## 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:

## Abstrakt

Lilek brambor (*Solanum tuberosum*) je z hlediska lidské spotřeby třetí nejvýznamnější plodinou na světě. Pochopení regulačních mechanismů kontrolujících zakládání hlíz má tedy kromě teoretického i praktický význam. Tuberizace *S. tuberosum* je komplexní morfogenní proces regulovaný jak podmínkami prostředí, tak vnitřními poměry v rostlině. Environmentální podmínky regulující nástup tuberizace jsou již dlouho známy, nicméně molekulární podstata iniciace tvorby hlíz začala být odhalována teprve nedávno, a to zejména s využitím divokého poddruhu *S. tuberosum* subsp. *andigena*. Důležitou komponentou komplexní sítě regulačních drah kontrolujících nástup tuberizace jsou mj. BELL transkripční faktory. Cílem této práce je vychýlit rovnováhu mezi hladinami BELL transkripčních faktorů indukujících a reprimujících tuberizaci směrem k podpoření iniciace tvorby hlíz u vybraných odrůd kulturního poddruhu bramboru *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (kultivary Kamýk a Korela). Pro dosažení tohoto cíle byly odvozeny transgenní linie s vneseným konstruktem obsahujícím část kódujícího úseku *StBEL11* resp. *StBEL29* v antisense orientaci (AS) pod kontrolou konstitutivního promotoru a linie nesoucí konstrukt obsahující kompletní sekvence genů *StBEL5+StPTB6* pod kontrolou nativních promotorů. Cílem vnesení prvních dvou konstruktů v antisense orientaci je prostřednictvím RNA interference snížit hladinu *StBEL11*, resp. *StBEL29* působících jako represory tuberizace. Vnesení konstruktů *StBEL5+PTB6* by mělo vést k mírnému navýšení hladin *StBEL5* a *StPTB6*. U dvou nezávislých linií *S. t. tuberosum* cv. Kamýk nesoucích *StBEL11* AS bylo potvrzeno snížení hladiny *StBEL11* transkriptu v listech. U těchto linií docházelo k dřívějšímu zakládání hlíz, vykazovaly i trend navýšení počtu hlíz a výnosů. Dále byla u těchto linií v listech stanovena hladina vybraných transkriptů souvisejících s regulací tuberizace. Hladina transkriptu pro interakčního partnera BELL transkripčních faktorů *StPOTH1* se nelišila od kontrolních wt rostlin. Hladina transkriptů pro klíčové složky indukčního mobilního tuberigenního signálu, *StSP6A* a *StBEL5*, v listech se v předběžném experimentu také výrazně neměnila, hladina transkriptu *StBEL5* byla spíše mírně snížena. Dosavadní výsledky této práce získané pro *BEL11* AS mutanty, jakkoli předběžné, ukazují na to, že výchozí hypotéza o možnosti posílení tuberizace u bramboru pomocí zásahu do rovnováhy BELL transkripčních faktorů by mohla být platná.

Klíčová slova: tuberizace bramboru, BELL transkripční faktory, *StBEL11*, *StBEL29*, *StBEL5*, *Solanum tuberosum*, kultivary

## Abstract

Potato (*Solanum tuberosum*) is the third most important crop in terms of human consumption. Hence understanding regulatory mechanisms controlling tuber initiation is significant not only from a theoretical but also practical point of view. Tuberization of *S. tuberosum* is a complex morphogenic process regulated by both, environmental conditions and inner plant status. Environmental conditions regulating the onset of tuberization have been known for a long time, but the molecular basis of tuber initiation has only recently been discovered, in particular using wild subspecies *S. tuberosum* subsp. *andigena*. BELL transcription factors are among the important components of the regulatory signalling network. The aim of this study was to modulate balance between the BELL transcription factors that induce and repress tuberization towards strengthening of tuber induction using two cultivars of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*, cv. Kamýk, resp. cv. Korela. To achieve this, transgenic lines carrying construct containing a part of coding sequence *StBEL11*, resp. *StBEL29* in antisense orientation (AS) under control of constitutive promoters and lines carrying complete sequences of *StBEL5* and *StPTB6* genes under control of their native promoters were derived. We used the StBEL11 and StBEL29 AS constructs with the aim to decrease via RNA interference the levels of StBEL11, resp. StBEL29 that act as tuberization repressors. Transformation by StBEL5 + StPTB6 construct should result in a moderate increase in StBEL5 and StPTB6 levels. The decrease in *StBEL11* transcript was confirmed in the leaves of two independent transgenic lines of *S. t. tuberosum* cv. Kamýk carrying StBEL11 AS construct. These transgenic lines formed tubers earlier, and tended to increased tuber number and yields. Furthermore, the levels of selected transcripts related to tuberization were determined in these transgenic lines. Transcript level of the BELL interaction partner StPOTH1 in mutants did not differ from control. Transcript level of key component of the mobile tuberigenic signal StSP6A in the leaves did not change significantly in the preliminary experiment, the level of the *StBEL5* transcript was only slightly reduced. The results obtained for the BEL11 AS mutants, although preliminary, suggest that the initial hypothesis of the possibility to enhance potato tuberization by modulation of BELL transcription factors balance might be valid.

Key words: potato tuberization, BELL transcription factors, StBEL11, StBEL29, StBEL5, *Solanum tuberosum*, cultivars

## Seznam zkratek

6x LD	loading dye
ARF8	Auxin response factor 8
AS	antisense orientace
BAP	6-Benzylaminopurin
BELL	Bel1-like
CCA1	Circadian Clock Associated 1
CDC	Cell-division-cycle
cDNA	complementary DNA
CIM	callus inducing medium
CO	CONSTANS
C <sub>t</sub>	threshold cycle
DEPC	diethylpyrokarbonát
dNTP	směs deoxyribonukleotidů pro PCR
DOF	DNA-binding with one finger
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EtBr	ethidium bromid
FD	FLOWERING LOCUS D
FKF1	FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT, F-BOX1
FT	FLOWERING LOCUS T
GA <sub>3</sub>	kyselina giberelová
GAS	galactinol synthase
GFP	green fluorescent protein
GI	GIGANTEA
GUS	β-Glucoronidase
Hd3A	HEADING DATE 3a

KNOX	KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN
LD	long day
LHY	LATE ELONGATED HYPOCOTYL
LOG	LONELY GUY
mRNA	messenger RNA
NAA	1-naftylacetic acid
OE	overexpression
PCR	polymerase chain reaction
PEBP	phosphatidyl ethanolamine-binding protein
PhyB	Phytochrome B
PRR	PSEUDO-RESPONSE REGULATOR
PTB	Polypyrimidine tract-binding proteins
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
SD	short day
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIM	shoot inducing medium
StCDF1	CYCLING DOF FACTOR1
StCOL1	StCONSTANS-like1
StGA2ox	StGA2 oxidase
StPOTH1	POTATO HOMEODOMAIN 1
StSP3D	SELF PRUNING 3D
StSP5G	SELF PRUNING 5G
StSP6A	SELF PRUNING 6A
StSPL	SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE
SUT1	Sucrose transporter1
TAC	tuberigen activation complex

TAE pufr	tris-acetátový pufr
TALE	three-amino acid loop extension
T-DNA	transferová DNA
TF	transkripční faktor
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometan
UBI	polyubikvitin
UTR	untranslated region
wt	wild type



## Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Cíle: .....	2
2	Literární přehled.....	3
2.1	Tuberizace <i>Solanum tuberosum</i> .....	3
2.1.1	Faktory regulující nástup tuberizace .....	3
2.1.1.1	Vliv délky dne a teploty .....	3
2.1.1.2	Role fytohormonů .....	4
2.1.1.3	Dostupnost dusíku.....	4
2.1.1.4	Sacharidová bilance .....	4
2.1.2	Tuberigenní signalizace.....	5
2.1.2.1	StCDF1 .....	6
2.1.2.2	FT-like proteiny .....	7
2.1.2.3	BELL transkripční faktory .....	8
2.1.2.4	microRNA.....	14
2.1.3	Změny ve stolonu indukované tuberigenním signálem.....	15
2.1.3.1	Změny v genové expresi spojené s nástupem tuberizace.....	15
2.1.3.2	Morfologické změny při přeměně stolonu v hlízu .....	15
3	Materiál a metody .....	17
3.1	Rostlinný materiál.....	17
3.2	Kultivace rostlin <i>in vitro</i> .....	17
3.2.1	Kultivační médium .....	17
3.2.2	Vegetativní množení rostlin <i>in vitro</i> .....	18
3.2.3	Kultivační podmínky.....	18
3.3	Odvození transgenních rostlin .....	18
3.3.1	Transformace <i>A. tumefaciens</i> .....	20
3.3.2	Ověření přítomnosti transgenů u <i>A. tumefaciens</i> .....	21
3.3.2.1	Příprava templátu pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) .....	21
3.3.2.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	22
3.3.2.3	Elektroforetická separace výsledných produktů PCR.....	23
3.3.3	Transformace rostlinného materiálu.....	24
3.3.3.1	Ko-kultivace transformovaného <i>A. tumefaciens</i> s listy <i>S. t. tuberosum</i> .....	24

3.3.3.2	Navození tvorby kalusu .....	24
3.3.3.3	Navození tvorby prýtu .....	26
3.3.4	Ověření přítomnosti transgenu u rostlinného materiálu .....	27
3.3.4.1	Příprava templátu pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) .....	27
3.3.4.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	27
3.4	Stanovení míry exprese transgenu .....	27
3.4.1	Izolace RNA .....	28
3.4.2	Elektroforetická separace pro ověření kvality izolované RNA.....	28
3.4.3	Syntéza cDNA metodou reverzní transkripce .....	29
3.4.4	Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) .....	30
3.4.4.1	Ověření identity získaných amplikonů při qPCR .....	34
3.5	Stanovení míry exprese vybraných cílových transkriptů .....	35
3.6	Tuberizační experimenty <i>in vitro</i> .....	35
3.7	Zpracování dat .....	35
4	Výsledky .....	36
4.1	Odvození transgenních linií <i>Solanum t. tuberosum</i> .....	36
4.1.1	Transformace <i>A. tumefaciens</i> .....	36
4.1.2	Transformace rostlinného materiálu.....	37
4.2	Ověření exprese transgenu.....	41
4.3	Charakterizace vybraných transgenních linií .....	47
4.3.1	Tuberizační experimenty <i>in vitro</i> .....	47
4.3.2	Stanovení hladin vybraných cílových transkriptů .....	51
5	Diskuze .....	54
6	Závěr .....	60
7	Seznam použité literatury.....	61

# 1 Úvod

Tuberizace lilku bramboru je proces, při němž vznikají zásobní orgány – hlízy přeměnou podzemní části stonku – stolonu. Hlízy pak rostlině slouží jako zásobárna živin a umožňují též vegetativní rozmnožování. Současně má tvorba hlíz velký význam nejen pro přežití rostlin, ale také pro podporu lidského života. Lilek brambor je třetí nejvýznamnější plodinou na světě. Má tedy význam zabývat se regulací procesu tuberizace. Pochopení regulace tohoto procesu je nezbytné pro navržení strategií na navýšení výnosu a vylepšení kvality hlíz. Celosvětový výzkum tohoto komplexního biologického procesu přinesl informace o roli různých biomolekul spjatých s procesem tuberizace bramboru. Mezi ně patří i BELL transkripční faktory (TF). U bramboru bylo detekováno 13 genů kódujících BELL TF, z nichž u tří byla prokázána souvislost s regulací tuberizace. Jedná se o StBEL5 působící indukčně na tvorbu hlíz, StBEL11 a StBEL29, které naopak působí jako represory tuberizace. Cílem této práce je zjistit, zda vychýlení rovnováhy mezi hladinami BELL TF může vést k posílení tuberizace u kulturních odrůd bramboru.

## 1.1 Cíle:

### Cíle

Pomocí transgenozy vychýlit rovnováhu mezi indukčními a inhibičními signály z rodiny BELL transkripčních faktorů, a posílit tak zakládání hlíz u vybraných domácích odrůd kulturního bramboru

### Dílčí cíle:

- Odvodit transgenní linie *S. t. tuberosum* cv. Kamýk a cv. Korela nesoucí následující konstrukty:
  - 1) *CaMV 35S*: úsek kódující sekvence *StBEL11* v antisense orientaci
  - 2) *CaMV 35S*: úsek kódující sekvence *StBEL29* též v antisense orientaci
    - s cílem snížit expresi *StBEL11* resp. *StBEL29*
  - 3) kompletní sekvence genů *StBEL5+StPTB6* pod kontrolou nativních promotorů
    - s cílem mírně navýšit expresi *StBEL5* a *StPTB6*
- U odvozených linií ověřit přítomnost a expresi transgenu
- Ověřit, zda byla u transgenních linií ovlivněna tuberizace
- Zjistit, zda byly expresí transgenu ovlivněny i další složky tuberigenního signálu

## 2 Literární přehled

### 2.1 Tuberizace *Solanum tuberosum*

Tuberizace lilku bramboru (*Solanum tuberosum*) je komplexní morfogenní proces, při němž dochází k tvorbě zásobních orgánů – hlíz, přeměnou z podzemní části prýtu tzv. stolonu. Pro úspěšnost rostliny je důležité správné načasování tohoto procesu, tudíž je iniciace tuberizace kontrolována komplikovanou sítí regulačních drah, které jsou dále kontrolovány jak environmentálními podmínkami, tak vnitřním statusem rostliny (viz kapitola 2.1.1). Za podmínek indukujících tuberizaci je v listu produkován systemický tuberigenní signál (viz kapitola 2.1.2), který je floémem transportován do stolonu, kde následně indukuje vývojové změny spjaté s tvorbou hlíz (viz kapitola 2.1.3) (přehledně v Hannapel et al., 2017).

#### 2.1.1 Faktory regulující nástup tuberizace

##### 2.1.1.1 Vliv délky dne a teploty

Pro výzkumné účely je nejčastěji využíván poddruh *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, který pochází z Jižní Ameriky z oblasti podhůří And poblíž rovníku. V těchto oblastech trvá noc přibližně 12 hodin a noční teploty jsou nízké. Divoký poddruh bramboru *S. tuberosum* subsp. *andigena* je na tyto podmínky adaptován a vyžaduje je pro indukci tuberizace (Dodds, 1962). Za dlouhodobých podmínek (LD, long day) vyskytujících se v létě v temperátní zóně tento poddruh téměř netuberizuje, je tedy označován jako striktně krátkodenní (SD, short day). Bylo zjištěno, že rozhodujícím faktorem však není délka dne, ale délka noci. Pokud za SD podmínek dojde k přerušení tmy během noci, rostliny *S. tuberosum* subsp. *andigena* netuberizují (Rodríguez-Falcon et al., 2006).

Naproti tomu kulturní odrůdy bramboru (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*), odvozené od linií pěstovaných na jihu Chile v nižších nadmořských výškách, jsou adaptovány i na LD podmínky a vyšší teploty, vyskytující se v létě v temperátních zónách (Glendinning, 1975). Ačkoli kulturní odrůdy tuberizují i za LD podmínek, je tuberizace SD podmínkami podpořena u všech variet bramboru. Nízké teploty mají na tuberizaci též pozitivní vliv, vysoké teploty naopak snižují výnosy hlíz (Menzel, 1980; Kim a Lee, 2019). Avšak existuje značná variabilita v tom, do jaké míry mají podmínky prostředí vliv na indukci tuberizace u různých variet bramboru (Glendinning, 1975). Moderní kultivary podrobené selekci tuberizují časně a iniciace tvorby hlíz je relativně nezávislá na délce dne.

### **2.1.1.2 Role fytohormonů**

Bylo provedeno mnoho experimentů potvrzujících roli fytohormonů při procesech spjatých s tvorbou hlíz. Klíčová je celková rovnováha metabolismu a transportu fytohormonů, která se mění během jednotlivých fází tvorby hlíz (přehledně v Aksenova et al., 2012). Bylo prokázáno, že při růstu stolonu hrají důležitou gibereliny, jejichž vysoká hladina podporuje elongaci stolonu (Xu et al., 1998a). Avšak před počátkem tvorby hlíz hladina giberelinů naopak rychle klesá, zejm. v subapikální oblasti stolonu (Kloosterman et al., 2007). Vysoká hladina giberelinů brání přeměně stolonu v hlízu (Xu et al., 1998a). Kyselina abscisová má naopak pozitivní vliv na indukci tvorby hlíz, díky jejímu inhibičnímu efektu na působení giberelinů (Xu et al., 1998a; Macháčková et al., 1998). Dalším fytohormonem pozitivně regulujícím tuberizaci je kyselina jasmonová a její deriváty – kyselina tuberonová a glukosid kyseliny tuberonové (Yoshihara et al., 1989). Dříve se dokonce myslelo, že tyto sloučeniny fungují jako tuberigenní signál transportovaný na dlouhou vzdálenost, nicméně jejich specifická role při procesu tvorby tuberigenního stimulu v listech však není dosud objasněna (Aksenova et al., 2012). Důležitá je též auxin-cytokininová rovnováha, která hraje klíčovou roli při regulaci proliferace ve vznikajících hlízách (Kolachevskaya et al., 2018).

### **2.1.1.3 Dostupnost dusíku**

Již delší dobu je známo, že změnou režimu výživy N je možné posunout endogenní rovnováhu fytohormonů a tím regulovat nástup tuberizace. Kontinuální vysoká dostupnost N vede k navýšení obsahu giberelinů a snížení obsahu kyseliny abscisové v prýtu, což má za následek podporu růstu prýtu, ale zpoždění/inhibici tuberizace (Krauss a Marschner, 1982; Krauss, 1985). Předpokládá se, že příčinou zpoždění/inhibice tuberizace je nedostatek asimilátů pro podzemní část rostliny, na úkor nárůstu nadzemní části prýtu (Krauss, 1985).

### **2.1.1.4 Sacharidová bilance**

Jedním z parametrů, který rozhoduje o zahájení tuberizace, je energetický stav rostliny vycházející ze sacharidového metabolismu. Vysoká hladina sacharidů v médiu má indukční vliv na tuberizaci *in vitro* (Hendriks et al., 1991; Xu et al., 1998a). Důležitá je také distribuce sacharidů mezi jednotlivými orgány rostliny. Sacharidy zastávají úlohu hlavního motoru transportu látek floémem (přehledně v Li et al., 2017), tudíž se také podílí na regulaci transportu tuberigenního signálu (viz kapitola 2.1.2). Dále sacharidy působí jako signální molekuly (přehledně v Smeekens a Hellmann, 2014).

### 2.1.2 Tuberigenní signalizace

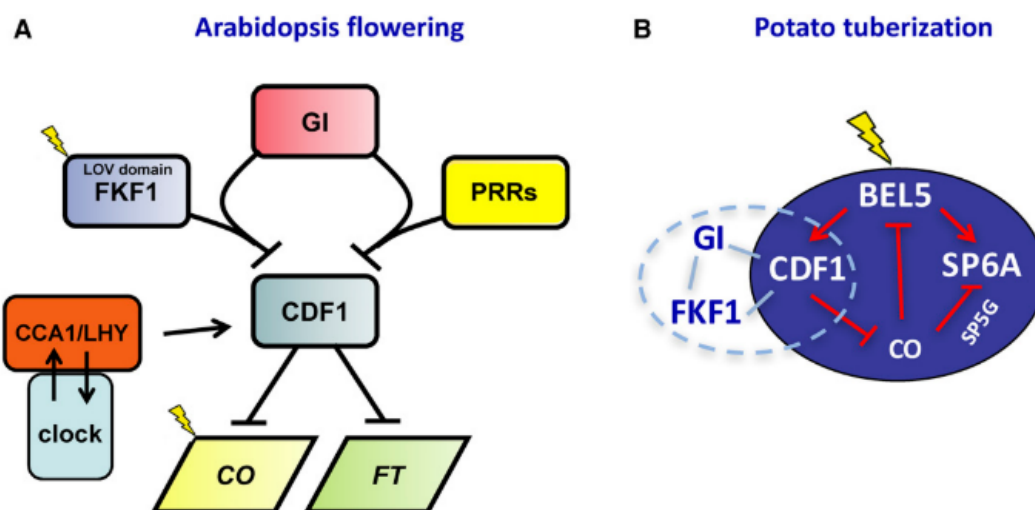
Tuberigenní signalizace je nejlépe prostudována u *S. tuberosum* subsp. *andigena*, jen několik málo prací se zabývá tuberigenní signalizací u kulturních oddrůd bramboru. Jedná se o komplexní síť, zahrnující jak složky aktivující tuberizaci, tak i represory. Díky tomu je možné regulovat správné načasování iniciace tuberizace a koordinovat vývoj vznikajících hlíz. Přeměna stolonu v hlízu významně ovlivní transport látek (např. fytohormonů a metabolitů) v celé rostlině, neboť nově vznikající hlízy jsou silným sinkem. Mezi složky tuberigenního signálu se řadí proteiny, resp. RNA, které specificky regulují přepnutí vývojového programu stolonu na iniciaci tvorby hlíz. Byly detekovány tři hlavní složky tuberigenního signálu indukující iniciaci tuberizace: CYCLING DOF FACTOR1 (StCDF1), SELF PRUNING 6A (StSP6A), a StBEL5 (Banerjee et al., 2006; Navarro et al., 2011; Kloosterman et al., 2013). StCDF1 a StBEL5 jsou transkripční faktory (Banerjee et al., 2006; Kloosterman et al., 2013), StSP6A působí jako koregulátor (Teo et al., 2017). Zatímco protein StSP6A a *StBEL5* mRNA působí jako mobilní signály transportované floémem z listu do stolonu, StCDF1 není mobilní, působí tedy v místě exprese – v listech (Banerjee et al., 2006; Navarro et al., 2011; Kloosterman et al., 2013).

Tuberigenní signalizace vykazuje podobnost s fotoperiodickou dráhou regulující nástup kvetení. StCDF1 interaguje s proteiny, které jsou výstupem cirkadiálních hodin, stejně jako homolog *A. thaliana* AtCDF1, kontrolující zahájení kvetení (Sawa et al., 2007; Kloosterman et al., 2013). Avšak regulace těchto dvou procesů je odlišná. Zatímco AtCDF1 má negativní vliv na indukci kvetení u *A. thaliana*, StCDF1 podporuje zahájení tvorby hlíz u *S. tuberosum* (Sawa et al., 2007; Kloosterman et al., 2013; Morris et al., 2014) (viz kapitola 2.1.2.1).

StSP6A je homologem FLOWERING LOCUS T (FT) *Arabidopsis thaliana*, který působí jako florigenní signál, transportovaný floémem z listů do apikálního meristému prýtu, kde vyvolá květní indukci (Corbesier et al., 2007; Navarro et al., 2011). Na regulaci nástupu tuberizace se podílí též další protein z rodiny FT, zvaný SELF PRUNING 5G (StSP5G), který však působí jako represor tuberizace (Abelenda et al., 2016). Role FT-like proteinů při tuberigenní signalizaci je podrobněji popsána v kapitole 2.1.2.2.

Další složkou tuberigenního signálu jsou transkripční faktory rodiny BELL. Jak již bylo zmíněno, jednou z klíčových složek mobilního tuberigenního signálu je *StBEL5* mRNA, podílející se na iniciaci tuberizace. Dále byl vliv na regulaci tuberizace prokázán u StBEL11 a StBEL29, které však působí jako represory tuberizace (podrobněji je role BELL TF uvedena v

kapitole 2.1.2.3). Schéma základních složek tuberigenní signalizace v porovnání s florigenní signalizací viz obrázek 1.



Obrázek 1: Porovnání fotoperiodické regulace kvetení u *A. thaliana* (A) a tuberizace u *S. tuberosum* (B), A: Za podmínek neindukčních pro kvetení, AtCDF1 reprimuje transkripci AtFT a AtCONSTANS (CO), pozitivního regulátoru exprese AtFT, čímž je kvetení reprimováno. Pokud nastanou podmínky indukční pro kvetení, AtCDF1 je degradován skrze interakci s proteiny: FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT, F-BOX1 (FKF1) a GIGANTEA (GI), které jsou výstupem cirkadiálních hodin a k jejichž stabilizaci je vyžadováno modré světlo. Kromě toho je transkripce AtCDF1 reprimována proteiny PRR (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR), které jsou též výstupem cirkadiálních hodin. Naopak proteiny CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) a LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), které jsou produkty tzv. ranních genů centrálního cirkadiálního oscilátoru, aktivují transkripci AtCDF1. B: Za podmínek neindukčních pro tuberizaci dochází u bramboru k tvorbě komplexu GI/FKF1/StCDF1, což má za následek degradaci StCDF1 – tuberizace je tedy inhibována. Za podmínek indukčních pro tuberizaci je StCDF1 stabilizován, reprimuje aktivitu CO, čímž je reprimována exprese StSP5G a dojde k derepresi StBEL5 a StSP6A (převzato z Hannapel et al., 2017)

Byl prokázán též vliv dvou mobilních microRNA na regulaci tvorby hlíz. Jedná se o *miR172* (Martin et al., 2009), která má pozitivní vliv na zahájení tuberizace a *miR156*, jejíž přesná role není dosud příliš objasněna (Bhogale et al., 2014) (viz kapitola 2.1.2.4).

