

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Magdaléna Dybová

Fotosyntetické charakteristiky rostlin bramboru se sníženou expresí transkripčního faktoru BEL11
Photosynthetic patterns of potato plants with silencing expression of transcription factor BEL11

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Petra Mašková, Ph.D

Praha, 2022

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Petře Maškové, Ph.D za odborné rady, neutuchající podporu, vstřícnost a trpělivost, za čas, který mi věnovala, a za profesionální a zároveň přátelský přístup. Také bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D za konzultace, podporu a vstřícnost. Dále všem členům laboratoře studia regulačních faktorů morfogeneze rostlin za příjemnou a přátelskou atmosféru, zaučení v laboratoři, veškerou pomoc a konzultace zejména Mgr. Andree Zounkové, Mgr. Janu Konečnému a Mgr. Monice Kofroňové, Ph.D.

Chtěla bych poděkovat dalším laboratořím, ve kterých jsem experimenty prováděla. Z laboratoře vedené Dr. Lukášem Fischerem především Mgr. Elišce Kobercové za vstřícnost a z laboratoře biochemie RNA především RNDr. Tomáši Maškovi, Ph.D za odborné rady a konzultace.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu a trpělivost během studia a psaní této práce.

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: 26. 4. 2022

Bc. Magdaléna Dybová

Podpis:

Abstrakt

Lilek brambor (*Solanum tuberosum*) patří mezi nejdůležitější plodiny na světě. Hlízy se tvoří během morfogenního procesu zvaného tuberizace, jehož načasování je řízeno komplexní regulační sítí, do které zasahují podmínky prostředí i vnitřní faktory. Při studiu regulace tuberizace je nejčastěji využíván genotyp poddruhu *S. t. andigena*, který striktně vyžaduje krátkodenní fotoperiodu. Kulturní druhy *S. t. tuberosum* tuberizují i za podmínek dlouhého dne. Regulace iniciace tuberizace zahrnuje působení endogenních faktorů, zejména fytohormonů, sacharidů a mobilních signálů, mezi které patří mimo jiné BEL transkripční faktory – StBEL5, StBEL11 a StBEL29 –, jejichž transkripty jsou produkovány listy a transportovány do stolonu. StBEL5 tuberizaci podporuje, StBEL11 a -29 ji naopak potlačují.

Cílem této diplomové práce bylo přispět k objasnění role StBEL11 při regulaci tuberizace, a to pomocí charakterizace mutantů se sníženou expresí *StBEL11*. Dílčím cílem bylo odvození transgenních linií *S. t. andigena* se sníženou hladinou *StBEL11* pomocí konstruktu s úsekem *StBEL11* v antisense orientaci pod kontrolou 35S CaMV promotoru. Podařilo se odvodit 42 stabilních transgenních linií připravených ke stanovení hladiny *StBEL11* mRNA. Dalším dílčím cílem bylo sledovat vliv snížení *StBEL11* na fotosyntetické parametry, sacharidovou bilanci a růstové charakteristiky. Využila jsem již odvozené linie *S. t. tuberosum* cv. Kamýk se sníženou hladinou *StBEL11* vykazující zvýšený tuberizační potenciál (Zouňková DP, 2019). Snížení hladiny *StBEL11* vedlo k navýšení množství fotosyntetických pigmentů a především ke zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy. V obsahu ani distribuci nestrukturních sacharidů po rostlině jsem nenalezla významnější systematické odchylky. U mutantních rostlin se zvýšenou rychlostí fotosyntézy, jsem překvapivě zjistila pokles čerstvé hmotnosti prýtu (S) i kořenů (R). Nicméně R/S poměr byl zvýšený, což ukazuje na posílenou alokaci asimilátů do podzemních orgánů. Počet listů, délka ani tloušťka stonku nebyla změněná, ale transgenní linie vykazaly menší listovou plochu. Pro potvrzení změn v distribuci biomasy mezi nadzemní a podzemní orgány je potřeba najít vhodné kultivační podmínky pro komplexní zhodnocení růstu včetně biomasy a morfologie stolonů.

Klíčová slova: *Solanum tuberosum*, tuberizace, BEL TF, StBEL11, rychlost čisté fotosyntézy, sacharidová bilance

Abstract

The potato (*Solanum tuberosum*) is one of the most important crops in the world. Tubers form during morphogenic process called tuberization, which timing is controlled by a complex regulatory network involving both environmental conditions and internal factors. For the study of this process, model genotype of subspecies *S. t. andigena* is mostly used. It requires a short photoperiod. Vast majority of cultivated potatoes are of species *S. t. tuberosum* that tuberize even under long-day conditions. Regulation of tuber initiation involves the action of endogenous factors, mainly phytohormones, carbohydrates and specific mobile signals, including BEL transcriptional factors – StBEL5, StBEL11 and StBEL29 – which transcripts are produced in leaves and transported into stolons. StBEL5 stimulates tuberization, whereas StBEL11 and -29 suppress it.

The aim of this thesis was to contribute to understanding the role of StBEL11 in the regulation of tuberization by characterization of mutants with decreased *StBEL11* levels. A sub-objective was to derive of transgenic lines *S. t. andigena* with decreased *StBEL11* levels using a construct with part of *StBEL11* coding region in antisense orientation under 35S CaMV promotor. I was able to derive forty two stable transgenic lines, which are prepared for *StBEL11* transcript levels determinations. Another sub-objective was to evaluate effect of decreased *StBEL11* level on photosynthetic parameters, carbohydrate balance and growth characteristics. For this sub-objective I used previously derived independent transgenic lines of *S. t. tuberosum* cv. Kamýk with decreased *StBEL11* levels exhibiting enhanced tuberization potential (Zouňková DP, 2019). Transgenic lines exhibited increased photosynthetic pigments levels and particularly increased net photosynthesis rates. Non-structural carbohydrate levels and their distribution throughout the plant did not differ significantly. Surprisingly, in transgenic lines with increased photosynthesis rates, I found a decrease in both shoot (S) and root (R) fresh weight. Nevertheless, the R/S ratio was increased in transgenic lines, indicating enhanced assimilate allocation to belowground organs. Leaf number, stem length and thickness were not altered, but the transgenic lines showed less leaf area. To confirm the changes in biomass distribution between above- and belowground organs, suitable culture conditions need to be found to achieve comprehensive growth characteristics including stolon biomass and morphology.

Key words: *Solanum tuberosum*, tuberization, BEL TF, StBEL11, net photosynthesis rate, carbohydrate balance

Seznam použitých zkratek

A _{XY}	absorbance při vlnové délce XY nm
ABA	kyselina abscisová (abscisic acid)
ABF	ABRE-binding factor
AGL8	AGAMOUS-LIKE8
AGPáza	adenosindifosfát-glukózapyrofosforyláza
AP2-like	APETALA2-like
ARF6/8	AUXIN RESPONSE FACTOR6/8
AS	antisense orientace
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BAP	6-benzylaminopurin
BEL	BELLRINGER1-like
BRI1	BRASSINOSTEROIDS INSENSITIVE1
bZIP	basic leucin zipper
CAB	chlorofyl a/b vážící protein
C (x+c)	karotenoidy (xantofyly + karoteny)
CDC2	CELL DIVISION CYCLE2
CDF1	CYCLING DOF FACTOR1
CIM	kalus indukující médium (callus inducing medium)
CK	cytokininy
CKX	cytokininoxidáza/dehydrogenáza
CO	CONSTANS
CU	cytosin/uracil
DEPC	diethylpyrokarbonát
DMF	dimethylamid kyseliny mravenčí
dw	suchá hmotnost (dry weight)
EDTA	kyselina etyléndiamintetraoctová
EtBr	ethidium bromid
FD	Flowering locus D
F _M	maximální fluorescence
F _O	počáteční fluorescence
FPF1	FLOWERING PROMOTER FACTOR1
FT	Flowering locus T

F _V /F _M	maximální kvantový výtěžek fluorescence chlorofylu
F _V	variabilní fluorescence
fw	čerstvá hmotnost (fresh weight)
fwd	forward
GA	gibereliny (gibberellic acid)
<i>GA2ox1</i>	<i>GA2-oxidáza1</i>
<i>GA3ox2</i>	<i>GA3-oxidáza2</i>
<i>GA20ox1</i>	<i>GA20-oxidáza1</i>
GAS	galaktinolsyntáza
GUS	β-glukuronidáza
Hd3a	Heading date 3a
HPLC	vysokoúčinný kapalinový chromatograf
HXK	hexokináza
Ch <i>a</i>	chlorofyl <i>a</i>
Ch <i>b</i>	chlorofyl <i>b</i>
IPT	izopentenyltransferáza (ISOPENTENYL TRANSFERASE)
KNOX	KNOTTED1-like homeobox
LD	DNA Loading Dye – nanášecí barvička
LOG	LONELY GUY
miRNA	microRNA
NAA	kyselina 1-naftyloctová
P	fotosyntetický pigment
P _N	rychlost čisté fotosyntézy (net photosynthesis rate)
PAR	fotosynteticky aktivní záření
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PHYB	fytochrom B (phytochrom B)
PIN	PIN-FORMED
POR	protochlorofylidoxidoreduktáza
POTH1	POTATO HOMEobox1
PS II	fotosystém II
PTB1/6	polypyrimidine tract-binding1/6
Q	chinon
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)

RAP1	RELATED TO APETALA2 1
rev	reverse
RNAi	RNA interference
R/S	poměr čerstvé hmotnosti kořenového systému k prýtu (root/shoot)
Rubisco	ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIM	prýt indukující médium (shoot inducing medium)
SLA	specifická listová plocha (specific leaf area)
SnRK1	SNF1-related protein kinase
SPL	SQUAMOSA PROMOTER BINDING-like
SP3D	SELF-PRUNING 3D
SP5G	SELF-PRUNING 5G
SP6A	SELF-PRUNING 6A
Sl	<i>Solanum lycopersicum</i>
St	<i>Solanum tuberosum</i>
SuSy	sacharózasyntáza (sucrose synthase)
SUT1/4	sucrose transporter1/4
SWEET11	Sugar Will Eventually be Exported Transporter11
TAE	TRIS acetát-EDTA
TALE	three-amino acid loop extension
TF	transkripční faktor
TKN2	HOMEBOX PROTEIN KNOTTED2
TLOG1	TOMATO LONELY GUY1
T6P	trehalóza-6-fosfát
UBI	polyubiquitin
UTR	nepřekládaná oblast (untranslated region)
WT	divoký typ (wild type)
35S CaMV	promotor 35S viru tabákové mozaiky (cauliflower mosaic virus)

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Cíle	2
2. Literární přehled	3
2.1. Faktory ovlivňující indukci tuberizace	3
2.1.1. Fytohormony	4
2.1.2. Sacharidová bilance	6
2.1.3. Proteiny a RNA se signální funkcí	11
2.2. BEL transkripční faktory	15
2.2.1. BEL transkripční faktory u bramboru	16
2.3. Experimentální materiál <i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i> cv. Kamýk s BEL11 AS konstruktem	20
3. Materiál a metody	21
3.1. Rostlinný materiál	21
3.2. Kultivace rostlin <i>in vitro</i>	21
3.2.1. Kultivační médium	21
3.2.2. Kultivace a vegetativní množení rostlin	22
3.3. Odvození stabilních transgenních linií <i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> genotypu 7540 s BEL11 AS konstruktem	23
3.3.1. Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
3.3.2. Transformace listů <i>S. t. andigena</i> konstruktem nesoucím BEL11 AS	27
3.3.3. Ověření přítomnosti konstruktů v <i>S. t. andigena</i>	29
3.4. Stanovení fotosyntetických charakteristik <i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i> cv. Kamýk s vneseným BEL11 AS konstruktem	30
3.4.1. Fluorescence chlorofylu	31
3.4.2. Obsah fotosyntetických pigmentů	31
3.4.3. Obsah antokyanů	32
3.4.4. Rychlost čisté fotosyntézy	32
3.4.5. Stanovení obsahu nestrukturních rozpustných sacharidů	33
3.4.6. Stanovení obsahu škrobu	34
3.4.7. Stanovení exprese sacharózového transportéru <i>StSUTI</i> v listech	35
3.5. Stanovení růstových charakteristik <i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i> cv. Kamýk s vneseným BEL11 AS konstruktem	40
3.6. Zpracování dat	41

4. Výsledky	42
4.1. Transformace <i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> genotyp 7540 s BEL11 AS konstruktem	44
4.2. Fotosyntetické charakteristiky transgenních linií <i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i> cv. Kamýk se sníženou hladinou <i>StBEL11</i>	46
4.2.1. Rychlá kinetika fluorescenční indukce.....	47
4.2.2. Obsah fotosyntetických pigmentů v listech.....	49
4.2.3. Obsah antokyanů v listech.....	51
4.2.4. Rychlost čisté fotosyntézy	52
4.2.5. Obsah a distribuce nestrukturních sacharidů po rostlině	54
4.2.6. Exprese <i>StSUT1</i> transportéru v listech	62
4.3. Růstové charakteristiky transgenních linií <i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i> cv. Kamýk se sníženou hladinou <i>StBEL11</i>	63
4.3.1. Hladina <i>StBEL11</i> v kořenech.....	67
5. Diskuse	69
5.1. Transformace <i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i>	69
5.2. Fotosyntetické charakteristiky a distribuce asimilátů u <i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i> cv. Kamýk se sníženou hladinou <i>StBEL11</i>	70
6. Závěr	79
7. Seznam použité literatury	80

1. Úvod

Mezi nejvíce pěstované a využívané plodiny patří lilek brambor (*Solanum tuberosum*), jehož hlízy jsou nepostradatelné jak pro výživu lidí, tak v různých odvětvích průmyslu. Hlízy, které se vytváří na podzemních částech stonku, stolonu, slouží rostlině jako zásobárna živin pro přežití nepříznivých podmínek a k vegetativnímu rozmnožování. Tvorba hlíz (tuberizace) bramboru je komplexní morfogenní proces, který je řízen složitou sítí regulačních drah, které jsou doposud prozkoumány jen částečně. Molekulární podstata tohoto procesu je zkoumána především pomocí vybraného krátkodenního genotypu poddruhu *andigena*. Ovšem většinou populace je jako plodina využíváno množství kultivarů poddruhu *tuberosum*, kde regulační dráhy vykazují řadu odchylek od zkoumaného genotypu. Je tedy dobré vědět, jak tento proces probíhá u obou poddruhů, a ověřovat, do jaké míry zjištění provedená na ssp. *andigena* platí i pro ssp. *tuberosum*.

Mezi důležité tuberigenní signály transportované floémem na dlouhou vzdálenost patří některé BEL transkripční faktory, z nichž StBEL11 působí jako represor tuberizace u ssp. *andigena*. Tato práce je zaměřena na studium ssp. *tuberosum* kultivar Kamýk se sníženou expresí *StBEL11* a soustředí se na ovlivnění fotosyntetických charakteristik a alokace asimilátů ve vztahu k vybraným růstovým charakteristikám.

1.1. Cíle

Hypotéza

Snížení hladiny *StBEL11*, které vede k posílení tuberizace, pozitivně ovlivňuje i fotosyntetické charakteristiky listu a mění distribuci asimilátů po rostlině, což se následně promítá do změn v růstových charakteristikách.

Cíle

U modelového genotypu *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* linie 7540 se sníženou expresí *StBEL11* (vnesením konstruktů s úsekem *StBEL11* v antisense orientaci) a již dříve odvozených linií *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Kamýk (nesoucích shodný konstrukt) testovat, zda snížení hladiny *StBEL11* posílí fotosyntetickou kapacitu listů a distribuci asimilátů ve prospěch podzemních sinků. Na základě získaných výsledků přispět k objasnění vztahu mezi mobilním tuberigenním signálem a modulací sacharidové bilance a alokace sacharidů mezi jednotlivé orgány rostliny, která vede k posílení tuberizace.

Dílčí cíle

- Odvodit dostatečné množství transgenních linií *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* s vneseným *StBEL11* konstruktem v antisense orientaci (AS), ověřit přítomnost transgenu a selektovat linie se sníženou hladinou *StBEL11* transkriptu.
- Porovnat fotosyntetickou kapacitu rostlin *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* a *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Kamýk, u WT a vybraných nezávislých transgenních linií s konstruktem s *StBEL11* AS.
 - Stanovit rychlou kinetiku fluorescenční indukce, obsah fotosyntetických pigmentů a antokyanů, rychlost čisté fotosyntézy.
 - Stanovit obsah a distribuci nestrukturních rozpustných sacharidů a škrobu ve vybraných orgánech, hladinu transkriptu *StSUTI* transportéru v listech.
- Porovnat růstové charakteristiky WT a transgenních linií *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Kamýk s konstruktem s *StBEL11* AS.
 - Stanovit čerstvou hmotnost prýtu a kořenů, R/S poměr.
 - Stanovit počet listů, celkovou listovou plochu, specifickou listovou plochu, délku a tloušťku stonku, délku kořene.

2. Literární přehled

Brambor (*Solanum tuberosum* L.) patří do čeledi lilkovitých (Solanaceae). Řadí se mezi nejdůležitější plodiny na světě. Význam pro člověka tkví v jeho hlízách. Hromadí se v nich velké množství škrobu, zásobní proteiny, také mikroprvky, antioxidanty, vitamíny, minerály a pouze malé množství tuků. Je využíván nejen v potravinářském a zemědělském průmyslu, ale také pro výrobu škrobu, etanolu a lepidla. Široce rozšířený poddruh *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* s mnoha kultivary je adaptován na různé fotoperiodické podmínky, tvorba hlíz je posílena krátkou fotoperiodou. Poddruh *S. tuberosum* ssp. *andigena* je pěstován především v Andách. Některé jeho genotypy (např. 7540; modelový genotyp pro studium tuberizace) tvoří hlízy pouze za krátkého dne (např. Hardigan et al., 2017).

Hlízy se tvoří na modifikovaném podzemní stonku (stolonu), který vyrůstá z podzemní části stonku a roste plagiotropně. Pokud je blízko pod povrchem a je vystaven dostatečnému množství světla, zezelená a vertikálním růstem nad povrch půdy vytvoří nový prýt. Za příznivých podmínek pro tvorbu hlíz je posílen transport asimilátů (především sacharózy) do stolonu, který se přestane prodlužovat, v subapikální oblasti zduří a začne se vyvíjet v hlízu (Xu et al., 1998a). Při indukci hlízy dochází k zastavení růstu stolonu a v perimedulární zóně subapikální části stolonu k reorientaci směru dělení buněk z transverzálního na longitudinální. Díky tomu stolon zduří (Xu et al., 1998a). Aby se v tomto místě mohl ukládat škrob, a tak mohla vzniknout hlíza, musí být z fotosyntetizujících pletiv do stolonové špičky posílen transport fotoasimilátů floémem. Fotoasimiláty jsou u bramboru transportovány nejčastěji ve formě sacharózy, která nejprve slouží jako zdroj uhlíku a energie potřebné na dělení buněk a růst hlíz a později jako zdroj pro ukládání zásob ve formě škrobu. Po naplnění hlízy a na konci vegetační sezóny se hlíza stává dormantní a v této klidové fázi přečká nepříznivé podmínky, zimu. Po dormanci v hlíze dochází k mobilizaci uložených rezerv a hlíza se ze sinkového orgánu stává orgánem zdrojovým. Dormantní pupeny na hlíze mohou vyrašit a dát vzniknout novému prýtu. Hlízy mají tedy dvě role, jsou zásobním orgánem a zároveň hrají roli ve vegetativním rozmnožování.

2.1. Faktory ovlivňující indukci tuberizace

Založení a vývoj hlíz je ovlivněn mnoha environmentálními, biochemickými a hormonálními podněty. Tvorbu hlíz např. stimulují krátké dny a nízké teploty (Gregory, 1965) a zpomaluje velké množství dusíku v půdě především ve formě amonného iontu (Gao et al.,

2014). V případě *in vitro* kultur se hlízy tvoří dříve na médiu s vyšším obsahem sacharózy (Xu et al., 1998b). Informaci o délce dne zpracovává fytochrom B (PHYB), který je součástí negativního regulačního mechanismu, který brání tuberizaci (Jackson et al., 1996) přes negativní ovlivnění exprese signálních látek stimulujících tuberizaci (viz dále), z nichž část slouží jako mobilní signál na dlouhou vzdálenost a mění vývoj ve špičce stolonu. U krátkodenních genotypů se negativní signalizace PHYB uplatňuje za neindukční fotoperiody, u kulturních genotypů zajišťují překonání vlivu PHYB alelické formy genů tuberigenního signálu (viz dále). Linie bramboru ssp. *andigena* s konstruktem nesoucím PHYB v antisense orientaci (AS) ztratily fotoperiodickou kontrolu tuberizace, díky čemuž tvořily hlízy i za dlouhého dne (Jackson et al., 1996; Martin et al., 2009).