### 2.1.2.1 StCDF1

StCDF1 je transkripční faktor patřící do rodiny DOF (DNA-binding with one finger), který funguje jako mediátor mezi výstupem cirkadiálních hodin a tuberigenním signálem StSP6A a pozitivně reguluje nástup tuberizace (viz kapitola 2.1.2, obrázek 1) (Kloosterman et al., 2013). Bylo zjištěno, že jedním z faktorů přizpůsobení tuberizace na LD podmínky je u kulturních brambor důsledek alelické variability *StCDF1* (Kloosterman et al., 2013; Morris et al., 2014). U pozdně tuberizujících linií *S. tuberosum* (diploidní linie andigena x neo-tuberosum) byla detekována homozygotita (alela *StCDF1.1*), zatímco u časně tuberizujících linií byly nalezeny



dvě odlišné alely (*StCDF1.2* a *StCDF1.3*). Obě tyto alely obsahovaly inzerci, která přerušila kódující sekvenci na C-konci. Narušení těchto alel umožňuje vyhnout se post-translační kontrole délky dne, což umožňuje tuberizaci i v dlouhých dnech. Navození konstitutivní exprese *StCDF1.2* u striktně krátkodenní *S. tuberosum* subsp. *andigena* vedlo k překonání pro tuberizaci neindukčních LD podmínek (Kloosterrman et al., 2013). Toto potvrdila i další studie, která odhalila, že *S. tuberosum neo-tuberosum*, na rozdíl od subsp. *andigena*, obsahuje alelu s narušenou sekvencí v oblasti C-konce (Morris et al., 2014).

### 2.1.2.2 FT-like proteiny

FT-like proteiny u bramboru patří do skupiny PEBP proteinů (phosphatidyl ethanolamine-binding protein) (Karlgrén et al., 2011). Jedná se o malé globulární proteiny, které vytváří komplex s FD-like (FLOWERING LOCUS D like) a 14-3-3 proteiny a společně regulují expresi cílových genů (Taoka et al., 2013; Teo et al., 2017). Funkce těchto proteinů v regulaci nástupu kvetení je konzervována u všech krytosemenných rostlin, avšak během evoluce došlo mnohokrát k duplikaci genů, kódujících tyto proteiny, které si buď zachovaly původní funkci či získaly nové funkce (Karlgrén et al., 2011). U *S. tuberosum* byly detekovány čtyři FT-like geny *StSP6A*, *StSP5G*, *StSP5G-like*, a *StSP3D* (*SELF PRUNING 3D*). Protein *StSP3D* se účastní květní indukce, proteiny *StSP6A*, *StSP5G* a *StSP5G-like* proteiny regulují nástup tuberizace (Navarro et al., 2011).

#### StSP6A

Protein *StSP6A* je jednou z klíčových složek tuberigenního signálu, podporující zahájení tuberizace (Navarro et al., 2011). U *S. tuberosum* subsp. *andigena* byla za indukčních SD podmínek detekována vysoká hladina transkriptu *StSP6A* v listech a stolonech. Rostliny *S. tuberosum* subsp. *andigena* overexprimující (OE) *StSP6A* tuberizovaly i za jinak neindukčních LD podmínek. Naopak umlčení exprese *StSP6A* u tohoto poddruhu vedlo k opoždění nástupu tuberizace za SD podmínek. I přesto, že umlčení *StSP6A* mělo za následek opoždění tuberizace, celkové výnosy byly srovnatelné s rostlinami divokého genotypu (wt, wild type), což naznačuje, že *StSP6A* je zapojen v regulaci iniciace tuberizace, ale neovlivňuje další vývoj hlíz. Expresní analýzy u kulturních odrůd bramboru dále potvrdily, že navýšení hladiny transkriptu *StSP6A* v listech koreluje s dobou zahájení tuberizace, a že *StSP6A* je zapojen v kontrole nástupu tuberizace i u fotoperiodicky neutrálních kultivarů. (Navarro et al., 2011)

Naroubování *StSP6A* OE *S. tuberosum* subsp. *andigena* na wt podnož, vedlo k podpoření tuberizace, což naznačuje, že *StSP6A* funguje jako mobilní tuberigenní signál (Navarro et al.,

2011). V souladu s tímto jsou i výsledky dalšího experimentu, kdy byl transgenní roub exprimující *Hd3A* (HEADING DATE 3a, FT-like homolog z *Oryza sativa* indukující kvetení za SD, který dokáže indukovat tuberizaci *S. tuberosum*) naroubován na wt podnož, což vedlo k navození tuberizace u *S. tuberosum* subsp. *andigena* za jinak neindukčních LD podmínek (Navarro et al., 2011). Hd3A značený GFP (green fluorescent protein) byl navíc detekován ve stolonu wt podnože (Navarro et al., 2011). Bylo potvrzeno, že protein StSP6A interaguje s FD-like a 14-3-3 proteinem za vzniku komplexu TAC (tuberigen activation complex), který reguluje expresi cílových genů zapojených v iniciaci tuberizace (Teo et al., 2017).

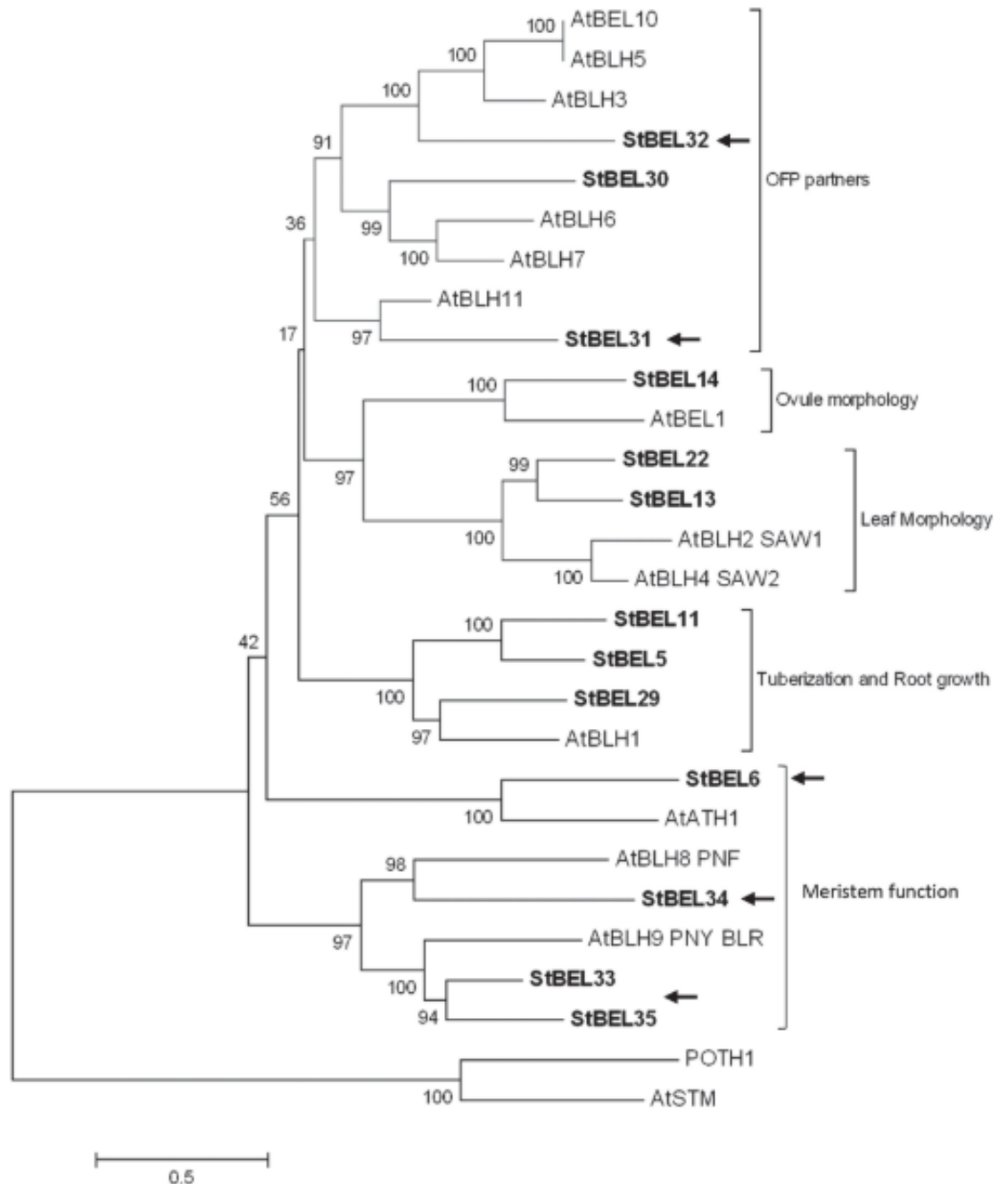
### **StSP5G a StSP5G-like**

Proteiny StSP5G a StSP5G-like působí antagonisticky vůči StSP6A, tedy jako represory tuberizace (Abelenda et al., 2016). Vysoká hladina *StSP5G* a *StSP5G-like* transkriptu byla v listech *S. tuberosum* subsp. *andigena* detekována za neindukčních LD podmínek (Navarro et al., 2011). Bylo zjištěno, že exprese *StSP5G* je aktivována transkripčním faktorem StCONSTANS-like1 (StCOL1), který přímo váže konzervovaný TGTGGT element přítomný v *StSP5G* promotoru. Exprese *StCOL1* je regulována cirkadiánními hodinami a vykazuje diurnální vzor exprese. Nejvyšší hladina tohoto transkriptu byla detekována za svítání. Dále bylo zjištěno, že pro stabilizaci StCOL1 proteinu je nezbytný receptor červeného světla PhyB (Phytochrome B). Jak umlčení exprese *StSP5G*, tak *StCOL1* vedlo k aktivaci exprese *StSP6A* v listech *S. tuberosum* subsp. *andigena* za LD podmínek. StSP5G tedy v závislosti na StCOL1 reprimuje expresi *StSP6A* za LD podmínek, čímž zajišťuje u *S. tuberosum* subsp. *andigena* striktní SD požadavky pro tuberizaci. (Abelenda et al., 2016)

#### **2.1.2.3 BELL transkripční faktory**

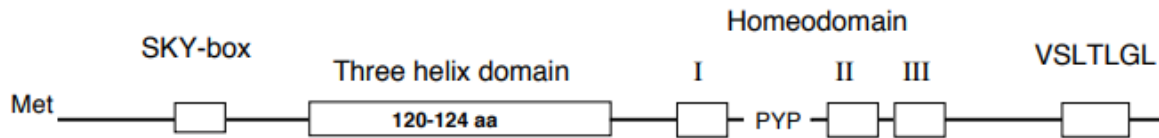
BEL1-like transkripční faktory (BELL TF), patřící do skupiny TALE (three-amino acid loop extension: prolin-tyrosin-prolin), jsou transkripční faktory vyskytující se napříč rostlinnými druhy (Bürglin, 1997). Spolu se svými interakčními partnery – transkripčními faktory rodiny KNOX (KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN), též ze skupiny TALE, regulují různé vývojové procesy rostlin (Bellaoui et al., 2001; Muller et al., 2001; Smith et al., 2002; Chen et al., 2004, 2003; Rutjens et al., 2009; Khan et al., 2012). Zvýšení rostlinné komplexity během evoluce pozitivně koreluje s nárůstem obou těchto rodin. Zatímco červené a zelené řasy mají jeden či dva *KNOX*, resp. *BELL* geny, genomy vyšších rostlin obsahují několik genů *KNOX* i *BELL* (Mukherjee et al., 2009). Modelový organismus vyšších rostlin *Arabidopsis thaliana* obsahuje 13 genů pro BELL TF. Fylogenetické analýzy odhalily 13 *BEL1-like* genů *S. tuberosum*

ortologních s *BEL1-like A. thaliana*, viz obrázek 2 (Chen et al., 2003; Sharma et al., 2014). Vliv na regulaci tuberizace byl prokázán u tří BELL TF: StBEL5, StBEL11 a StBEL29 (Chen et al., 2003; Banerjee et al., 2006; Ghate et al., 2017). Geny kódující tyto tři proteiny zodpovídají za tvorbu více než 70 % všech transkriptů *BELL* přítomných v rostlině *S. tuberosum*. Jsou si blízce příbuzné (viz obrázek 2). (Sharma et al., 2014).



Obrázek 2: Porovnání aminokyselinových sekvencí 13 známých BEL1-like proteinů *S. tuberosum* s BEL1-like proteiny *A. thaliana* uspořádaných do fylogenetického stromu; čísla v oblasti větvení značí bootstrapovou hodnotu (v procentech) podporující rozvětvení; délka větve indikuje rozsah změn (měřítko v levém dolním rohu). BEL1-like proteiny *S. tuberosum* (StBELL TF) jsou vyznačeny tučně, vpravo je pro každou skupinu uvedena předpokládaná funkce. (převzato z Sharma et al., 2014)

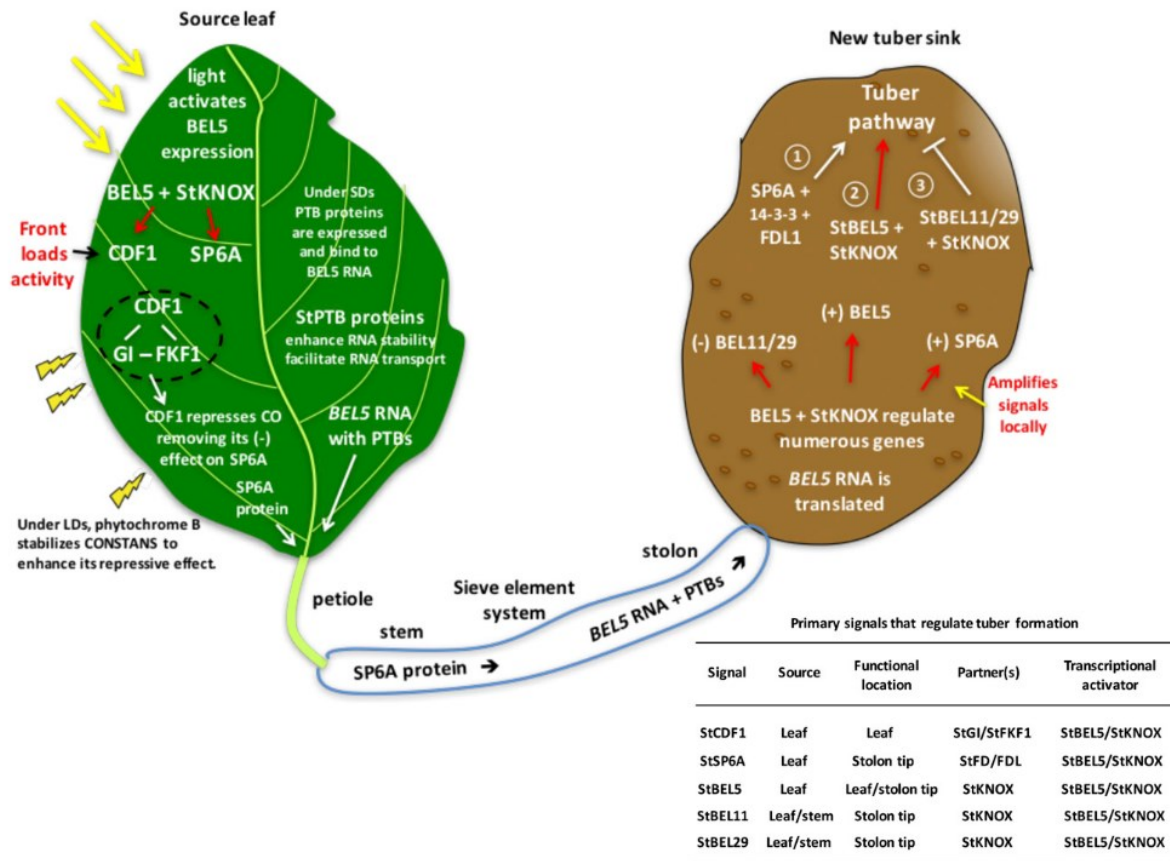
BELL TF jsou charakterizovány přítomností čtyř konzervovaných regionů: SKY-boxu lokalizovaného v N-terminální oblasti, BELL domény, homeodomény a VSLTLGL motivu na C konci (viz obrázek 3). Délka StBELL TF se pohybuje v rozmezí od 423 do 738 aminokyselin. (Sharma et al., 2014)



Obrázek 3: Struktura StBELL TF: všechny StBELL obsahují SKY box, BELL doménu (Three helix domain), homeodoménu tvořenou třemi podjednotkami a VSLTLGL motiv. Konzervovaný TALE motiv (proline-tyrosine-proline, PYP) se nachází mezi podjednotkami I a II homeodomény (převzato z Sharma et al., 2014).

## StBEL5

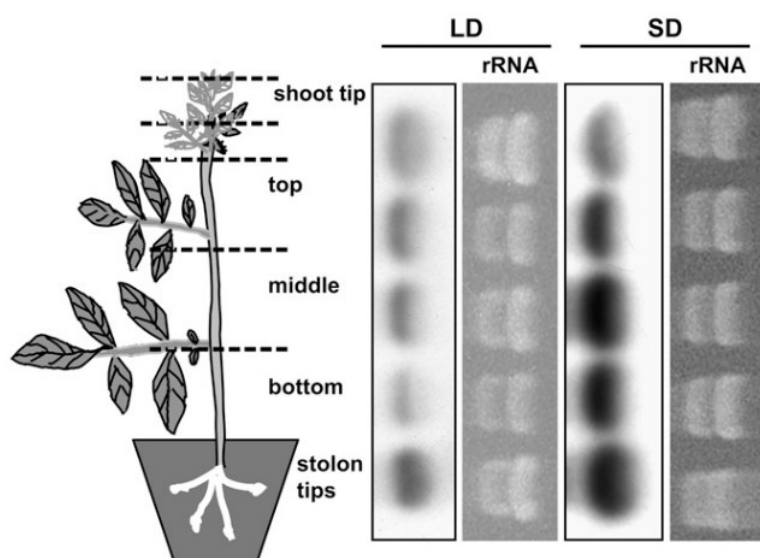
StBEL5 je nejlépe prostudovaným BELL TF. Za podmínek indukujících tuberizaci StBEL5 spolu se svým interakčním partnerem rodiny KNOX - StPOTH1 (POTATO HOMEODOMAIN 1) aktivuje transkripci *StSP6A* a *StCDF1* v listech a tím iniciuje tuberigenní signalizaci (Chen et al., 2003; Sharma et al., 2016; Cho et al., 2015). Kromě toho je ve formě transkriptu transportován floémem do stolonu, kde je translatován a poté také vytváří heterodimer s StPOTH1 (Banerjee et al., 2006). Ve stolonu dochází k amplifikaci tuberigenního signálu, díky autoregulační smyčce exprese *StBEL5* a další aktivaci exprese *StSP6A* (Sharma et al., 2016). StBEL5-StPOTH1 a StSP6A následně aktivují expresi cílových genů (synergicky nebo nezávisle) zapojených v regulaci tvorby hlíz (viz kapitola 2.1.3.1) (Navarro et al., 2011; Sharma et al., 2016). Vedle toho StBEL5-StPOTH1 podporuje navýšení hladiny *StBEL11* a *StBEL29* transkriptů, působících jako represory tuberizace (Ghate et al., 2017). Předpokládá se, že tato zkřížená regulace pravděpodobně umožňuje optimální koordinaci dělení buněk ve vznikajících hlízách a zajišťuje udržení rovnováhy rozdělování zdrojů. Model tuberigenní signalizace viz obrázek 4.



Obrázek 4: Model tuberigenní signalizace: Expres *StBEL5* v listu je navýšena za působení indukční fotoperiody. *StBEL5* protein v listu vytváří heterodimer s *KNOX* TF (*StPOTH1*). Tento heterodimer v listu aktivuje expresi *StCDF1* a *StSP6A*, čímž je iniciována tuberigenní signalizace. Za LD podmínek je působením modrého světla skrze fytochrom B stabilizován *CDF1/GI/FKF1* komplex, což má za následek degradaci *StCDF1* – tedy inhibici tuberigenní signalizace. Za SD podmínek je *StCDF1* stabilizován a reprimuje aktivitu *CO*, což má pozitivní vliv na expresi *StSP6A*, který působí jako mobilní indukční tuberigenní signál transportovaný z listů do stolonu. Kromě toho, jsou za SD podmínek v listu exprimovány *PTB* proteiny (Polypyrimidine tract-binding proteins), které váží *StBEL5* mRNA a zajišťují stabilitu tohoto transkriptu při transportu floémem z listu do stolonu. Ve stolonu dojde k translaci *StBEL5* mRNA a tvorbě *StBEL5-StPOTH1* heterodimeru a následně k amplifikaci tuberigenního signálu díky autoregulační smyčce exprese *StBEL5* a další aktivaci exprese *StSP6A*. *StBEL5-StPOTH1* heterodimer a *StSP6A* v komplexu s 14-3-3 a FD-like proteinem (*FDL1*) ve stolonu aktivují expresi cílových genů zapojených v regulaci tvorby hlíz. *StBEL5-StPOTH1* heterodimer mj. aktivuje expresi *StBEL11* a *StBEL29*, negativních regulátorů tuberizace (převzato z Hannapel et al., 2017).

Jak konstitutivní overexpres *StBEL5*, tak *StPOTH1* vede k navýšení výnosu hlíz za SD a překonání neindukčních LD podmínek u *StBEL5* OE resp. *StPOTH1* OE linií *S. tuberosum* subsp. *andigena* (Chen et al., 2003). *StBEL5* OE linie, na rozdíl od *StPOTH1* OE linií, nevykazovaly změny v morfologii listů (Chen et al., 2003; Rosin et al., 2003), charakteristické pro ostatní *KNOX* OE mutanty (Sinha et al., 1993; Lincoln et al., 1994; Chen et al., 1997; Morimoto et al., 2005; Chatterjee et al., 2011; Shu et al., 2015; Mahajan et al., 2016). Nicméně konstitutivní overexpres *StBEL5* vede zároveň k výraznému navýšení aktivity i v pletivech, kde je exprese nežádoucí (David Hannapel, osobní sdělení).

Bylo prokázáno, že *StBEL5* mRNA je u *S. tuberosum* subsp. *andigena* přítomna konstitutivně, nicméně její akumulace v listech a stolonech je navýšena za SD podmínek, viz obrázek 5 (Chen et al., 2003; Banerjee et al., 2006). Jak u LD, tak u SD pěstovaných rostlin byla *StBEL5* mRNA detekována ve floému, xylému a v epidermálních buňkách (Banerjee et al., 2006). Transport *StBEL5* mRNA floémem na dlouhou vzdálenost – z listů do stolonu - byl prokázán pomocí roubovacích experimentů (Banerjee et al., 2006). Za tímto účelem byl naroubován *StBEL5* OE mutantní roub z *S. tuberosum* subsp. *andigena* na wt podnož a následovala kultivace za podmínek *in vitro* a *in vivo*. Pohyb *StBEL5* mRNA z roubu do podnože byl zaznamenán bez ohledu na podmínky kultivace. Takto naroubované rostliny vykazovaly vyšší výnosy hlíz oproti kontrole (wt roub -wt podnož), což naznačuje, že je floémem transportován kompletní transkript *StBEL5* (Banerjee et al., 2006).



Obrázek 5: Akumulace *StBEL5* mRNA v nadzemní části prýtu a stolonu za LD a SD podmínek u wt rostlin *S. tuberosum* subsp. *andigena*; za SD podmínek se zvyšuje koncentrační gradient směrem od vzrostného vrcholu ke stolonu (převzato z Banerjee et al., 2006)

Nedávná studie prokázala, že *StBEL5* transkript interaguje s proteiny rodiny PTB (polypyrimidine tract-binding protein): StPTB1 a StPTB6 (Cho et al., 2015). Tyto proteiny se váží na konzervované cytosin/uracil motivy, které jsou přítomné na 3'UTR (untranslated region) konci transkriptu *StBEL5* a vazbou zvyšují jeho stabilitu a usnadňují transport floémem (Cho et al., 2015). Bylo prokázáno, že odstranění 3'UTR konce *StBEL5* transkriptu vede ke snížení jeho stability a mobility (Banerjee et al., 2006, 2009). U *S. tuberosum* subsp. *andigena* byla detekována vysoká hladina transkriptů *StPTB1* i *StPTB6* v listovém mezofylu a žilkách listů za SD podmínek a navýšení hladin těchto transkriptů korelovalo s navýšením hladiny

*StBEL5* transkriptu (Cho et al., 2015). *StPTB1* OE, resp. *StPTB6* OE linie *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Desirée vykazovaly navýšení výnosů hlíz a u těchto linií byla též navýšena stabilita *StBEL5* mRNA oproti wt. Naopak linie *S. tuberosum* cv. Desirée s umlčenou expresí *StPTB1*, resp. *StPTB6* měly nižší výnosy hlíz a akumulovaly méně transkriptu *StBEL5*. (Cho et al., 2015)

Rovněž mRNA interakčního partnera StPOTH1 byla detekována ve floému (Banerjee et al., 2006) a bylo potvrzeno, že funguje jako mobilní signál transportovaný floémem (Mahajan et al., 2012).

### **StBEL11 a StBEL29**

Ačkoli jsou StBEL11 a StBEL29 BELL TF nejbližší příbuzné StBEL5, jejich působení na tuberizaci je antagonistické (Sharma et al., 2014; Ghate et al., 2017). Linie *S. tuberosum* subsp. *andigena* u nichž byla navozena konstitutivní overexprese *StBEL11*, resp. *StBEL29* měly výrazně nižší výnosy hlíz oproti kontrole (wt) (Ghate et al., 2017). Naopak transgenní linie *35S CaMV: antisense StBEL11*, resp. *35S CaMV: antisense StBEL29 S. tuberosum* subsp. *andigena* se sníženou expresí *StBEL11*, resp. *StBEL29* vykazovaly vyšší výnosy hlíz oproti kontrole (wt) za SD podmínek (Ghate et al., 2017). Předpokládá se, že antagonistické působení StBEL11 a StBEL29 vůči StBEL5 na tuberizaci, je dáno tím, že StBEL11, resp. StBEL29 reprimuje expresi cílových genů StBEL5 (Ghate et al., 2017). Získání represivní transkripční funkce StBEL11, resp. StBEL29 může souviset buď s přítomností nového sekvenčního motivu u StBEL11 a StBEL29 proteinů nebo s unikátní BELL-KNOX interakcí, nicméně to nebylo zatím ověřeno (Ghate et al., 2017).

Pro určení lokalizace exprese *STBEL11*, resp. *StBEL29* byly vytvořeny linie *StBEL11:GUS* ( $\beta$ -Glucuronidase) a *StBEL29:GUS S. tuberosum* subsp. *andigena*. Výrazná GUS aktivita byla detekována ve vodivých pletivech řapíku a stonku, naproti tomu v kořenech nebyla GUS aktivita detekována a ve stolonech za SD podmínek byla GUS aktivita jen velmi slabá (Ghate et al., 2017). Dále byla stanovena hladina *StBEL11*, resp. *StBEL29* transkriptu a bylo zjištěno, že ačkoli je *StBEL11*, resp. *StBEL29* transkript přítomný v rostlině konstitutivně, akumulace *STBEL11*, resp. *STBEL29* transkriptu ve stolonu *S. tuberosum* subsp. *andigena* je výrazně navýšena za SD podmínek (Ghate et al., 2017). Byla proto ověřena mobilita těchto transkriptů pomocí roubování. Byl použit transgenní roub *GAS* (galactinol synthase):*StBEL11*, resp. *GAS:StBEL29* (*GAS* promotor je pletivově specifický – aktivní pouze v nejmenších žilkách listu) *S. tuberosum* subsp. *andigena* a wt podnož. *StBEL11*, resp. *StBEL29* transkript byl pomocí

transgen-specifických primerů detekován ve stolonu a sekundárních kořenech wt podnože, což potvrdilo, že tyto transkripty působí jako mobilní signál (Ghate et al., 2017). Jelikož *StBEL11* a *StBEL29* transkripty vykazují podobné vzorce akumulace v závislosti na fotoperiodě jako transkript *StBEL5*, je možné, že jejich pohyb a stabilita je řízena společným faktorem (Chen et al., 2003; Ghate et al., 2017). Dále bylo zjištěno, že v 3'UTR oblasti *StBEL11*, resp. *StBEL29* transkriptu se vyskytují stejné sekvenční motivy jako u *StBEL5* transkriptu, kterému umožňují vazbu PTB proteinů, nicméně interakce *StBEL11*, resp. *StBEL29* transkriptů s PTB proteiny zatím nebyla testována (Sharma et al., 2014; Cho et al., 2015; Ghate et al., 2017).

#### 2.1.2.4 microRNA

Jak již bylo zmíněno, byl prokázán vliv dvou microRNA na regulaci tuberizace: *miR172* a *miR156* (Martin et al., 2009; Bhogale et al., 2014; Lakhotia et al., 2014).

##### **miR172**

U *S. tuberosum* subsp. *andigena* je hladina *miR172* navýšena za indukčních SD podmínek ve stolonu (Martin et al., 2009). Overexprese *miR172* u tohoto poddruhu bramboru podpořila tuberizaci za středně indukční fotoperiody (SD s přerušáním tmy během noci) a vyvolala tuberizaci za jinak neindukčních LD podmínek. Dále bylo zjištěno, že u *miR172* OE mutantů byla navýšena hladina *BEL5* mRNA. Bylo zjištěno, že cílem *miR172* je transkript pro transkripční faktor RELATED TO APETALA2 1. Předpokládá se, že důvodem podpoření tuberizace u *S. tuberosum* subsp. *andigena* *miR172* OE linií je narušená fotoperiodická odpověď. *miR172* byla detekována ve vodivých pletivech a byly provedeny roubovací experimenty, přičemž naroubování *miR172* OE na wt podnož vedlo k podpoření tuberizace. Tyto experimenty tedy nasvědčují, že *miR172* působí jako mobilní signál podporující tuberizaci. (Martin et al., 2009)

##### **miR156**

U *S. tuberosum* subsp. *andigena* byla za LD podmínek detekována vyšší hladina *miR156* v listech, zatímco za SD podmínek byla její hladina navýšena ve stolonu (Bhogale et al., 2014). Overexprese *miR156* vedla k drastické změně fenotypu – změněné architektury rostliny a dále k celkovému snížení výnosu hlíz a redukci hladin *miR172* a *StSP6A* transkriptu za SD podmínek (Bhogale et al., 2014). Nicméně *miR156* OE mutanti *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Desirée i subsp. *andigena* tvořily za SD podmínek nadzemní hlízy (Eviatar-Ribak et al., 2013; Bhogale et al., 2014). Bylo zjištěno, že cílem *miR156* jsou transkripty pro transkripční faktory regulující různé vývojové procesy rostlin - SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE3



(StSPL3), StSPL6, StSPL9, StSPL13, a StLIGULELESS1. Přesná úloha miR156 při regulaci tuberizace však není objasněna (Bhogale et al., 2014).

### **2.1.3 Změny ve stolonu indukované tuberigenním signálem**

#### **2.1.3.1 Změny v genové expresi spojené s nástupem tuberizace**

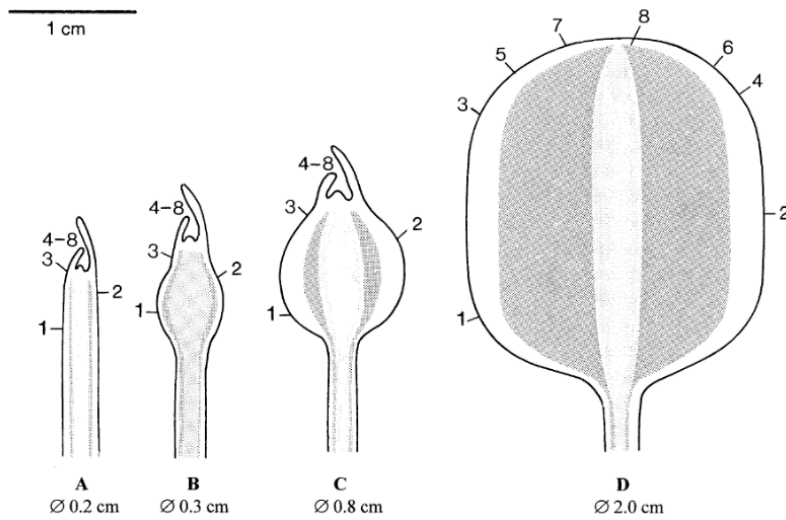
Mobilní složky tuberigenního signálu (StSP6A a BELL transkripční faktory, viz kapitola 2.1.2) ve stolonu regulují expresi řady genů spjatých s tvorbou hlíz. Cílové geny StSP6A a BELL TF se do značné míry překrývají, což umožňuje precizní koordinaci vývojových změn při přeměně stolonu v hlízu (Navarro et al., 2011; Sharma et al., 2016; Ghate et al., 2017). Navíc exprese *StSP6A* je pod kontrolou StBEL5 (Sharma et al., 2016). Jelikož je tuberizace komplexní energeticky náročný proces, je tato koordinace velmi důležitá. Každá fáze tuberizace je regulována širokou škálou genů exprimovaných v různé míře v různých buňkách.

Bylo zjištěno, že cílové geny StBEL5 obsahují ve své upstream sekvenci TTGAC motiv, mezi tyto geny patří např. i samotný *StBEL5* a *StSP6A*, jejichž exprese je up-regulována StBEL5. Další geny, jejichž exprese je up-regulována StBEL5 jsou např. geny kódující proteiny zapojené v regulaci metabolismu, transportu a signalizaci fytohormonů, např. *StGA2ox1*, kódující StGA2 oxidázu – enzym zodpovědný za inaktivaci giberelinů, geny pro auxinové přenašeče StPIN1, StPIN4; *LOG1*, *LOG2* a *LOG3* (LONELY GUY) kódující enzymy zapojené v produkci aktivní formy cytokinů; *ARF8* (Auxin response factor 8) kódující transkripční faktor zapojený v auxinové signalizaci. Dále pak geny kódující proteiny regulující buněčný cyklus (*CDC*) nebo např. gen *SUT1* pro sacharózový transportér. (Sharma et al., 2016) Striktní koordinaci indukce tvorby hlíz dokládá i fakt, že exprese *StGA2ox1*, *StPIN1*, *StPIN4*, *ARF8*, *CDC*, *SUT1* je pozitivně regulována též STSP6A (Navarro et al., 2011). Dále bylo zjištěno, že StBEL11 a StBEL29 naopak negativně ovlivňují expresi cílových genů StBEL5 a StSP6A, konkrétně to bylo prokázáno u *StSP6A* a *StPIN1* (Ghate et al., 2017).

#### **2.1.3.2 Morfologické změny při přeměně stolonu v hlízu**

Pro stolon je charakteristické prodlužování internodií, ohyb špičky prýtu a diageotropický růst. Časné stadium iniciace tuberizace zahrnuje zastavení elongačního růstu a iniciaci radiálního růstu v subapikální oblasti (Cutter, 1978). Tento radiální růst je způsoben růstem buněk dřene a primární kůry těsně pod apikálním meristémem stolonu. Následuje dělení a růst buněk přilehlých ke dřevové oblasti, což zajistí další růst hlízy, viz obrázek 6 (Xu et al., 1998b). Tyto

progenitorové buňky jsou přímém kontaktu s vodivými pletivy (Xu et al., 1998b), což umožňuje přijmout signál transportovaný floémem (viz kapitola 2.1.2).



Obrázek 6: Schéma podélných řezů znázorňující morfologii stolonu a vyvíjející se hlízy bramboru pěstovaného *in vivo*; čísla označují nody; oblast buněk přiléhajících ke dřevné oblasti, jejichž růst a dělení umožní růst hlízy, jsou vyznačeny šedivě (převzato z Xu et al., 1998b)

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Rostlinný materiál

Lilek brambor *Solanum tuberosum* subsp. *Tuberosum*, cv. Kamýk a cv. Korela (ze sbírek *in vitro* kultur KEBR PřF UK).

### 3.2 Kultivace rostlin *in vitro*

#### 3.2.1 Kultivační médium

Pro kultivaci rostlin *in vitro* bylo použito MS médium (Murashige a Skoog, 1962). Příprava MS média probíhala následovně: do destilované vody bylo přidáno odpovídající množství komerčně dodávaných solí základního MS média (Murashige and Skoog Basal Medium, Sigma - Aldrich; 4,33 g/l). Poté byl přidán roztok vitamínů (5 ml/l, složení viz tabulka 1), který byl před použitím uchován při -20°C. Dále pak byla přidána sacharóza, v případě udržovacích kultur do konečné koncentrace 30 g/l. Za stálého míchání na magnetické míchačce byly rozpuštěny všechny přidané složky a následně byl roztok doplněn destilovanou vodou na výsledný objem. Poté bylo přidáním 0,1M/0,2M roztoku KOH upraveno pH na hodnotu 5,75 (pH metr Orion 410 A+). Po úpravě pH bylo přidáno odpovídající množství agaru (8 g/l, Sigma-Aldrich). Poté bylo médium za občasného míchání přivedeno k varu v mikrovlnné troubě a následně rozlito po 25 ml do 100ml Erlenmeyerových baněk, které byly uzavřeny alobalem a poté sterilizovány v autoklávu po dobu 20 minut, při teplotě 121°C a tlaku 0,144 MPa (Tuttnauer 2540 EK/ Chirana PS 20A).

Tabulka 1: Složení roztoku vitamínů přidaného do MS média

Látka	Koncentrace v zásobním roztoku [g/l]	látky roztoku	Výsledná koncentrace látky v médiu [mg/l]
Inositol	20		100
Kyselina nikotinová	0,1		0,5
Pyridoxin-HCl	0,1		0,5
Thiamin-HCl	0,1		0,5
Glycin	0,4		2

### **3.2.2 Vegetativní množení rostlin *in vitro***

Veškeré manipulace s kulturami byly prováděny ve sterilních podmínkách v laminárním boxu (Heraeus /Envair - ecoAir) za použití sterilních nástrojů (předem vysterilizovaných v horkovzdušném sterilizátoru Binder po dobu 3 hod při teplotě 150°C). Dále byly nástroje průběžně sterilizovány, tak že byly ponořeny do 96% ethanolu a opáleny nad kahanem. Pro vegetativní množení a udržování kultur byly použity nodální segmenty vyříznuté z rostlin kultivovaných *in vitro*. Segmenty byly kultivovány po třech ve 100ml Erlenmeyerových baňkách s MS médiem připraveným podle shora uvedeného postupu.

### **3.2.3 Kultivační podmínky**

Udržovací kultury byly kultivovány v kultivační místnosti s dlouhodobou fotoperiodou (16/8 hod – světlo/tma) a teplotou 22±2°C.

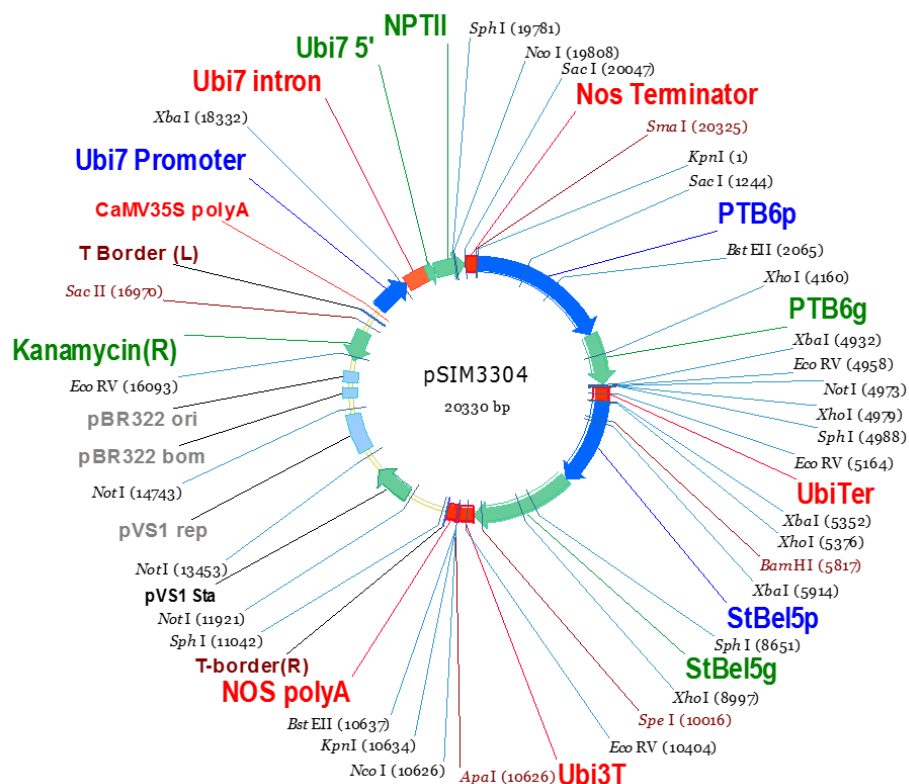
## **3.3 Odvození transgenních rostlin**

Transformace rostlinného materiálu byla provedena pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (kmen C58C1). Plazmidy použité pro transformaci byly získány od dr. Davida Hannapela z Iowa State University (seznam vnášených plazmidů viz tabulka 2). Plazmidy nakapané na filtračním papírku byly převedeny do vodného roztoku a elektroporovány do *Escherichia coli* (kmen XL1Blue) a namnoženy. Poté byly plazmidy izolovány z *E. coli* formou mini- a midiprepů a následně byla ověřena přítomnost transgenu restrikcí štěpením.

Všechny plazmidy nesou rezistenci ke kanamycinu, jak v T-DNA, což umožní selekci transgenního rostlinného materiálu, tak i mimo ni, pro umožnění selekce transgenních buněk *A. tumefaciens*.

Tabulka 2: Seznam vnášených plazmidů

Značení:	
BEL11 AS	Plazmid pCB201: část kódujícího úseku <i>StBEL11</i> (262-663 bp) v antisense orientaci pod kontrolou konstitutivního 35S CaMV promotoru (Ghate et al., 2017)
BEL29 AS	Plazmid pCB201: část kódujícího úseku <i>StBEL29</i> (211-1009 bp) v antisense orientaci, pod kontrolou konstitutivního 35S CaMV promotoru (Ghate et al., 2017)
BEL5+PTB6	Plazmid pSIM3304: kompletní sekvence genů <i>StBEL5+StPTB6</i> pod kontrolou nativních promotorů v rámci jedné T-DNA (viz obrázek 7)



Obrázek 7: Mapa plazmidu pSIM3304 obsahující kompletní sekvenci genů *StBEL5* a *StPTB6* pod kontrolou nativních promotorů, v rámci jedné T-DNA (mapu plazmidu včetně restrikčních míst poskytl Dr. David Hannapel)

Cílem vnesení konstruktů BEL11 AS, resp. BEL29 AS, zahrnujících *StBEL11*, resp. *StBEL29* v antisense orientaci pod kontrolou konstitutivního promotoru, je prostřednictvím RNA interference snížit/umlčet expresi nativního *StBEL11* resp. *StBEL29*. Konstrukt BEL5+PTB6

zahrnuje gen *StBEL5*, kódující mobilní mRNA působící indukčně na tvorbu hlíz, spolu s genem *PTB6*, kódujícím RNA-vázajícím protein, jež zajišťuje stabilitu *StBEL5* mRNA, oba pod kontrolou nativních promotorů. Vnesení tohoto konstruktu by mělo vést k mírnému navýšení exprese *StBEL5* a *StPTB6*.

### 3.3.1 Transformace *A. tumefaciens*

Konzerva kompetentních buněk *A. tumefaciens* kmen C58C1 (skladována při -70°C), získaná od Mgr. Vojtěcha Čermáka, byla přenesena do krabice s ledem. Poté byly ke 100 µl suspenze buněk *A. tumefaciens* přidány 3 µl vybraného plazmidu. Následně byla tato suspenze inkubována 1 min na ledu. Poté byla suspenze přenesena do elektroporační kyvety a sklepnuta na její dno. Kyveta byla vložena do elektroporátoru (Eppendorf Eporator®), který byl nastaven na hodnoty 25 µF; 2 kV a poté byl aplikován elektrický pulz trvající 4,5-4,9 ms. Následně byla suspenze *A. tumefaciens* vypláchnuta 1 ml sterilního YEB média (složení YEB média viz tabulka 3) a přenesena do zkumavky s bakteriologickou zátkou a kultivována 3 hod při 28°C. Poté byla část bakterií přenesena za sterilních podmínek v laminárním boxu na plotny s pevným LB médiem (složení LB média viz tabulka 4) se selekčními antibiotiky: kanamycin (50 mg/l) a rifampicin (100 mg/l), kde byly kultivovány po dobu 3 dní při teplotě 28°C. Poté byla vybraná kolonie *A. tumefaciens*, u níž byla předem ověřena přítomnost vnášeného transgenu (viz kapitola 3.3.2), přenesena, opět za sterilních podmínek, kličkou do Erlenmeyerovy baňky s tekutým YEB médiem, opět s přidanými selekčními antibiotiky (stejně jako v případě pevného LB média). Poté byly bakterie kultivovány přes noc na třepačce (130 ot./min) při teplotě 28°C. Takto připravená suspenze buněk *A. tumefaciens* byla použita pro transformaci rostlinného materiálu (kap. 3.3.3)

Tabulka 3: Složení YEB média: roztoky 1 a 2 byly připravovány zvlášť, po sterilizaci v autoklávu byly spojeny

	<b>Látka</b>	<b>Množství látky [g]</b>
<b>Roztok 1</b>	Pepton	10
	Kvasničný extrakt	1
	Sacharóza	5
	NaCl	10
	Doplněn destilovanou vodou na objem 900 ml	
<b>Roztok 2</b>	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5
	Doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml	

Tabulka 4: Složení LB média, sterilizováno autoklávováním

<b>Látka</b>	<b>Množství látky [g] v 1 l média</b>
Pepton	10
Kvasničný extrakt	10
NaCl	10
Agar	15

### 3.3.2 Ověření přítomnosti transgenů u *A. tumefaciens*

Přítomnost vnášeného transgenů byla nejprve u *A. tumefaciens* a posléze i u regenerovaných rostlin ověřena metodou PCR (polymerase chain reaction). Odebírání materiálu probíhalo za sterilních podmínek v laminárním boxu.

#### 3.3.2.1 Příprava templátu pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR)

V případě *A. tumefaciens* byla pomocí sterilního párátko odebrána malá část z jednotlivých kolonií narostlých na pevném LB médiu, přenesena do sterilních mikrozkušavek typu Eppendorf s 250 µl vody pro PCR (příprava vody pro PCR viz kapitola 3.4). Takto připravené vzorky *A. tumefaciens* byly použity jako templát pro PCR.

### 3.3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci hledaného úseku vnesené DNA pomocí PCR byl použit kit FastStart PCR Master (Roche), který obsahuje Taq polymerázu typu hot start. Do reakce byly dále přidány genově specifické primery, templátová DNA a voda pro PCR. Byly připraveny 20 $\mu$ l reakční směsi (viz tabulka 5).

Tabulka 5: Složení reakční směsi PCR pro ověření přítomnosti transgenu

<b>Přidaná látka</b>	<b>Množství přidané látky v 1 reakční směsi [μl]</b>
FastStart PCR Master (2x koncentrovaný) (Roche)	10
Voda pro PCR	7
Primer forward (fwd) (10 $\mu$ M) *	1
Primer reverse (rev) (10 $\mu$ M) *	1
Templátová DNA	1

\* Přehled použitých primerů pro ověření přítomnosti transgenu (viz tabulka 6)

Tabulka 6: Přehled primerů (v orientaci 5' - 3') použitých pro ověření přítomnosti transgenu

<b>Primery pro detekci <i>BEL5+PTB6</i></b>	fwd: GGATTCGTTTTCTAGGTGC
	rev: TTAAGACTTTTTGGCTATGGTGC
<b>Primery pro detekci <i>BELL11 AS</i></b>	fwd: CTATCCTTCGCAAGACCCTT
	rev: ACATCATCATCATCAACAACACC
<b>Primery pro detekci <i>BELL29 AS</i></b>	fwd: CTATCCTTCGCAAGACCCTT
	rev: ACAACAACAACAGCAACAACA

Pro detekci konstruktů StBEL5+StPTB6 byly primery navrženy tak, aby byl amplifikovaným úsekem přechod mezi StBEL5 a StPTB6. V případě konstruktů StBEL11 AS a StBEL29 AS forward primer zasahuje do oblasti 35S CaMV promotoru.

Reakční směsi připravené podle tabulky 5 byly umístěny do PCR cycleru (Eppendorf 5331 MasterCycler Gradient Thermal Cycler) (program viz tabulka 7).



Tabulka 7: Program PCR pro ověření přítomnosti transgenu

<b>HOLD</b>		25°C (95°C víčko)	
<b>Úvodní denaturace</b>	8 min	95°C	
<b>Denaturace</b>	15 s	95°C	Cyklus opakující se 32x
<b>Nasedání primerů</b>	15 s	52,5°C	
<b>Extense</b>	27 s	72°C	
<b>Závěrečná extense</b>	4 min	72°C	
<b>HOLD</b>		10°C (95°C víčko)	

### 3.3.2.3 Elektroforetická separace výsledných produktů PCR

Pro elektroforetickou separaci výsledných produktů PCR byl použit 1,5% agarózový gel v 1x TAE pufru (tris-acetátový pufr). Agaróza byla rozpuštěna přivedením k varu v mikrovlnné troubě. Po vychladnutí na teplotu cca 60°C byl agarózový roztok nalit do elektroforetické vany. Před utuhnutím bylo přidáno ještě interkalační fluorescenční barvivo ethidium bromid (1 µl roztoku EtBr/ 50 ml gelu; koncentrace roztoku EtBr: 5 mg/ml). Po ozáření gelu ultrafialovým světlem dojde k emisi oranžového světla, což umožňuje vizualizaci DNA. Dále byl před utuhnutím do elektroforetické vany umístěn hřeben, pomocí kterého byly vytvořeny jamky, do nichž byly později naneseny vzorky. Po utuhnutí byl gel dále zalit 1x TAE puftrem, do kterého byly přidány další 2 µl EtBr. Do každého vzorku (výsledný produkt PCR) byly přidány 2 µl nanášecí barvičky 6xLD (Loading Dye), která umožňuje zviditelnění vzorku a tím pádem i možnost sledovat průběh elektroforézy. Do jednotlivých jamek bylo naneseno po 18 µl vzorku (výsledný produkt PCR a 6xLD) a 4 µl markeru. Separace probíhala při napětí 5 V/cm. Dokumentace gelu byla provedena pomocí Kodak Gel Logic Imagine systému a softwaru Carestream MI.