2.1.1. Fytohormony

Důležitým faktorem ovlivňujícím tuberizaci je rovnováha fytohormonů. Z fytohormonů regulují zahájení tvorby hlíz především gibereliny (GA), kyselina abscisová (ABA), auxiny, cytokininy (CK), strigolaktony a brasinosteroidy. Nejlépe prozkoumaný vliv na nástup tuberizace je u GA. Pro iniciaci tuberizace je důležitý nízký obsah GA ve špičce stolonu (Xu et al., 1998b), kterého je možné dosáhnout změnou rovnováhy mezi enzymy účastnicími se biosyntézy či inaktivace a degradace aktivních GA. Za indukčních podmínek dochází ve stolonu k expresi genu *StGA2ox1* pro enzym GA2-oxidáza (Kloosterman et al., 2007), který GA inaktivuje. Naopak exprese genu *StGA20ox1* kódující enzym GA20-oxidáza účastníci se biosyntézy GA je snížena (Carrera et al., 2000). Ke snížení hladiny aktivních GA přispívá také ve stolonu redukováná exprese genu *StGA3ox2* pro GA3-oxidázu, která katalyzuje poslední krok v biosyntéze aktivních GA – přeměnu prekurzoru GA₂₀ na aktivní GA₁ (Bou-Torrent et al., 2011). Prekurzor GA₂₀ je v rostlině bramboru mobilnější než aktivní GA₁ a záleží, kde je GA₂₀ metabolizován (Bou-Torrent et al., 2011). Při konstitutivní overexpressi *StGA20ox1* dochází ke stálému doplňování zásobního poolu GA₂₀ ve stolonu (Carrera et al., 2000), a tak k produkci aktivní formy ve stolonu a oddálení tuberizace. Ovšem při overexpressi *StGA3ox2* jak pod konstitutivním promotorem, tak pod listově specifickým, nastává tuberizace dříve. Neboť je GA₁, který není tak dobře mobilní, vytvořen především v nadzemní části rostliny. Ve stolonech je tedy nízká hladina aktivní formy a může být iniciována tvorba hlíz (Bou-Torrent et al., 2011). Ke zpoždění iniciace tvorby hlíz může dojít, pokud ve špičce stolonu GA nelze degradovat, nebo jsou stále tvořeny nové

aktivní GA. Naproti tomu linie s podpořenou degradací GA, nebo se zablokovanou tvorbou, vykazují dřívější tuberizaci (Carrera et al., 2000; Kloosterman et al., 2007).

ABA je pozitivní regulátor tuberizace – inhibuje elongaci stolonů (přes antagonistické působení s GA) a podporuje jejich tloušťnutí (Xu et al., 1998b; Muñiz García et al., 2014). Obohacení média indukujícího tvorbu hlíz (8 % sacharózy) o ABA vedlo ke dřívější tuberizaci. ABA tvorbu hlíz vyvolala i za neindukčních podmínek (médium s 1 % sacharózy) (Xu et al., 1998b). GA působí obráceně. Dokonce aplikace exogenních GA zvrátila duření stolonů (Muñiz García et al., 2014). Iniciace tuberizace tedy závisí na crosstalku signalizačních drah ABA a GA, který je zprostředkován ABF (ABRE-binding factor) transkripčními faktory (TF) (Muñiz García et al., 2012; 2014).

Při počátku tvorby hlízy dochází k dramatickému zvýšení koncentrace auxinu ve špičce stolonu, která se následně pomalu snižuje. Pokud je pokles koncentrace znemožněn, hlíza nevznikne (Roumeliotis et al., 2012). Místem syntézy auxinu je špička stolonu, ze které je auxin polárně transportován směrem k bázi stolonu pomocí proteinových transportérů PIN (PIN-FORMED) (Roumeliotis et al., 2012). Endogenní zvýšení koncentrace auxinu ve špičce stolonu pravděpodobně alespoň částečně podmiňuje změnu směru dělení buněk v subapikální části stolonu při duření (Roumeliotis et al., 2012). Za zvýšenou koncentrací auxinu ve špičce stolonu je zodpovědná výrazná exprese genu homologního k *YUCCA-like* genům kódující enzym účastnící se biosyntézy auxinu (Roumeliotis et al., 2012). Exprese tohoto genu (*StYUCCA-like1*) ve stolonové špičce se zvýšila po přechodu z dlouhodobých podmínek na krátkodenní (Roumeliotis et al., 2012). Viditelnému zduření stolonu předchází také exprese genu *ARF6* (*AUXIN RESPONSE FACTOR6*) (Faivre-Rampant et al., 2004). Pro iniciaci tuberizace je potřebná pouze krátkodobá zvýšená koncentrace auxinu. Exprese je tedy brzy downregulována a ve zduřelém stolonu je hladina obou transkriptů již výrazně nižší (Faivre-Rampant et al., 2004; Roumeliotis et al., 2012). Dochází ke stabilizaci koncentrace auxinu a k jejímu následnému pomalému poklesu během růstu hlízy (Roumeliotis et al., 2012).

Role CK v tuberizaci nelze jednoduše definovat jako pozitivní nebo negativní, alespoň u rostlin pěstovaných *in vitro* (Raspor et al., 2012), i když exogenní aplikace zeatin ribozidu na stolony kultivované *in vitro* indukovala tuberizaci (Mauk a Langille, 1978). Snížení hladiny aktivních CK v transgenních liniích bramboru cv. Desirée overexprimujících (35S CaMV [cauliflower mosaic virus] promotor) gen *AtCKX2*, který kóduje enzym cytokininoxidáza/dehydrogenáza účastnící se katabolismu CK, sice vedlo u některých linií v podmínkách *in vitro* k tvorbě hlíz za dlouhého dne, ale za kontinuální tmy transgenní linie

vytvořily méně hlíz na explantát s větším průměrem než kontrola (Raspor et al., 2012). U linií cv. Desirée overexprimující (35S CaMV promotor) gen *AtCKX1*, který také kóduje cytokininoxidáza/dehydrogenázu, byly pozorovány jiné změny – za dlouhého dne byl u transgenních linií nižší počet menších hlíz na explantát, za kontinuální tmy hlízy vytvořilo větší procento transgenních prýtů oproti WT (divoký typ) (Raspor et al., 2021). Rozdíly v efektech navýšení exprese dvou genů pro různé izoformy enzymu mohou být dány rozdílnou subcelulární lokalizací daných izoform (Werner et al., 2003; Niemann et al., 2018). Důležitost CK v tuberizační dráze naznačuje práce Eviatar-Ribak et al. (2013), která popisuje fenotyp linií rajčete (*Solanum lycopersicum*) s overexpresí (35S CaMV promotor) genu *TLOG1* (*TOMATO LONELY GUY1*) kódujícího enzym, který reaktivuje metabolity biosyntézy CK za vzniku bioaktivní formy (Kurakawa et al., 2007). U mutantů došlo k tvorbě vzdušných hlíz ze stonkových axilárních meristémů, které přirozeně hlízy netvoří, díky uvolnění potenciálu tvořit zásobní orgány z axilárních pupenů (Eviatar-Ribak et al., 2013).

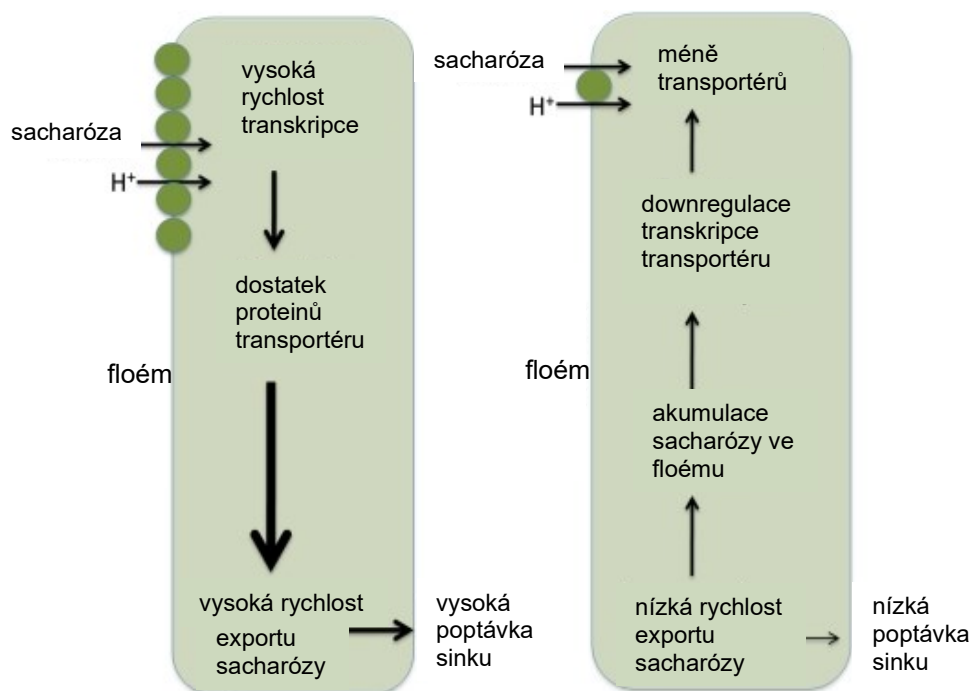
Strigolaktony inhibují větvení prýtu (Gomez-Roldan et al., 2008) a stejný vliv mají i na stolon (Roumeliotis et al., 2012). Inhibují prorůstání axilárních pupenů stolonu a následně také tvorbu hlíz (Roumeliotis et al., 2012), neboť počet hlíz je ovlivněn stupněm větvení stolonů (Celis-Gamboa et al., 2003).

Brasinosteroidy podporují tvorbu hlíz přes expresi genů fotoperiodické a tuberigenní signální dráhy ve stolonu (*StCDF1*, *StSP6A*, *StSWEET11*, *StBEL5*; viz níže) (Zhu et al., 2019; Huang et al., 2021). Exogenně aplikované brasinosteroidy na prýt zvýšily počet hlíz nejspíše přes indukci exprese *StCDF1* (*CYCLING DOF FACTOR1*) a *StSP6A* (*SELF-PRUNING 6A*) (Zhu et al., 2019). Pozitivní regulační roli v signalizaci brasinosteroidů hraje receptor StBRI1 (BRASSINOSTEROIDS INSENSITIVE1), jehož umlčení prostřednictvím RNA interference (RNAi) způsobilo drastické snížení celkového výnosu, a to průměrné váhy hlíz a jejich počtu na rostlinu (Huang et al., 2021).

2.1.2. Sacharidová bilance

Sacharidy mají funkci stavební (např. celulóza), zásobní (škrob, inulin) a jsou zdrojem energie a uhlíku. Mezi rozpustné sacharidy patří sacharóza, je hlavní transportní formou sacharidů, a tak se účastní na vytváření hnací síly floémového toku ovlivňující transport i mobilních signálů. Hraje důležitou roli v morfogenních procesech a má také signální funkci např. při kvetení (Corbesier et al., 1998) či tuberizaci (Raices et al., 2003). Při vývoji hlíz

je důležitým metabolitem, neboť je schopná regulovat produkci asimilátů ve zdrojových pletivech na základě požadavků sinků (Lawlor a Paul, 2014; White et al., 2015). Pokud je přísun asimilátů ze zdroje nižší než poptávka mladých vyvíjejících se sinků, dochází k produkci malých orgánů s podřadnými charakteristikami (Lawlor a Paul, 2014). Vytvoření silného sinku může vést k potlačení růstu prýtu (Rapoport a Loomis, 1985), ovšem i za různého rozvoje listové plochy bývá rychlost fotosyntézy na jednotku listové plochy relativně konstantní (Lawlor a Paul, 2014). V případě produkce většího množství asimilátů než je poptávka sinku, může dojít k inhibici fotosyntézy hromadícími se asimiláty v listu (Obrázek 1) (Paul a Foyer, 2001). Zvrátit inhibiční efekt asimilátů na fotosyntézu může navýšení síly sinku, např. indukci tvorby zásobního orgánu (Ribeiro et al., 2016), podpora růstu sinkových orgánů, které nepřispívají k výnosu plodiny, nebo respiračních procesů, které přebytečné asimiláty spotřebují (Lawlor a Paul, 2014). Proto musí být tvorba sinků jako jsou zásobní orgány, květy nebo semena dobře načasovaná a musí stále probíhat komunikace mezi sinkovými a zdrojovými orgány (Rolland et al., 2006; Zierer et al., 2021).



Obrázek 1: Regulace nakládání floému sinkem. Množství transportérů sacharózy na plazmatické membráně sítkových buněk ovlivňuje kapacitu nakládání do floému a je přímo úměrné rychlosti jejich exprese. Rychlost transkripce je regulována signální kaskádou reagující na změny hladiny sacharózy, která je výsledkem dynamické rovnováhy mezi aktivitou nakládání a exportem. Rychlá změna množství mRNA i proteinů transportéru umožňuje pohotovou kontrolu. Pokud je poptávka sinků vysoká, hladina sacharózy je nízká a rychlost transkripce je vysoká. Pokud poptávka sinků klesá, export se zpomaluje, sacharóza se hromadí ve floému a snižuje transkripci a množství transportérů. Při snížení transportu sacharózy (výdej i příjem do floému), sacharidy se hromadí v mezofylu a fotosyntéza je regulovaná. (Převzato a upraveno, Ainsworth a Bush, 2011.)

Komunikace je mimo jiné zprostředkována signalizační funkcí sacharidů. Degradanční produkt sacharózy, glukóza, interaguje se svým senzorem, hexokinázou (HXK), která se účastní regulace exprese genů na různých úrovních. Míra generování signálu tak reflektuje dostupnost sacharidů (Rolland et al., 2006). HXK je bifunkční protein a účastní se také metabolismu glukózy, kdy katalyzuje její fosforylaci. HXK propojuje signalizační dráhu glukózy s drahami regulovanými auxiny a CK a signalizací živin a světla, což umožňuje řízení růstu a vývoje rostliny v reakci na měnící se okolní prostředí (Moore et al., 2003). Rostliny *Arabidopsis* s vyřazenou AtHXK1 z funkce (glucose insensitive mutanti) měly při vysoké ozáření oproti WT malé, tmavě zelené listy s malými buňkami. Tito mutanti byli necitliví k auxinu a hypersenzitivní na CK (Moore et al., 2003). Možnost vyřazení pouze metabolické funkce ukázala, že role HXK v metabolismu glukózy je oddělena od její role senzoru v signalizaci glukózy (Moore et al., 2003). Glukóza, pokud se v buňce hromadí, může díky své signalizační funkci také způsobit represi promotorů fotosyntetických genů, např. genu pro malou podjednotku Rubisco (ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxigenáza) nebo plastocyanin (Xiao et al., 2000; Moore et al., 2003).

Dalším metabolickým signálem je trehalóza-6-fosfát (T6P), jehož hladina reflektuje hladinu sacharózy (Nunes et al., 2013; Lunn et al., 2014). T6P se oproti jiným sacharidům vyskytuje ve velmi nízké koncentraci, která se zvyšuje s vyšší dostupností sacharózy. Hladina T6P reguluje aktivitu protein kinázy SnRK1 (SNF1-related protein kinase), která udržuje energetickou homeostázu buňky regulováním anabolických a katabolických procesů přes fosforylaci cílových proteinů. Při zvýšené koncentraci sacharózy se zvedá koncentrace T6P, která zabraňuje SnRK1 kináze inhibovat anabolické procesy. Výsledkem je podpořený růst. Kinázový systém se SnRK1 kinázou pod kontrolou T6P je ovšem součástí rozsáhlejší sacharidové regulační sítě. SnRK1 je velmi citlivým indikátorem hladin dalších sacharidů (glukóza-6-fosfát, glukóza-1-fosfát) ale také adenylátů (koncentrace adenosinmonofosfátu roste při energetickém vyčerpání), které rychle odpovídají jak na krátkodobé podmínky prostředí, tak na poptávku metabolismu. Rovnováha mezi zdrojem a sinkem je tak rychle a precizně regulována (Lawlor a Paul, 2014). T6P může také ovlivňovat syntézu škrobu přes regulaci AGPázy (ADP-glukózapyrofosforyláza), klíčového enzymu syntézy škrobu (Lunn et al., 2006). Při změně obsahu T6P se mění rychlost fotosyntézy (Pellny et al., 2004). U linií tabáku (*Nicotiana tabacum*) s vneseným genem pro trehalózafosfátsyntázu z *Escherichia coli* byla vyšší maximální aktivita Rubisco, díky které se navýšila rychlost asimilace CO₂ jak za saturační ozáření, tak za různých koncentrací CO₂. V případě linií se zvýšenou aktivitou proteinů (trehalózafosfátfosfatáza, trehalózafosfáthydroláza)

zajišťujícími snížením koncentrace T6P, došlo k opačným jevům – snížení maximální aktivity Rubisco, také snížení obsahu chlorofylů, a tak i výrazné snížení rychlosti fotosyntézy (Pellny et al., 2004).

Sacharidy jsou syntetizovány v mezofylových buňkách listů, odkud jsou transportovány plasmodesmy k parenchymatickým buňkám floému (Ainsworth a Bush, 2011). U bramboru probíhá nakládání do floému přes apoplast (Riesmeier et al., 1994). Tedy sacharóza musí z parenchymatických buněk floému vystoupit do apoplastu pomocí transportérů rodiny SWEET (Sugar Will Eventually be Exported Transporter) lokalizovaných na plazmatické membráně parenchymatických buněk floému v žilnatině listu (Chen et al., 2012). Jejich vyřazení z funkce má za následek redukci odtoku sacharidů z listů, a tak zvýšený obsah sacharózy a škrobu v listech a redukovanou délku kořenů (Chen et al., 2012). Do průvodních buněk vstupuje sacharóza symportem s protonem zajišťovaným proteiny SUT (sucrose transporter) (Bürkle et al., 1998). Vykládání sacharózy z floému ve stolonu probíhá podobně jako její nakládání v produkčním listu. Příjem sacharózy do floému ve zdrojovém pletivu a vykládání v sinku vede k vytvoření koncentračního gradientu sacharózy zodpovědného za hromadný tok floémové šťávy k sinkům.

U bramboru byly nalezeny tři SUT transportéry – StSUT1, StSUT2 a StSUT4 (Riesmeier et al., 1993; Barker et al., 2000; Weise et al., 2000), které se mohou nacházet v jedné buňce a jsou schopny tvořit jak homooligomery, tak interagovat mezi sebou (Reinders et al., 2002). Všechny tři vykazaly diurnální oscilaci exprese (Chincinska et al., 2008). StSUT1 je symportér sacharózy s protonem. Je nejdůležitějším transportérem pro nakládání sacharózy do floému v produkčních listech a právě zde je převážně exprimován (Riesmeier et al., 1993), a to v průvodních buňkách (Lemoine et al., 1996). Protein se nachází na plazmatické membráně sítkových elementů, kam je mRNA transportována pomocí endoplazmatického retikula skrze plasmodesmy (Kühn et al., 1997; Liesche et al., 2008). Pokud je translace zablokována, transkript je degradován (He et al., 2008). Umlčení exprese *StSUT1* (prostřednictvím konstruktů v AS) vede ke snížení odtékání sacharidů z listů, a tak ke zvýšení akumulace sacharidů, škrobu a antokyanů v listech, k redukci růstu a tvorby kořenů a hlíz (Riesmeier et al., 1994). Pomocí umlčení exprese *StSUT1* v hlízkách díky promotoru specifickému pro hlízy byla zjištěna role StSUT1 také ve vykládání floému v hlízkách během časných fází jejich vývoje (Kühn et al., 2003). *StSUT2* je exprimován více v sinkových pletivech než ve zdrojových (Barker et al., 2000). Exprese *StSUT4* je nejvyšší v sinkových orgánech a zvyšuje se během kvetení a vývoje hlíz (Chincinska et al., 2008). Lokalizace proteinu se mění v závislosti na stáří rostliny – v mladých rostlinách je

lokalizován především v plazmatické membráně sinkových listů, ve starších rostlinách byl objeven především ve zdrojových listech ve svěracích buňkách průduchů a na tonoplastu (Chincinska et al., 2013). Geny pro transportéry StSUT1 a StSUT4 vykázaly podobný expresní vzorec s maximální hladinou transkriptů uprostřed světelné periody (Chincinska et al., 2008). U rostlin s umlčenou expresí *StSUT4* prostřednictvím RNAi byl ve zdrojových listech zaznamenán vyšší obsah rozpustných sacharidů na konci světelné periody než u kontrolních rostlin. Toto navýšení bylo doprovázeno zvýšenou rychlostí odtoku sacharózy. Zvýšila se tedy i akumulace sacharózy a škrobu v mikrohřízkách *in vitro*. Sice Chincinska et al. (2008) nezaznamenali v transgenních liniích průkaznou změnu exprese *StSUT1*, ale nevyloučili negativní posttranslační regulaci prostřednictvím tvorby heterodimeru se StSUT4. Tento způsob navýšení aktivity StSUT1 v liniích s umlčenou expresí *StSUT4* by mohl mít za následek i tuberizaci za nízkého obsahu sacharózy v médiu u *in vitro* pěstovaných linií, kdy by byl zvýšen příjem sacharózy do stolonů (Chincinska et al., 2013).