### 3.3.3 Transformace rostlinného materiálu

Rostlinný materiál určený k transformaci byl odvozen výhradně z vrcholových segmentů rostlin udržovaných v podmínkách *in vitro*. Segmenty byly kultivovány (1 měsíc) po sedmi v plastových nádobách (Sigma – Aldrich Phytacon™ Vessel) s upraveným víčkem (ve víčku byl vytvořen kruhový otvor o průměru cca 1,5 cm, jímž byl provlečen molitan) na MS médiu, jehož složení bylo shodné se složením média pro udržovací kultury (viz kapitola 3.2.1).

#### 3.3.3.1 Ko-kultivace transformovaného *A. tumefaciens* s listy *S. t. tuberosum*

Do sterilních plastových Petriho misek (průměr 9 cm) bylo v laminárním boxu napipetováno 10 ml sterilního tekutého MS média s 2% sacharózou a 50 µl suspenze transformovaných buněk *A. tumefaciens*. Listy *S. tuberosum* (cv. Kamýk a Korela) byly naříznuty žiletkou přes střední žilku a byly umístěny na médium adaxiální stranou dolů. Poté byly kultivovány za stálé tmy 2 dny při teplotě 25°C.

#### 3.3.3.2 Navození tvorby kalusu

Následně byly listy *S. tuberosum* přeneseny na Petriho misky (průměr 6 cm) s cca 15 ml sterilního kalus indukujícího média (CIM, callus inducing medium) s přidanými selekčními antibiotiky (kanamycin – selekce transgenních buněk, claforan – pro odstranění *Agrobacteria* z kultury) (složení a příprava viz tabulka 8). Před přenesením listu z tekutého MS média se suspenzí *A. tumefaciens* na CIM, byla adaxiální strana listů osušena pomocí sterilního filtračního papíru. Struktura CIM byla rozrušena pinzetou, aby bylo možné listy umístit tak, aby se celou adaxiální plochou dotýkaly média. Kultivace probíhala za stejných podmínek jako v případě udržovacích kultur (viz kapitola 3.2.3), po dobu jednoho týdne.

Tabulka 8: Složení média indukujícího tvorbu kalusu (CIM) s přidanými selekčními antibiotiky; před přidáním agaru bylo upraveno pH na hodnotu 5,75 a médium bylo autoklávováno (obdobně jako při přípravě MS média viz kapitola 3.2.1); z důvodu citlivosti na vysokou teplotu byly růstové regulátory a antibiotika sterilizované filtrací (sterilní injekční filtr ROTH, porozita 0,45 µm) a přidány do média až po autoklávování, za sterilních podmínek v laminárním boxu.

<b>Látka</b>	<b>Množství látky na 1 l média</b>	<b>Koncentrace zásobního roztoku</b>	<b>Skladování zásobního roztoku</b>
Soli základního MS média (Murashige and Skoog Basal Medium, Sigma – Aldrich)	4,33 g	-	-
Glukóza (D-Glukosa bezvodá, Penta)	16 g	-	-
Myo-inositol (Sigma-Aldrich)	0,1 g	-	-
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2 mg	10 mg/ml	(4°C)
Agar (Sigma-Aldrich)	6 g	-	-
Vitamíny pro CIM	1 ml zásobního roztoku	(viz tabulka 9)	(-20°C)
NAA (1-naftyloctová kyselina, Sigma-Aldrich)	5 mg	2,5 mg/ml	(4°C)
BAP (6-Benzylaminopurin, Sigma-Aldrich)	0,1 mg	1 mg/ml	(4°C)
Claforan (Taximed)	300 mg	100 mg/ml	(-20°C)
Kanamycin (Sigma-Aldrich)	50 mg	50 mg/ml	(4°C)

Tabulka 9: Složení zásobního roztoku vitamínů pro CIM a SIM (shoot inducing médium, viz kapitola 3.3.3.3)

<b>Látka</b>	<b>Množství látky na 50 ml zásobního roztoku</b>
Thiamin-HCl	5 mg
Pyridoxin-HCl	25 mg
Kyselina nikotinová	25 mg
Glycin	100 mg

### 3.3.3.3 Navození tvorby prýtu

Po jednom týdnu kultivace na CIM byly listy porostlé kalusem v oblasti řezu, přeneseny na petriho misky (průměr 6 cm) s cca 15 ml média indukujícího tvorbu prýtu (SIM, shoot inducing medium) opět se selekčními antibiotiky (složení viz tabulka 10). Listy byly opakovaně přenášeny na médium o stejném složení, přičemž subkultivační interval byl první měsíc 1 týden, poté 2 týdny. První regenerované prýty se začaly objevovat po 1 měsíci kultivace na SIM. Regenerované prýty byly přenášeny na MS médium (složení viz kapitola 3.2.1) s přidáním selekčními antibiotiky (Claforan: 300 mg/l média; Kanamycin: 50 mg/l média). Kultivace listů na SIM byla ukončena po cca 3 měsících.

Tabulka 10: Složení média indukujícího tvorbu prýtu (SIM) s přidáním selekčními antibiotiky, postup přípravy byl obdobný jako u CIM (viz kapitola 3.3.3.2, tabulka 8)

Látka	Množství látky na 1 l média	Koncentrace zásobního roztoku	Skladování zásobního roztoku
Soli základního MS média (Murashige and Skoog Basal Medium, Sigma – Aldrich)	4,33 g	-	-
Glukóza (D-Glukosa bezvodá, Penta)	16 g	-	-
Myo-inositol (Sigma-Aldrich)	0,1 g	-	-
Agar (Sigma-Aldrich)	6 g	-	-
Vitamíny pro CIM a SIM	1 ml zásobního roztoku	(viz tabulka 9)	(-20°C)
NAA (1-naftyloctová kyselina, Sigma-Aldrich)	0,02 mg	2,5 mg/ml	(4°C)
GA <sub>3</sub> (Kyselina gibberelová; Sigma-Aldrich)	0,02 mg	1 mg/10 ml	(4°C)
Trans- Zeatin ribosid (Sigma-Aldrich)	2 mg	1 mg/ml	(-20°C)
Claforan (Taximed)	300 mg	100 mg/ml	(-20°C)
Kanamycin (Sigma-Aldrich)	50 mg	50 mg/ml	(4°C)

### 3.3.4 Ověření přítomnosti transgenů u rostlinného materiálu

Stejně jako u *A. tumefaciens*, byla i u regenerovaných rostlin přítomnost vnášeného transgenů ověřena metodou PCR.

#### 3.3.4.1 Příprava templátu pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR)

Jako výchozí rostlinný materiál byly použity listy rostlin regenerovaných z kalusu odvozeného z listů ko-kultivovaných s transformovaným *A. tumefaciens*, z nichž byla izolována DNA. Odebírání materiálu probíhalo za sterilních podmínek v laminárním boxu. Z každé rostliny byl odebrán 1 list do sterilní mikrozkušavky typu Eppendorf a byl rozmělněn pomocí sterilní homogenizační tyčinky. Dále bylo do těchto mikrozkušavek přidáno 400  $\mu$ l extrakčního pufru (200mM Tris-HCl pH 7,5; 250mM NaCl, 25mM EDTA; 0,5% SDS) a byly centrifugovány 5 min (Centrifuge 5424 R, Eppendorf, 4°C, 15871 x g). Poté byla odebrána vrchní fáze, bylo k ní přidáno 300  $\mu$ l chloroformu a tato směs byla umístěna na vortex (Scientific industries) na dobu 5 min. Poté byla směs centrifugována 5 min (4°C, 17115 x g). Následně bylo odebráno 300  $\mu$ l horní fáze a k tomuto extraktu bylo přidáno 300  $\mu$ l izopropanolu, poté byla směs promíchána pomocí pipety (opakovaným nasátím a vypuštěním) a umístěna na led, kde probíhalo srážení po dobu 10 min. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 5 min (4°C, 17115 x g). Následně byla odstraněna všechna tekutina a mikrozkušavky s peletem DNA byly otevřené umístěny na buničitou vatu, dokud nedošlo k vysušení vzorku. Poté byl sediment rozpuštěn ve 100  $\mu$ l 2mM Tris (Tris(hydroxymethyl) aminomethan), pH 8,5 a poklepáním na mikrozkušavky byla DNA uvolněna do roztoku. Takto připravený vzorek byl použit jako templát pro PCR.

#### 3.3.4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Tento krok probíhal stejně jako v případě ověření přítomnosti transgenů u *A. tumefaciens* (viz kapitola 3.3.2.2), rozdíl byl pouze v použitém templátu. Elektroforetická separace výsledných produktů PCR viz kapitola 3.3.2.3.

### 3.4 Stanovení míry exprese transgenů

Míra exprese transgenů byla stanovena metodou kvantitativní PCR (qPCR). Nejdříve bylo nutné izolovat z rostlinného materiálu RNA, poté byla tato RNA použita jako templát pro reverzní transkripci, při níž byla syntetizována cDNA, která byla následně použita jako templát pro qPCR. Aby nedošlo ke kontaminaci vzorků RNázami, byla veškerá práce prováděna v rukavicích a byla používána voda bez nukleáz určená pro PCR (ddH<sub>2</sub>O, dvakrát destilovaná demineralizovaná voda, s přídavkem DEPC (diethylpyrokarbonát) o výsledné koncentraci 0,1

%; po přidání DEPC byla voda inkubována za stálého míchání 15 až 20 hodin za pokojové teploty, poté vařena 4 hodiny, autoklávována a nakonec sterilizována filtrací za použití filtru s porozitou 0,2  $\mu\text{m}$ ).

### **3.4.1 Izolace RNA**

RNA byla izolována pouze z listů rostlin těch linií, u nichž byla potvrzena přítomnost transgenu metodou PCR (viz kapitola 3.3.4). Celková RNA byla z listů izolována metodou fenol-chloroformové extrakce. Listy (cca 200 mg) byly odebrány za sterilních podmínek. Ihned po odebrání byly v kapse vytvořené z alobalu ponořeny do nádoby s tekutým dusíkem. Poté byly přemístěny do předem vysterilizované a vychlazené třecí misky s tekutým dusíkem a homogenizovány pomocí tlučku. Dále byl přidán TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) (2 ml/ 200 mg vzorku) a vzorek byl dále důkladně homogenizován. Poté byl vzorek rozdělen a přenesen do dvou mikrozkušavek typu Eppendorf po 1 ml, ty byly umístěny na vortex (Vorte-Genie 2, Scientific industries) po dobu 5 min a poté centrifugovány po dobu 10 min (Centrifuge 5424 R, Eppendorf, 4°C, 13523 x g). Po centrifugaci byl odebrán supernatant do nových zkumavek typu Eppendorf, bylo přidáno 350  $\mu\text{l}$  chloroformu a tato směs byla promíchána na vortexu a následně byla ponechána 5 min při pokojové teplotě. Poté byly vzorky znova centrifugovány (4°C, 20 min, 17115 x g). Po centrifugaci došlo k rozdělení vzorku na 3 fáze. Do nové zkumavky typu Eppendorf byla odebrána horní vodná fáze s rozpuštěnou RNA, k níž byl přidán izopropanol (v poměru 1:1). Tato směs byla promíchána na vortexu. Poté byly vzorky umístěny do krabice s ledem, kde po dobu 20 min probíhalo srážení. Následně byly vzorky centrifugovány (4°C, 25 min, 17115 x g). Poté byl odstraněn supernatant, ve zkumavkách zůstal na dně pelet obsahující RNA, který byl následně 2x promyt vychlazeným 75% etanolem. Po druhém důkladném odsátí supernatantu byly zkumavky s peletem RNA ponechány na buničité vatě, dokud nedošlo k vysušení vzorku. Vysušené vzorky byly rozpuštěny ve 40  $\mu\text{l}$  vody pro PCR, dva shodné vzorky byly spojeny. Poté byla změřena koncentrace RNA a určena míra čistoty pomocí přístroje NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Vzorky byly následně uchovávány při -70°C.

### **3.4.2 Elektroforetická separace pro ověření kvality izolované RNA**

Integrita izolované RNA byla ověřena pomocí denaturační elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu v tris-acetátovém pufru (1x TAE). Agaróza byla rozpuštěna přivedením k varu v mikrovlnné troubě. Po vychladnutí na teplotu cca 60°C byl agarózový roztok nalit do elektroforetické vany a byl do ní umístěn hřeben pro vytvoření jamek. Po utužení byl gel dále

zalit 1xTAE pufrem. Byly připraveny vzorky (viz tabulka 11), které byly denaturovány v termobločku (65°C) po dobu 10 min a poté okamžitě přemístěny do krabice s ledem, po 10 min byly vzorky nanášeny na elektroforetický gel. Separace probíhala při napětí 6 V/cm. Dokumentace elektroforetického gelu viz kapitola 3.3.2.3.

Tabulka 11: Složení vzorků pro ověření kvality izolované RNA pomocí elektroforetické separace

Látka	Množství látky v 1 reakční směsi [μl]
RNA	Objem odpovídající 5 μg
Formamid	Alespoň 50 % výsledného objemu
Ethidium bromid (5 mg/ml)	1 μl
DNA Gel Loading Dye (6X, Thermo Fisher Scientific)	3 μl

### 3.4.3 Syntéza cDNA metodou reverzní transkripce

Ze vzorků, které vykazovaly dostatečnou čistotu a integritu izolované RNA, byly připraveny reakční směsi (viz tabulka 12), které byly následně krátce centrifugovány (Centrifuge 5424 R, Eppendorf, 4°C, short) a poté denaturovány v termobločku (70°C) po dobu 5 min. Vzorky byly následně umístěny do krabice s ledem, byly k nim přidány další složky (viz tabulka 13) a poté byly vzorky umístěny do PCR cycleru, kde proběhla syntéza cDNA (Eppendorf 5331 MasterCycler Gradient Thermal Cycler; program viz tabulka 14).

Tabulka 12: Složení reakčních směsí pro reverzní transkripci připravených k denuraci v termobločku (RT: vzorek se směsí náhodných hexamerů - random primer (N)<sub>6</sub>, RT-: negativní kontrola bez reverzní transkriptázy; RT bez RP: vzorek bez random primerů)

	RT	RT-	RT bez RP
RNA (8 μg) + voda pro PCR [μl]	16,6	16,6	17
Oligo (dT) 1 μg/μl [μl]	1	1	1
Random primer (N) <sub>6</sub> 0,3 μg/μl [μl]	0,4	0,4	-

Tabulka 13: Složky reakční směsi pro reverzní transkripci přidané po denaturaci

	RT	RT-	RT bez RP
Voda pro PCR [ $\mu$ l]	7	10	7
5x reakční pufr Thermo Scientific™ [ $\mu$ l]	8	8	8
dNTP (10mM) [ $\mu$ l]	4	4	4
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ L) Thermo Scientific™ [ $\mu$ l]	1	-	1
RevertAid-H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ L) Thermo Scientific™ [ $\mu$ l]	2	-	2

Tabulka 14: Program PCR pro reverzní transkripci

25°C	HOLD
25°C	10 min
37°C	5 min
42°C	75 min
70°C	10 min
4°C	HOLD

#### 3.4.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

Metoda qPCR je založena na klasické PCR, avšak s tím rozdílem, že je v každém cyklu zaznamenáváno množství DNA pomocí speciálního cycleru, který na rozdíl od klasického PCR cycleru umožňuje měřit současně v každém cyklu i hladinu fluorescence odpovídající amplifikovanému produktu. Používala jsem fluorescenční barvičku SYBR Green I, jenž



emituje zelené záření po navázání do malého žlábků dvouřetězcové DNA (volný substrát fluorescenční záření neemituje).

Důležitým parametrem qPCR je tzv.  $C_t$  hodnota (Threshold Cycle), která reflektuje cyklus, při kterém došlo k nárůstu fluorescence nad práh pozadí. Pro možnost vytvoření standardní křivky (vztah  $C_t$  hodnoty vzhledem ke koncentraci vstupní cDNA), z jejíhož sklonu je možné určit účinnost amplifikace (PCR efficiency) daného amplikonu (pomocí LightCycler® 480 Software, Version 1.5), byly připraveny ředící řady vybraných vzorků kontrolního materiálu (viz tabulka 15).

Tabulka 15: Ředící řady pro qPCR

<b>Ředění cDNA</b>		<b>Značení relativní koncentrace ve vyhodnocovacím programu</b>
5x	10 $\mu$ l cDNA do 40 $\mu$ l vody pro PCR	5E5
50x	10 $\mu$ l 5x cDNA do 90 $\mu$ l vody pro PCR	5E4
500x	10 $\mu$ l 50x cDNA do 90 $\mu$ l vody pro PCR	5E3
5000x	10 $\mu$ l 500x cDNA do 90 $\mu$ l vody pro PCR	5E2
50000x	10 $\mu$ l 5000x cDNA do 90 $\mu$ l vody pro PCR	5E1
500000x	10 $\mu$ l 50000x cDNA do 90 $\mu$ l vody pro PCR	5E0

Hodnota účinnosti PCR pro jednotlivé amplikony je dále využita při výpočtu relativní kvantifikace (opět pomocí LightCycler® 480 Software, Version 1.5), při níž je vypočtená koncentrace kopií cílového genu (Target Gene) vztažena k vypočtené koncentraci referenčního genu (Reference Gene). Jako referenční geny jsou využívány geny, jejichž exprese by měla být u všech testovaných vzorků shodná, nejčastěji se jedná o tzv. house-keeping geny. V tomto případě byl jako referenční gen pro lilek brambor použit *polyubiquitin* (UBI), který byl již

testován a vybrán jako vhodný (Stupecká DP, 2018). Za účelem stanovení míry exprese transgenů byla hodnota relativní kvantifikace cílového transkriptu porovnávána u odvozených transgenních rostlin s rostlinami divokého genotypu (wild type, wt).

Pro qPCR reakci byl použit kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) Do reakce byly dále přidány směs primerů, cDNA a voda pro PCR. Složení reakční směsi pro qPCR viz tabulka 16.

Tabulka 16: Složení reakční směsi pro qPCR

<b>látka</b>	<b>Množství látky v 1 reakční směsi [μl]</b>
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2x koncentrovaný) (Roche)	5
Voda pro PCR	1
Směs primerů forward + reverse (oba 2,5μM)*	2
cDNA	2

\*seznam primerů pro qPCR viz tabulka 17

Tabulka 17: Přehled primerů (v orientaci 5' - 3') použitých pro qPCR při ověření exprese vneseného transgenu a stanovení relativní míry exprese vybraných cílových transkriptů

	Sekvence primeru 5'-3'	GI (GenBank)
<b>Primery pro transkript <i>UBI</i></b>	Fwd: CTTCAAATTTCTCTTTCAAGATGCAG Rev: AGCCTTTGCTGATCCGGGG	102599865
<b>Primery pro transkript <i>BEL5</i></b>	Fwd 1: GCTAACAAGGAGCCAGGTGT Fwd 2: GCTAACAAGGAGCCAGGT CT	102577460
	Rev 1: ATGTTTCTCTTCATTTGGAGCACT Rev 2: ATGTTTCTCTTCATTTGGAGCCTC	102577460
<b>Primery pro transkript <i>PTB6</i></b>	Fwd: ATCATGCTCTTGTTTCAGAGGG	102603741
	Rev: TGGTCCGGTGTTAATATTTGGG	
<b>Primery pro transkript <i>BEL11</i></b>	Fwd: CGCGCTTGGCTTTTCGAGC	102577885
	Rev: TGGCTTCCATAGTCTAACTCTAG	
<b>Primery pro transkript <i>BEL29</i></b>	Fwd: CGCAGAGAGGCAAGAAATTCA	102577906
	Rev: CAGCTTGCTCCAACCAGTGTA	
<b>Primery pro transkript <i>POTH1</i></b>	Fwd: GGAAATTGTGGCGGAGGCA	102577616
	Rev: GTGCTCCAACCTTTTGGCAAT	
<b>Primery pro transkript <i>SP6A</i></b>	Fwd: CAACTTTTACACTCTGATTATGGTG	102577452
	Rev: GCTTGTATTTGTAGTTGCTGGGA	

Každý vzorek byl připraven jako triplikát (technická opakování), jak pro standardní křivky (koncentrace cDNA viz ředící řada tabulka 15), tak pro jednotlivé vzorky, které byly připraveny ve dvou koncentracích cDNA (zpravidla ředěná 5x a 500x).

Pro přípravu reakční směsi byly vytvořeny premixy, aby byly eliminovány chyby při pipetování. Nejdříve byl připraven premix z kitu LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) a vody pro PCR (pro odpovídající počet triplikátů + rezerva 0,5 reakce/triplikát), tento premix byl rozdělen na dílčí premixy, do kterých byly přidány odpovídající primery, tyto dílčí

premixy byly rozpipetovány po 28 µl do mikrozkušavek typu Eppendorf, jejichž počet odpovídal počtu triplikátů. Nakonec byla do každého aliquotu směsi přidáno 7 µl odpovídající cDNA. Vzorky byly po 10 µl napipetovány do destičky LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 (Roche). Destička byla zalepena fólií (LightCycler® 480 Sealing Foil Roche), která zamezuje odpařování vzorků během qPCR. Pro snížení rizika kontaminace vzorků probíhala celá příprava qPCR reakcí v laminárním PCR boxu za použití pipetovacích špiček s filtry. Při přípravě bylo dbáno na to, aby byl kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) vystaven světlu jen po dobu nezbytně nutnou k přípravě qPCR reakce, jelikož je nestabilní na světle.

Destička byla přenášena v polystyrenové krabici, aby bylo zabráněno přístupu světla. Následně byla destička centrifugována (3 min, 538 x g, Eppendorf Centrifuge 5430) a vložena do termocycleru LightCycler® 480 System (Roche) (program viz tabulka 18).

Tabulka 18: Program qPCR

<b>Počáteční denaturace</b>	5 min	95°C	
<b>Denaturace</b>	10 s	95°C	Cyklus opakující se 45x
<b>Nasedání primerů</b>	15 s	58°C	
<b>Extense</b>	10 s	72°C	
<b>Křivka tání</b>	10 s	97°C	
	1 min	65°C	
	Kontinuální	97°C	
<b>Chlazení</b>	1 min	40°C	

#### 3.4.4.1 Ověření identity získaných amplikonů při qPCR

V případě potřeby byla délka produktů qPCR ověřována pomocí elektroforetické separace. S ohledem na předpokládanou délku byl za tímto účelem připraven 3% agarózový gel v 1x TAE pufu (tris-acetátový pufr). EtBr (3 µl roztoku/100 ml gelu; koncentrace roztoku EtBr: 1 mg/ml) byl přidán přímo do lahve s horkým agarózovým roztokem (z důvodu rychlého tuhnutí 3% agarózového gelu) a tento roztok byl nalit do elektroforetické vany, do které byl dále umístěn hřeben pro vytvoření jamek. Po utužení byly nanášeny vzorky – výsledné produkty qPCR (technické replikáty byly spojeny), k nimž byly přidány 2 µl nanášecí barvičky (6xLD).

Separace probíhala při napětí 5 V/cm. Dokumentace elektroforetického gelu viz kapitola 3.3.2.3. V každém z pokusů byla též pro kontrolu provedena analýza křivek tání.

### **3.5 Stanovení míry exprese vybraných cílových transkriptů**

Míra exprese vybraných cílových transkriptů byla stanovena obdobným způsobem jako míra exprese transgenů (viz kapitola 3.4), rozdíl byl pouze v použitých primerech pro qPCR (viz tabulka 17).

### **3.6 Tuberizační experimenty *in vitro***

Pro tuberizační experimenty *in vitro* bylo použito MS médium (složení viz kapitola 3.2.1) obsahující 0,2 mg BAP/l média a 6 %, resp. 8 % sacharózy. Jako výchozí rostlinný materiál byly použity nodální segmenty ze střední části vybraných linií rostlin *S. tuberosum* cv. Kamýk (včetně kontroly – wt) kultivovaných *in vitro* (subkultivační interval 4 týdny). Segmenty byly kultivovány po třech v 50ml Erlenmeyerových baňkách s 20 ml média za stálé tmy při teplotě 22±2°C po dobu 5 týdnů.

### **3.7 Zpracování dat**

Grafy a tabulky byly vytvořeny v programu MS Excel, který byl též použit pro vypočítání průměrů, směrodatné odchylky a střední chyby průměru. Pro statistické vyhodnocení byl použit program NCSS 9.0. Pro porovnání výsledků experimentů, v nichž byly mutantní rostliny porovnávány s kontrolou (wt) a vzorky obsahovaly biologické i technické replikáty (expresní analýzy) byla použita analýza rozptylu: ANOVA – Repeated Measures Analysis of Variance (subject variable – biologický replikát, between factors – genotyp) – Dunnet's 2-sided test (vs. control). Pro vyhodnocení tuberizačních experimentů byla použita One-Way analysis of Variance Dunnet's 2-sided test (vs. control). Vzorky, které se statisticky významně lišily od kontrolní varianty, byly označeny následovně:  $\alpha = 0,05$  (označeny \*),  $\alpha = 0,1$  (označeny (\*\*)). V grafech znázorňujících výsledky experimentů, u nichž nebylo možné provést statistické hodnocení jsou chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku, pokud bylo provedeno statistické hodnocení, chybové úsečky v grafu znázorňují stření chybu průměru.

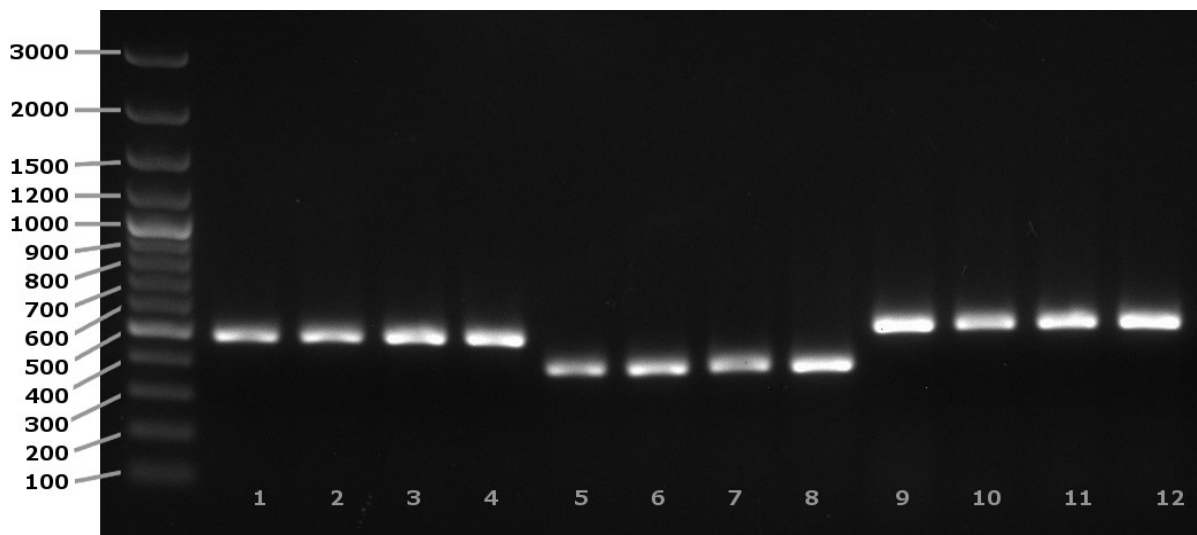
## 4 Výsledky

### 4.1 Odvození transgenních linií *Solanum t. tuberosum*

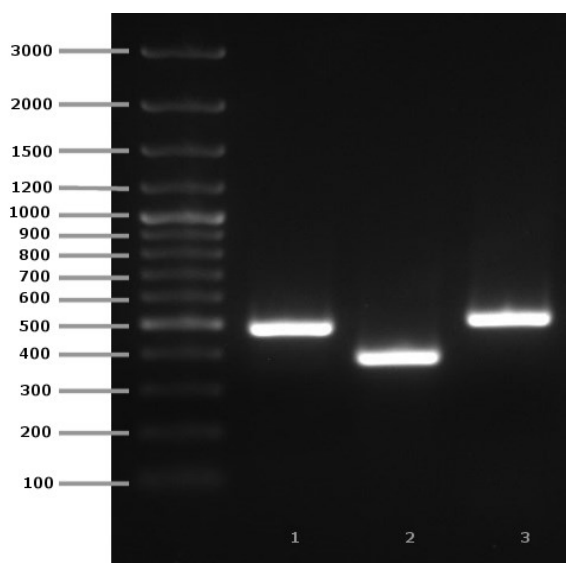
Pro transformaci byly použity kultivary *S. t. tuberosum* cv. Kamýk a cv. Korela, které byly transformovány vždy jedním z následujících konstruktů: 1) část kódující sekvence *StBEL11* v antisense orientaci pod kontrolou 35S CaMV promotoru (*BEL11 AS*), 2) část kódující sekvence *StBEL29* též v antisense orientaci pod kontrolou 35S CaMV promotoru (*BEL29 AS*) 3) kompletní geny *StBEL5+StPTB6* pod kontrolou nativních promotorů (*BEL5+PTB6*) (viz kapitola 3.3, tabulka 2). Tyto konstrukty byly získány ve formě plazmidů od dr. Davida Hannapela. Transformace rostlinného materiálu byla zprostředkována pomocí *Agrobacterium tumefaciens* a probíhala v následujících krocích: transformace *A. tumefaciens* elektroporací plazmidů, ko-kultivace transformovaného *A. tumefaciens* s listy *S. t. tuberosum*, navození tvorby transgenního kalusu, regenerace prýtu z transgenního kalusu (viz kapitola 3.3).

#### 4.1.1 Transformace *A. tumefaciens*

Transformaci *A. tumefaciens* (kmen C58C1) konstrukty BEL11 AS, BEL29 AS, resp. BEL5 + PTB6 jsem provedla dvakrát. Při první transformaci bylo vybráno po výsevu na selekční médium po 5 nezávislých koloniích pro jednotlivé konstrukty a byla u nich ověřena přítomnost transgenu. Jelikož přítomnost transgenu byla potvrzena u všech testovných linií, byla náhodně vybrána jedna linie pro daný konstrukt a použita k transformaci *S. t. tuberosum* cv. Kamýk a poté další linie od každého konstruktů k transformaci *S. t. tuberosum* cv. Korela. Při druhé transformaci bylo vybráno po čtyřech nezávislých liniích transformovaných konstrukty BEL5 + PTB6, BEL11 AS, resp. BEL29 AS, u nichž byla opět ověřena přítomnost transgenu (ilustrační fotografie elektroforetogramu PCR produktů úseku transgenu na obrázku 8) a bylo vybráno po jedné linii k transformaci *S. t. tuberosum* cv. Kamýk.



Obrázek 8: Elektroforetogram – ověření přítomnosti transgenů u *A. tumefaciens*: jako marker byl použit Thermo Scientific O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder; **vzorky 1, 2, 3, 4**: nezávislé linie transformované konstruktem BEL11 AS; **vzorky 5, 6, 7, 8**: nezávislé linie transformované konstruktem BEL29 AS; **vzorky 9, 10, 11, 12**: nezávislé linie transformované konstruktem BEL5 + PTB6; délky produktů PCR, při použití *A. tumefaciens* jako templátu odpovídají délkám produktů PCR, při použití samotného plazmidu jako templátu (viz obrázek 9)



Obrázek 9: Elektroforetogram: výsledné produkty PCR, při použití plazmidu jako templátu: jako marker byl použit Thermo Scientific O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder; vzorek 1: BEL11 AS, vzorek 2: BEL29 AS, vzorek 3: BEL5+PTB6

#### 4.1.2 Transformace rostlinného materiálu

Transformace byla provedena u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk (2x) a cv. Korela (1x) (transformace *S. t. tuberosum* cv. Kamýk byla opakována z důvodu ztrát způsobených kontaminacemi, u cv. Korela došlo též ke ztrátě zapříčiněné kontaminacemi, nicméně z časových důvodů nebylo možné transformaci zopakovat). Pro transformaci byly použity listy *S. t. tuberosum* cv. Kamýk resp. cv. Korela odebrané z rostlin kultivovaných *in vitro*. Byly vybrány největší listy (zhruba

30 listů pro každý konstrukt). Odebrané listy byly naříznuty přes střední žilku a byly kokultivovány s transgenními buňkami *A. tumefaciens* (viz kapitola 3.3.3.1). Poté byla navozena tvorba kalusu kultivací listů na médiu indukujícím tvorbu kalusu (CIM) po dobu 1 týdne (viz kapitola 3.3.2.2). Po 1 týdnu kultivace na CIM se na listech v oblasti řezu začal objevovat kalus. Následně byly listy přeneseny na médium indukující tvorbu prýtu (SIM) (viz kapitola 3.3.2.3). První a druhý týden kultivace na SIM docházelo k dalšímu nárůstu kalusu, třetí týden začaly kalusy zelenat, čtvrtý týden již došlo k regeneraci prvních prýtů (viz obrázek 10). Další regenerované rostliny se objevovaly na explantátech průběžně ještě cca další dva měsíce. Regenerované prýty byly postupně přenášeny na MS médium se selekčními antibiotiky (viz kapitola 3.3.2.3).

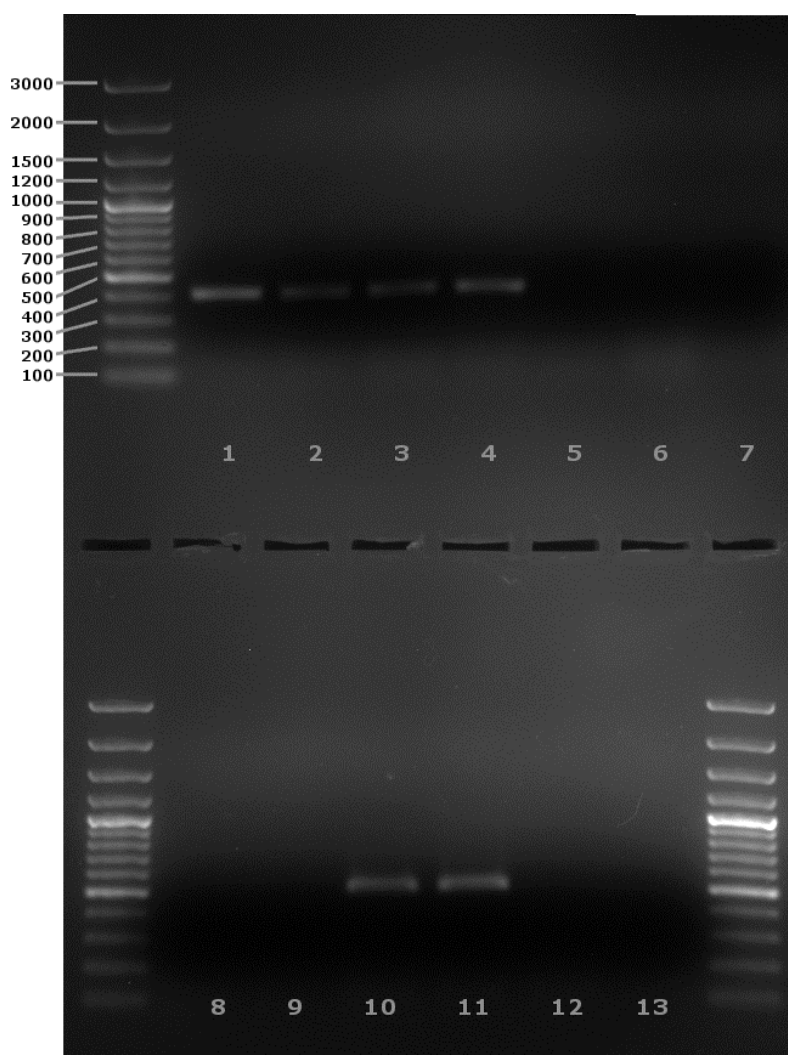


Obrázek 10: Fotodokumentace průběhu regenerace po transformaci *S. t. tuberosum* cv. Kamýk – transformováno konstruktem BEL29 AS, regenerace prýtu - kultivace na SIM (4. týden)

U regenerovaných rostlin byla postupně ověřována přítomnost transgenů (viz kapitola 3.3.3). Primery použité pro PCR reakci byly navrženy tak, aby byl detekován pouze vnesený transgen, nikoli nativní geny *StBEL5*, *StPTB6*, *StBEL11*, resp. *StBEL29*. Jelikož některé fáze transformace a regenerace byly prováděny pro všechny konstrukty současně, byly pro kontrolu, že je skutečně detekován pouze vnesený transgen, připraveny i reakce s primery pro detekci ostatních konstruktů. Výsledné produkty PCR byly elektroforeticky separovány (ilustrační fotografie elektroforetogramu viz obrázek 11). Linie, u nichž transgen nebyl detekován, byly vyřazeny z dalších experimentů. U kultivaru Kamýk bylo získáno celkem 50 linií BEL5+PTB6, z toho však 4 linie kontaminovaly, z nekontaminovaných linií byla u 13 ověřena přítomnost



transgenu, pouze 2 byly negativní a zbylé linie budou ještě genotypovány. Dále 36 linií BEL11 AS, z nichž bylo kontaminováno 5, u 8 nekontaminovaných linií byla potvrzena přítomnost transgenu, 6 linií bylo negativních, zbylé linie budou genotypovány. Linií nesoucích konstrukt StBEL29 AS bylo získáno 24, z nichž kontaminovalo 8, u 12 nekontaminovaných linií byla ověřena přítomnost transgenu, zbylé linie budou genotypovány. U kultivaru Korela jsem získala relativně méně linií, zejména z důvodu masivních kontaminací. U všech získaných linií jsem ověřila přítomnost transgenu, z toho 2 linie byly negativní. Přehled označení linií a ověření přítomnosti transgenu viz tabulky 19 (cv. Kamýk) a 20 (cv. Korela).



Obrázek 11: Elektroforetogram – ověření přítomnosti transgenu u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk (názvy linií odpovídají označení v tabulce 19); marker Thermo Scientific™ O'GeneRuler™ Ready-to-use 100bp Plus DNA Ladder; **vzorek 1**: B29-1; **vzorek 2**: B29-2; **vzorek 3**: B29-3; **vzorek 4**: B29-4; **vzorek 5**: negativní kontrola – B29-1 s primery pro detekci konstrukt BEL5 + PTB6; **vzorek 6**: negativní kontrola – B29-2 s primery pro detekci konstrukt BEL5 + PTB6; **vzorek 7**: negativní kontrola PCR– bez templátu; **vzorek 8**: B5-1 – transgen u této linie nebyl detekován – linie byla vyřazena; **vzorek 9**: B5-2 transgen u této linie nebyl detekován – linie byla vyřazena; **vzorek 10**: B5-3; **vzorek 11**: B5-4; **vzorek 12**: negativní kontrola – B5-1 s primery pro detekci konstrukt BEL29 AS; **vzorek 13**: B5-2 s primery pro detekci konstrukt BEL29 AS; délky produktů PCR, při použití DNA izolované z listů regenerovaných rostlin jako templátu odpovídají délkám produktů PCR, při použití samotného plazmidu jako templátu (viz obrázek 9)

Tabulka 19: Přehled získaných transgenních linií *S. t. tuberosum* cv. Kamýk; ✓ potvrzena přítomnost transgenu; x transgen nebyl detekován (tyto linie byly vyřazeny); - přítomnost transgenu zatím nebyla ověřována; linie, které zkontaminovaly jsou označeny červeně

cv. Kamýk					
Linie transformované konstruktem BEL5 + PTB6		Linie transformované konstruktem BEL11 AS		Linie transformované konstruktem BEL29 AS	
Název linie	Přítomnost transgenu	Název linie	Přítomnost transgenu	Název linie	Přítomnost transgenu
B5-1	X	B11-1	✓	B29-1	✓
B5-2	X	B11-2	✓	B29-2	✓
B5-3	✓	B11-3	✓	B29-3	✓
B5-4	✓	B11-4	✓	B29-4	✓
B5-5	✓	B11-5	✓	B29-5	✓
B5-6	✓	B11-6	✓	B29-6	✓
B5-7	✓	B11-7	✓	B29-7	✓
B5-8	✓	B11-8	X	B29-8	✓
B5-9	✓	B11-9	X	B29-9	✓
B5-10	✓	B11-10	✓	B29-10	-
B5-11	✓	B11-11	✓	B29-11	-
B5-12	-	B11-12	✓	B29-12	✓
B5-13	-	B11-13	✓	B29-13	✓
B5-14	✓	B11-14	X	B29-14	-
B5-15	✓	B11-15	X	B29-15	-
B5-16	-	B11-16	X	B29-16	-
B5-17	✓	B11-17	✓	B29-17	-
B5-18	✓	B11-18	X	B29-18	-
B5-19	✓	B11-19	✓	B29-19	✓
B5-20	✓	B11-20	-	B29-20	✓
B5-21	✓	B11-21	-	B29-21	-
B5-22	-	B11-22	-	B29-22	-
B5-23	-	B11-23	-	B29-23	-
B5-24	-	B11-24	-	B29-24	-
B5-25	-	B11-25	-		
B5-26	-	B11-26	-		
B5-27	-	B11-27	-		
B5-28	-	B11-28	-		
B5-29	-	B11-29	-		
B5-30	-	B11-30	-		
B5-31	-	B11-31	-		
B5-32	-	B11-32	-		
B5-33	-	B11-33	-		
B5-34	-	B11-34	-		
B5-35	-	B11-35	-		
B5-36	-	B11-36	-		
B5-37	-				
B5-38	-				
B5-39	-				
B5-40	-				
B5-41	-				
B5-42	-				
B5-43	-				
B5-44	-				
B5-45	-				
B5-46	-				
B5-47	-				
B5-48	-				
B5-49	-				
B5-50	-				

Tabulka 20: Přehled získaných transgenních linií *S. t. tuberosum* cv. Korela: ✓ potvrzena přítomnost transgenu; x transgen nebyl detekován (tyto linie byly vyřazeny; linie, které zkontaminovaly jsou označeny červeně)

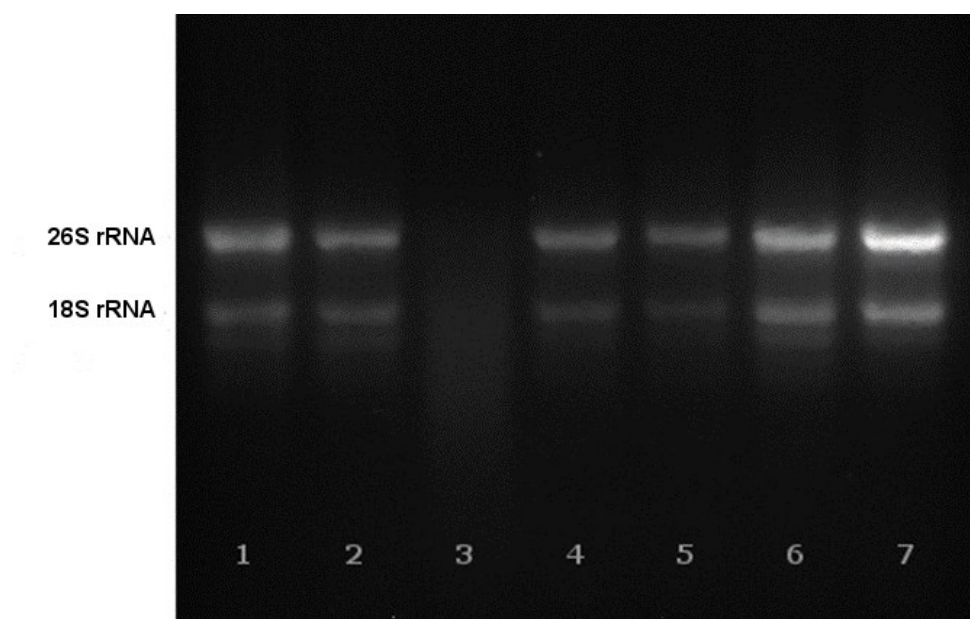
cv. Korela					
Linie transformované konstruktem BEL5 + PTB6		Linie transformované konstruktem BEL11 AS		Linie transformované konstruktem BEL29 AS	
Název linie	Přítomnost transgenu	Název linie	Přítomnost transgenu	Název linie	Přítomnost transgenu
-		B11-1	✓	B29-1	✓
				B29-2	✓
				B29-3	✓
				B29-4	X
				B29-5	✓
				B29-6	✓
				B29-7	✓
				B29-8	X

## 4.2 Ověření exprese transgenu

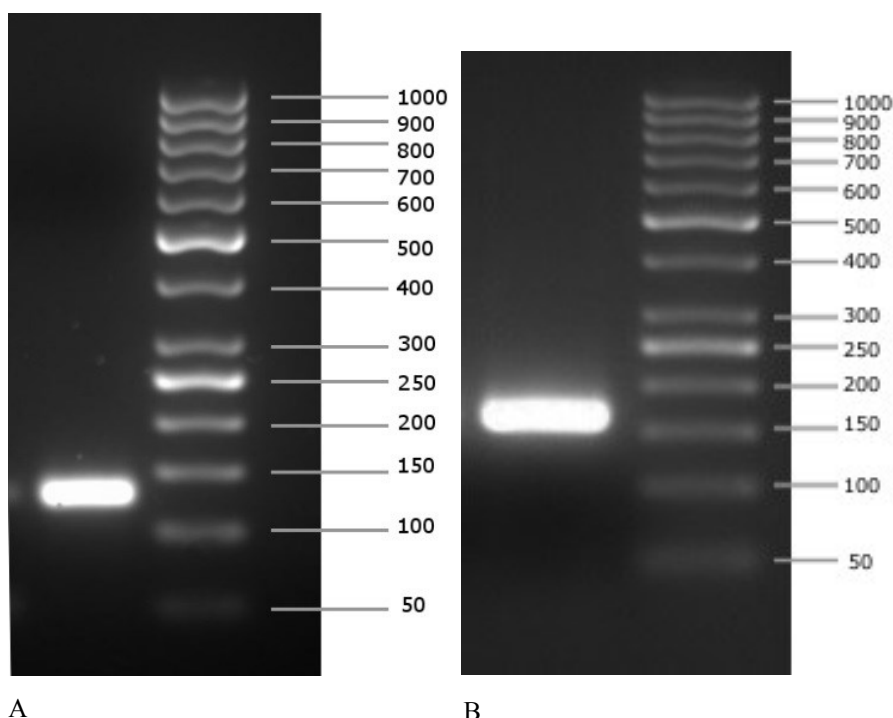
S ohledem na menší úspěšnost transformace cv. Korela (většina materiálu zkontaminovala již během kultivace na CIM) byly další experimenty prováděny jen s cv. Kamýk. Z listů regenerovaných transgenních rostlin, u nichž byla potvrzena přítomnost transgenu, byla izolována RNA, jejíž kvalita byla ověřena pomocí denaturační elektroforetické separace (ukázka elektroforetogramu viz obrázek 12). Intaktní RNA byla použita jako templát pro syntézu cDNA (viz kapitola 3.4.3), která byla následně použita jako templát pro qPCR (viz kapitola 3.4.4). Při prvních experimentech byly jako templát pro reverzní transkripci použity jak směsi s random primery (RT), tak bez nich (RT bez RP). Ukázalo se, že při vyhodnocení qPCR se Ct hodnota pro cDNA nasynthetizovanou oběma uvedenými způsoby neliší, tudíž pro další experimenty byly používány vzorky pouze s oligodT primery, které snižují riziko záchytu částečně degradovaných transkriptů, které mohou vznikat právě prostřednictvím transgenní antisense RNA.

Primery pro qPCR byly navrženy tak, aby byl detekován přechod dvou exonů, což zajistí odlišení velikostí produktů cDNA a genomové DNA (přehled primerů pro qPCR viz kapitola 3.4.4, tabulka 17). Pro kontrolu nulového záchytu genomové DNA byly u vybraných vzorků připraveny reakce, kde templát pocházel z reakcí, kdy do reverzní transkripce nebyl přidán enzym (RT-). Ve všech případech nebyl u těchto vzorků po qPCR detekován produkt. V případě použití primerů pro stanovení hladiny *StPTB6* a *StBEL5* transkriptů (kombinace primerů Fwd 2 a Rev 2) byla ověřena délka výsledných produktů qPCR pomocí elektroforetické separace (viz kapitola 3.4.4.1) (obrázek 13). Velikost produktů ostatních reakcí již byla testována a potvrzena Lenkou Stupeckou (Stupecká DP, 2018). Pro stanovení hladiny *StBEL5* transkriptu

byla nejdříve použita kombinace primerů Frw 1 a Rev 1, které byly testovány a použity Lenkou Stupeckou pro stanovení hladiny tohoto transkriptu u *S. t. tuberosum* cv. Lada a mutantní linie D69, nicméně u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk se nepodařilo transkript detekovat s použitím těchto primerů. Pro zjištění, zda nejsou primery degradovány či jinak znehodnoceny, byla provedena qPCR s těmito primery, přičemž byly použity ředící řady cDNA (viz kapitola 3.4.4) nasyntetizované podle RNA izolované z listu *S. t. tuberosum* cv. Lada, resp. cv. Kamýk. *StBEL5* transkript se podařilo detekovat pouze u *S. t. tuberosum* cv. Lada, u cv. Kamýk nikoli. Hladina transkriptu referenčního genu (*UBI*) byla u obou ředících řad cDNA (cv. Kamýk a cv. Lada) srovnatelná. Dále proto byly navrženy a testovány další primery pro stanovení hladiny *StBEL5* transkriptu u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk v kombinacích: Fwd 1 – Rev 2; Fwd 2 - Rev 1; Fwd 2 - Rev 2. *StBEL5* transkript se dařilo detekovat pouze v případě použití kombinace primerů Fwd 2 – Rev 2, které byly použity pro další experimenty.