Nejen v metabolismu, ale i v signalizaci hrají roli také enzymy štěpící sacharózu – invertázy a sacharózasyntázy (SuSy). Aktivita SuSy je důležitý ukazatel síly sinku vyvíjející se hlízy (Zrenner et al., 1995). Při změně vykládání floému z apoplastického na symplastické ve špičce stolonu během raných fází iniciace tuberizace (Viola et al., 2001) se katalytická aktivita SuSy navyšuje a zároveň se snižuje aktivita invertázy vázané na buněčnou stěnu (Appeldoorn et al., 1997). Také se navyšuje exprese genů kódujících proteiny zapojených v biosyntéze škrobu v hlízách (Ferreira et al., 2010). Exprese těchto genů podléhá diurnálnímu rytmu a je vázána na dostupnost sacharózy přicházející z listu (Ferreira et al., 2010).

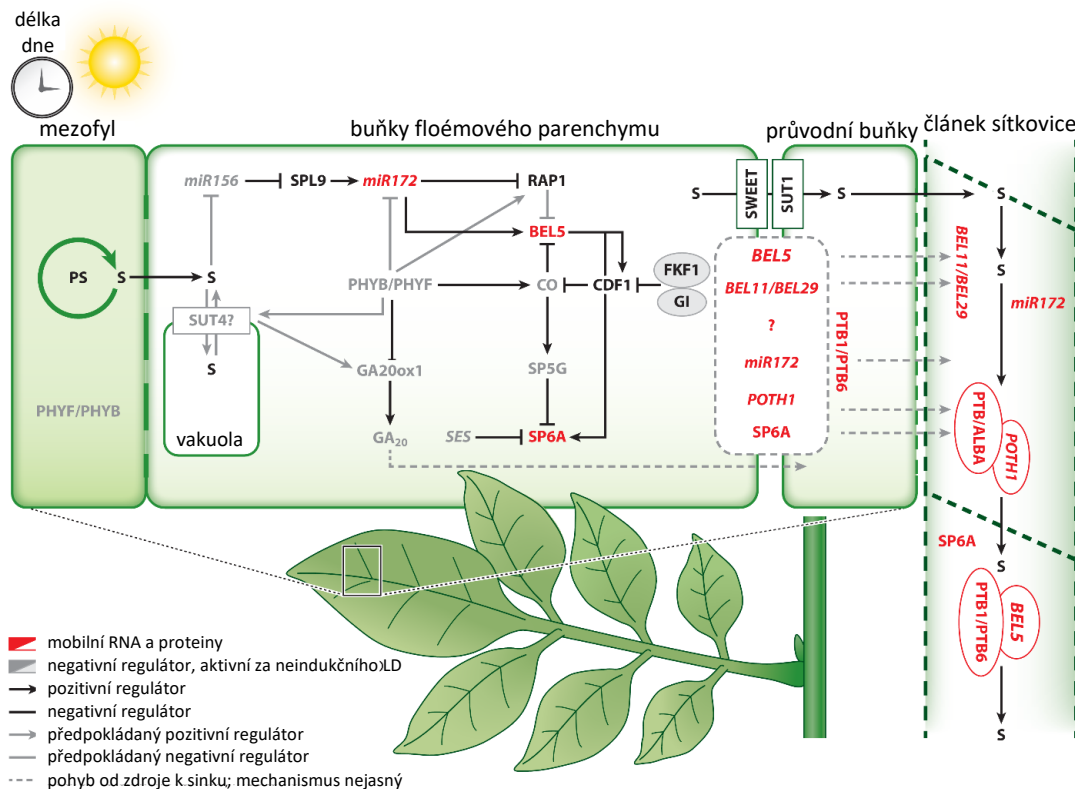
Bylo zjištěno, že síla sinku a způsob vykládání sacharózy v indukovaném stolonu jsou spojeny s jednou složkou mobilního tuberigenního signálu (SP6A, viz. 2.1.3.1.). Protein StSP6A také propojuje fotoperiodickou a sacharidovou signalizaci tuberizace. Tento protein podél transportní dráhy floémem interaguje s proteinem StSWEET11, a tak blokuje jeho transportní aktivitu (Abelenda et al., 2019). Autoři předpokládají, že tím je indukován přechod z apoplastického vykládání sacharózy na symplastické během raných fází tuberizace. Exprese genů pro oba proteiny se navíc překrývá v apikálním meristému stolonu a perimedulární oblasti (Abelenda et al., 2019). Overexprese *StSP6A* způsobuje redukci exportu sacharózy z floému do okolního parenchymu podél transportní cesty, díky čemuž jsou asimiláty efektivněji transportovány do terminálních sinků (stolony, kořeny) (Lehretz et al., 2021).

2.1.3. Proteiny a RNA se signální funkcí

Mechanismus regulace nástupu tuberizace na molekulární úrovni má mnoho společných rysů s nástupem kvetení. Vhodné fotoperiodické podmínky pro kvetení i tuberizaci jsou vnímány listy přes PHYB a cirkadiální hodiny, produkuje se mobilní tuberigenní signál (Obrázek 2), který v cílovém pletivu spustí kaskádu procesů, která vede k vytvoření hlízy (přehledně v review Rodríguez-Falcón et al., 2006).

2.1.3.1. Proteiny

Mezi nejdůležitější proteinové signály regulující počátek tvorby hlíz se řadí StCDF1 (CYCLING DOF FACTOR1), StSP6A (SELF-PRUNING 6A), oba proteiny kódované homologními geny u *Arabidopsis* se účastní regulace nástupu kvetení, a dále StBEL5 (BELLRINGER1-like 5) (Obrázek 2) (Banerjee et al., 2006; Navarro et al., 2011; Kloosterman et al., 2013).



Obrázek 2: Model regulace indukce tvorby hlíz u bramboru prostřednictvím mobilních signálů produkovaných v listu. Dva hlavní mobilní signály, SP6A protein (FT homolog) a *BEL5* mRNA, jsou produkovány v listu a přes floém translokovány do stolonů, kde stimulují tuberizaci. Jejich exprese je regulována signály z prostředí, především délkou dne, která je vnímána přes proteiny cirkadiálních hodin. Exprese *SP6A* je negativně kontrolována CO, které aktivuje transkripci *SP5G* (FT homolog, antagonist *SP6A*) za neindukčních dlouhých dnů. Za dlouhého dne je transkripce *CO* zvýšena přes proteolytickou degradaci *CDF1* zprostředkovanou komplexem *FKF1/GI*, zatímco *CO* protein je stabilizován *PHYB* a *PHYF*. Za krátkého dne se *CDF1* vyhýbá degradaci, čímž inhibuje expresi *CO* a nepřímo aktivuje expresi *SP6A*. Množství *SP6A* transkriptu je také kontrolováno malými RNA *SES*. Transkripce *SP6A* a *CDF1* je aktivována pomocí *BEL5*, který působí společně s *POTH1*. Akumulace *BEL5* mRNA je pod kontrolou *miR172* (přes *RAP1*) a *PHYB*. Je prokázáno, že mRNA *POTH1*, *BEL11*, *BEL29* a *miR172* jsou mobilní floémem. Transport *BEL5* a *POTH1* mRNA je usnadněn RNA-vazebnými proteiny (*PTB1/PTB6*, *ALBA*). Jak je zprostředkován transport *SP6A* není známo. Sacharóza mimo jiné slouží jako signál dostatečné kapacity zdroje, který by mohl být integrován do fotoperiodické dráhy prostřednictvím *miR156/SPL*. Dostupnost sacharózy regulují sacharidové transportéry *SWEET*, *SUT1* a *SUT4*. Byl navržen také pohyb přímého prekursoru aktivních GA, *GA₂₀*. Tečkovaný rámeček a otazník: nejasná přesná subcelulární lokalizace a způsob, jakým daní účastníci dráhy vstupují do sítkových elementů. Zkratky: *ALBA*: ALBA-DOMAIN PROTEIN; *FKF1*: FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX PROTEIN1; *GI*: GIGANTEA; LD: dlouhý den; *PHYF*: PHYTOCHROME F; *PS*: fotosyntéza; *S*: sacharóza; *SES*: SUPPRESSING EXPRESSION OF *SP6A*; vysvětlení dalších zkratk viz seznam zkratk a kapitoly 2.1. a 2.2. (Převzato a upraveno, Zierer et al., 2021.)

CDF1 se u *Arabidopsis* (AtCDF1) hromadí za neindukčních podmínek krátkého dne v listech. Prostřednictvím vazby do promotoru *CO* (*CONSTANS*) a *FT* (Flowering locus T) potlačuje jejich expresi, a tím blokuje kvetení (Sawa et al., 2007; Song et al., 2012). Za dlouhého dne AtCDF1 interaguje s proteiny cirkadiálních hodin, což vede k jeho degradaci a derepresi *CO* (Imaizumi et al., 2005; Sawa et al., 2007).

U bramboru, kde je tuberizace indukovaná krátkou fotoperiodou, CO hraje opačnou roli – tvorbu hlíz inhibuje. StCO je v listech za dlouhého dne stabilizován PHYB (Abelenda et al., 2016) a tuberizaci inhibuje (Kloosterman et al., 2013; Abelenda et al., 2016). Za krátkého dne dochází k hromadění StCDF1, které reprimuje *StCO*, a tím uvolňuje z represe proces tuberizace (Kloosterman et al., 2013). U kultivarů bramboru bez striktního požadavku na krátkou fotoperiodu pro tuberizaci existují alelické formy proteinu StCDF1, kterým chybí doména pro interakci s proteiny cirkadiálních hodin. Díky tomu nemohou tyto proteiny posttranslačně regulovat StCDF1 a zajistit jeho degradaci. StCDF1 se stabilizuje a působí konstitutivní represi *StCO* i za dlouhého dne (Kloosterman et al., 2013).

FT u *Arabidopsis* funguje jako florigenní mobilní signál. Kóduje protein, který je vytvářen v listech a po translokaci pomocí floému do apexu prýtu indukuje změnu apikálního meristému prýtu v květní meristém (Corbesier et al., 2007). V apexu se váže s FD (Flowering locus D) proteinem (patřící do bZIP [basic leucin zipper] TF) (Wigge et al., 2005). Následně tento komplex indukuje transkripci genů identity květního meristému, např. *APETALA1* (Abe et al., 2005).

U bramboru do genové rodiny *FT*-like patří *StSP3D*, *StSP6A* a *StSP5G*. Předpokládaná role *StSP3D* je kontrola přechodu ke kvetení, *StSP6A* je nezbytným signálem pro zahájení tuberizace a *StSP5G* tuberizaci potlačuje přes represi exprese *StSP6A* (Navarro et al., 2011). Funkční podobnost proteinů StSP3D a StSP6A vyplývá ze zvrácení fenotypu pozdního kvetení v mutantech *Arabidopsis* díky expresi *StSP6A* (Navarro et al., 2011). Transkripce *StSP5G* je indukována StCO za dlouhého dne (Kloosterman et al., 2013; Abelenda et al., 2016), naopak za krátkého dne nahromaděné StCDF1 reprimuje expresi *StCO* a tak uvolňuje tuberigen *StSP6A* z represe (Kloosterman et al., 2013). *StSP6A* je exprimován v listech a za krátkého dne je protein transportován do stolonů. Díky této závislosti je tuberizace u druhů bramboru ssp. *andigena* striktně krátkodenním procesem (Navarro et al., 2011). Ve stolonu dochází k expresi později než v listu a v roubovacím experimentu s rostlinami bramboru exprimujícími *Hd3a* (Heading date 3a [*FT* homolog rýže]) byl v podnoži objeven endogenní *StSP6A* transkript, což naznačuje pozitivní autoregulační smyčku exprese (Navarro et al., 2011). Autoregulační smyčka zajistí vysoké

množství tuberigenního signálu, které je potřeba pro přeměnu stolonu v hlízu. Analýza exprese *StSP6A* v komerčních kultivarech zahrnující kultivary rané až pozdní ukázala, že akumulace tohoto transkriptu v listech koreluje s časem tuberizace daných kultivarů. *StSP6A* se tedy podílí na kontrole tuberizace i u kulturních bramborů ssp. *tuberosum* (Navarro et al., 2011). U kulturního bramboru ssp. *tuberosum* tvořícího hlízy i za dlouhého dne Morris et al. (2014) našli nejen pozměněné alely *StCDF1*, díky kterým není protein degradován, ale i rozdílnou alelu v *StSP6A*, která umožňuje expresi *StSP6A* právě i za dlouhého dne.

StSP6A je pravděpodobně, podobně jako FT, mobilní ve formě proteinu. Protein *StSP6A* ve stolonu interaguje s St14-3-3 a StFD-like proteiny za vzniku komplexu aktivujícího tvorbu hlíz (tuber activation complex) (Teo et al., 2017). Během časných fází tvorby hlíz *StSP6A* ovlivňuje hormonální aktivitu a signalizaci ve stolonu přes indukci exprese genů, které kódují proteiny spojené s přepnutím vývoje stolonu v hlízu (rovnováha fytohormonů, buněčné dělení, transport sacharidů) – *StPIN1*, *StPIN4*, *StGA2ox1*, *AGL8* (*AGAMOUS-LIKE8*), *ARF8*, *FPF1* (*FLOWERING PROMOTER FACTOR1*), *CDC2* (*CELL DIVISION CYCLE2*) a *SUT1* (Navarro et al., 2011).

2.1.3.2. miRNA

MicroRNA (miRNA) patří mezi malé nekódující RNA, které posttranskripčně regulují tvorbu těch proteinů, k jejichž mRNA jsou částečně komplementární. Časování vývojových událostí se u *Arabidopsis* účastní *miR156* a *miR172*, které zároveň fungují jako mobilní signály (Wu et al., 2009). *miR156* cílí na mRNA transkripčních faktorů z rodiny SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING-like) regulující různé vývojové procesy rostlin, zejména kvetení (Schwab et al., 2005). Exprese *miR172* je regulována v závislosti na stáří rostliny, s blížícím se kvetením dochází k její akumulaci (Aukerman a Sakai, 2003). Rostliny overexprimující tuto miRNA kvetou dříve než WT, neboť *miR172* reprimuje translaci *AP2*-like (*APETALA2*-like) genů, které působí jako represory kvetení (Aukerman a Sakai, 2003), a to nezávisle na *CO* (Jung et al., 2007).

Tyto dvě miRNA regulují také tuberizaci u bramboru (Bhogale et al., 2014; Martin et al., 2009). Exprese *StmiR156* je posílena za dlouhodobní fotoperiody a klesá se stářím rostliny. Linie bramboru overexprimující *miR156* oproti kontrole vykazovaly posílené větvení prýtu způsobené vyšší aktivitou cytokininů díky zvýšené expresi *StLOG1* (*LONELY GUY1*) a *StCyclin D3.1* (cytokinin-responsive gene), dále snížení čerstvé hmotnosti kořenů, snížení hladiny *StSP6A* v listech, či nižší výnos hlíz za indukčních podmínek krátkého dne

(Bhogale et al., 2014). *StmiR156* brání rostlině brzkému přechodu z juvenilní fáze přes redukci hladiny *miR172* (Bhogale et al., 2014), která je naopak pozitivním regulátorem tuberizace (Martin et al., 2009). Redukce je možná přes interakci se StSPL9, který se váže na promotor *miR172* (Bhogale et al., 2014).

V bramboru se *StmiR172* vyskytuje nezávisle na délce dne, ale při krátkých dnech se mění její distribuce a hladina se významně zvyšuje v duřicím stolonu. *StmiR172* podporuje transkripci dalšího tuberigenního signálu *StBEL5* (viz dále) přes downregulaci *RAP1 (RELATED TO APETALA2 1)* a její overexprese alespoň částečně blokuje signalizaci zprostředkovanou PHYB. Zároveň PHYB negativně reguluje hladinu *StmiR172* ve stolonech za neindukčních podmínek dlouhého dne (Martin et al., 2009). Při overexpresi *StmiR172* dochází k dřívějšímu ukončení juvenilní fáze – je podpořeno kvetení a hlízy se tvoří i za neindukčního dlouhého dne (Martin et al., 2009).

2.2. BEL transkripční faktory

Mezi další významné tuberigenní signály patří BEL (BELLRINGER-like) TF patřící do třídy proteinů three-amino acid loop extension (TALE), která se vyskytuje napříč rostlinnou říší (Bürglin, 1997; Mukherjee et al., 2009). U *Arabidopsis* je známo 13 *BEL* genů (Rutjens et al., 2009). U žádného z nich nebylo dosud zjištěno zapojení v regulaci nástupu kvetení. TALE TF se vyznačují velmi vysokým stupněm sekvenční podobnosti v DNA-vazebné oblasti (tzv. homeodoména). Homeodoména je tvořena třemi α -helixy, které jsou složeny v kompaktní globulární strukturu, jejíž třetí helix se váže do velkého žlábků DNA cílových genů (Gehring et al., 1994). Této vazby se účastní také aminokyselinová smyčka tvořená prolinem, tyrosinem a prolinem, která se nachází mezi helixy I a II (Bürglin, 1997; Passner et al., 1999). *BEL* proteiny jsou charakterizovány dalšími třemi konzervovanými oblastmi: SKY-box (serin–lysin–tyrosin), který je lokalizován na N-konci, BELL doména a VSLTLGL motiv na C-konci (Passner et al., 1999; Bellaoui et al. 2001; Chen et al., 2003). SKY-box a BELL doména se účastní interakce s KNOTTED1-like homeobox (KNOX) proteiny, které také patří mezi TALE TF. Funkce VSLTLGL motivu zůstává nejasná (Bellaoui et al., 2001; Chen et al., 2003). Bellaoui et al. (2001) navrhuje, že by mohl být důležitý při výběru KNOX partnera. Interakce *BEL* a KNOX proteinů vede ke vzniku funkčního heterodimeru, který reguluje transkripci cílových genů (Smith a Hake, 2003; Chen et al., 2004; Liu et al., 2014). Interakce je selektivní, KNOX proteiny mají rozdílnou afinitu k jednotlivým *BEL* proteinům. Díky této specifitě mají různé *BEL*-KNOX

heterodimery odlišnou afinitu k různým cílovým genům (Smith et al., 2002), a tak jednotlivé heterodimery mohou hrát roli v různých regulačních dějích. BEL-KNOX heterodimery u *Arabidopsis* regulují expresi genů spojených např. s klíčením a časným vývojem semenáčku (Kim et al., 2013), s udržováním apikálního meristému prýtu (Rutjens et al., 2009), se stavbou květenství (Smith a Hake, 2003), ale také s morfologií listů (Kumar et al., 2007).

2.2.1. BEL transkripční faktory u bramboru

U bramboru nalezneme genovou rodinu *StBEL* se 13 členy a jedním pseudogenem. Známé *StBEL* proteiny byly rozřazeny do 5 fylogeneticky příbuzných skupin na základě jejich aminokyselinové sekvence (Sharma et al., 2014). Nejvíce prozkoumaný je *StBEL5* (Chen et al., 2004; Banerjee et al., 2006; Lin et al., 2013). Promotorová aktivita *StBEL5* detekovaná pomocí konstruktů *proStBEL5:GUS* (reportérový gen β -glukuronidáza) byla v bramboru fotoperiodicky citlivého poddruhu ssp. *andigena* zaznamenána v listové žilnatině, řapících, nově se tvořících hlízách, ve stolonech tuberizujících i netuberizujících rostlin a v kořenech (Banerjee et al., 2006). Aktivita GUS byla na příčném řezu řapíkem nejvyšší v cévních svazcích. Ve stonku, ani na jeho příčném řezu, aktivita nebyla detekována. Fotoperioda měla na promotorovou aktivitu v listech velmi malý vliv. Mírně silnější aktivita GUS byla pozorována u rostlin za dlouhého dne (Banerjee et al., 2006). Pokud je *StBEL5* overexprimován (*35S:CaMV:StBEL5*), dochází k tvorbě hlíz i za neindukčních podmínek (v případě ssp. *andigena* za dlouhého dne) (Banerjee et al., 2006).