Obrázek 12: Elektroforetogram - ověření kvality izolované RNA (*S. t. tuberosum* cv. Kamýk – označení linií viz tabulka 19, kultivace *in vitro*, LD, listí); **vzorek 1:** B29-4; **vzorek 2:** B29-2; **vzorek 3:** B5-3 – degradovaná RNA, tento vzorek byl vyřazen; **vzorek 4:** B5-4; **vzorek 5:** B29-1; **vzorek 6:** B29-3; **vzorek 7:** wt



A

B

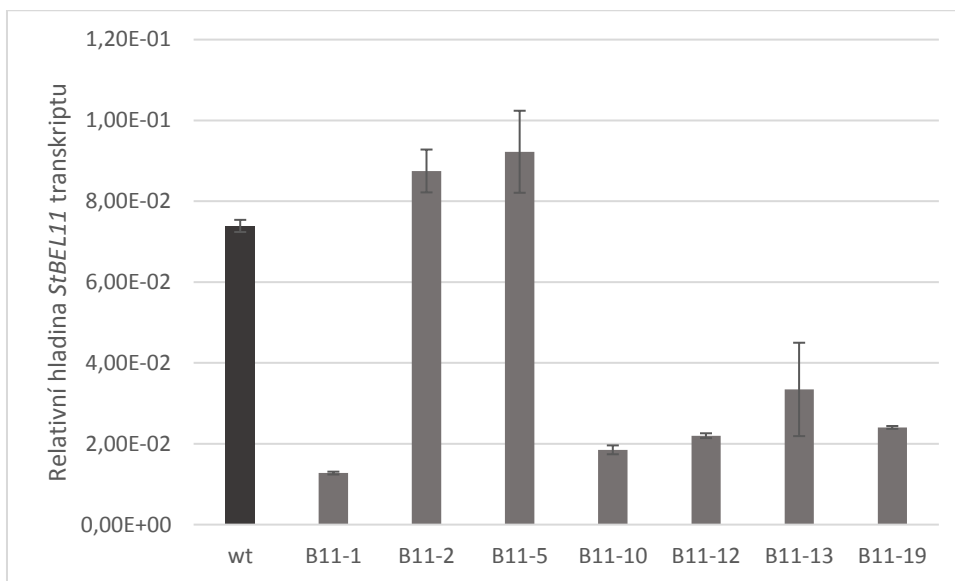
Obrázek 13: Ověření délky produktů qPCR pomocí elektroforetické separace v 3% agarózovém gelu; jako marker byl v obou případech použit O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); **A**: výsledný produkt qPCR s primery pro detekci *StPTB6* (*S. tuberosum* cv. Kamýk wt, kultivace in vitro, LD, list, ředění cDNA 5x), délka produktu odpovídá předpokládané délce 131 bp; **B**: výsledný produkt qPCR s primery pro detekci *StBEL5* (Fwd 2 a Rev 2) (*S. tuberosum* cv. Kamýk wt, kultivace in vitro, LD, list, ředění cDNA 5x), délka produktu odpovídá předpokládané délce 166 bp

Ověření míry exprese transgenů bylo prováděno tak, že metodou qPCR byla stanovena hladina transkriptů, které by měly být expresí transgenů ovlivněny. V případě exprese *BELL11 AS* a *BELL29 AS* by díky produkci antisense RNA mělo dojít k RNA interferenci potažmo k celkovému snížení *StBELL11*, resp. *StBELL29* transkriptu. U konstruktů *BEL5+PTB6* by naopak mělo expresí transgenů dojít k celkovému navýšení hladin obou transkriptů (endogenní + transgenní).

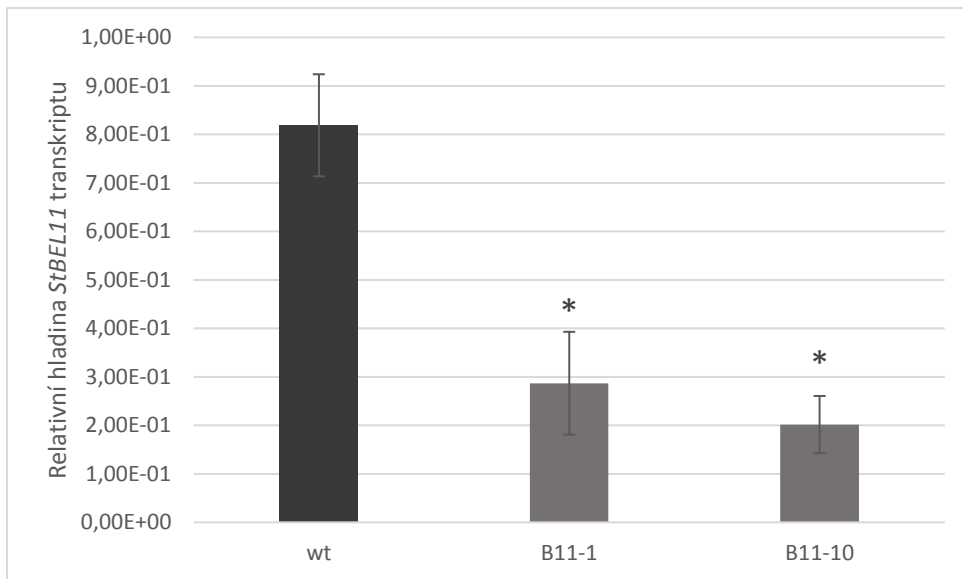
Relativní míra exprese transgenů byla nejdříve orientačně stanovena u 7 nezávislých linií *S. tuberosum* cv. Kamýk s vneseným konstruktem BEL11 AS (1 biologický vzorek ve dvou ředěních cDNA pro každou linii). V tomto předběžném experimentu byla naměřena snížená hladina *StBELL11* transkriptu oproti wt u 5 nezávislých linií (B11-1, B11-10, B11-12, B11-13 a B11-19), u zbylých dvou linií (B11-2 a B11-5) došlo naopak k mírnému navýšení hladiny tohoto transkriptu (graf 1). Pro další testování byly vybrány 2 nezávislé linie s nejnižší hladinou tohoto transkriptu při tomto předběžném experimentu (B11-1 a B11-10). Následné experimenty potvrdily snížení hladiny *StBELL11* transkriptu u těchto dvou linií. U linie B11-1 byla hladina *StBELL11* transkriptu téměř třikrát nižší oproti wt, u linie B11-10 čtyřikrát nižší (graf 2). Tento

rozdíl byl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti  $\alpha=0,05$ . Hladina exprese transgenu u těchto linií bude dále ověřena též ve stolonu, pro toto ověření je již odebrán biologický materiál.

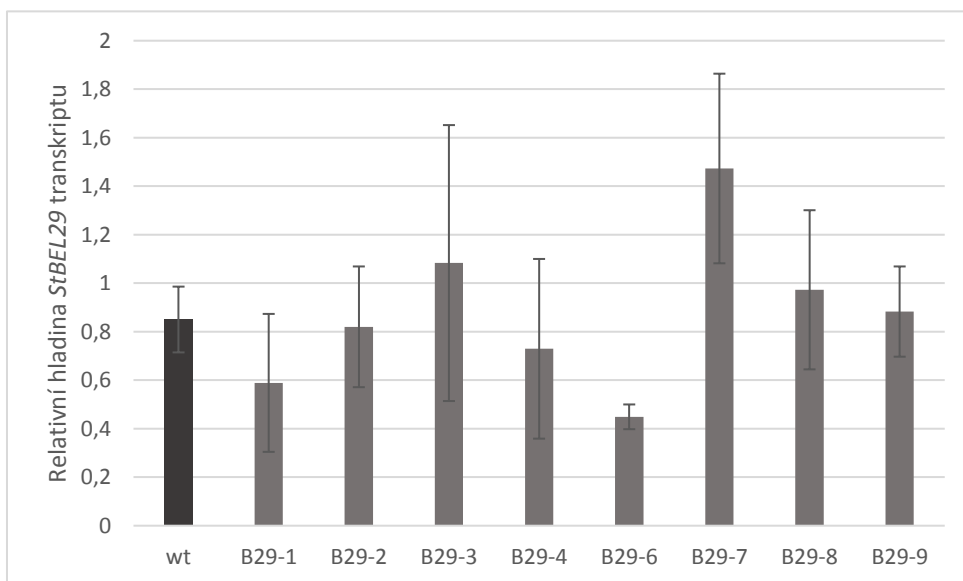
Dále byla relativní míra exprese transgenu předběžně stanovena u 8 nezávislých linií *S. t. tuberosum* cv. Kamýk s vneseným konstruktem BEL29 AS (1 biologický vzorek ve dvou ředěních cDNA pro každou linii). Podle tohoto orientačního experimentu se zdá, že hladina *StBEL29* transkriptu oproti wt je nižší pouze u jedné linie (B29-6; viz graf 3), nicméně je třeba provést další ověření (i u dalších odvozených linií viz kapitola 4.1.2). Předběžné stanovení relativní míry exprese transgenu bylo dále provedeno u 6 nezávislých linií *S. t. tuberosum* cv. Kamýk s vneseným konstruktem BEL5+PTB6 (1 biologický vzorek ve dvou ředěních cDNA pro každou transgenní linii 6 vzorků též ve dvou ředěních pro wt). Ačkoli bylo očekáváno mírné navýšení hladiny *StBEL5* a *StPTB6* transkriptů oproti wt, zdá se, že u všech dosud testovaných transgenních linií došlo ke snížení hladiny *StBEL5* (graf 4). Předběžné stanovení *StPTB6* transkriptu ukázalo možné mírné navýšení u dvou linií (B5-9 a B5-10, viz graf 5). Hladiny obou sledovaných transkriptů budou dále testovány (i u dalších odvozených linií viz kapitola 4.1.2).



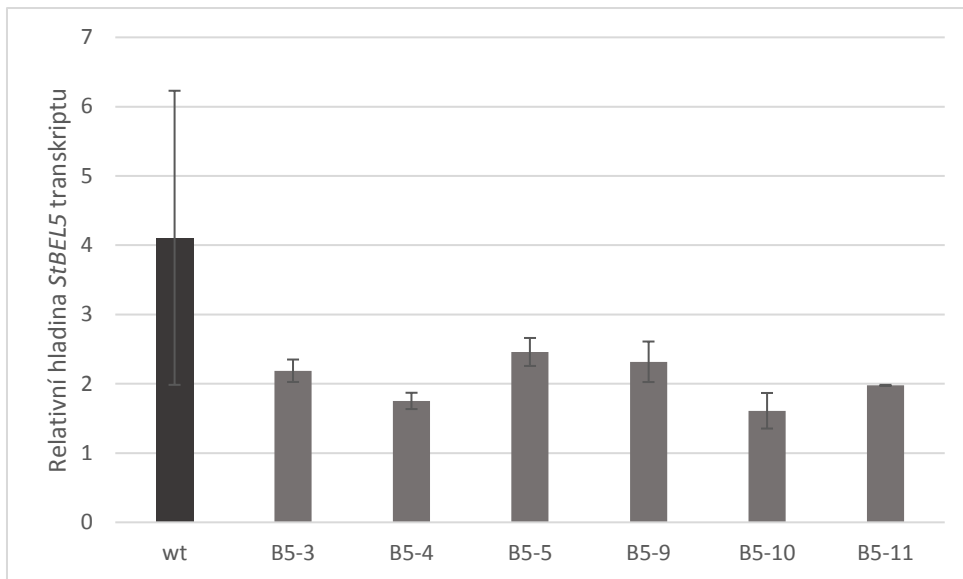
Graf 1: Stanovení relativní hladiny transkriptu *StBEL11* (normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *UBI*) u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk BEL11 AS mutantů v porovnání s WT; rostliny kultivované *in vitro*, LD, list; byl použit 1 biologický vzorek ve dvou ředěních cDNA (5x a 500x) pro každou linii, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku



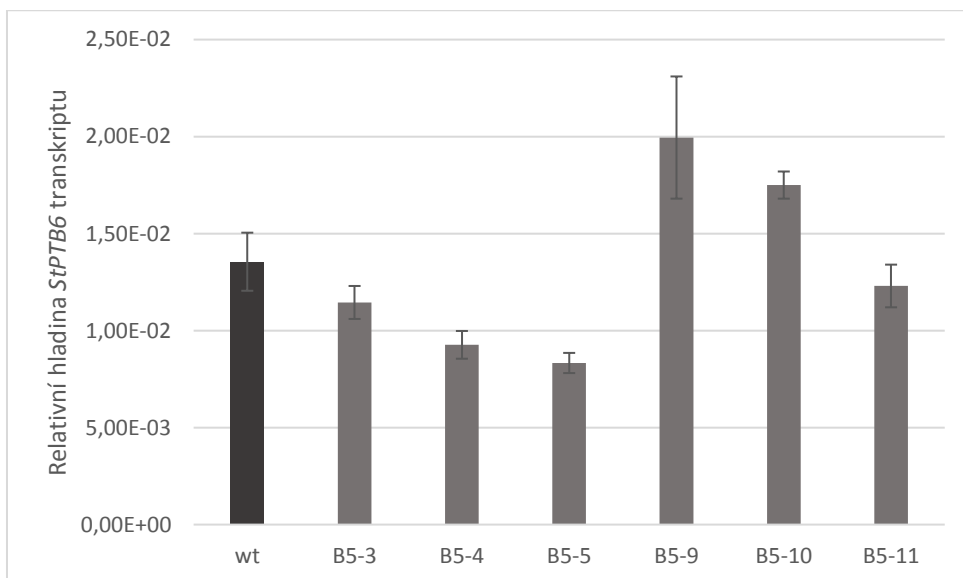
Graf 2: Stanovení relativní hladiny transkriptu *StBEL11* (normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *UBI*) u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk BEL11 AS linií B11-1 a B11-10 v porovnání s wt; rostliny kultivované *in vitro*, LD, list; n = 8-14; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru wt, \*značí statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha = 0,05$



Graf 3: Stanovení relativní hladiny transkriptu *StBEL29* (normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *UBI*) u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk BEL29 AS mutantů v porovnání s wt; rostliny kultivované *in vitro*, LD, list; byl použit 1 biologický vzorek ve dvou ředěních cDNA (5x a 500x) pro každou linii, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku



Graf 4: Stanovení relativní hladiny transkriptu *StBEL5* (normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *UBI*) u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk BEL5+PTB6 mutantů v porovnání s wt; rostliny kultivované *in vitro*, LD, list; byl použit 1 biologický vzorek ve dvou ředěních cDNA (5x a 500x) pro každou transgenní linii a 6 vzorků též ve dvou ředěních pro wt, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku



Graf 5: Stanovení relativní hladiny transkriptu *StPTB6* (normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *UBI*) u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk BEL5+PTB6 mutantů v porovnání s wt; rostliny kultivované *in vitro*, LD, list; byl použit 1 biologický vzorek ve dvou ředěních cDNA (5x a 500x) pro každou linii, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku



### 4.3 Charakterizace vybraných transgenních linií

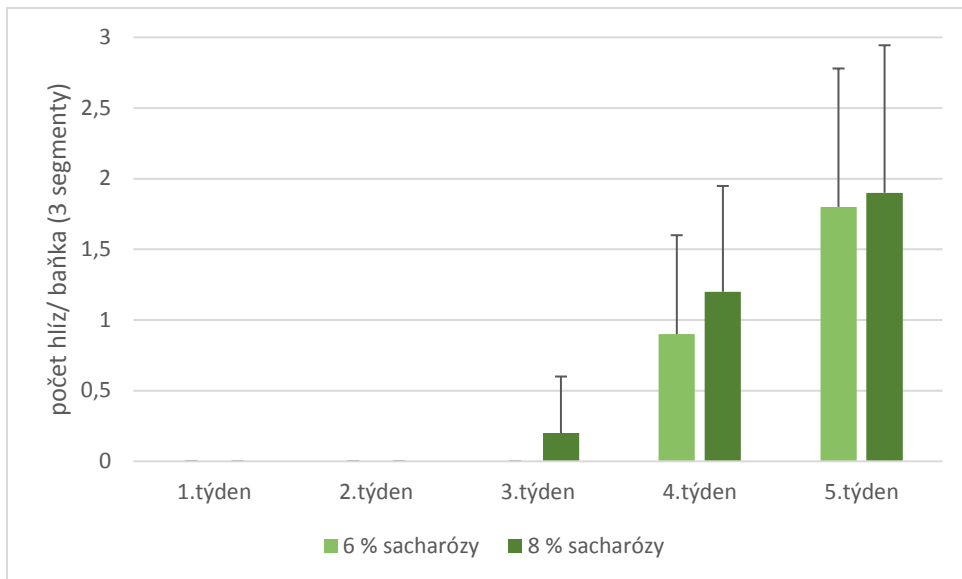
Transgenní linie *S. t. tuberosum* cv. Kamýk B11-1 a B11-10 nesoucí konstrukt BEL11 AS, u nichž bylo ověřeno snížení hladin *StBEL11* trnaskriptu, byly použity pro další experimenty. U těchto mutantních rostlin nebyly při udržovací kultivaci v podmínkách *in vitro* patrné žádné významnější odchylky ve fenotypu oproti wt (viz obrázek 14). Charakterizace byla zaměřena na stanovení tuberizačního potenciálu *in vitro*. Byly provedeny tuberizační experimenty (kapitola 4.3.1) a byla stanovena exprese vybraných cílových transkriptů, u nichž bylo v publikované literatuře prokázáno, že jejich hladina ovlivňuje tuberizaci u *S. tuberosum* (viz kapitola 4.3.2).



Obrázek 14: Vzhled rostlin *S. t. tuberosum* cv. Kamýk, rostliny v udržovací kultuře *in vitro* (4 týdny), LD: wt (vlevo), B11-1 (uprostřed) a B11-10 (vpravo)

#### 4.3.1 Tuberizační experimenty *in vitro*

Byly provedeny tuberizační experimenty *in vitro* za standardních tuberizačních podmínek (viz kapitola 3.6). Nejdříve byl proveden experiment za účelem optimalizovat tuberizační podmínky *in vitro* pro *S. t. tuberosum* cv. Kamýk. Pro tento účel byly použity nodální segmenty výhradně ze střední části rostlin *S. t. tuberosum* cv. Kamýk (wt) starých 4 týdny. Odebrané nodální segmenty byly kultivovány po třech na médiu s 6 % resp. 8 % sacharózy. Kultivace probíhala po dobu 5 týdnů, počet mikrohlízek byl zaznamenáván každý týden. První mikrohlízky byly zaznamenány po 3 týdnech kultivace na médiu s 8 % sacharózy. Po 4 týdnech kultivace se mikrohlízky objevily i na médiu s 6 % sacharózy (graf 6). Ilustrační fotografie mikrohlízek po 5 týdnech kultivace viz obrázek 15.



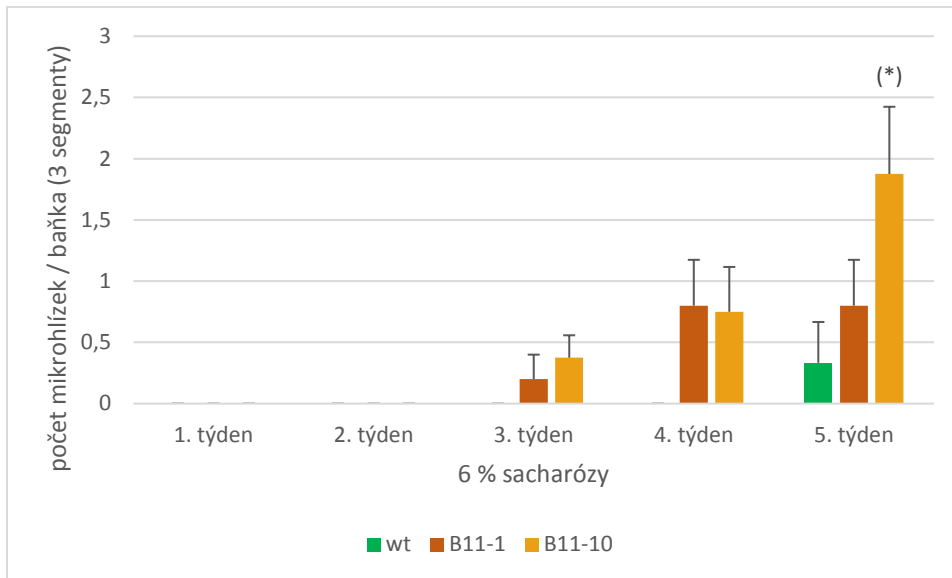
Graf 6: Tuberizační experiment *in vitro*, *S. t. tuberosum* cv. Kamýk (wt), kultivace za tmy, na MS médiu s 6 %, resp. 8 % sacharózy, n= 10, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku



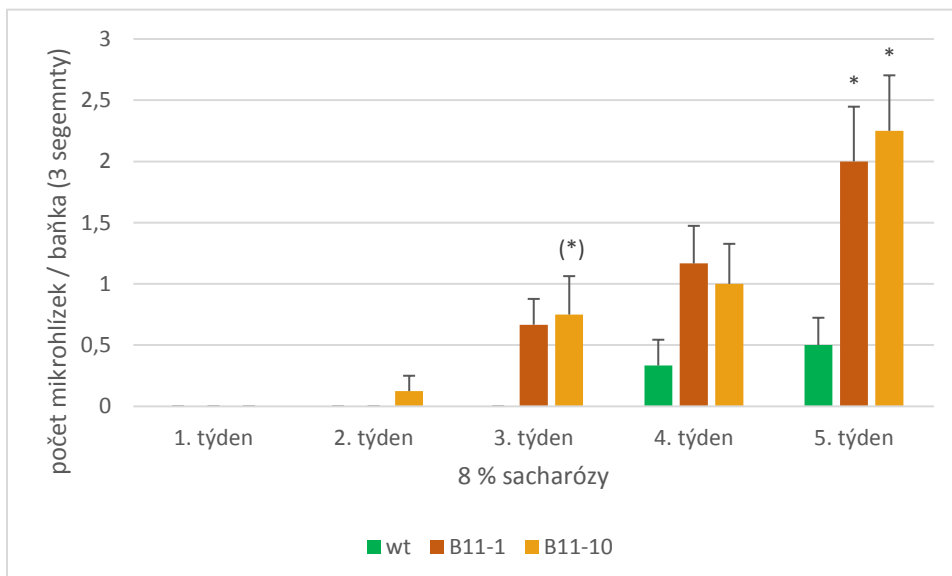
Obrázek 15: Vzhled mikrohlízek *S. t. tuberosum* cv. Kamýk (wt), kultivace *in vitro*, za tmy, na médiu s 8 % sacharózy, 5. týden

Obdobný experiment byl poté proveden pro stanovení tuberizačního potenciálu transgenních linií *S. t. tuberosum* cv. Kamýk B11-1 a B11-10. Cílem bylo zjistit, zda snížená exprese *StBEL11* podpoří tuberizaci u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk. Linie B11-10 začala tuberizovat již po dvou týdnech kultivace na médiu s 8 % sacharózy, po třech týdnech byly mikrohlízky přítomné u obou transgenních linií na médiu s 6 % i 8 % sacharózy. U wt tuberizace započala až po čtyřech týdnech kultivace na médiu s 8 % sacharózy a 5 týdnech kultivace na médiu s 6% sacharózy (grafy 7 a 8). U obou transgenních linií tedy tuberizace započala dříve než u wt,

nicméně tuberizace wt v tomto druhém experimentu byla opožděná oproti prvnímu provedenému experimentu (graf 6). Přestože byl nástup tuberizace u tohoto experimentu pravděpodobně pomalejší, u transgenních linií započala tuberizace dříve i ve srovnání s wt z prvního experimentu.