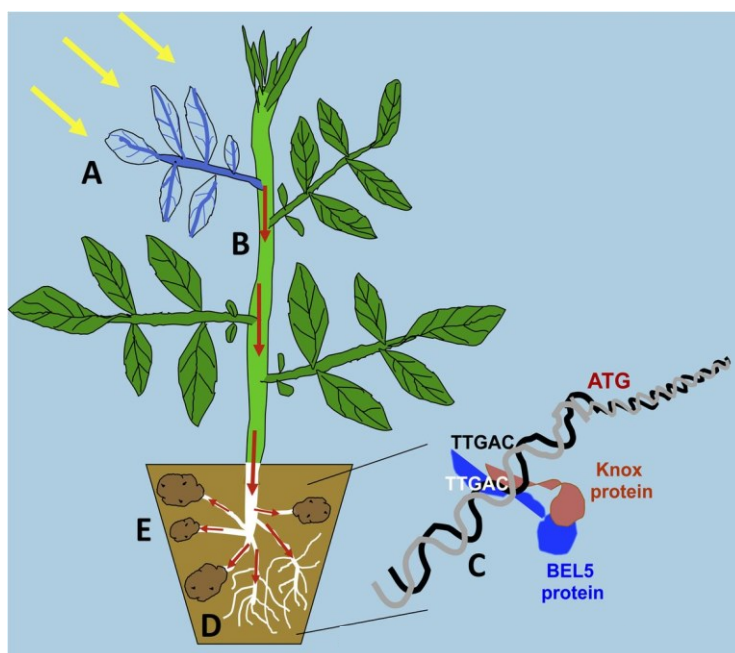
2.2.1.1. Transkripční faktor *StBEL5* u bramboru

StBEL5 mRNA funguje jako signál na dlouhou vzdálenost – vzniká v listech a je dopravována pomocí floému do stolonů (Banerjee et al., 2006) a kořenů (Lin et al., 2013). Transkripce v průvodních buňkách floému a pohyb jsou posíleny za indukčních podmínek krátkého dne (Chen et al., 2003; Banerjee et al., 2006; Lin et al., 2013), kdy dochází k vyššímu výnosu hlíz než u rostlin pěstovaných za neindukčních podmínek dlouhého dne (Banerjee et al., 2006). Pohyb floémem je zprostředkován RNA-vazebnými proteiny (polypyrimidine tract-binding; *StPTB1*, *StPTB6*) (Cho et al., 2015). Váží se na oblasti bohaté na cytosin a uracil v 3'UTR (untranslated region) transkriptu a zvyšují jeho stabilitu. Aktivita promotorů *StPTB1* a *-6* byla nalezena v průvodních buňkách floému stonku i řapíků (Cho et al., 2015). Pro studium mobility *StBEL5* mRNA byly vytvořeny linie bramboru

ssp. *andigena* s *GAS:StBEL5* konstruktem. Promotor *GAS* (galaktinolsyntáza) je aktivní téměř výhradně v malých listových žilkách (Ayre et al., 2003), a tak zajišťuje cílenou expresi v průvodních buňkách floému, čímž se navyšuje transportní pool *StBEL5* transkriptu. U těchto linií bylo pozorováno několikanásobně vyšší množství mutantní RNA v kořenech než ve stolonech, a to nezávisle na fotoperiodě. Transkript se hromadil více v kořenech sekundárních než v primárních (Lin et al., 2013). Vedle změn ve stolonu bylo pozorováno v souvislosti s navýšením exportního poolu *StBEL5* mRNA navýšení hladiny *StGA2ox1* RNA v listech i v kořenech, čímž autoři vysvětlují posílení růstu kořenů.

StBEL proteiny tvoří heterodimery s *KNOX* proteiny, prokázána byla interakce zejména s *POTH1* (*POTATO HOMEODOMAIN 1*) (Chen et al., 2003; Sharma et al., 2014). K expresi *POTH1* dochází v mnoha částech rostliny bramboru, např. ve vrcholech prýtu, listové žilnatině, nodech, kořenech a špičkách stolonů (Mahajan et al., 2012). mRNA *POTH1* je také mobilní floémem, na jeho 3'UTR (untranslated region) s cytosin/uracil (CU) motivy se váže *StPTB6* protein (Mahajan et al., 2012). Overexprese *POTH1* u linií bramboru ssp. *andigena* způsobila zvýšení počtu hlíz za krátkodenní i dlouhodobé fotoperiody (Rosin et al., 2003).

Heterodimer *StBEL5-POTH1* pozitivně ovlivňuje tvorbu hlíz i růst prýtu a kořenů pomocí regulace transkripce cílových genů spojených se syntézou fytohormonů a jejich signalizací. *StBEL5-POTH1* interaguje s cílovými geny prostřednictvím tandemových TTGAC motivů v promotorech (Obrázek 3) (Chen et al., 2004; Sharma et al., 2016). Aby došlo k ovlivnění transkripce cílového genu, musí se na TTGAC motivy navázat oba proteiny dimeru (Chen et al., 2004). Heterodimer se dokáže vázat na tandemové TTGAC motivy, které mají různou orientaci v promotorech cílových genů (Sharma et al., 2016). Při bodové mutaci v tomto motivu se *StBEL5-POTH1* komplex k promotoru nenaváže, a tak nedochází k ovlivnění transkripce cílového genu (Chen et al., 2004; Lin et al., 2013; Sharma et al., 2016). Tyto motivy obsahuje i promotor samotného genu *StBEL5*, díky kterým podléhá autoregulační smyčce, a tak protein *StBEL5* podporuje expresi sebe sama a i jiných *StBEL* (Lin et al., 2013; Sharma et al., 2016; Ghate et al., 2017).



Obrázek 3: Model vlivu mobilní *StBEL5* RNA na vývoj kořenů a hlíz. A: Iniciací transkripce *StBEL5* genu světlem (žluté šipky) v listové žilnatině a řapících (modrá). B: Pohyb *StBEL5* RNA (červené šipky), krátkodenní fotoperioda podporuje pohyb do špiček stolonů, pohyb do kořenů probíhá bez ohledu na délku dne. C: Předpokládaná zvýšená translace *StBEL5* v podzemních orgánech, vazba na KNOX proteinového partnera a následná aktivace a regulace transkripce vybraných genů prostřednictvím vazby na tandemový motiv TTGAC v promotoru. D: Zvýšení růstu kořenů díky regulaci transkripce fytohormonů a jejich hladin prostřednictvím *StBEL5*. E: Zvýšení růstu hlíz přes regulaci transkripce fytohormonů a jejich hladin prostřednictvím *StBEL5*. (Převzato a upraveno, Lin et al., 2013.)

Aktivita *StBEL5* je nejlépe prozkoumaná ve stolonu, kde v komplexu se svým KNOX partnerem reguluje tuberizaci přes ovlivnění transkripce cílových genů (Sharma et al., 2016), které jsou spojeny s metabolismem fytohormonů (auxinů, CK a GA) nebo s jejich transportem (Chen et al., 2003; Hannapel et al., 2013; Lin et al., 2013; Sharma et al., 2016). Např. reprimuje expresi genu *GA2ox1* (Chen et al., 2004), naopak zvyšuje transkripci *GA2ox1* (Lin et al., 2013), navyšuje hladinu transkriptu pro auxinový transportér *StPIN1* (Sharma et al., 2016). V kořenech zvyšuje množství transkriptu *YUCCA1a* a transkriptu *IPT (ISOPENTHENYL TRANSFERASE)* účastníci se syntézy cytokininů (Lin et al., 2013). Také overexprese *POTH1* vedla k negativní regulaci biosyntézy GA, a tak ke zvýšení výnosu hlíz (Rosin et al., 2003).

Komplex *StBEL5-POTH1* také reguluje expresi genů *StCDF1* a *StSP6A* ve stolonech (Sharma et al., 2016). U linií *GAS:BEL5* (navýšení transportního poolu *BEL5*) byla za krátkodenních podmínek navýšena exprese *StSP6A* ve stolonech i kořenech (Sharma et al., 2016). Heterodimer ve stolonech indukuje také expresi genů obsahující v promotoru tandmový motiv TTGAC, jejichž transkripce je indukována *StSP6A*, (*StPIN1*, *StPIN4*,

AGL8, *ARF8*, *FPF1*, *CDC2* a *StGA2ox1*). Tandemový motiv v promotoru obsahuje i StSP6A indukovaný *StSUT1*, ale jeho transkripce není ve stolonu StBEL5-POTH1 heterodimerem ovlivněna. Mezi další geny, jejichž expresi ovlivňuje jen StBEL5-POTH1 heterodimer, patří *StLOG1-3* a *StPIN2* (Sharma et al., 2016).

2.2.1.2. Transkripční faktory *StBEL11* a *StBEL29* u bramboru

Gen *StBEL5* je fylogeneticky velmi příbuzný s geny *StBEL11* a *-29* (Sharma et al., 2014). Jejich proteiny mají velkou podobnost v aminokyselinové sekvenci konzervovaných domén. Transkripty těchto tří *StBEL* genů tvoří více než 70 % z celkového množství *StBEL* transkriptů v bramboru (Sharma et al., 2014) a společně regulují tvorbu hlíz (Ghate et al., 2017). Promotorová aktivita *StBEL11/29* byla stanovena u ssp. *andigena* linií s *proStBEL11/29:GUS* ve střední žilce listu, řapících, stoncích a ve vodivých pletivech. Ve stolonech se slabá GUS aktivita objevila až po třech týdnech působení indukčních podmínek krátkého dne. Promotorová aktivita byla zesílena za krátkého dne v listové žilnatině, řapících a stolonech (Ghate et al., 2017).

Transkripty *StBEL11/29* se za krátkodenní fotoperiody akumulují v řapících, stoncích a stolonech (Ghate et al., 2017). Navýšení ve stolonech je dáno především jejich transportem z nadzemní části. Mobilita transkriptů byla potvrzena roubovacím experimentem, kde roub byl z *GAS:StBEL11/29* rostliny a podnož z WT. Transgenní transkript (odlišitelný pomocí qPCR [kvantitativní polymerázová řetězová reakce] se specifickými primery) byl detekován v sekundárních kořenech a špičkách stolonů (Ghate et al., 2017). Autoři předpokládají, že pohyb floémem je podpořen krátkodenní fotoperiodou a přítomností CU motivů v 3'UTR, umožňující vazbu StPTB proteinů s *StBEL11/29*, stejně jako v případě *StBEL5* (Cho et al., 2015).

Overexprese *StBEL11* (*35S:CaMV:StBEL11*) neovlivnila čerstvou hmotnost prýtů rostlin bramboru ssp. *andigena*, ale významně redukovala výnos hlíz (Ghate et al., 2017). Vnesený úsek *StBEL11 AS* (*35S:CaMV:StBEL11 AS*) také neměl vliv na čerstvou hmotnost prýtu, ovšem výnos hlíz byl za krátkodenních indukčních podmínek navýšen (Ghate et al., 2017). U hlíz nebyla pozorována změna morfologie oproti kontrole. S navýšením výnosu hlíz u linií s AS konstruktem korelovaly i zvýšené hodnoty transkriptu *StSP6A* ve stolonu (Ghate et al., 2017). Tento výsledek naznačuje, že exprese genu *StSP6A* je ovlivňována nejen StBEL5 (Sharma et al., 2016), ale i StBEL11/29, které by tak přes

ovlivnění exprese *StSP6A* negativně regulovaly tuberizační signální dráhu (Ghate et al., 2017).

2.2.1.3. Transkripční faktor *BEL11* u rajčete

Funkce *BEL11* byla zkoumána také u další rostliny z čeledi lilkovitých, rajčete (Meng et al., 2018). Studie byla zaměřena na vliv exprese *SIBEL11* při dozrávání plodů. Umlčení *SIBEL11* pomocí RNAi vedlo k vyššímu obsahu chlorofylu v nezralých plodech a inhibovalo, nebo alespoň zpozdilo, dozrávání plodů (Meng et al., 2018). V chloroplastech transgenních plodů byl zvýšený počet tylakoidů a také se vyskytovalo více chloroplastů v buňkách. Tyto výsledky naznačují, že se protein *SIBEL11* účastní regulace vývoje chloroplastů a syntézy chlorofylu v plodech rajčete (Meng et al., 2018). Tyto děje může ovlivňovat prostřednictvím cílových genů, které obsahují tandemový TTGAC motiv ve svých promotorových sekvencích. Mezi takové geny patří i geny kódující proteiny spojené právě s metabolismem chlorofylu a vývojem chloroplastů (Meng et al., 2018), např. je reprimována exprese *CAB* (chlorofyl a/b vazebný protein) a *TKN2* (homeobox protein knotted2), jejichž proteiny hrají roli ve vývoji chloroplastů, a *POR* (protochlorofylidoxidoreduktáza) (Meng et al., 2018), která je zapojena v syntéze chlorofylu (Buhr et al., 2008).

2.3. Experimentální materiál *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Kamýk s *BEL11* AS konstruktem

Transgenní linie bramboru ssp. *tuberosum* cv. Kamýk se sníženou hladinou transkriptu *StBEL11* byly odvozeny pomocí konstruktu s *StBEL11* AS vneseného pod 35S CaMV promotorem, a to v rámci diplomové práce A. Zounkové. Následně byl u vybraných linií ověřen tuberizační potenciál *in vitro* (Zounková DP, 2019). Dřívější nástup tvorby hlíz byl potvrzen jak na médiu s 8 % sacharózy, tak i na médiu s 6 % sacharózy. Mikrohlízky měly i vyšší průměrnou čerstvou hmotnost (Zounková DP, 2019; Zounková et al., 2021). Zounková DP (2019) také zjistila trend navýšení počtu mikrohlízek u transgenních rostlin.

Hladina *StBEL11* byla stanovena v listech a stolonech rostlin pěstovaných *ex vitro*. Vybrané linie mají redukovanou hladinu *StBEL11* v listech cca na $\frac{1}{3}$ hladiny u kontroly, ale ve stolonech nebyl zjištěn průkazný rozdíl od WT (Zounková et al., 2021). Vychýlení rovnováhy BEL TF snížením hladiny *StBEL11* v listech vede k podpoření tuberizace u *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Kamýk.

3. Materiál a metody

3.1. Rostlinný materiál

Lilek brambor *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* 7540 WT (divoký typ) a *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kamýk (WT a linie s ověřenou sníženou expresí genu *StBEL11* [linie 1, 10, 12 a 19]). Genotypy jsem získala ze sbírek kultur *in vitro* KEBR PŘF UK, transgenní linie odvodila Mgr. A. Zounková (Zounková DP, 2019).

3.2. Kultivace rostlin *in vitro*

3.2.1. Kultivační médium

Pro kultivaci rostlin *in vitro* jsem použila MS médium (Murashige a Skoog, 1962). Dle Tabulky 1 jsem do destilované vody přidala komerčně dodávané soli MS média (Murashige and Skoog basal medium, Sigma), roztok vitamínů (složení viz. Tabulka 2) a sacharózu (Lach-Ner, s. r. o.). Využívala jsem dva typy kultur – autotrofní bez přidané sacharózy v médiu a mixotrofní s 2 % sacharózy. Po rozpuštění složek média za stálého míchání na magnetické míchačce (IKA, RH basic) jsem upravila pH pomocí pH metru (pH meter model 410, Orion) a 0,1M roztoku KOH na hodnotu 5,75. Poté jsem roztok doplnila destilovanou vodou na výsledný objem. Do takto připraveného roztoku jsem přidala agar pro kultivaci rostlinných kultur (Sigma), koncentrace viz. Tabulka 1. Médium jsem za občasného míchání přivedla k varu pomocí mikrovlnné trouby a po 50 ml nalila do baněk. Běh jsem uzavřela dvojitou vrstvou alobalu a sterilizovala v autoklávu (Tuttnauer 2540 EK nebo PS20A, Chirana) při teplotě 121 °C, tlaku 220 kPa, po dobu 20 minut.

Rostliny cv. Kamýk, které jsem využila k *ex vitro* experimentům, jsem předpěstovala na stejném kultivačním médiu, ale s vyšším obsahem sacharózy (30 g.l⁻¹) v plastových nádobách (Phytacón Vessel, Sigma) s upraveným víčkem. Byl v něm vytvořen kruhový otvor o průměru 1,5 cm a provlečen molitan.

Tabulka 1: Koncentrace látek v kultivačním MS médiu.

Látka	Koncentrace látky v médiu
MS soli	4,33 g.l ⁻¹
Vitamíny (viz. Tabulka A)	5 ml.l ⁻¹
Sacharóza	0 / 20 g.l ⁻¹
pH upraveno na 5,75, doplněno na výsledný objem	
Agar	8 g.l ⁻¹

Tabulka 2: Složení roztoku vitamínů přidávaného do kultivačního MS média.

Látka	Koncentrace látky v zásobním roztoku [g.l ⁻¹]	Výsledná koncentrace látky v médiu [mg.l ⁻¹]
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. Kultivace a vegetativní množení rostlin

Pro vegetativní množení a udržování kultur jsem používala jak nodální segmenty, tak apex rostlin kultivovaných *in vitro*. Vysazovala jsem segmenty po pěti do 250ml Erlenmeyerových baněk. Ty jsem uzavírala v případě mixotrofních kultur dvojitou vrstvou alobalu (tloušťka alobalu 0,2 mm) a v případě autotrofních kultur prodyšným víčkem. Toto víčko bylo vytvořeno vyříznutím dvou kruhových otvorů (průměr 7 mm) do průhledné fólie a jejich přelepením prodyšnou lepicí páskou (Leucopor, Duchefa). Prodyšná víčka jsem uzavřela do velké Petriho misky, abych je mohla skladovat i v nesterilním prostředí, a vysterilizovala pomocí autoklávu na stejný program, jako kultivační médium (viz kapitola 3.2.1.).

Veškeré manipulace se sterilními kulturami, až na přesun rostlin do *ex vitro* podmínek, jsem prováděla v laminárním boxu (Heraeus Lamin Air TL 2448, Instruments) s použitím předem vysterilizovaných nástrojů (v horkovzdušném sterilizátoru Binder; po dobu 3 hodin, při 150 °C). Nástroje jsem během práce v laminárním boxu průběžně sterilizovala ponořením do 96% etanolu a opálením nad kahanem.

Rostliny v podmínkách *in vitro* jsem pěstovala v kultivační místnosti s ozářeností 160 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, s fotoperiodou 16 hodin a při teplotě 21/18 °C (den/noc).

3.3. Odvození stabilních transgenních linií *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* genotypu 7540 s BEL11 AS konstruktem

K transformaci rostlin *S. t. andigena* pěstovaných *in vitro* jsem použila *Agrobacterium tumefaciens* kmen C58C1 a midiprep plazmidu s úsekem kódujícím *StBEL11* v anti-sense orientaci (BEL11 AS) pod kontrolou konstitutivního 35S CaMV promotoru (Ghate et al., 2017; Zounková DP, 2019). Konstrukt nese v T-DNA vedle cílové sekvence i gen pro rezistenci ke kanamycinu, což umožňuje selekci transgenních rostlinných buněk. Plazmid jsme získali již dříve od profesora D. J. Hannapela z Iowa State University. Stejný plazmid byl použit i pro transformaci *S. t. tuberosum* cv. Kamýk (Zounková DP, 2019). Postup transformace, který je popsán v Zounková DP (2019) při transformaci cv Kamýk, jsem použila pro transformaci *S. t. andigena*.

3.3.1. Transformace *Agrobacterium tumefaciens*

Zásobní suspenzi kompetentních buněk *A. tumefaciens* skladovanou při -70 °C jsem získala od Mgr. V. Čermáka, Ph.D z KEBR PřF UK.

K 100 µl suspenze kompetentních buněk agrobakteria jsem napipetovala 3 µl midiprepu o koncentraci plazmidu 5 µg.µl⁻¹. Směs jsem nechala inkubovat 1 minutu na ledu. Poté jsem ji přepipetovala do elektroporační kyvety, sklepnula na dno a kyvetu vložila do elektroporátoru (Eporator, Eppendorf), který byl nastaven na hodnoty 2 kV a 25 µF. Byl aplikován elektrický pulz trvající 5,5 ms. Po aplikaci pulzu jsem k suspenzi přidala 1 ml YEB média (složení viz. Tabulka 3; Wise et al, 2006) a přenesla ji do zkumavky s bakteriologickou zátkou. Suspenze byla kultivovaná 3 hodiny na třepačce (ELMI) při 170 otáčkách za minutu a 28 °C.

Tabulka 3: Složení YEB média (Wise et al., 2006). Roztoky 1 a 2 byly připraveny zvlášť a spojeny po sterilizaci v autoklávu.

	Látka	Množství látky [g]
Roztok 1	Pepton	10
	Kvasničný extrakt	1
	Sacharóza	5
	NaCl	10
	rozpuštěno v destilované vodě, doplněno na objem 900 ml	
Roztok 2	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
	rozpuštěno v destilované vodě, doplněno na objem 100 ml	

Po tříhodinové kultivaci jsem kulturu transformovaného agrobakteria rozlila na tuhé LB médium (složení viz. Tabulka 4; Wise et al., 2006) se selekčními antibiotiky kanamycinem (Gibco) a rifampicinem (Serva) (koncentrace antibiotik viz. Tabulka 5). Selektce transformovaných buněk je možná díky rezistenci ke kanamycinu, kterou nese vnášený plazmid. Agrobakterium jsem na tomto médiu kultivovala 3 dny ve tmě, při teplotě 28°C. Poté jsem u vybraných kolonií ověřila přítomnost konstruktů (viz. kapitola 3.3.1.1.). Jednu z ověřených transgenních kolonií jsem za sterilních podmínek přenesla kličkou do Erlenmeyerovy baňky s 10 ml YEB média a antibiotiky (Tabulka 5). Nechala jsem kultivovat přes noc na třepačce při 170 otáčkách za minutu, při teplotě 28 °C. Takto připravenou suspenzi buněk *A. tumefaciens* jsem použila na transformaci rostlinného materiálu.

Tabulka 4: Složení LB média (Wise et al., 2006), sterilizace klávováním.

Látka	Množství látky v médiu [g.l⁻¹]
Pepton	10
Kvasničný extrakt	10
NaCl	10
Agar (Plant agar, Duchefa)	15

Tabulka 5: Koncentrace zásobních roztoků antibiotik. Kanamycin byl sterilizován filtrací (porozita 0,45 µm, Rotilabo).

Antibiotikum	Koncentrace zásobního roztoku [mg.ml ⁻¹]	Výsledná koncentrace v médiu [mg.l ⁻¹]	Skladování zásobního roztoku
Kanamycin sulfát (v destilované vodě)	50	50	4 °C
Rifampicin (v metanolu)	10	100	-20 °C

3.3.1.1. Ověření přítomnosti konstruktů v *A. tumefaciens* pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

Před samotnou transformací rostlinného materiálu jsem ověřila přítomnost konstruktů v kultivovaných bakteriích.

Malou část vybraných kolonií *A. tumefaciens* jsem pomocí sterilního párátko odebrala do mikrozkušavek typu Eppendorf s 250 µl DNase/RNase-free vody (příprava níže) a na vortexu nechala roztřepat na suspenzi. Takto připravené vzorky *A. tumefaciens* jsem použila jako templáty pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR).

Sterilní DNase/RNase-free voda se připravuje z ddH₂O, ke které se přidává diethylpyrokarbonát (DEPC; Sigma) o výsledné koncentraci 0,1 %. Za stálého míchání se inkubuje 15-20 hodin při laboratorní teplotě. Po té se v digestoři cca 4 hodiny vaří, aby se odstranily toxické produkty, a nakonec autoklávuje 40 minut při 121 °C a 210 kPa.

Pro detekční PCR jsem připravila premix (Tabulka 6) z FastStart PCR Master mixu (Roche), z DNase/RNase-free vody a primerů (Generi Biotech; sekvence níže). Pro detekci konstruktů pro BEL11 AS forward (fwd) primer zasahuje do oblasti 35S CaMV promotoru a reverse (rev) primer do oblasti BEL11 AS sekvence.

Sekvence (Zounková DP, 2019) fwd primeru: CTATCCTTCGCAAGACCCTT.

Sekvence (Zounková DP, 2019) rev primeru: ACATCATCATCATCAACAACACC.

Tabulka 6: Složení premixu pro ověření přítomnosti transgenu pomocí PCR.

Látka	Množství v 1 reakční směsi [μl]
FastStart Master mix	10
DNase/RNase-free voda	7
10 μM primer fwd	1
10 μM primer rev	1

Premix jsem rozpipetovala po 19 μl a do každé zkumavky připipetovala 1 μl templátu (suspenze *A. tumefaciens*). Připravila jsem také pozitivní kontrolu s vnášeným plazmidem a negativní kontrolu s DNase/RNase-free vodou místo templátu. Vzorky jsem pro amplifikaci umístila do PCR cycleru (Mastercycler epgradient S, Eppendorf) s programem uvedeným v Tabulce 7.

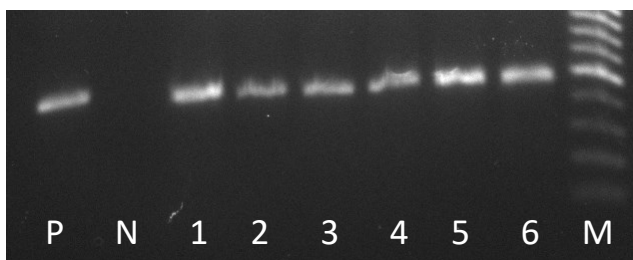
Tabulka 7: Program PCR cycleru pro ověření přítomnosti konstruktů.

HOLD	předehřívání víčka	95 °C	
Úvodní denaturace	8 minut	95 °C	
Denaturace	15 sekund	95 °C	32 cyklů
Nasedání primerů	15 sekund	57,5 °C	
Extenze	27 sekund	72 °C	
Závěrečná extenze	4 minuty	72 °C	
HOLD		10 °C	

3.3.1.2. Elektroforetická separace výsledných produktů PCR

Pro elektroforetickou separaci výsledných produktů PCR jsem použila 1,5% agarózový gel v 1x TAE pufru (0,04M TRIS-acetát, 1mM EDTA [kyselina etyléndiamintetraoctová]). Agarózu (Sigma) jsem rozpustila v mikrovlnné troubě, po zchladnutí asi na 60 °C jsem roztok nalila do elektroforetické vany a přidala interkalační fluorescenční barvivo ethidium bromid (EtBr; koncentrace zásobního roztoku 1 mg.ml⁻¹; 5 μl.100ml⁻¹ gelu). Ještě před utužením gelu jsem do elektroforetické vany umístila hřeben, který vytvořil jamky, do nichž jsem později nanasla vzorky. Ke každému vzorku jsem přidala 2 μl nanášecí barvičky 6x LD (DNA Loading Dye, Thermo Fisher) pro klesnutí vzorku do jamky a zviditelnění vzorku během elektroforetické separace. Po utužení jsem gel přemístila do elektroforetické vany, zalila 1x TAE puftrem, do jamek nanasla vzorky po 18 μl a molekulární marker o objemu 4 μl (Gene Ruler 100 bp Plus, Thermo Fisher). Separace proběhla při

stejným proudem a napětím 5 V.cm⁻¹. K dokumentaci jsem použila systém Kodak Gel Logic Imagine a software Carestream MI (ilustrační foto gelu na Obrázku 4).



Obrázek 4: Ilustrační foto gelu po elektroforetické separaci PCR produktů pro ověření přítomnosti konstruktů v *A. tumefaciens*. P - pozitivní kontrola (plazmid místo templátu); N - negativní kontrola (DNAse/RNAse-free voda místo templátu); 1-6 - označení ověřované kolonie; M - marker Gene Ruler 100 bp Plus.

3.3.2. Transformace listů *S. t. andigena* konstruktům nesoucím BEL11 AS

K transformaci jsem použila čtyřtýdenní rostliny z autotrofní i mixotrofní kultivace a suspenzi transformovaného *A. tumefaciens* (viz. 3.3.1.). Postupovala jsem dle v laboratoři zavedeného transformačního protokolu pro *S. t. tuberosum*, který vychází z Dietze et al. (1995). V laminárním boxu jsem napipetovala 50 μ l suspenze k 10 ml tekutého MS média s 2 % sacharózy (koncentrace MS solí stejná jako v kapitole 3.2.1.) ve sterilní plastové Petriho misce o průměru 9 cm. Za sterilních podmínek jsem odřízla vyvinuté listy z rostlin *S. t. andigena* napěstovaných *in vitro* a pomocí žiletky několikrát nařízla jejich střední žilku. List jsem položila adaxiální stranou na hladinu suspenze v Petriho misce. Ko-kultivace s transgenním agrobakteriím trvala tři dny ve tmě za laboratorní teploty.

3.3.2.1. Navození tvorby kalusu

Listy ko-kultivované s *A. tumefaciens* jsem pečlivě osušila sterilním filtračním papírem a opět adaxiální stranou je umístila na médium indukující tvorbu kalusu (callus inducing medium – CIM; složení Tabulka 8; Dietze et al., 1995) ve sterilních 4cm plastových Petriho miskách. Médium jsem vysterilizovala ve velké lahvi, po jeho zchladnutí asi na 60 °C jsem do něj přidala růstové regulátory (NAA – kyselina 1-naftyloctová; BAP – 6-benzylaminopurin) a antibiotika a rozlila po 30 ml do Petriho misek. Kultivace probíhala jeden týden v kultivační místnosti za stejných podmínek jako při udržovací kultivaci rostlin (kapitola 3.2.2.).

Tabulka 8: Složení média indukujícího kalus (CIM) (Dietze et al., 1995). Zásobní roztoky růstových regulátorů a antibiotik byly sterilizovány filtrací (porozita 0,45 µm, Rotilabo) a přidány do předem vyklávaného média. Před utužením bylo médium rozlito do plastových sterilních 4cm Petriho misek.

Látka	Množství v 1 l	Zásobní roztok [mg.ml ⁻¹]	Skladování zásobního roztoku
MS soli (Sigma)	4,33 g	-	-
D-glukóza bezvodá (Penta)	16 g	-	-
Myo-inositol (Sigma)	0,1 g	-	-
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O (Lachema)	2 mg	10	-
Agar	6 g	-	-
Vitamíny pro CIM a SIM	1 ml zásobního roztoku	složení Tabulka 9	-20 °C
Přidáno po sterilizaci média v autoklávu:			
NAA (Sigma)	5 mg	1	4 °C
BAP (Sigma)	0,1 mg	1	4 °C
Claforan (Taximed)	300 mg	100	-20 °C
Kanamycin	50 mg	50	4 °C

Tabulka 9: Složení zásobního roztoku vitamínů pro CIM a SIM.

Látka	Množství látky v zásobním roztoku [mg.ml ⁻¹]
Kyselina nikotinová	0,5
Pyridoxin-HCl	0,5
Thiamin-HCl	0,1
Glycin	2

3.3.2.2. Navození tvorby prýtu

Po týdnu kultivace na CIM jsem listy přenesla na médium indukující tvorbu prýtu (shoot inducing medium – SIM; složení Tabulka 10; Dietze et al., 1995). SIM médium jsem připravila stejným způsobem jako CIM (kapitola 3.3.2.1.). Dle zvoleného protokolu subkultivace na SIM probíhá první měsíc každý týden a poté je interval prodloužen na dva týdny. Ovšem kvůli eliminaci přerůstajícího *A. tumefaciens*, ke kterému dochází častěji v případě drobnějších listů *S. t. andigena* než u větších listů kulturních genotypů, jsem

subkultivaci na SIM prováděla každý týden. Během druhého měsíce kultivace na SIM jsem pro snížení rizika přerůstání agrobakteriem zvolila navíc vyšší koncentraci antibiotika claforanu (500 mg.l^{-1}) (cefotaximum, Taximed). Kultivace probíhala až dvanáct týdnů, kdy ještě regenerovaly nové prýty. Regenerované prýty jsem přenášela na MS médium (složení kapitola 3.2.1., s 3 % sacharózy a se selekčními antibiotiky – 300 mg.l^{-1} claforanu, 50 mg.l^{-1} kanamycinu).

Tabulka 10: Složení média indukujícího prýt (SIM) (Dietze et al., 1995). Růstové regulátory a antibiotika byly vysterilizovány filtrací (porozita $0,45 \mu\text{m}$, Rotilabo) a přidány do vysterilizovaného média.

Látka	Množství v 1 l	Zásobní roztok [mg.ml^{-1}]	Skladování zásobního roztoku
MS soli	4,33 g	-	-
D-glukóza bezvodá	16 g	-	-
Myo-inositol	0,1 g	-	-
Agar	6 g	-	-
Vitamíny pro CIM a SIM	1 ml zásobního roztoku	složení Tabulka 9	$-20 \text{ }^\circ\text{C}$
Přidáno po sterilizaci média v autoklávu:			
NAA	0,02 mg	1	$4 \text{ }^\circ\text{C}$
GA ₃ (Sigma)	0,02 mg	1	$4 \text{ }^\circ\text{C}$
Trans-zeatin ribozid (Sigma)	2 mg	1	$-20 \text{ }^\circ\text{C}$
Claforan	300 nebo 500 mg	100	$-20 \text{ }^\circ\text{C}$
Kanamycin	50 mg	50	$4 \text{ }^\circ\text{C}$

3.3.3. Ověření přítomnosti konstruktů v *S. t. andigena*

Pro ověření jsem jako templát použila vyizolovanou DNA z lístku regenerantů. Další postup přípravy reakcí na PCR a zvolený amplifikační program byly stejné jako při detekci konstruktů v *A. tumefaciens* (viz kapitola 3.3.1.1.). Jediný rozdíl byl v polymeráze – FastStart PCR Master mix jsem nahradila DreamTaq PCR Master mix (Thermo Scientific) a reakce míchala na ledu. Elektroforetická separace výsledných produktů PCR probíhala stejně jako při detekci konstruktů v *A. tumefaciens* (viz. kapitola 3.3.1.2.).

3.3.3.1. *Izolace DNA*

Lístek z regenerantu jsem za sterilních podmínek odebrala do sterilní mikroskopické Eppendorf. Odebraný rostlinný materiál jsem rozmělnila pomocí sterilní homogenizační tyčinky a přidala 400 μ l extrakčního pufru (200mM Tris [Carl Roth], pH 7,5, 250mM NaCl [Lach-Ner, s. r. o.], 25mM EDTA [Sigma], 0,5% SDS [sodium dodecyl sulfate; Sigma]). Suspenzi jsem nechala centrifugovat 5 minut při 15 800 rcf (Centrifuge 5415 D, Eppendorf), aby se usadily pevné zbytky rostlinného materiálu. Supernatant s DNA jsem odebrala do nové sterilní mikroskopické Eppendorf, přidala 300 μ l chloroformu, 5 minut protřepala na vortexu (Scientific industries) a poté opět nechala 5 minut centrifugovat (16 100 rcf). DNA zůstala v horní fázi oddělená vrstvou proteinů od organické fáze. Do nové sterilní mikroskopické Eppendorf jsem odebrala horní fázi, přidala k ní 300 μ l izopropanolu (uchovávan při -20°C), promíchala pipetou a nechala srážet DNA 10 minut na ledu. Po srážení jsem vzorky 5 minut centrifugovala (16 100 rcf). Odebrala jsem supernatant a pelet jsem nechala vyschnout na buničité vatě. K suchému peletu jsem přidala 100 μ l 2mM Tris (pH 8,5) a poklepáním prstem na mikroskopickou pelet rozpustila. Takto připravené vzorky jsem použila jako templát pro PCR.

3.4. Stanovení fotosyntetických charakteristik *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Kamýk s vneseným BEL11 AS konstruktem

Pro tuto část práce jsem použila kulturní brambor *S. t. tuberosum* kultivar Kamýk – WT a nezávislé transgenní linie 1, 10, 12 a 19 s BEL11 AS.

Rostliny jsem kultivovala 4 týdny na médiu s 3 % sacharózy v plastových nádobách s prodyšným víčkem (viz. kapitola 3.2.2.). Poté jsem je přesadila po jedné do květináče se sterilní zeminou smíchanou s perlitem a zasypala až po apex a nejmladší lístek rostliny. Rostliny v květináčích jsem pěstovala 3 týdny ve skleníku nebo v kultivačním boxu při ozáření $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiodě 16 hodin, teplotě 21/18 $^{\circ}\text{C}$ (den/noc) a vlhkosti vzduchu 60 %.

Pro stanovení fotosyntetických charakteristik listu bramboru jsem zvolila nedeštruktivní (rychlá kinetika fluorescenční indukce, rychlost čisté fotosyntézy) i destruktivní metody (obsah fotosyntetických pigmentů, antokyanů a nestrukturních rozpustných sacharidů a škrobu).

3.4.1. Fluorescence chlorofylu

V této práci jsem využila pouze měření rychlé kinetiky fluorescenční indukce. Rychlá kinetika fluorescenční indukce je dočasná fluorescence chlorofylu na tmě adaptovaných rostlin po vystavení krátkému (1-2 s) vybuzejícímu pulsu aktinického modrého světla. Křivka záznamu této fluorescence má typický tvar s několika určitými hladinami fluorescence chlorofylu označovanými zkratkami O, J, I a P. O (origin) je počátek křivky a odpovídá základní hladině fluorescence chlorofylu v temnostně adaptovaném stavu. Také je označován jako F_O . Hladiny J a I odpovídají krátkodobé rovnováze mezi excitační energií vstupující do fotosystému II (PS II) a odtékající energií. Tato rovnováha je způsobena redoxním stavem chinonů (Q) a následujících akceptorů elektronů, které přicházejí z PS II. Úrovně J a I nastávají po 2 a 30 ms po začátku světelného pulsu. Vrchol křivky (peak, P, F_P ; $F_P = F_M$) znázorňuje maximální fluorescenci chlorofylu dosaženou pro aktuální excitační záření. Vzestup fluorescence chlorofylu z úrovně O do P odráží postupnou akumulaci redukovaného chinonu Q_A (přehledně v Stirbet a Govindjee, 2011). Rychlou kinetiku fluorescenční indukce jsem měřila pomocí kapesního fluorimetru (FluorPen FP100) u předem na tmě adaptovaných listů – na 20 minut jsem je zabalila do alobalu. Světelný pulz jsem aplikovala na dvě různá místa plně vyvinutého listu mimo střední žilku. Z naměřených dat jsem vytvořila OJIP křivku a vypočítala maximální kvantový výtěžek fluorescence chlorofylu.

Maximální kvantový výtěžek fluorescence chlorofylu (F_V/F_M) popisuje stav reakčních center PSII, kde F_M je maximální fluorescence, označována také jako F_P , které se dosáhne ozářením na tmě adaptovaného listu krátkým silným světelným pulsem. F_V je variabilní fluorescence, která je rozdílem fluorescence maximální a počáteční (F_O).

3.4.2. Obsah fotosyntetických pigmentů

Pro stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů jsem z čepele plně vyvinutého listu vyřízla pomocí korkovrtu 3 terčíky, každý o ploše 27 mm². Z každé rostliny jsem zhotovila dva technické replikáty. Terčíky jsem vložila do 4 ml dimethylamidu kyseliny mravenčí (DMF) a uložila do tmy a 4 °C. Po týdenní inkubaci jsem ve skleněných kyvetách pomocí spektrofotometru (Evolution 201, program Thermo insight) změřila absorbanci jednotlivých eluátů při vlnových délkách 480, 647, 664 a 750 nm. Hodnoty absorbance při 750 nm (A_{750}) slouží ke korekci (odečtení od ostatních hodnot), protože různé látky

vyluhované společně s fotosyntetickými pigmenty částečně světlo absorbují i odrážejí, což tvoří tzv. pozadí. Z takto upravených hodnot jsem podle níže uvedených rovnic (Wellburn, 1994) vypočítala obsah chlorofylu *a* (Ch *a*), chlorofylu *b* (Ch *b*) a karotenoidů (C (x+c)).

Výpočet koncentrace pigmentů [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ DMF]:

$$\text{Ch } a = 11,65 \cdot A_{664} - 2,69 \cdot A_{647}$$

$$\text{Ch } b = 20,81 \cdot A_{647} - 4,53 \cdot A_{664}$$

$$C (x+c) = (1000 \cdot A_{480} - 0,89 \cdot \text{Ch } a - 52,02 \cdot \text{Ch } b) / 245$$

Přepočet množství pigmentů (P) na plochu [$\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$]:

$$(P \cdot \text{objem DMF v ml}) / (\text{plocha terčíku v mm}^2 \cdot \text{počet terčíků})$$

$$\text{Tedy: } (P \cdot 4) / (27 \cdot 3)$$

3.4.3. Obsah antokyanů

Pro stanovení obsahu antokyanů jsem postupovala podle protokolu Mancinelli et al. (1975) upraveného dle Kofroňová et al. (2020). Odebrala jsem celý plně vyvinutý list. Vzorky po mrazovém vysušení v lyofilizátoru (Lyovac GT 2, Finn-aqua) jsem zvážila, přidala k nim 1 ml metanolu okyseleného H_2SO_4 (o výsledném pH 1) a 10 minut je zahřívala v termobločku (The Cube Dry Bath, Cleaver) při 70 °C. Poté jsem vzorky umístila do tmy a 4 °C. Po dvou dnech jsem vzorky centrifugovala 10 minut při 16 100 rcf (Centrifuge 5415 D, Eppendorf), supernatant přepipetovala do čisté mikrozkušavky a na spektrofotometru změřila absorbanci při vlnových délkách 530 a 657 nm. Při vlnové délce 530 nm částečně absorbuje také chlorofyl, velikost této absorbance odpovídá třetinové absorbanci chlorofylu při vlnové délce 657 nm (Mancinelli et al., 1975). Naměřené hodnoty jsem vztáhla na hmotnost sušiny.

Přepočet absorbance na gram sušiny: $(A_{530} - 0,33 \cdot A_{657}) / \text{suchá hmotnost}$.

3.4.4. Rychlost čisté fotosyntézy

Rychlost čisté fotosyntézy (P_N) jsem stanovovala pomocí přístroje Licor (LI-6400 XT Portable Photosynthesis System, LI-COR). Velikost měřené listové plochy byla 6 cm^2 . Vstupní koncentrace oxidu uhličitého byla nastavena na 500 ppm a teplota listu na 21 °C. Pro měření jsem použila program TimedLamp, který umožňuje postupnou změnu ozářenosti při zachování vstupní koncentrace CO_2 . Sekvence ozářeností byla následující:

0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (10 minut), 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (5 minut), 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (5 minut), 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (5 minut), 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (5 minut) a 900 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (5 minut) fotosynteticky aktivního záření (PAR). U rostlin pěstovaných ve skleníku byla horní hranice ozáření 1100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR. Hodnoty P_N byly zaznamenávány každou minutu.