Graf 7: Porovnání tuberizačního potenciálu *in vitro* *S. t. tuberosum* cv. Kamýk –B11-1 a B11-10 - transgenních linií BELL11 AS wt - kontrola,; kultivace za tmy, na MS médiu s 6 % sacharózy, n= 5-8, chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; (\*) značí statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha = 0,1$

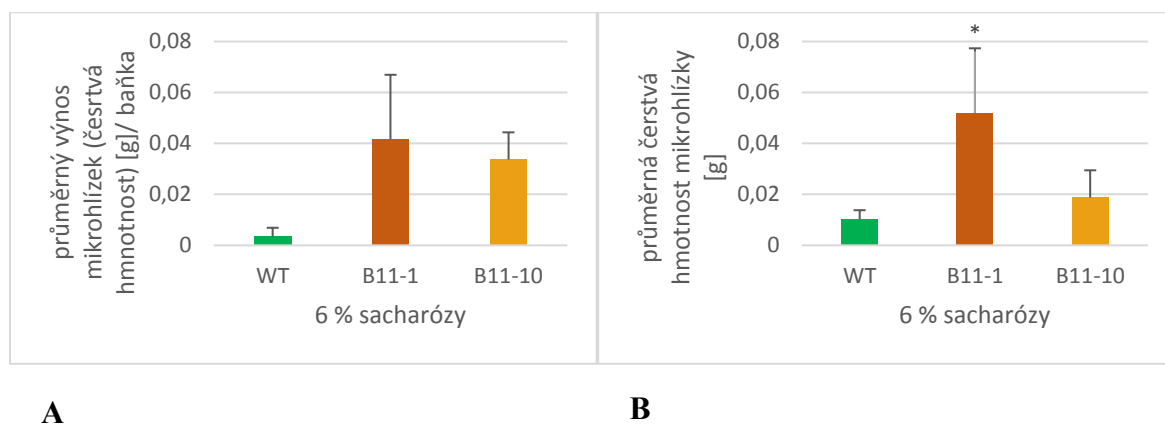


Graf 8: Porovnání tuberizačního potenciálu *in vitro* *S. t. tuberosum* cv. Kamýk, transgenní linie BELL11 AS: B11-1 a B11-10 v porovnání s kontrolou (wt), kultivace za tmy, na MS médiu s přidáním BAP a s 8 % sacharózy, n= 6-8, chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru;

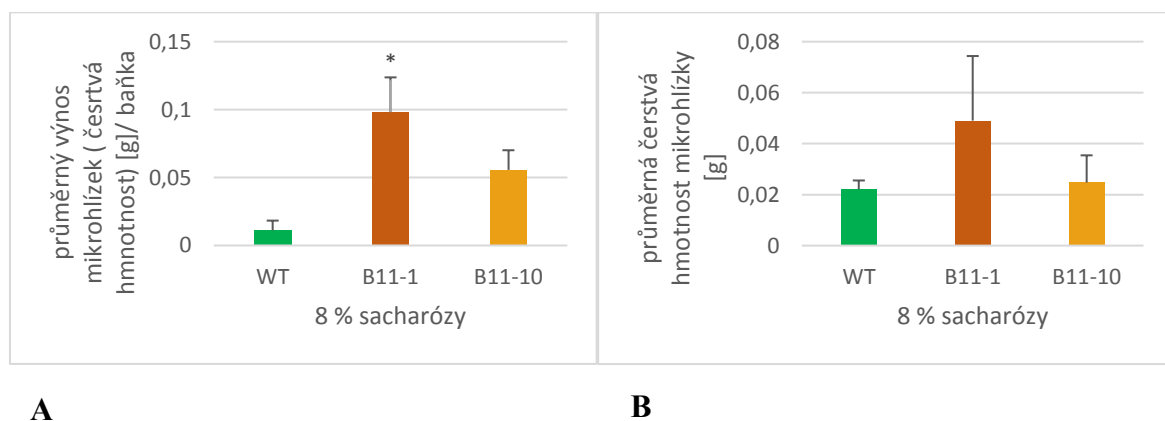
\* značí statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha = 0,05$ ; (\*) značí statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha = 0,1$

Mikrohlízky byly po 5 týdnech kultivace zváženy a byl vypočítán průměrný výnos (čerstvá hmotnost mikrohlízek /baňka) a průměrná hmotnost mikrohlízek. U obou transgenních linií byl zaznamenán trend v navýšení průměrného výnosu na baňku, navýšení bylo statisticky průkazné u linie B11-1 na médiu s 8 % sacharózy (grafy 9A a 10A). U linie B11-1 byla zaznamenána také vyšší průměrná hmotnost mikrohlízek, výsledky však byly statisticky průkazné pouze na médiu s 6 % sacharózy (grafy 9B a 10B).

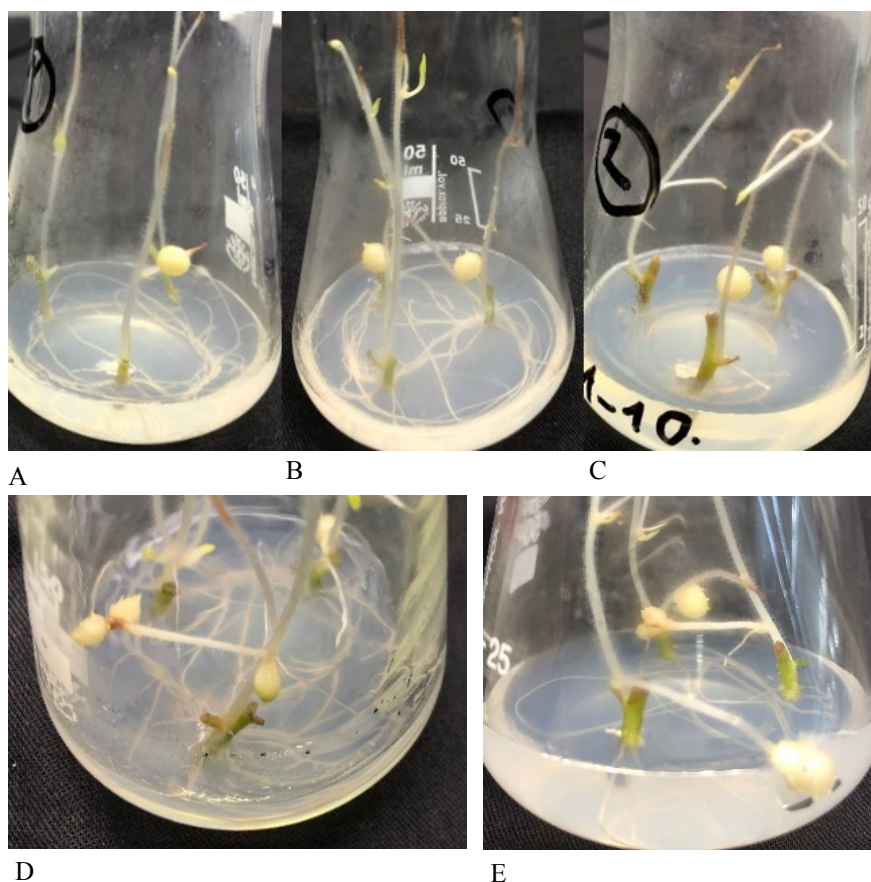
U transgenních linií se kromě obvyklého kulovitého tvaru vyskytovaly i dvojité mikrohlízky. Ilustrační fotografie mikrohlízek viz obrázek 16.



Graf 9: A: Průměrný výnos mikrohlízek na baňku; B: průměrná čerstvá hmotnost mikrohlízky; *S. t. tuberosum* cv. Kamýk – transgenní linie BELL11 AS: B11-1 a B11-10 v porovnání s kontrolou (wt); kultivace za tmy, na MS médiu s 6 % sacharózy, A: n= 5-8; B: n=2-15; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; \* značí statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha = 0,05$



Graf 10: A: Průměrný výnos mikrohlízek na baňku; B: průměrná čerstvá hmotnost mikrohlízky; *S. t. tuberosum* cv. Kamýk transgenní linie BELL11 AS: B11-1 a B11-10 v porovnání s kontrolou (wt); kultivace za tmy, na MS médiu s 8 % sacharózy, A: n= 6-8; B: n= 3-18; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; \* značí statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha = 0,05$

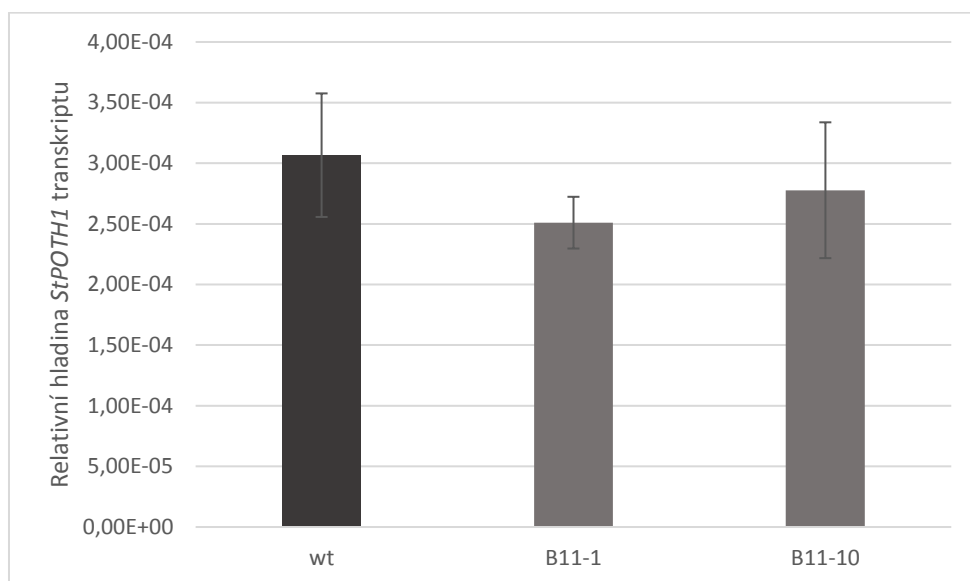


Obrázek 16: Fotodokumentace vzhledu založených mikrohlízek u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk, kultivace *in vitro*, kultivace za tmy, na MS médiu s 8 % sacharózy, 5. týden; horní řádek (A,B, C) – kulovité mikrohlízky, A: wt, B: B11-1, C: B11-10; spodní řádek (D,E) – dvojité mikrohlízky, D: B11-1, E: B11-10

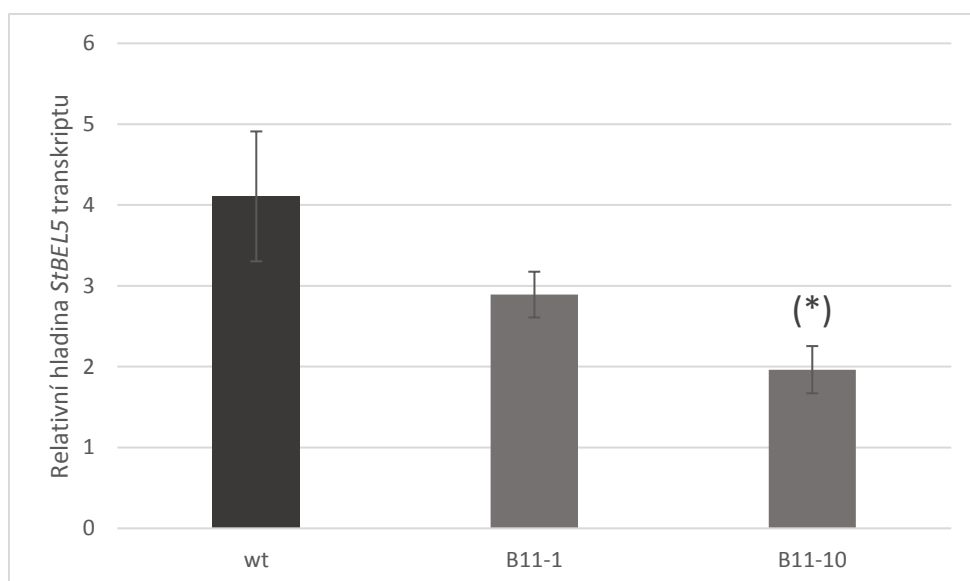
#### 4.3.2 Stanovení hladin vybraných cílových transkriptů

Charakterizace transgenních linií B11-1 a B11-10 (BELL11 AS) *S. t. tuberosum* cv. Kamýk dále zahrnovala stanovení hladin vybraných cílových transkriptů, u nichž bylo v publikovaných studiích prokázáno, že jejich hladina ovlivňuje tuberizaci *S. tuberosum*. Dosud byla stanovena hladina transkriptů v listech, a to u *StPOTH1*, interakčního partnera BELL transkripčních faktorů. Výsledky neukázaly statisticky průkazné rozdíly (graf 11). Dále bylo ověřováno, zda snížení hladiny *StBEL11* transkriptu u linií B11-1 a B11-10 ovlivní hladinu *StBEL5* transkriptu. U obou transgenních linií došlo překvapivě ke snížení hladiny tohoto transkriptu v listech, nicméně statisticky průkazné výsledky byly pouze u linie B11-10, a to pouze na hladině  $\alpha = 0,1$  (graf 12). Dále byla orientačně stanovena hladina transkriptu *StSP6A* v listech. Výsledky neukazují na významnější změnu v hladině *StSP6A* v listech u B11-1, resp. B11-10 oproti wt

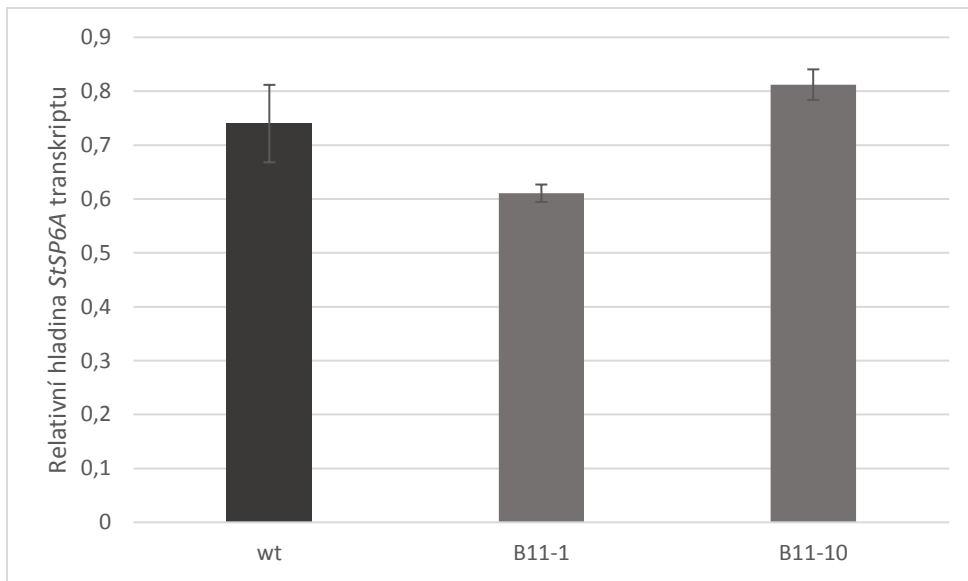
(graf 13), nicméně výsledky bude nutné ověřit z důvodu nedostatečného počtu opakování (graf 13). Pro indukci tuberizace jsou klíčové zejména regulace exprese cílových transkriptů ve stolonu, pro tyto analýzy byly již odebrány vzorky, které budou v nejbližší době zpracovávány.



Graf 11: Stanovení relativní hladiny transkriptu *StPOTH1* (normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *UBI*) u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk, B11-1 a B11-10 - transgenní linie BELL11 AS, wt - kontrola; rostliny kultivované *in vitro*, LD, list; n = 4-6; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; výsledky byly bez statisticky průkazných rozdílů



Graf 12: Stanovení relativní hladiny transkriptu *StBEL5* (normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *UBI*) u *S. tuberosum* cv. Kamýk, B11-1 a B11-10 - transgenní linie BELL11 AS, wt - kontrola; rostliny kultivované *in vitro*, LD, list; n = 8-12, (\*) značí statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha = 0,1$  chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru



Graf 13: Stanovení relativní hladiny transkriptu *StSP6A* (normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *UBI*) u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk, B11-1 a B11-10 - transgenní linie BELL11 AS, wt - kontrola; rostliny kultivované *in vitro*, LD, list; byl použit 1 biologický vzorek ve dvou ředěních cDNA (5 x a 500 x) pro každou linii, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku

## 5 Diskuze

Náplní mé diplomové práce bylo získat transgenní rostliny odrůd kulturního bramboru *S. tuberosum* se změněnou expresí genů pro BELL TF, s cílem zásahu do signalizace vedoucího k posílení tuberizace. Toto téma je součástí rozsáhlejšího projektu, který je koordinován Dr. D. Hannapelem z Iowa State University. Cílem tohoto projektu je získat výsledky týkající se tuberigenní signalizace u širokého spektra kultivarů bramboru, jelikož existuje značná variabilita v tom, do jaké míry různé faktory ovlivňují tuberizaci u jednotlivých kultivarů (Glendinning, 1975). Navíc většina publikovaných výsledků týkajících se molekulární podstaty regulace tuberizace byla získána s použitím divokého poddruhu bramboru – *S. tuberosum* subsp. *andigena*, u kulturního *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* existuje jen několik málo studií u kultivaru Desirée. V tomto mezinárodním projektu zastupujeme střední Evropu, byly proto vybrány české kultivary bramboru – cv. Kamýk a cv. Korela. Tyto kultivary máme na pracovišti dlouhodobě ve sbírce *in vitro* kultur a nadto jsou považovány za relativně dobře transformovatelné.

V mé diplomované práci byly pro transformaci rostlin použity tři různé konstrukty (poskytl Dr. D. Hannapel): 1) část kódujícího úseku *StBEL11* v antisense orientaci pod kontrolou konstitutivního promotoru *CaMV 35S* (BELL11 AS), 2) část kódujícího úseku *StBEL29* též v antisense orientaci pod kontrolou *CaMV 35S* promotoru (BELL29 AS) – cílem použití těchto dvou konstruktů bylo prostřednictvím RNA interference snížit hladiny *StBEL11*, resp. *StBEL29*, jež fungují jako mobilní signály reprimující tuberizaci, a tím podpořit signalizaci vedoucí k tvorbě hlíz (Ghate et al., 2017), 3) konstrukt zahrnující kompletní genovou sekvenci *StBEL5*, který kóduje mobilní mRNA působící indukčně na tvorbu hlíz (Chen et al., 2003), spolu s kompletní genovou sekvencí *StPTB6*, kódující RNA-vázající protein, jež váže *StBEL5* mRNA, a tím zvyšuje její stabilitu a zajišťuje ochranu před degradací během transportu na dlouhou vzdálenost floémem (Cho et al., 2015). Oba geny jsou v rámci jedné T-DNA, pod kontrolou nativních promotorů (BEL5+PTB6). Výběr konstruktů vycházel zejména ze zadání zmíněného projektu. Hlavní cíl vychází z myšlenky, že mírné vychýlení rovnováhy mezi indukčními a inhibičními BELL TF povede k optimální odpovědi z hlediska regulace nástupu tuberizace a současně výrazně redukuje možné negativní důsledky spojené s úplnou ztrátou či konstitutivní expresí TF. Konstrukt BEL5+PTB6 by měl jen mírně navýšit expresi obou zmíněných genů a zároveň díky použití nativních promotorů odpovídat přirozené situaci z hlediska lokalizace exprese. Bylo totiž zjištěno, že ačkoli je konstitutivní exprese *StBEL5* u *S.*



*tuberosum* subsp. *andigena* spjata s časným nástupem tuberizace a vyšším výnosem hlíz (Chen et al., 2003), dochází zároveň i k navýšení aktivity v pletivech, kde je exprese nežádoucí. Nicméně již navýšení exprese *StBEL5* o 40 % by mohlo mít pozitivní vliv na tuberizaci (Dr. D. Hannapel, osobní sdělení).

Vybraný protokol pro transformaci vycházel z protokolu používaného na pracovišti ve spolupráci s Dr. Miroslavem Srbou. Zvolený kmen *A. tumefaciens* C58C1 je vhodný pro transformaci rostlin z čeledi *Solanaceae* (např. DP M. Srby 2006), což se potvrdilo i v případě vybraných genotypů bramboru. Oba kultivary byly dobře transformovatelné, nebyl problém s regenerací, nicméně celková efektivita transformace byla značně redukována množstvím kontaminací, zejména v době, kdy se v kultivační místnosti vyskytly třásněnky. Kontaminace se objevily jak při kultivaci na SIM, tak u regenerovaných rostlin, v případě cv. Korela i při kultivaci na CIM. Kultivar Kamýk byl proto transformován dvakrát, transformace cv. Korela bude zopakována v nejbližší době. U kultivaru Korela přežilo jen několik málo regenerantů, ale u kultivaru Kamýk bylo dosud získáno dohromady cca 100 linií (pro všechny 3 genotypy), zhruba polovina pro linie nesoucí BEL5+PTB6. U poloviny z nich byla ověřována přítomnost transgenů s využitím metody PCR. Primery pro PCR byly navrženy tak, aby bylo možné detekovat pouze vnesený konstrukt, nikoli nativní *StBEL5*, *StPTB6*, *StBEL11*, resp. *StBEL29*. Většina regenerantů byla pozitivních, což ukazuje na vhodnost vybraného transformačního protokolu. Ostatní dosud netestované linie budou v blízké době genotypovány.

Prvních 7 linií BEL11 AS, u kterých byl výsledek genotypování pozitivní, byla nejdříve předběžně testována exprese transgenů v listech, tj. porovnání relativních hladin *StBELL11* transkriptu vůči hladinám referenčního transkriptu (polyubiquitin). Z těchto linií byly vybrány dvě linie s nejnižší expresí *StBELL11* (B11-1 a B11-10) pro testování s dostatečným počtem biologických replikátů. Tento experiment potvrdil snížení exprese *StBELL11* v listech u těchto dvou linií oproti wt. Relativní hladiny transkriptu u biologických vzorků z experimentů se lišily, což může být dáno stářím rostlin nebo i podmínkami kultivace, i malé odchylky mohou ovlivnit exprese genů pro proteiny s regulační funkcí, např. TF (Yanagisawa, 1998). Nicméně kultivace a odběr biologického materiálu byly provedeny vždy současně pro transgenní linie i wt, což snižuje riziko chybného hodnocení, snížení hladiny *StBELL11* u transgenních linií oproti wt bylo navíc vždy znatelné. Průměrná hladina *StBELL11* transkriptu byla u B11-1 snížena téměř třikrát, u B11-10 čtyřikrát, a výsledky byly statisticky průkazné. Nicméně je třeba ověřit expresi také ve stolonu, pro toto ověření je již odebrán biologický materiál. Ghate et al., 2017 totiž při selekci linií *CaMV 35S: StBELL11 AS (S. tuberosum subsp. andigena)* se stabilní expresí transgenů,

zjistili, že u některých linií byla snížena hladina *StBEL11* transkriptu v listech oproti wt, avšak ne ve stolonu a naopak u některých linií došlo ke snížení hladiny tohoto transkriptu pouze ve stolonu, nikoli v listech.

U transgenních linií kultivaru Kamýk nesoucích BEL29 AS (8 linií), resp. BEL5+PTB6 (6 linií) bylo provedeno předběžné stanovení exprese *StBEL29*, resp. *StBEL5* a *StPTB6* v listu, zatím však nebyly nalezeny linie s očekávanou změnou exprese. Zajímavé bylo, že u linií s BEL5+PTB6 hladina *StBEL5* a *StPTB6* transkriptů nebyla ovlivněna shodně (oba transkripty navýšeny či sníženy). Pro ověření tohoto pozorování však bude potřeba experiment zopakovat s dostatečným množstvím vzorků. Dále do analýz budou zařazeny i další linie, které budou genotypováním vyhodnoceny jako transgen-pozitivní, dokud nebudou nalezeny linie, u nichž je transgen stabilně exprimován.

Pro ověřování exprese transgenu i další expresní analýzy provedené s využitím metody qPCR byl jako referenční gen použit polyubikvitin (UBI), který byl testován Lenkou Stupeckou a vybrán jako vhodný referenční gen pro stanovení hladiny cílových transkriptů v listech *S. tuberosum*. Jako templát pro qPCR byla pro všechny expresní analýzy použita cDNA ve dvou koncentracích (5x a 500x ředěná), ve 3 technických opakováních, což zvyšuje spolehlivost měření. Většina použitých sad primerů byla testována a použita pro stanovení exprese cílových transkriptů u *S. t. tuberosum* cv. Lada a mutantní linie D69 Lenkou Stupeckou (kontrola pomocí křivek tání), s výjimkou primerů pro detekci transkriptu *StPTB6* a primerů Fwd 2 a Rev 2 pro detekci *StBEL5* transkriptu – u obou byla provedena kontrola křivek tání a zkontrolována délka výsledných produktů qPCR pomocí elektroforetické separace. Primery Fwd 2 a Rev 2 pro detekci *StBEL5* byly použity poté, co pomocí primerů Fwd 1 a Rev 1 pro *StBEL5*, které Lenka Stupecká používala, nebylo možné detekovat *StBEL5* transkript u *S. tuberosum* cv. Kamýk. Důvodem může být vyšší hladina *StBEL5* transkriptu u cv. Lada, oproti cv. Kamýk. Dostupné sekvence pro *StBEL5* v databázích se mírně liší, což může vést ke snížení efektivity nasedání primerů. Primery Fwd 2 a Rev 2 byly proto navrženy tak, aby se úsek amplifikovaný s použitím těchto primerů nacházel v oblasti se 100% shodou mezi dostupnými sekvencemi.