3.4.5. Stanovení obsahu nestrukturních rozpustných sacharidů

Na analýzu obsahu sacharidů jsem odebrala vzorky ze zdrojových plně vyvinutých listů, z mladých listů (velikost odpovídala méně než třetině plochy zdrojového listu), apexu, řapíků plně vyvinutých listů (3 řapíky na vzorek, délka 1,5 cm), kořenů, stolonů a případně i nově se vytvářejících hlíz. Ze stolonů jsem odebrala všechny přítomné nezelené špičky v délce 0,5 cm. Pokud byl stolon kratší, odebrala jsem ho celý. Z hlízek jsem vybrala jen ty do průměru přibližně 0,5 cm. Vzorky v 1,5ml zkumavkách typu Eppendorf jsem zmrazila v tekutém dusíku a do zpracování uchovávala při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Po mrazovém vysušení v lyofilizátoru jsem vzorky zvažila. Ke každému vzorku jsem přidala 0,5 ml 80% metanolu, nechala je 15 minut inkubovat v termobločku při $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté vysušila ve SpeedVacu (Concentrator plus, Eppendorf) při $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ a programu V-AL do sucha. Podle hmotnosti sušiny jsem ke vzorkům přidala odpovídající množství demineralizované MiliQ vody (viz. Tabulka 11). Zkumavky se vzorky jsem na 15 minut vložila do ultrazvukové lázně (35 kHz; Bandelin Sonorex, Maneko) a poté centrifugovala 10 minut při 16 100 ref. Supernatant jsem odsála pomocí jehly a stříkačky a přefiltrovala přes membránový filtr (porozita 0,45 μm , Chromservis) do nové zkumavky typu Eppendorf. Takto připravené vzorky jsem do měření na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu (HPLC) uchovávala při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zbylé pelety jsem skladovala při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně využila pro stanovení obsahu škrobu.

K analýze sacharidů jsem využila HPLC s refraktometrickou detekcí s těmito parametry: mobilní fáze MiliQ voda, isokratická pumpa SISW HPI-300 nebo Delta Chrom SDS 030, průtoková rychlost 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, předkolonka Shodex Pb^{2+} (SP-G), kolona Shodex Pb^{2+} (SP0810), teplota kolony $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, refraktometrická detekce pomocí detektoru Shodex RI-71. Sacharidy jsem identifikovala na základě srovnání retenčních časů a plochy píku signálu s příslušnými standardy o známé koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Sigma) v softwaru CLARITY (DataApex). U některých vzorků bylo z důvodu nečistot ve vzorku nutné přeměření na systému HPLC s předkolonou Shodex Ca^{2+} (SC-G) a kolonou Shodex Ca^{2+} (SC1011). Všechny ostatní parametry byly identické se systémem rozdělování na koloně Shodex Pb^{2+} .

Tabulka 11: Množství přidávané MiliQ vody ke vzorkům na analýzu obsahu sacharidů.

Hmotnost sušiny [mg]	Množství MiliQ vody ve vzorku na analýzu obsahu rozpustných sacharidů [ml]	Množství MiliQ vody ve vzorku na analýzu obsahu škrobu [ml]
< 5	0,2	0,2
5 – 10	0,3	0,3
10 – 20	0,5	0,3
20 – 30	1	0,5
30 <	1,5	1

Výpočet obsahu jednotlivých sacharidů na jednotku sušiny určitého pletiva [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]:

$$S_V / S_S \cdot V_{\text{MiliQ}} / dw;$$

kde S_V je plocha píku konkrétního sacharidu v chromatogramu konkrétního vzorku; S_S je plocha píku standardu příslušného sacharidu; V_{MiliQ} je objem MiliQ vody, která byla přidána ke vzorku; dw je suchá hmotnost vzorku.

3.4.6. Stanovení obsahu škrobu

Pro tuto analýzu jsem použila pelety z analýzy rozpustných sacharidů. Pro odstranění zbytků rozpustných sacharidů jsem pelety nejprve promyla – ke každému vzorku jsem přidala 1 ml MiliQ vody, na 15 minut vložila do ultrazvukové lázně, 10 minut centrifugovala při 16 100 rcf, supernatant odsála jehlou a stříkačkou – a tyto kroky jsem třikrát zopakovala. K promytým peletům jsem přidala 0,5 ml 0,1M Na-acetátového pufru (pH 4,5; okyseleno HCl). Vzorky jsem vložila do autoklávu a zapnula klávací cyklus shodný s cyklem na sterilizaci médií. Po vychladnutí vzorků na 4 °C jsem k nim přidala po 100 μl předem připraveného enzymatického roztoku amyloglukosidázy (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; 70 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$; Sigma) a α -amylázy (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; 30 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$; Sigma) v 0,1M Na-acetátovém pufru. Aby enzymy mohly rozštěpit vazby mezi glukózovými jednotkami škrobu, nechala jsem vzorky inkubovat v termobločku při 40 °C přes noc. Další den ráno jsem enzymy inaktivovala při 95 °C 5 minut. Kapalínu jsem odpařila ve SpeedVacu při 60 °C a programu V-AQ. Následující kroky probíhaly již stejně, jako při analýze obsahu rozpustných sacharidů – vysušené vzorky s přidáním odpovídajícím množstvím MiliQ vody (Tabulka 11) jsem vložila na 15 minut do ultrazvukové lázně, 10 minut centrifugovala při 16 100 rcf, supernatant odsála a přefiltrovala do nové zkumavky a uložila do -20 °C do měření na HPLC. Toto měření

probíhalo na systému se zařazenou předkolonou a kolonou Shodex Ca²⁺, obsah škrobu jsem stanovila jako obsah glukózy.

3.4.7. Stanovení exprese sacharózového transportéru *StSUT1* v listech

V rámci vyhodnocení fotosyntetických charakteristik v listu jsem stanovila i hladinu transkriptu *StSUT1* v listech. Transportér SUT1 je zodpovědný za nakládání sacharózy z apoplastu do floému. Transkripty *StBEL11* jsem stanovila v kořenech.

3.4.7.1. Izolace RNA

Nejen při práci s RNA, ale i s rostlinným materiálem určeným pro izolaci RNA, jsem používala jednorázové rukavice kvůli všudypřítomným RNázám. Listy a kořeny pro izolaci RNA byly po odběru zabaleny do alobalu, zváženy, ponořeny do tekutého dusíku a skladovány při -80 °C. Den před izolací jsem dala vysterilizované třecí misky s tloučky (zabaleny v alobalu a sterilizovány v sušárně, viz. kapitola 3.2.2.) vymrazit do -20 °C. V digestoři jsem do třecí misky nalila tekutý dusík, vsypala zmražené vzorky a pomocí tloučky zhomogenizovala. Následně jsem přidala 1 ml TRI-REAGENTU (Sigma) na 100 mg čerstvé hmotnosti vzorku a pokračovala v homogenizaci do úplného rozmražení. Suspenzi jsem přenesla do mikrozkuřavky typu Eppendorf. Pokud tekutiny bylo více než 1 ml, rozdělila jsem ji do dvou mikrozkuřavek. Vzorky jsem 5 minut protřepala na vortexu (Vortex-Genie 2, Scientific industries) a poté jsem je zcentrifugovala (4 °C, 10 minut, 13 523 rcf; Centrifuge 5424 R, Eppendorf). Supernatant jsem odebrala do nových mikrozkuřavek, přidala 350 µl chloroformu, promíchala na vortexu a nechala stát 5 minut na stole. Poté jsem vzorky centrifugovala (4 °C, 20 minut, 17 115 rcf). Po této centrifugaci došlo k rozdělení na 3 fáze – spodní vrstva byla organická fáze chloroformu a fenolu, ve vrchní vodné fázi byla RNA a mezi nimi proužek vysrážených proteinů. Opatrně jsem odpipetovala vrchní fázi tak, abych nenarušila vrstvu proteinů, do nové mikrozkuřavky a přidala izopropanol v poměru 1:1. Promíchala jsem vzorky na vortexu a nechala srážet RNA 20 minut na ledu. Následovala centrifugace (4 °C, 25 minut, 17 511 rcf) a odpipetování supernatantu. Pelet obsahující RNA jsem 2x promyla vychlazeným 75% etanolem a po posledním důkladném odsátí supernatantu jsem nechala otevřené mikrozkuřavky na sterilní buničité vatě, aby se pelet dosušil. Vysušený vzorek jsem rozpustila ve 40 µl DNase/RNase-free vody. Pokud jsem po homogenizaci vzorek rozdělila do dvou mikrozkuřavek, v tomto

kroku jsem ho spojila. Míru čistoty a koncentraci izolované RNA jsem určila spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) a programu ND 1000. Poměr absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm ($A_{260}:A_{280}$) určuje kontaminaci proteiny (optimum do hodnoty 2,0) a poměr $A_{260}:A_{230}$ udává kontaminaci solemi (optimum okolo hodnoty 2,2). Vzorky jsem dále uchovávala při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.7.2. *Ověření kvality izolované RNA pomocí denaturační elektroforézy*

V mikrovlnné troubě jsem rozpustila agarózu v 1x TAE pufru (vše v DNase/RNase-free vodě) tak, aby vznikl 1,5% agarózový roztok. Po vychladnutí asi na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ jsem jej nalila do vaničky, umístila hřeben a nechala ztuhnout. Poté jsem hřeben vytáhla a gel v elektroforetické vaně zalila 1x TAE pufrem.

Vzorky pro nanášení jsem připravila dle Tabulky 12 a promíchala pipetou. Objem přidané RNA jsem u každého vzorku zvolila tak, aby v přidaném objemu byla koncentrace RNA $5\text{ }\mu\text{g}$ (6,4-14 μl). Proto se vždy lišil i objem formamidu.

Tabulka 12: Složení vzorku na denuraci před elektroforetickou separací pro ověření kvality izolované RNA.

Látka	Objem
RNA	objem odpovídající $5\text{ }\mu\text{g}$
Formamid	alespoň 50 % výsledného objemu
EtBr	1 μl

Připravené vzorky jsem nechala denaturovat v termobločku při teplotě $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Poté jsem je přemístila na led na 10 minut, následně k nim přidala odpovídající objem 6x LD, promíchala pipetou a nanasla 18 μl směsi na gel. Elektroforetická separace probíhala při stejnosměrném proudu a napětí $5\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$.

3.4.7.3. *Syntéza cDNA metodou reverzní transkripce*

cDNA jsem syntetizovala pouze ze vzorků, které vykazovaly dostatečnou čistotu a kvalitu (viz. kapitola 4.3.). Nejprve jsem připravila reakční směsi o objemu 18 μl : 8 μg RNA jsem doplnila DNase/RNase-free vodou do 17 μl a přidala 1 μl oligo dT ($0,5\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$; Generi Biotech) pro iniciaci syntézy. Tuto směs jsem krátce stočila ve vychlazené centrifuze a nechala 5 minut denaturovat v termobločku při $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté jsem ji

přemístila na led a přidala 22 μl premixu (složení viz. Tabulka 13). Připravila jsem jeden vzorek navíc bez reverzní transkriptázy (RT-), který slouží jako kontrola pro vzorky, které neprošly DNázováním (Tabulka 13). Vzorky jsem vložila do PCR cycleru a pustila program uvedený v Tabulce 14. Po ukončení programu byla cDNA skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího použití.

Tabulka 13: Složení premixu pro syntézu cDNA metodou reverzní transkripce.

Látka	Objem/vzorek [μl]	Objem/RT- [μl]
DNase/RNase-free voda	7	7+3
5x reakční pufr (Thermo Scientific)	8	8
dNTP (10 mM) (Sigma)	4	4
RiboLock RNase inhibitor (40 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$; Thermo Scientific)	1	-
RevertAid H Minus reverzní transkriptáza (200 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$; Thermo Scientific)	2	-

Tabulka 14: Program PCR cycleru pro syntézu cDNA metodou reverzní transkripce.

HOLD	25 $^{\circ}\text{C}$
10 min	25 $^{\circ}\text{C}$
5 min	37 $^{\circ}\text{C}$
75 min	42 $^{\circ}\text{C}$
10 min	70 $^{\circ}\text{C}$
HOLD	4 $^{\circ}\text{C}$

3.4.7.4. Kvantitativní PCR (qPCR)

Kvantitativní PCR (qPCR) je založena na principu klasické PCR, ale v každém cyklu je zaznamenáván nárůst fluorescence měřením přímo v lightcycleru (LightCycler 480 Systém, Roche). Korelace intenzity fluorescence s množstvím amplikonu je možná díky použití fluorescenční barvičky, v tomto případě SYBR Green I, která emituje zelené záření po navázání do malého žlábků dvouřetězcové DNA.

Důležitým parametrem je tzv. C_T hodnota (Threshold Cycle), která reflektuje cyklus, při kterém došlo k nárůstu fluorescence nad práh pozadí. Díky tomuto parametru a koncentraci vstupní cDNA lze vytvořit standardní křivku. Z jejího sklonu lze určit účinnost

amplifikace (PCR efficiency) daného amplikonu (k vyhodnocení jsem použila program LightCycler 480 Software, Version 1.5). Křivka je potřeba k relativní kvantifikaci založené na vypočtené koncentraci kopií cílového genu vztažené na vypočítanou koncentraci vybraného referenčního transkriptu. Jako referenční gen musí být zvolen takový gen, jehož exprese by měla být u všech vzorků stejná. Nejčastěji se jedná o tzv. house-keeping geny. Pro *S. t. tuberosum* cv. Kamýk jsem použila *polyubiquitin (UBI)*, který se v naší laboratoři při práci se *S. t. tuberosum* osvědčil (Stupecká DP, 2018; Zounková DP, 2019). Pro vytvoření standardních křivek jsem připravila ředící řady cDNA (Tabulka 15) vybraného reálného vzorku.

Tabulka 15: Ředící řady cDNA pro qPCR.

Ředění cDNA	Značení relativní koncentrace ve vyhodnocovacím programu	
5x	10 µl cDNA do 40 µl RNase-free vody	5E5
50x	10 µl 5x cDNA do 90 µl RNase-free vody	5E4
500x	10 µl 50x cDNA do 90 µl RNase-free vody	5E3
5 000x	10 µl 500x cDNA do 90 µl RNase-free vody	5E2
50 000x	10 µl 5 000x cDNA do 90 µl RNase-free vody	5E1
500 000x	10 µl 50 000x cDNA do 90 µl RNase-free vody	5E0

Každý vzorek jsem připravila jako triplikát (technická opakování), a to jak pro vzorek v ředící řadě, tak pro testovaný vzorek. K jejich přípravě jsem vytvořila premix z kitu LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche) a DNase/RNase-free vody. Ten jsem rozdělila na dva dílčí premixy a do každého přidala odpovídající dvojici primerů (pro *UBI* nebo pro cílový transkript *StSUT1* nebo *StBEL11*; Tabulka 16). Primery byly navrženy tak, aby znemožnily amplifikaci úseku z DNA (exon-exon, příp. exon-exon junction), proto nebylo třeba vzorky před reverzní transkripcí ošetřit DNázou. Tyto primery se osvědčily již v předchozích diplomových pracích Stupecké (2018) a Zounkové (2019). Dílčí premixy s primery jsem po 28 µl rozpipetovala do mikrozkušavek. Počet mikrozkušavek odpovídal počtu biologických vzorků. Do každé mikrozkušavky jsem přidala 7 µl odpovídající cDNA z ředící řady. Reálné vzorky jsem připravila vždy ve dvou koncentracích (ředění 5x a 500x). Reálné vzorky i vzorky ředících řad jsem po 10 µl napipetovala do tří jamek

v destičce (LightCycler 480 Multiwell Plate 348; Roche). Destičku jsem zalepila fólií (LightCycler 480 Sealing Foil; Roche), která zamezuje odpařování vzorků při amplifikaci. Množství jednotlivých látek v jedné reakční směsi viz. Tabulka 16. Destičku jsem nechala centrifugovat 2 minuty při 538 ref (Eppendorf Centrifuge 5430) a vložila do lightcycleru. Použitý program je v Tabulce 17.

Tabulka 16: Složení reakční směsi pro qPCR a použité primery.

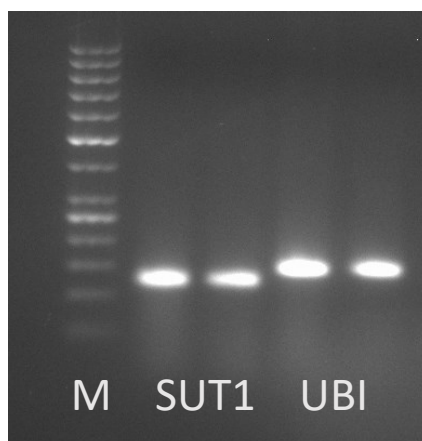
Látka	Množství v 1 reakční směsi [μ l]
LightCycler 480 SYBR Green I (2x koncentrovaný)	5
RNAse-free voda	1
Směs primerů fwd + rev (2,5 μ M)	2
cDNA	2
Gen	Sekvence primeru v 5'-3' orientaci
<i>UBI</i> (GI: 102599865)	fwd: CTTCAAATTTCTCTTTCAAGATGCAG
	rev: AGCCTTTGCTGATCCGGGG
<i>StSUT1</i> (GI: 102594012)	fwd: CCATTGCCGTTTTTCGTCGTC
	rev: TTTGCTGTTCTCATCCTGCCG
<i>StBEL11</i> (GI: 102577885)	fwd: CGCGCTTGGCTTTTCGAGC
	rev: TGGCTTCCATAGTCTAACTCTAG

Tabulka 17: Program LightCycleru pro qPCR.

Počáteční denaturace	5 minut	95°C	
Denaturace	10 vteřin	95°C	45 cyklů
Nasedání primerů	15 vteřin	58°C	
Extense	10 vteřin	72°C	
Křivka tání	10 vteřin	97°C	
	1 minuta	65°C	
	kontinuální	97°C	
Chlazení	1 minuta	40°C	

Data z LightCycleru jsem vyhodnotila pomocí programu LightCycler 480 Software, Version 1.5, který kvantifikuje transkript na základě poměru koncentrací – poměr koncentrací cílového transkriptu ku *UBI*. Průměrnou hodnotu u kontroly jsem stanovila rovnu 1. Poměry jednotlivých biologických vzorků transgenních linií jsou pak udávány jako změna vůči průměrné hodnotě tohoto poměru u kontrolní varianty.

Jestli se během amplifikace tvořil správný amplicon jsem ověřila pomocí elektroforetické separace (3% agarózový gel v 1x TAE pufru s EtBr). Jako marker velikosti jsem použila Gene Ruler 50 bp Plus (Thermo Fisher) (Obrázek 5). Amplicon *StSUT1* má délku 124 bp a *UBI* 148 bp. Amplicon *StBEL11* byl již dostatečně ověřen v diplomových pracích Stupecká (2018) a Zounková (2019).



Obrázek 5: Ilustrační foto gelu po elektroforetické separaci ampliconů pro ověření jejich délky. M - marker Gene Ruler 50 bp Plus; UBI - amplicon polyubiquitinu (148 bp); SUT1 - amplicon *StSUT1* (124 bp). Amplicony obou transkriptů ověřeny ze dvou nezávislých triplikátů v ředění 5x.

3.5. Stanovení růstových charakteristik *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Kamýk s vneseným BEL11 AS konstruktem

Pro morfologickou charakterizaci jsem využila rostliny předpěstované *in vitro* autotrofně. Vzrostlý vrchol rostlin s nejmladším lístkem jsem vysadila po jednom do 250ml Erlenmeyerovy baňky s 50 ml MS média bez sacharózy (viz. kapitola 3.2.1.) a uzavřela prodyšným víčkem. Rostliny jsem hodnotila po třítydenní kultivaci. Zjišťovala jsem tyto parametry: čerstvá hmotnost kořenů a prýtu, R/S poměr (čerstvá hmotnost kořenového systému / čerstvá hmotnost prýtu), plocha příčného řezu stonkem ve výšce 3 cm od báze a celková listová plocha. Pro elektronický záznam velikosti listové plochy a obvodu a plochy řezu stonkem jsem použila přístroj Epson Perfection V800 Photo (EPSON Scan) a příslušný program. Hodnocení takto zaznamenaných parametrů jsem provedla pomocí programu ImageJ (Fiji).

Od každé linie vč. kontroly (WT) jsem vyhodnotila alespoň 9 biologických replikátů. Část rostlin, kterou bylo nutné kultivovat kvůli eliminaci trásněnek na médiu s mospilanem (výsledná koncentrace 500 mg.l⁻¹; zásobní roztok sterilizován filtrací, přidán do

vysterilizovaného média), jsem kvůli zjištěné inhibici růstu nemohla zahrnout do hodnocení, proto jsem u linie 12 nakonec hodnotila pouze 5 rostlin.

Pro stanovení rychlosti růstu a větvení kořenů jsem využila protokol podle Lin et al. (2013). Kořenové kultury jsem založila z WT a transgenních linií (1, 10, 12 a 19), které byly předpěstovány 5 týdnů na MS médiu se 3 % sacharózy (viz. kapitola 3.2.1.). Do 100ml Erlenmeyerových baněk s 50 ml tekutého MS média se 3 % sacharózy (viz. kapitola 3.2.1.) jsem vložila 10 kořenových špiček o délce 1 cm. Tyto kultury jsem umístila na třepačku (50 otáček za minutu) a kultivovala 10 dní ve tmě při 25 °C. Po té jsem kořeny naskenovala, vyhodnotila větvení a pomocí programu ImageJ změřila jejich délku.

3.6. Zpracování dat

Grafy jsem vytvořila v programu Microsoft Office Excel 365, který jsem použila také pro vypočítání průměrů a středních chyb průměru. Data jsem statisticky vyhodnotila v programu NCSS 9 (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA). K porovnání experimentálních výsledků mezi souborem kontrolních rostlin a souborem rostlin mutantních jsem použila analýzu rozptylu ANOVA, One-Way Analysis of Variance, Dunnett's 2-sided (vs. control) nebo Kruskal-Wallis Z Test. Statisticky významné rozdíly jsem označila hvězdičkami dle hladiny významnosti: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ a (*) $p < 0,1$. Trend jsem ověřila na hladině významnosti $p < 0,15$ s označením ((*)).

4. Výsledky

Při studiu role transkripčního faktoru (TF) StBEL11 u bramboru jsem v rámci své diplomové práce pracovala se dvěma genotypy bramboru (*Solanum tuberosum*) – *S. t. ssp. andigena* genotyp 7540 a *S. t. ssp. tuberosum* cv. Kamýk. První část výsledků pojednává o odvození transgenních linií bramboru *ssp. andigena* s konstruktem *StBEL11* v antisense orientaci (BEL11 AS), jehož exprese by měla snížit hladinu transkriptu *StBEL11*. Takové linie by měly pomoci objasnit roli TF StBEL11 i u striktně krátkodenního genotypu, který je dominantně používán při studiu molekulárních mechanismů regulace nástupu tuberizace. K dispozici jsem měla také transgenní linie kulturního genotypu *ssp. tuberosum* cv. Kamýk, s již sníženou hladinou *StBEL11* transkriptu připravené Mgr. A. Zounkovou (Zounková DP, 2019). U čtyř vybraných transgenních linií s BEL11 AS konstruktem a kontrolního genotypu (WT) jsem hodnotila vybrané fotosyntetické a růstové charakteristiky (analýzy shrnuty v Tabulce 18). Hodnocením těchto charakteristik se zabývá druhá a třetí část výsledků.

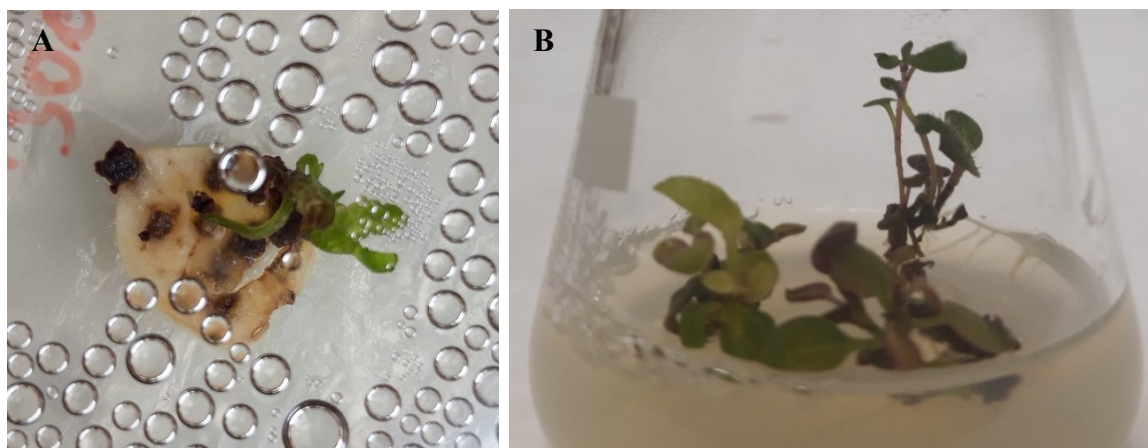
Tabulka 18: Přehled experimentů a provedených analýz. Pro analýzy prováděné v jednom experimentu byly použity stejné rostliny. Rostliny pro experimenty s názvem „box“ byly pěstovány v *ex vitro* podmínkách v kultivačním boxu.

	<i>in vitro</i>	skleník	box I	box II	box III
Transformace	<i>S. t. ssp. andigena</i> s <i>StBEL11</i> AS				
Fotosyntetické charakteristiky cv. Kamýk					
Fluorescence		x		x	x
Fotosyntetické pigmenty			x	x	x
Antokyany				x	x
Rychlost čisté fotosyntézy		x		x	x
Sacharidy				x	x
Morfologie cv. Kamýk					
Čerstvá váha a R/S poměr	x				
Plocha listu a řezu stonkem	x				
Kořeny	x				
Hladina transkriptů u cv. Kamýk					
<i>StSUT1</i> v listech			x		
<i>StBEL11</i> v kořenech			x		

4.1. Transformace *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* genotyp 7540 s BEL11 AS konstruktem

Solanum tuberosum ssp. *andigena* na našem pracovišti ještě nikdo netransformoval. Mým úkolem tedy bylo nejprve optimalizovat transformační protokol využívající *Agrobacterium tumefaciens* pro tento genotyp (kapitola 3.3.). Transformaci *S. t. andigena* BEL11 AS konstruktem (kapitola 3.3.) jsem provedla třikrát. Při první transformaci regenerovaly nové prýty, ale po měsíci kultivace na médiu indukujícím prýt (SIM; kapitola 3.3.2.2.) je i přes přítomnost antibiotik v médiu přerostla infekce (nejspíše agrobakterium). Z tohoto pokusu se mi tedy nepodařilo odvodit žádnou transgenní linii. Při dalším pokusu jsem listy po ko-kultivaci s transgenním *A. tumefaciens* pečlivěji osušila pomocí sterilního filtračního papíru, aby se množství agrobakteria na listech ještě více snížilo. Po měsíci kultivace na SIM, kdy lze podle protokolu pro ssp. *tuberosum* subkultivační interval prodloužit z jednoho týdne na dva, jsem zvýšila koncentraci antibiotika claforanu v médiu na 500 mg.l^{-1} a ponechala interval subkultivace jeden týden. I přes tato opatření bylo mnoho nově vzniklých prýtů, ale i listů s tvořícími se kalusy, přerůstáno nejspíše opět agrobakteriem. Tuto infekci se mi podařilo odléčit omýváním infikovaných prýtů a listů s kalusy v roztoku claforanu o koncentraci 1000 mg.l^{-1} . Získala jsem více než 140 vytvořených základů prýtu (Obrázek 6). Z této druhé transformace se mi nakonec podařilo získat 32 stabilně transformovaných nezávislých linií (seznam linií viz. Tabulka 19; označení 11-1/X). Z poslední transformace, která byla provedena podle protokolu použitého u druhé transformace, jsem odvodila 11 stabilně transformovaných nezávislých linií (viz. Tabulka 19; označení 11-2/X). Nižší počet regenerantů byl způsoben přítomností jiné infekce, která nebyla citlivá na claforan, a to již při kultivaci na médiu indukujícím kalus (CIM; kapitola 3.3.2.1.), kdy jsem materiál pravděpodobně kontaminovala během sušení listů po ko-kultivaci s transgenním agrobakteriem. Tuto infekci jsem odléčila omytím v roztoku ampicilinu o koncentraci 500 mg.l^{-1} a nanesením $30 \mu\text{l}$ zásobního roztoku antibiotika (100 mg.ml^{-1}) na Petriho misku s 30 ml nového CIM.

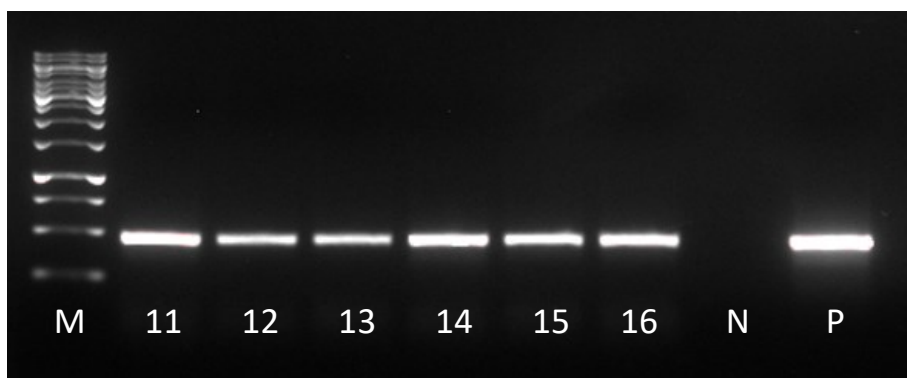
U regenerantů jsem přítomnost vnášeného konstruktů ověřila pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a elektroforetické separace PCR produktů (viz. kapitoly 3.3.1.1. a 3.3.1.2.; Obrázek 7). Všechny testy linií na přítomnost konstruktů byly pozitivní. V současnosti probíhá kultivace a množení linií z obou úspěšných transformací v podmínkách *in vitro* a postupně probíhá odběr vzorků na stanovení hladin cílového *StBEL11* transkriptu.



Obrázek 6: Ilustrační fotografie regenerovaných prýtů a rostliny *S. t. andigena* s vneseným BEL11 AS konstruktem. A: kalus a regenerovaný základ prýtu po 6 týdnech na médiu indukujícím tvorbu prýtu (SIM); B: regenerované základy prýtů a nová rostlina na MS médiu se selekčními antibiotiky (kapitola 3.3.2.2.).

Tabulka 19: Přehled odvozených transgenních linií *S. t. andigena* s ověřenou přítomností BEL11 AS konstruktu. + - přítomný konstrukt; červeně je označená linie, která špatně rostla, a tak byla vyřazena z experimentu.

Označení linií ze druhé transformace	Přítomnost konstruktu	Označení linií ze druhé transformace	Přítomnost konstruktu	Označení linií ze třetí transformace	Přítomnost konstruktu
11-1/1	+	11-1/17	+	11-2/1	+
11-1/2	+	11-1/18	+	11-2/2	+
11-1/3	+	11-1/19	+	11-2/3	+
11-1/4	+	11-1/20	+	11-2/4	+
11-1/5	+	11-1/21	+	11-2/5	+
11-1/6	+	11-1/22	+	11-2/6	+
11-1/7	+	11-1/23	+	11-2/7	+
11-1/8	+	11-1/24	+	11-2/8	+
11-1/9	+	11-1/25	+	11-2/9	+
11-1/10	+	11-1/26	+	11-2/10	+
11-1/11	+	11-1/27	+	11-2/11	+
11-1/12	+	11-1/28	+		
11-1/13	+	11-1/29	+		
11-1/14	+	11-1/30	+		
11-1/15	+	11-1/31	+		
11-1/16	+	11-1/32	+		



Obrázek 7: Ilustrační fotografie gelu po elektroforetické separaci PCR produktů pro ověření přítomnosti vnášeného BEL11 AS konstruktů v *S. t. andigena*. M - marker Gene Ruler 1 kbp (Thermo Fischer); 11-16 - označení ověřovaných transgenních BEL11 AS linií (označení zkráceno z 11-1/11 až 11-1/16); N - negativní kontrola (DNase/RNase free voda místo templátu); P - pozitivní kontrola (plazmid místo templátu).

4.2. Fotosyntetické charakteristiky transgenních linií *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Kamýk se sníženou hladinou *StBEL11*

S ohledem na skutečnost, že se u odvozených linií *S. t. andigena* dosud nepodařilo stanovit ovlivnění exprese *StBEL11*, zejména kvůli zdlouhavému procesu odvození nových transgenních linií, jsem pro stanovení fotosyntetických, růstových a morfologických charakteristik použila pouze již odvozené a ověřené linie kulturního bramboru. U linií vybraných pro experimenty byla v produkčním listu hladina transkriptu *StBEL11* snížena na cca $\frac{1}{3}$ hladiny kontroly a byl zjištěný zvýšený tuberizační potenciál (Zounková DP, 2019; Zounková et al., 2021).

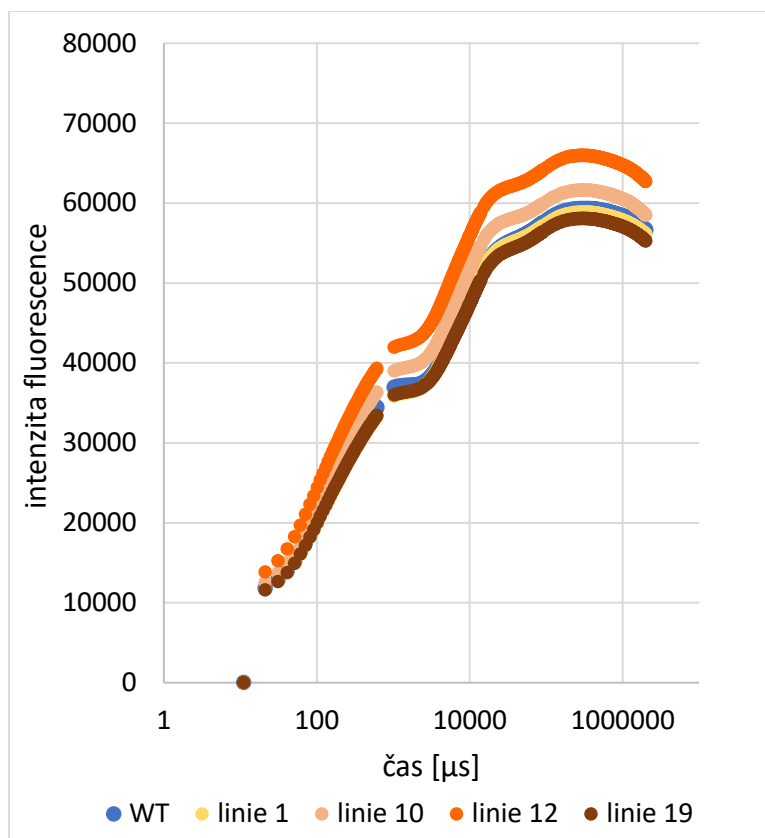
Rostlinný materiál jsem nejprve pěstovala ve skleníku, ale na další experimenty jsem rostliny umístila do kultivačního boxu (parametry viz kapitola 3.4.). Pěstování v boxu jsem zvolila z důvodu kontrolovatelných podmínek i za cenu nižšího možného počtu biologických replikátů kvůli omezenému prostoru. Rostlinný materiál v experimentu box I jsem sdílela s Mgr. A. Zounkovou a byl primárně určen na jiné analýzy. Materiál mi tedy sloužil pro ověření některých metodik a je vyhodnocený pouze orientačně. V experimentu box II jsem stanovila již všechny vybrané charakteristiky, ale mohla jsem napěstovat pouze WT a jednu transgenní linii. Experiment box III byl již úplný s kontrolním genotypem a čtyřmi nezávislými transgenními liniemi a to včetně linie 12, která byla vyhodnocena jako vhodný materiál až v průběhu experimentů.

4.2.1. Rychlá kinetika fluorescenční indukce

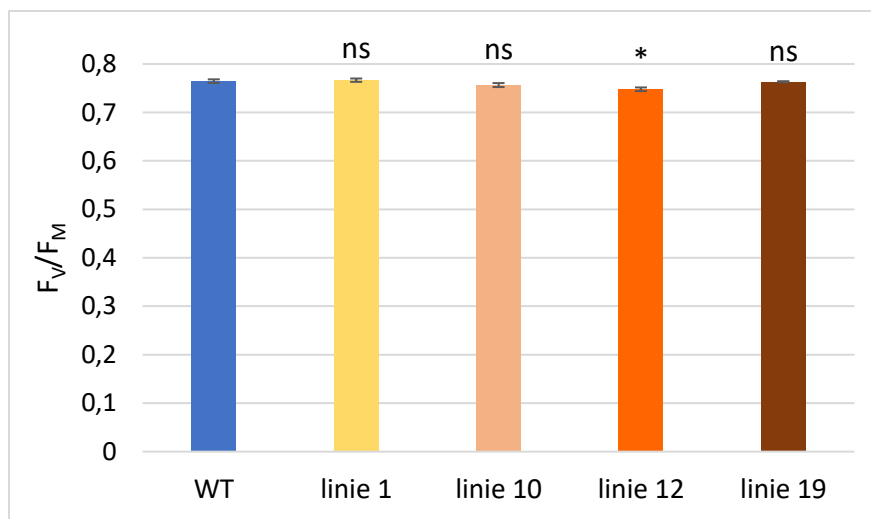
Z fluorescenčních charakteristik jsem hodnotila rychlou kinetiku fluorescenční indukce, tzv. OJIP křivku, a stanovila jsem maximální kvantový výtěžek fluorescence chlorofylu (F_V/F_M). Měření jsem provedla u rostlin pěstovaných ve skleníku (WT, linie 1, 10 a 19) a u rostlin pěstovaných v kultivačním boxu v experimentech box II (WT a linie 1) a box III (WT, linie 1, 10, 12 a 19).

Jak můžeme na Grafu 1 vidět, OJIP křivka má u kontroly (WT) i všech testovaných linií normální tvar. Tvar křivky nebyl v jednotlivých experimentech výrazně odlišný. U zdravých rostlin nevystavených stresu může F_V/F_M dosáhnout hodnoty až kolem 0,8 (Björkman a Demming, 1987). Rostliny všech genotypů pěstované ve skleníku dosáhly hodnot do 0,68, což je hodnota relativně nízká, a proto jsem se rozhodla brát výsledky ze skleníku pouze jako orientační. Naproti tomu všechny genotypy pěstované v kultivačním boxu se k optimální hodnotě blížily (okolo 0,75). Hodnoty F_V/F_M u linií sledovaných v experimentu box III (Graf 2) nebyly statisticky významně odlišné od kontroly. Podobné výsledky byly získány i u transgenních linií v experimentu box II. Jediný signifikantní rozdíl jsem zjistila při experimentu box III u linie 12, kde došlo k poklesu hodnoty F_V/F_M .

Výsledky neukázaly, že by exprese *StBEL11* AS způsobila systematické ovlivnění sledovaných fotosyntetických parametrů (OJIP křivka, maximální kvantový výtěžek fluorescence chlorofylu). Všechny linie při kultivaci v boxu měly vitální fotosyntetický aparát a byly vhodné pro hodnocení dalších fotosyntetických charakteristik.



Graf 1: OJIP křivka produkčního listu rostlin bramboru cv. Kamýk. WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny v kultivačním boxu; experiment box III. Počet opakování n = 5-7 (každé opakování je průměrem 2 technických replikátů z jedné rostliny).