U linií B11- 1 a B11-10, u nichž byla ověřena exprese transgenu v listech, byla v listech stanovena hladina vybraných cílových transkriptů. Byla stanovena hladina transkriptu interakčního partnera BELL TF, StPOTH1, dále hladina *StBEL5* transkriptu, jelikož byla prokázána interakce mezi jednotlivými BELL TF a hladina transkriptu *StSP6A*, jedné z klíčových složek tuberigenního signálu, jehož exprese je v listech aktivována heterodimerem StBEL5-StPOTH1 (Chen et al., 2003; Sharma et al., 2016; Ghate et al., 2017). Hladina

transkriptu *StPOTH1* se u B11-1 a B11-10 téměř nelišila od wt (výsledky byly bez statisticky průkazných rozdílů). Hladina *StBEL5* transkriptu však byla překvapivě nižší u mutantů, nicméně hladina tohoto transkriptu u wt byla poměrně rozkolísaná, bude proto nutné provést ověření. U B11-1 došlo pouze k mírnému snížení, které nebylo statisticky průkazné, u linie B11-10 bylo snížení statisticky průkazné na hladině  $\alpha = 0,1$ . Jelikož snížení exprese *StBEL11* vede k podpoření tuberizace (Ghate et al., 2017), dalo by se očekávat spíše navýšení *StBEL5* transkriptu, jakožto signálu podporujícího tuberizaci (Chen et al., 2003). Avšak *StBEL5* transkript je mobilní, jeho hladina v jednotlivých pletivech je tedy ovlivněna i mírou transportu (Banerjee et al., 2006), bude tudíž nutné ověřit hladinu tohoto transkriptu i ve stolonu. V publikovaných studiích byla odhalena interakce mezi jednotlivými BELL TF, konkrétně u *GAS:StBEL5* transgenních linií *S. tuberosum* subsp. *andigena* s navýšenou expresí *StBEL5* došlo zároveň k navýšení hladin transkriptů *StBEL11* a *StBEL29* ve stolonu (Ghate et al., 2017). Z toho vyplývá, že *StBEL5* pozitivně reguluje expresi *StBEL11* a *StBEL29*, ačkoli jejich vliv na tuberizaci je antagonistický vůči *StBEL5*. Předpokládá se, že tato zkřížená regulace umožňuje lépe kontrolovat lokalizaci růstu vznikajících hlíz (Ghate et al., 2017). Informace o hladině *StBEL11* a *StBEL29* v listech u *GAS:StBEL5* mutantů ani hladině *StBEL5* v listech u BEL11 antisense mutantů *S. tuberosum* zatím nebyly v literatuře publikovány. Ghate et al., 2017 stanovili hladinu *StBEL5* transkriptu pouze ve stolonech BEL11 antisense linií *S. tuberosum* subsp. *andigena*, kde se zdá, že hladina *StBEL11* výrazně neovlivňuje hladinu *StBEL5* transkriptu. Ghate et al., 2017 předpokládají, že antagonistická role *StBEL11* na tuberizaci vůči *StBEL5* je dána tím, že *StBEL11* reprimuje expresi genů, jejichž exprese je pozitivně regulována *BEL5*, mezi nimi mj. i *StSP6A*. Bylo zjištěno, že u *GAS:StBEL11* transgenních linií *S. tuberosum* subsp. *andigena* s navýšenou expresí *StBEL11*, které vykazovaly nižší výnosy hlíz, došlo zároveň ke snížení hladiny *StSP6A* transkriptu ve stolonech (Ghate et al., 2017). Nicméně informace o hladině *StSP6A* u BEL11 antisense linií *S. tuberosum* nebyly zatím publikovány. V listech našich BEL11 AS linií nedošlo k téměř žádné změně v hladině *StSP6A* transkriptu u B11-1, resp. B11-10 linie oproti wt a to i přes to, že hladina *StBEL5* transkriptu byla u těchto linií nižší. Nicméně tento experiment nebyl proveden v dostatečném počtu opakování. Navíc hladina *StBEL5* transkriptu u wt byla poměrně rozkolísaná, tudíž je třeba tyto výsledky ještě ověřit. Expresе všech tří vybraných cílových transkriptů bude dále hodnocena ve stolonech, pro toto ověření je již odebrán biologický materiál.

Transgenní linie BELL11 AS B11-1 a B11-10 *S. tuberosum* cv. Kamýk se sníženou hladinou *StBEL11* transkriptu byly dále použity pro tuberizační experimenty *in vitro*. Pro optimalizaci indukčních podmínek byl nejdříve proveden experiment s použitím wt rostlin kultivaru Kamýk. V tomto experimentu byly první mikrohlízky zaznamenány po 3 týdnech kultivace na médiu s 8 % sacharózy. Po 4 týdnech kultivace se mikrohlízky objevily i na médiu s 6 % sacharózy. Následně byl proveden experiment pro stanovení tuberizačního potenciálu u wt i transgenních linií B11-1 a B11-10. Ačkoli byla snaha vytvořit stejné podmínky pro oba tuberizační experimenty- segmenty byly kultivovány za stálé tmy, na médiích se shodným složením, přeci jen byly podmínky prvního a druhého experimentu mírně odlišné. První experiment probíhal v kultivačním boxu umístěném na chodbě u laboratoře 105. Z důvodu dlouhodobé poruchy tohoto boxu musel být druhý experiment proveden v kultivační místnosti S06 s mírně odlišnou teplotou. Linie B11-10 začala tuberizovat již po dvou týdnech kultivace na médiu s 8 % sacharózy, po třech týdnech byly mikrohlízky přítomné u obou transgenních linií na médiu s 6 % i 8 % sacharózy. U wt tuberizace započala až po čtyřech týdnech kultivace na médiu s 8 % sacharózy a 5 týdnech kultivace na médiu s 6% sacharózy. U obou transgenních linií tedy tuberizace započala dříve než u wt, nicméně tuberizace u wt v tomto experimentu byla opožděná oproti optimalizačnímu experimentu pravděpodobně s ohledem na nucenou změnu kultivačních podmínek. I přesto že byl nástup tuberizace v druhém provedeném experimentu pomalejší, u transgenních linií započala tuberizace dříve i ve srovnání s wt z prvního experimentu, což dále potvrzuje rychlejší nástup tvorby hlíz u mutantních linií. Pro hodnocení počtu založených hlíz u jednotlivých variant byl použit počet hlíz na baňku. Frekvence zakládání hlíz je velmi kolísavá, a to i přesto, že nodální segmenty pro pokus byly odebírány vždy ze stejné části stejně starých rostlin a kultivovány společně. Díky velkému rozptylu dat (některé segmenty/baňky byly bez hlíz bez ohledu na variantu) nejsou rozdíly v počtu hlíz statisticky průkazně rozdílné, i když celkový počet hlíz na variantu a experiment je u transgenních linií u obou ošetření vyšší oproti wt (v 5. týdnu 2-4x). U obou transgenních linií byl v 5. týdnu zaznamenán také trend vyššího průměrného výnosu na baňku, ale rozdíly opět díky velkému rozptylu nejsou většinou statisticky průkazné. Zdá se tedy, že výsledky by mohly být ve shodě s publikovanými informacemi, že snížení hladiny *StBEL11* má pozitivní vliv na tuberizaci (Ghate et al., 2017). Pro potvrzení sledovaných trendů bude nutné tuberizační experimenty *in vitro* zopakovat s větším počtem opakování a za srovnatelných podmínek s předchozím experimentem. Zvažujeme i zařazení varianty s vyšší koncentrací sacharidů v médiu, což by mohlo celý proces urychlit a zvýšit počet a velikost hlíz, potenciálně i

prohloubit rozdíly mezi wt a transgenními liniemi. Menšího rozptylu dat pro jednotlivé varianty by mohlo být dosaženo také lepším způsobem kultivace za tmy. Dosud byly použity polystyrenové krabice vystlané alobalem, které však nemusí zajistit úplnou tmou, a tak mohly být jednotlivé baňky v různé míře případným pronikajícím světlem negativně ovlivněny.

Téma diplomové práce, jak již bylo zmíněno, vychází z mezinárodního projektu koordinovaného Dr. Hannapelem z USA, současně však souvisí s plněním projektu GAUK, který je zaměřen na roli BELL transkripčních faktorů při indukci tuberizace u bramboru. V současnosti probíhá a bude dále pokračovat ověření přítomnosti a exprese transgenů v listech a stolonech linií *S. tuberosum* cv. Kamýk pro všechny tři konstrukty. Linie s ověřenou expresí transgenů budou dále charakterizovány, zejména budou provedeny tuberizační experimenty *in vitro*, ale i *ex vitro* za kontrolovaných SD a LD podmínek. Dále je v plánu u transgenních linií stanovit hladinu vybraných cílových transkriptů v listech a ve stolonech. Kromě tří již testovaných by měly být zařazeny i další, např. *StSUT1*, *StGA2ox*, *StLOG1-3* geny. Tyto geny obsahují ve své upstream sekvenci TTGAC motiv, který je cílem StBEL5-StPOTH1 (Sharma et al., 2016).

Paralelně s tím bude provedena druhá transformace *S. tuberosum* cv. Korela za použití všech tří konstruktů. U dosud získaných i nově odvozených linií bude ověřena přítomnost a exprese transgenů. Linie *S. tuberosum* cv. Korela s ověřenou expresí transgenů budou charakterizovány obdobně jako transgenní linie *S. tuberosum* cv. Kamýk.

Výše uvedené výsledky a plán navazujících experimentů by měl vyústit ve vytipování kombinace znaků, které mají obecný rozsah mezi kultivary z hlediska regulace tuberigenní odpovědi. Získané poznatky by poté bylo možné využít i pro šlechtění, např. nalezení kultivarů požadovaných vlastností pro křížení. Kromě potenciálu praktického využití může práce přispět k objasnění role jednotlivých BELL TF v signální síti regulující nástup tuberizace. Například s využitím metody roubování charakterizovat, zda zásah do rovnováhy indukčních a inhibičních BELL TF je rozhodující v listech nebo stolonu, případně do jaké míry se na indukci tuberizace podílí exprese v obou pletivech. Metoda roubování již byla částečně optimalizována. Dále by mohla být ověřena mobilita BELL TF u transgenních linií ve floémových exudátech. Metodika jímání floémových exudátů byla na pracovišti optimalizována (Stupecká, 2018). Další zajímavé výsledky by mohla přinést např. i transformace vybranými konstrukty *S. tuberosum* subsp. andigena linie SAA, která má téměř nulový tuberizační potenciál. Bylo by tudíž zajímavé zjistit, zda zásah do rovnováhy v expresi BELL TF podpoří tuberizaci u této linie.

## 6 Závěr

### Závěr

Byla optimalizována metodika transformace *S. t. tuberosum* cv. Kamýk a Korela

Byly odvozeny transgenní linie:

pro *S. t. tuberosum* cv. Kamýk:

- 44 linií BEL5+PTB6, z nichž u 13 byla dosud potvrzena přítomnost transgenu
- 25 linií BEL11 AS, z nichž u 8 byla dosud potvrzena přítomnost transgenu
- 17 linií BEL29 AS, z nichž u 12 byla dosud potvrzena přítomnost transgenu

pro *S. t. tuberosum* cv. Korela :

- 3 linie BEL29 AS s ověřenou přítomností transgenu

Míra exprese transgenu v listu byla předběžně stanovena u *S.t. tuberosum* cv. Kamýk:

- 6 linií BEL5+PTB6
- 8 linií BEL29 AS
- 7 linií BEL11 AS
  - z nichž u dvou bylo prokázáno snížení hladiny *StBEL11* transkriptu v listech

Vybrané linie se sníženou hladinou *StBEL11* transkriptu vykazovaly ve srovnání s kontrolním genotypem:

- urychlení nástupu tuberizace *in vitro*
- trend navýšení počtu založených mikrohlízek i výnosů
- podobné hladiny *StPOTH1* a *StSP6A* transkriptů v listech, hladina transkriptu *StBEL5* v listech však byla mírně snížena

Zdá se tedy, že vychýlení rovnováhy BELL TF, snížením hladiny *StBEL11*, by mohlo vést k podpoření tuberizace u *S. t. tuberosum* cv. Kamýk

## 7 Seznam použité literatury

- Abelenda, J.A., Cruz-Oró, E., Franco-Zorrilla, J.M., a Prat, S.** (2016). Potato StCONSTANS-like1 Suppresses Storage Organ Formation by Directly Activating the FT-like StSP5G Repressor. *Curr. Biol.* **26**: 872–881.
- Aksenova, N.P., Konstantinova, T.N., Golyanovskaya, S.A., Sergeeva, L.I., a Romanov, G.A.** (2012). Hormonal Regulation of Tuber Formation in Potato Plants. *Russ. J. Plant Physiol.* **59**: 451–466.
- Banerjee, A.K., Chatterjee, M., Yu, Y., Suh, S., Miller, W.A., a Hannapel, D.J.** (2006). Dynamics of a Mobile RNA of Potato Involved in a Long-Distance Signaling Pathway. *Plant Cell* **18**: 3443–3457.
- Banerjee, A.K., Lin, T., a Hannapel, D.J.** (2009). Untranslated Regions of a Mobile Transcript Mediate RNA Metabolism. *Plant Physiol.* **151**: 1831–1843.
- Bellaoui, M., Pidkowich, M.S., Samach, A., Kushalappa, K., Kohalmi, S.E., Modrusan, Z., Crosby, W.L., a Haughn, G.W.** (2001). The Arabidopsis BELL1 and KNOX TALE Homeodomain Proteins Interact through a Domain Conserved between Plants and Animals. *Plant Cell* **13**: 2455–2470.
- Bhogale, S., Mahajan, A.S., Natarajan, B., Rajabhoj, M., Thulasiram, H. V, a Banerjee, A.K.** (2014). MicroRNA156: A Potential Graft-Transmissible MicroRNA That Modulates Plant Architecture and Tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant Physiol.* **164**: 1011–1027.
- Bürglin, T.R.** (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes ( MEIS , PBC , KNOX , Iroquois , TGIF ) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4173–4180.
- Chatterjee, M., Bermudez-lozano, C.L., Clancy, M.A., Davis, T.M., a Folta, K.M.** (2011). A Strawberry KNOX Gene Regulates Leaf , Flower and Meristem Architecture. *PLoS One* **6**: 1–13.
- Chen, H., Banerjee, A.K., a Hannapel, D.J.** (2004). The tandem complex of BEL and KNOX partners is required for transcriptional repression of *ga20ox1*. *Plant J.* **1**: 276–284.
- Chen, H., Rosin, F.M., Prat, S., a Hannapel, D.J.** (2003). Interacting Transcription Factors from the Three-Amino Acid Loop Extension Superclass Regulate Tuber Formation. *Plant Physiol.* **132**: 1391–1404.
- Chen, J., Janssen, B., Williams, A., a Sinha, N.** (1997). A Gene Fusion at a Homeobox Locus : Alterations in Leaf Shape and Implications for Morphological Evolution. *Plant Cell* **9**: 1289–1304.
- Cho, S.K., Sharma, P., Butler, N.M., Kang, I., Shah, S., Rao, A.G., a Hannapel, D.J.** (2015). Polypyrimidine tract-binding proteins of potato mediate tuberization through an interaction with StBEL5 RNA. *J. Exp. Bot.* **66**: 6835–6847.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Qingzhi, F., Searle, I., Giakountis, A., Gissot, L., Turnbull, C., a Coupland, G.** (2007). FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of Arabidopsis. *Science* **316**: 1030–1033.

- Cutter, E.G.** (1978). Structure and development of the potato plant P.M. Harris, ed (Chapman & Hall: London).
- \*Dodds, K.S.** (1962). The Potato and Its Wild Relatives: Classification of cultivated potatoes D.S. Correll, ed (Texas Research Foundation: Renner, Texas).
- Eviatar-Ribak, T., Shalit-Kaneh, A., Chappell-Maor, L., Amsellem, Z., Eshed, Y., a Lifschitz, E.** (2013). A Cytokinin-Activating Enzyme Promotes Tuber Formation in Tomato. *Curr. Biol.* **23**: 1057–1064.
- Ghate, T.H., Sharma, P., Kondhare, K.R., Hannapel, D.J., a Banerjee, A.K.** (2017). The mobile RNAs , StBEL11 and StBEL29 , suppress growth of tubers in potato. *Plant Mol. Biol.* **93**: 563–578.
- Glendinning, D.R.** (1975). Neo-Tuberosum " new potato breeding material . 1 . The origin , composition , and development of the Tuberosum and Neo-Tuberosum gene pools. *Potato Res.* **18**: 256–261.
- Hannapel, D.J., Sharma, P., Lin, T., a Banerjee, A.K.** (2017). The Multiple Signals That Control Tuber Formation. *Plant Physiol.* **174**: 845–856.
- Hendriks, T., Vreugdenhil, D., a Stiekema, W.J.** (1991). Patatin and four serine proteinase inhibitor genes are differentially expressed during potato tuber development. *Plant Mol. Biol.* **17**: 385–394.
- Karlgrén, A., Gyllenstrand, N., Kallman, T., Sundström, J.F., Moore, D., Lascoux, M., a Lagercrantz, U.** (2011). Evolution of the PEBP Gene Family in Plants : Functional Diversification in Seed Plant Evolution. *Plant Physiol.* **156**: 1967–1977.
- Khan, M., Tabb, P., a Hepworth, S.R.** (2012). BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 regulate Arabidopsis inflorescence architecture in conjunction with homeobox genes KNAT6 and ATH1. *Plant Signal. Behav.* **7**: 1–5.
- Kim, Y. a Lee, B.** (2019). Differential Mechanisms of Potato Yield Loss Induced by High Day and Night Temperatures During Tuber Initiation and Bulking : Photosynthesis and Tuber Growth. *Front. Plant Sci.* **10**: 1–9.
- Kloosterman, B., Navarro, C., Bijsterbosch, G., Lange, T., Prat, S., Visser, R.G.F., a Bachem, C.W.B.** (2007). StGA2ox1 is induced prior to stolon swelling and controls GA levels during potato tuber development. *Plant J.* **52**: 362–373.
- Kloosterman, B., Abelenda, J.A., Carretero Gomez, M. del M., Oortwijn, M., Boer, J.M. De, Kowitzanich, K., Horvath, B.M., Eck, H.J. Van, Smaczniak, C., Prat, S., Visser, R.G.F., a Bachem, C.W.B.** (2013). Naturally occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes. *Nature* **495**: 246–250.
- Kolachevskaya, O.O., Sergeeva, L.I., Getman, I.A., Lomin, S.N., Savelieva, E.M., a Romanov, G.A.** (2018). Core features of the hormonal status in in vitro grown potato plants. *Plant Signal. Behav.* **13**: 1–4.
- Krauss, A.** (1985). INTERACTION OF NITROGEN NUTRITION, PHYTOHORMONES, AND TUBERIZATION P.H. Li, ed (ACADEMIC PRESS, INC.: Lonon).
- Krauss, A. a Marschner, H.** (1982). Influence of nitrogen nutrition, daylength and temperature on contents of gibberellic and abscisic acid and on tuberization in potato plants. *Potato Res.* **25**: 13–21.



- Lakhotia, N., Joshi, G., Bhardwaj, A.R., Katiyar-agarwal, S., Agarwal, M., Jagannath, A., Goel, S., a Kumar, A.** (2014). Identification and characterization of miRNAome in root , stem , leaf and tuber developmental stages of potato ( *Solanum tuberosum* L .) by high-throughput sequencing. *BMC Plant Biol.* **14**: 1–16.
- Li, J., Wu, L., Foster, R., a Ruan, Y.** (2017). Molecular regulation of sucrose catabolism and sugar transport for development , defence and phloem function. *J. Integr. Plant Biol.* **59**: 322–335.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K., a Hakeaibi, S.** (1994). A knotted1-like Homeobox Gene in Arabidopsis Is Expressed in the Vegetative Meristem and Dramatically Alters Leaf Morphology When Overexpressed in Transgenic Plants. *Plant Cell* **6**: 1859–1876.
- Macháčková, I., Konstantinova, T.N., Sergeeva, L., Loznikova, V.N., Golyanovskaya, S.A., Dudko, N.D., Eder, J., a Aksenova, N.P.** (1998). Photoperiodic control of growth, development and phytochrome balance in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* **102**: 272–278.
- Mahajan, A., Bhogale, S., Kang, I.H., Hannapel, D.J., a Banerjee, A.K.** (2012). The mRNA of a Knotted1-like transcription factor of potato is phloem mobile. *Plant Mol. Biol.* **79**: 595–608.
- Mahajan, A.S., Kondhare, K.R., Rajabhoj, M.P., Kumar, A., Ghate, T.H., Ravindran, N., Habib, F., Siddappa, S., a Banerjee, A.K.** (2016). Regulation , overexpression , and target gene identification of Potato Homeobox 15 ( POTH15 ) – a class-I KNOX gene in potato. *J. Exp. Bot.* **67**: 4255–4272.
- Martin, A., Adam, H., Díaz-mendoza, M., Marek, Z., González-schain, N.D., a Suárez-lópez, P.** (2009). Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development* **2881**: 2873–2881.
- Menzel, C.M.** (1980). Tuberization in Potato at High Temperatures : Responses to Gibberellin and Growth Inhibitors. *Ann. Bot.* **46**: 259–265.
- Morimoto, R., Kosugi, T., Nakamura, C., a Takumi, S.** (2005). Intragenic diversity and functional conservation of the three homoeologous loci of the KN1 -type homeobox gene *Wknox1* in common wheat. *Plant Mol. Biol.* **57**: 907–924.
- Morris, W.L., Hancock, R.D., Ducreux, L.J.M., Morris, J.A., Usman, M., Verrall, S.R., Sharma, S.K., Bryan, G., Mcnicol, J.W., Hedley, P.E., a Taylor, M.A.** (2014). Day length dependent restructuring of the leaf transcriptome and metabolome in potato genotypes with contrasting tuberization phenotypes. *Plant, Cell Environ.* **37**: 1351–1363.
- Mukherjee, K., Brocchieri, L., a Burglin, T.R.** (2009). A Comprehensive Classification and Evolutionary Analysis of Plant Homeobox Genes. *Mol. Biol. Evol.* **26**: 2775–2794.
- Muller, J., Wang, Y., Franzen, R., Santi, L., Salamini, F., a Rohde, W.** (2001). In vitro interactions between barley TALE homeodomain proteins suggest a role for protein-protein associations in the regulation of *Knox* gene function. *Plant J.* **27**: 13–23.
- Navarro, C., Abelenda, J.A., Cruz-Oró, E., Cue'llar, C.A., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K., a Prat, S.** (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature*: 0–5.
- Rodríguez-Falcon, M., Bou, J., a Prat, S.** (2006). Seasonal Control of Tuberization in Potato : Conserved Elements with the Flowering Response. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 151–180.

- Rosin, F.M., Hart, J.K., Horner, H.T., Davies, P.J., a Hannapel, D.J.** (2003). Overexpression of a Knotted-Like Homeobox Gene of Potato Alters Vegetative Development by Decreasing Gibberellin Accumulation. *Plant Physiol.* **132**: 106–117.
- Rutjens, B., Bao, D., Eck-stouten, E. Van, Brand, M., Smeekens, S., a Proveniers, M.** (2009). Shoot apical meristem function in Arabidopsis requires the combined activities of three BEL1-like homeodomain proteins. *Plant J.* **58**: 641–654.
- Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A., a Imaizumi, T.** (2007). FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day- length measurement in Arabidopsis. *Science* (80- ). **318**: 261–265.
- Sharma, P., Lin, T., Grandellis, C., Yu, M., a Hannapel, D.J.** (2014). The BEL1-like family of transcription factors in potato. *J. Exp. Bot.* **65**: 709–723.
- Sharma, P., Lin, T., a Hannapel, D.J.** (2016). Targets of the StBEL5 Transcription Factor Include the FT Ortholog StSP6A. *Plant Physiol.* **170**: 310–324.
- Shu, Y., Tao, Y., Wang, S., Huang, L., Yu, X., Wang, Z., Chen, M., Weihong, G., a Ma, H.** (2015). GmSBH1 , a homeobox transcription factor gene , relates to growth and development and involves in response to high temperature and humidity stress in soybean. *Plant Cell Rep.* **34**: 1927–1937.
- Sinha, N.R., Williams, R.E., a Hake, S.** (1993). Overexpression of the maize homeo box gene , KNOTTED-I , causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev.* **7**: 787–795.
- Smeekens, S. a Hellmann, H.A.** (2014). Sugar sensing and signaling in plants. *Front. Plant Sci.* **5**: 113.
- Smith, H.M.S., Boschke, I., a Hake, S.** (2002). Selective interaction of plant homeodomain proteins mediates high DNA-binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 9579–9584.
- Stupecká, L.** (2018). Diplomová práce: Indukce tvorby hlíz u spontánně tuberizující linie bramboru: úloha sacharidů a mobilních transkriptů.
- Taoka, K.I., Ohki, I., Tsuji, H., Kojima, C., a Shimamoto, K.** (2013). Structure and function of florigen and the receptor complex. *Trends Plant Sci.* **18**: 287–294.
- Teo, C., Takahashi, K., Shimizu, K., Shimamoto, K., a Taoka, K.** (2017). Potato Tuber Induction is Regulated by Interactions Between Components of a Tuberigen Complex. *Plant Cell Physiol.* **58**: 365–374.
- Xu, X., Lammeren, A.A.M. Van, Vermeer, E., a Vreugdenhil, D.** (1998a). The Role of Gibberellin , Abscisic Acid , and Sucrose in the Regulation of Potato Tuber Formation in Vitro. *Plant Physiol.* **117**: 575–584.
- Xu, X., Vreugdenhil, D., a van Lammeren, A.M.** (1998b). Cell division and cell enlargement during potato tuber formation. *J. Exp. Bot.* **49**: 573–582.
- Yanagisawa, S.** (1998). Transcription Factors in Plants: Physiological Functions and Regulation of Expression. *J. Plant Res.* **111**: 363–371.
- Yoshihara, T., Omer, E.A., Koshino, H., Sakamura, S., Kikuta, Y., a Koda, Y.** (1989). Structure of a Tuber-inducing Stimulus from Potato Leaves (*Solanum tuberosum* L .). *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2835–2837.

\* sekundární citace