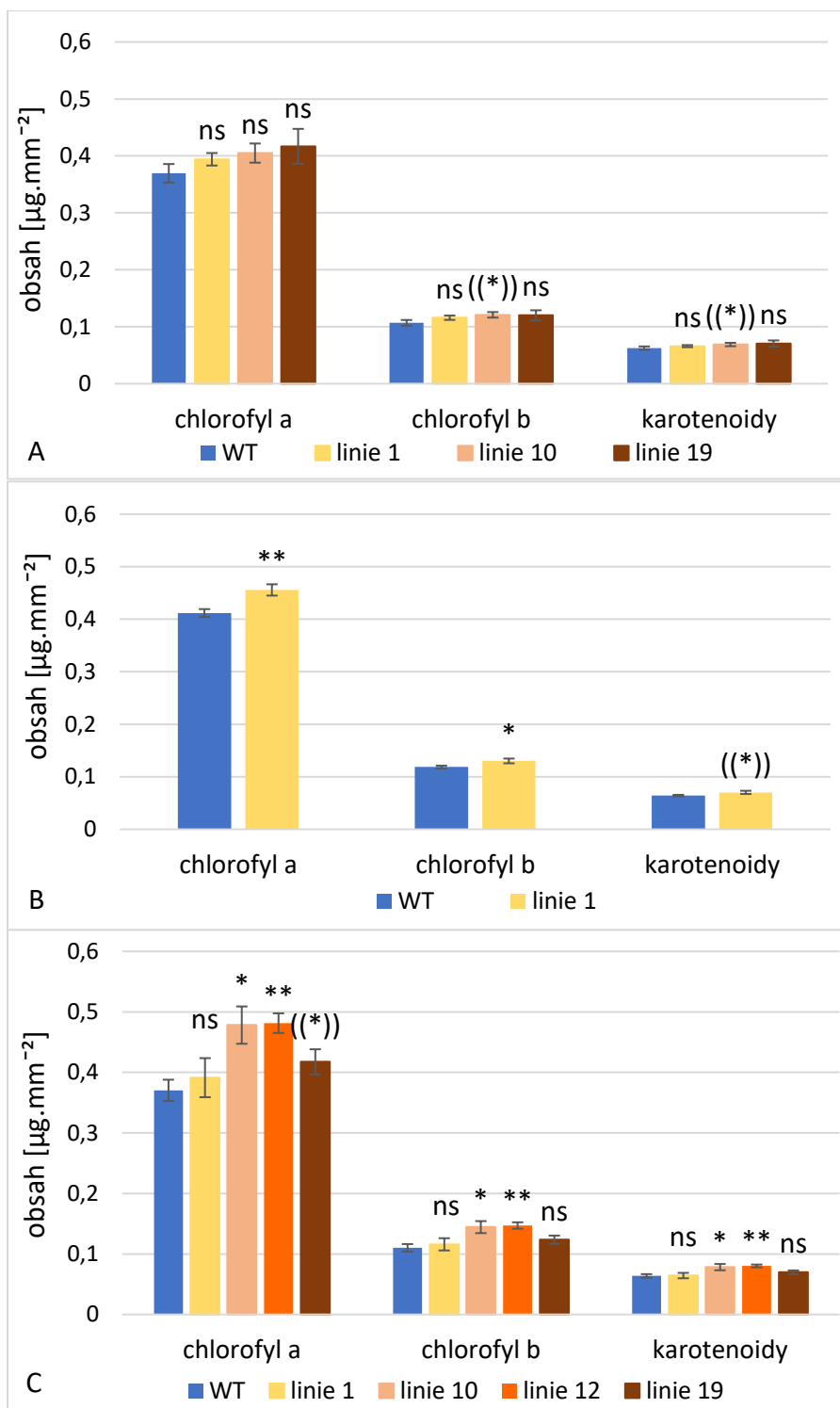


Graf 2: Maximální kvantový výtěžek fluorescence chlorofylu (F_v/F_m) produkčního listu rostlin bramboru cv. Kamýk. Parametr F_v/F_m je poměr variabilní fluorescence $F_v = F_m - F_o$ a maximální fluorescence F_m . WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny v kultivačním boxu; experiment box III. Počet opakování n = 5-7 (každé opakování je průměrem 2 technických replikátů z jedné rostliny). Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control). Statisticky významný rozdíl je označen hvězdičkou dle hladiny významnosti: * $p < 0,05$; ns - statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.

4.2.2. Obsah fotosyntetických pigmentů v listech

Vzorčky na stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů (chlorofyl *a* [Ch *a*], chlorofyl *b* [Ch *b*] a karotenoidy) jsem odebrala z plně vyvinutých listů rostlin pěstovaných v podmínkách *ex vitro* v kultivačním boxu z experimentů box I (WT, linie 1, 10 a 19), box II (WT a linie 1) a box III (WT, linie 1, 10, 12 a 19). Obsah jednotlivých pigmentů u kontroly byl podobný ve všech třech experimentech. V experimentu box I (Graf 3A) se hodnoty transgenních linií statisticky významně nelišily od kontroly, kromě linie 10, u které bylo navýšení Ch *b* a karotenoidů statisticky průkazné na hladině $p < 0,15$. U ostatních transgenních linií a všech měřených pigmentů byl ale patrný trend k navýšení oproti kontrole (bez statisticky významných rozdílů). Experiment box II přinesl zvýšení hodnot obsahu Ch *a* a Ch *b* a trend ke zvýšení obsahu karotenoidů u linie 1 (Graf 3B). Ačkoli signifikantní navýšení obsahu fotosyntetických pigmentů u linie 1 nebylo v experimentu box III potvrzeno (Graf 3C), došlo v něm k signifikantnímu zvýšení obsahu všech tří pigmentů u linií 10 a 12 a k trendu navýšení Ch *a* u linie 19.

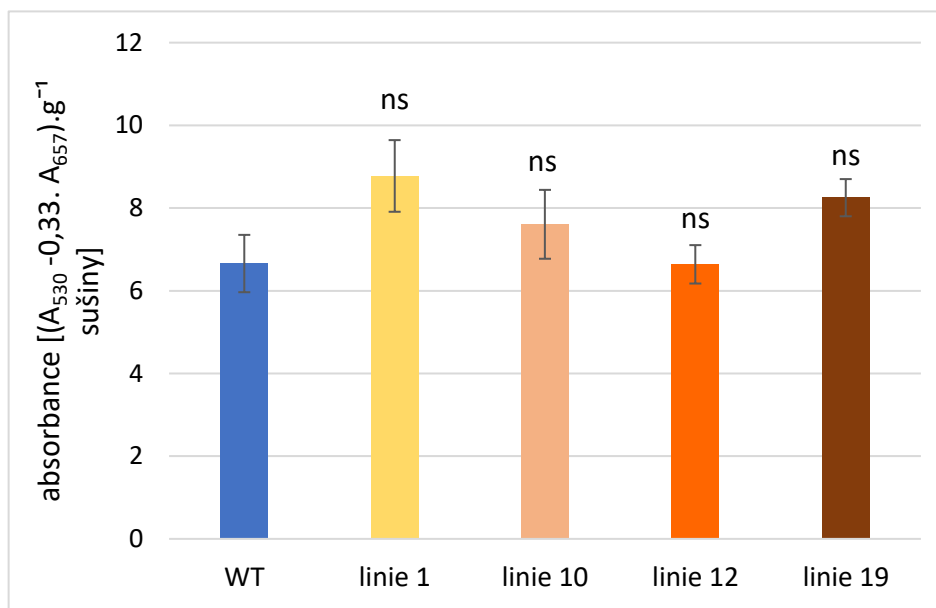
Výsledky naznačují, že by u všech sledovaných linií mohl být navýšen obsah fotosyntetických pigmentů, i když jejich hladiny kolísají. Pro potvrzení by bylo třeba experiment zopakovat, ideálně s větším počtem rostlin.



Graf 3: Obsah fotosyntetických pigmentů v produkčním listu bramboru cv. Kamýk. A: experiment box I; B: experiment box II; C: experiment box III. WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny v kultivačním boxu. Počet opakování n = 4-8 (každé opakování je průměrem 2 technických replikátů). Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Kruskal-Wallis multiple-comparison Z-value test). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami dle hladiny významnosti: ** p<0,01; * p<0,05; ((**)) p<0,15; ns - statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.

4.2.3. Obsah antokyanů v listech

Obsah antokyanů jsem stanovila v produkčních listech rostlin pěstovaných v podmínkách *ex vitro* v kultivačním boxu – box II a box III. Výsledky neukázaly na statisticky významnou změnu v obsahu antokyanů u BEL11 AS linií oproti kontrole ani v jednom experimentu, zejména kvůli velkému rozptylu naměřených hodnot jak u kontroly, tak u jednotlivých transgenních linií (Graf 4).

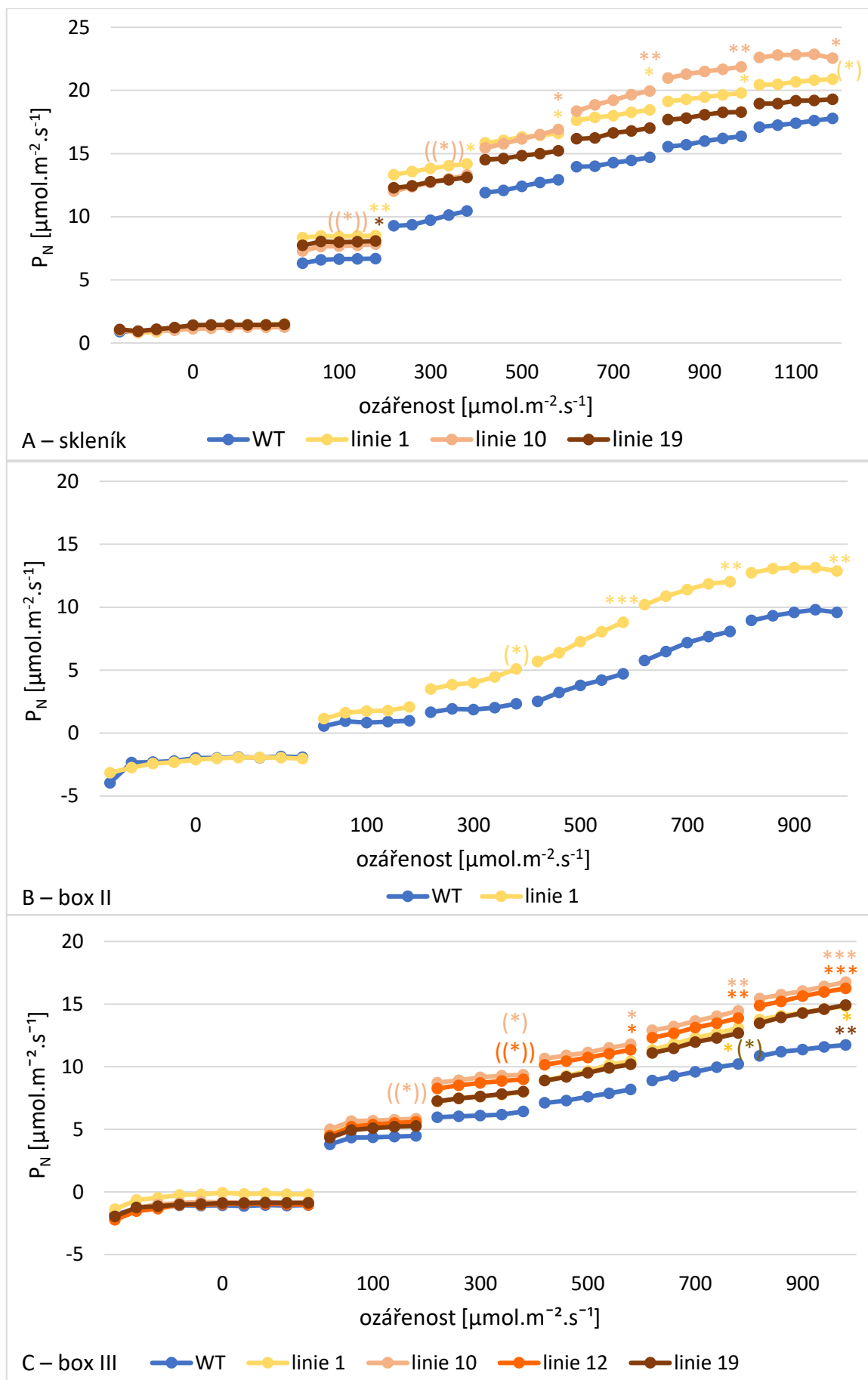


Graf 4: Obsah antokyanů v produkčních listech rostlin bramboru cv. Kamýk. WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny v kultivačním boxu; experiment box III. Počet opakování n = 5-7 (každé opakování je průměr 2 technických replikátů). Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control); ns - statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.

4.2.4. Rychlost čisté fotosyntézy

U rostlin pěstovaných ve skleníku a v kultivačním boxu (experimenty box II a box III) jsem změřila rychlost čisté fotosyntézy (P_N) za různé ozáření. Ozáření se pohybovala v rozpětí 0-1100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fotosynteticky aktivního záření (PAR) u rostlin ze skleníku, resp. 0-900 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR u rostlin z kultivačního boxu kvůli odlišným ozářením během kultivace. Rychlost čisté fotosyntézy se u transgenních linií oproti kontrole zvyšovala postupně (Graf 5), mírně již při ozáření 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR. Trend vzrůstající P_N se zvyšující se ozářeními přetrvával až k nejvyšší použité ozáření, kde P_N byla nejvyšší, a to pro všechny sledované genotypy. Statisticky významné rozdíly oproti kontrole byly ve všech experimentech z kultivačního boxu u všech transgenních linií, a to zejména u nejvyšších ozáření.

Rostliny všech analyzovaných linií exprimující *StBEL11* AS (kromě linie 19 pěstované ve skleníku) vykazaly zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy. U linií 10 a 12 z experimentu box III, které měly nejvyšší obsah fotosyntetických pigmentů, jsem naměřila i nejvyšší P_N . Trend navýšení P_N byl patrný i při nejnižších ozářeních 100 a 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR.



Legenda ke Grafu 5 je na následující straně.

Graf 5: Rychlost čisté fotosyntézy (P_N) v závislosti na množství fotosynteticky aktivního záření (PAR) u produkčního listu bramboru cv. Kamýk. A: skleník; B: experiment box II; C: experiment box III. WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny. Počet opakování $n = 4-7$. Měření probíhalo při ozáření 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR 10 minut a dále v sekvenci 100, 300, 500, 900 a 1100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR po 5 minutách, u rostlin z kultivačního boxu do 900 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR. Hodnoty byly zaznamenávány každou minutu. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control; statistické hodnocení bylo provedeno jen pro poslední záznam z každé ozáření). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami dle hladiny významnosti: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; (*) $p < 0,1$; ((*)) $p < 0,15$. Hvězdičky jsou odlišeny barevně podle barev linií. Absence * značí statisticky nevýznamný rozdíl.

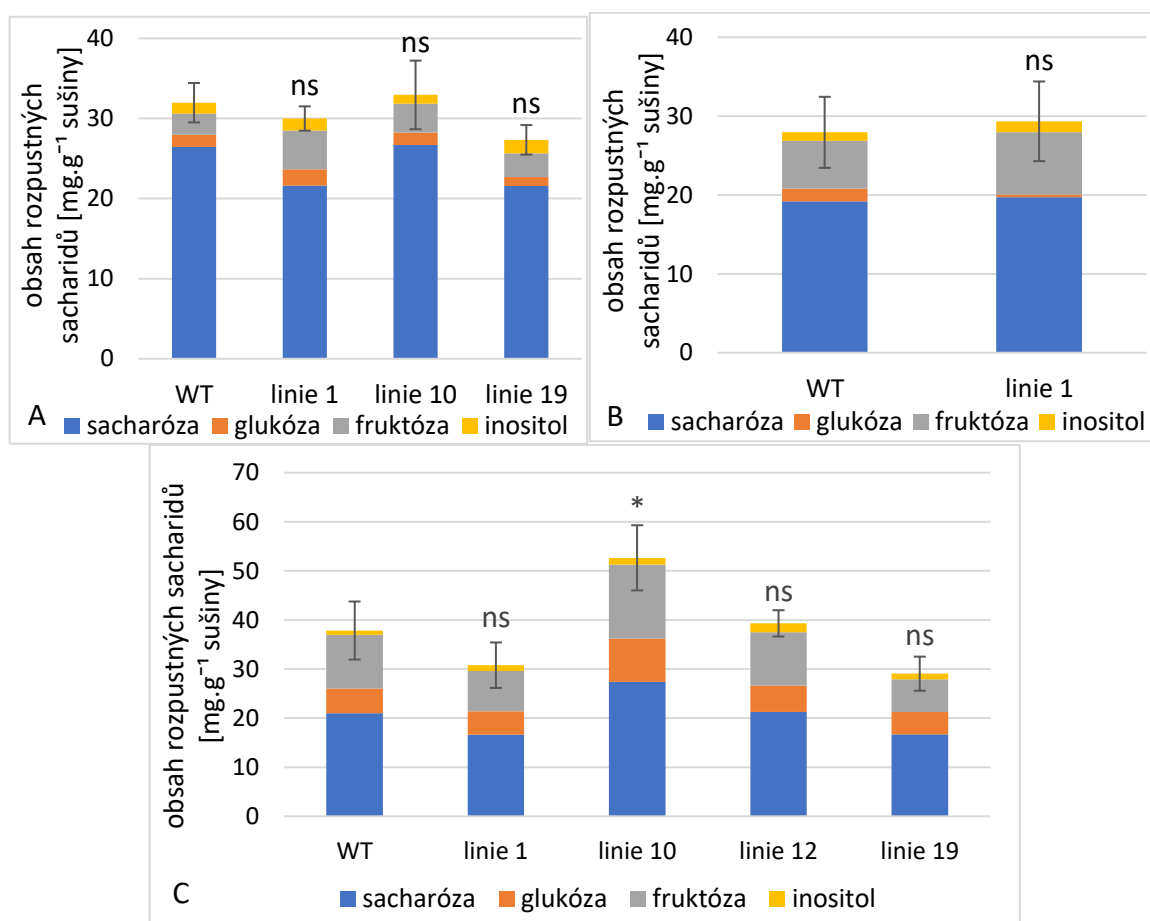
4.2.5. Obsah a distribuce nestrukturních sacharidů po rostlině

S ohledem na průkazné navýšení rychlosti čisté fotosyntézy jsem se rozhodla stanovit obsah sacharidů a jejich distribuci po rostlině. Toto stanovení jsem provedla u rostlin pěstovaných v kultivačním boxu (experimenty box I, box II a box III). Z rostlinného materiálu z experimentu box I jsem měla na tuto analýzu k dispozici pouze vzorky produkčních listů. V experimentu box II jsem porovnávala s kontrolou rostliny jen jedné transgenní linie, ale množství materiálu dovolilo odebrat vzorky ze všech vytipovaných orgánů (produkční list, apex, řapíky, kořeny, stolony a případně hlízy). Z důvodu časové náročnosti zpracování jsem ale připravila jen vzorky z listů, apexu a stolonu, a to pouze na analýzu rozpustných sacharidů. Plně jsem zpracovala až vzorky odebrané z experimentu box III, kdy bylo možné analyzovat již všechny vybrané linie. Z důvodu nízkého počtu hodnocených rostlin jsem se rozhodla připravit dva technické replikáty produkčního listu a kořenů, které by měly snížit variabilitu získaných hodnot.

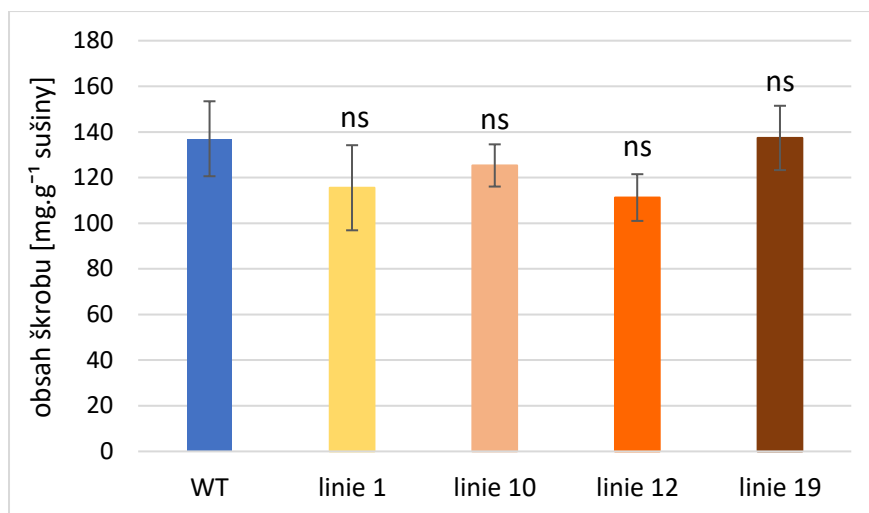
Analýza obsahu rozpustných sacharidů pomocí HPLC (vysokoúčinný kapalinový chromatograf) byla relativně obtížná, zejména kvůli interferujícím látkám ve vzorcích. Ty znemožnily odečtení množství některých sacharidů (kolona Shodex Pb^{2+} – sacharóza, glukóza, zejména v listu). Proto bylo nutné vzorky přeměřovat ještě na koloně Shodex Ca^{2+} , kde není možné rozlišení fruktózy a inositolu, hojně zastoupených v listových vzorcích, z důvodu blízkosti jejich retenčních časů. To vedlo k nutnosti většinu vzorků nadzemních částí měřit na obou kolonách (množství sacharózy a glukózy hodnocené na Ca^{2+} , množství fruktózy a inositolu na Pb^{2+}).

Celkové množství sacharidů v produkčním listu se statisticky významně nelišilo mezi kontrolou a většinou transgenních linií (Graf 6). Jen u produkčních listů linie 10 z boxu III (Graf 6C) došlo k navýšení celkového obsahu rozpustných sacharidů oproti WT.

Obsah a zastoupení jednotlivých sacharidů se měnily jen málo. U linie 1 z experimentu box I (Graf 6A) jsem pozorovala trend snížení obsahu sacharózy a zvýšení obsahu fruktózy. U linie 10 byl trend navýšení obsahu fruktózy. V případě vzorků z boxu II (Graf 6B) byl u transgenní linie 1 patrný trend snížení obsahu glukózy a trend navýšení u inositolu. V experimentu box III (Graf 6C) byl u linie 10 trend navýšení patrný u všech čtyř rozpustných sacharidů. Trend snížení množství fruktózy byl patrný u linie 19. Tedy analýza rozpustných sacharidů v produkčním listu nepřinesla výsledky s konzistentními výraznými změnami. Škrob jsem stanovila pouze u vzorků z experimentu box III a ani v jeho množství nebyl nalezen průkazný rozdíl (Graf 7). Podobné hladiny rozpustných sacharidů a škrobu u kontroly i většiny transgenních linií ukazují na to, že se produkty fotosyntézy v produkčním listu mutantů nehromadí více než u WT.

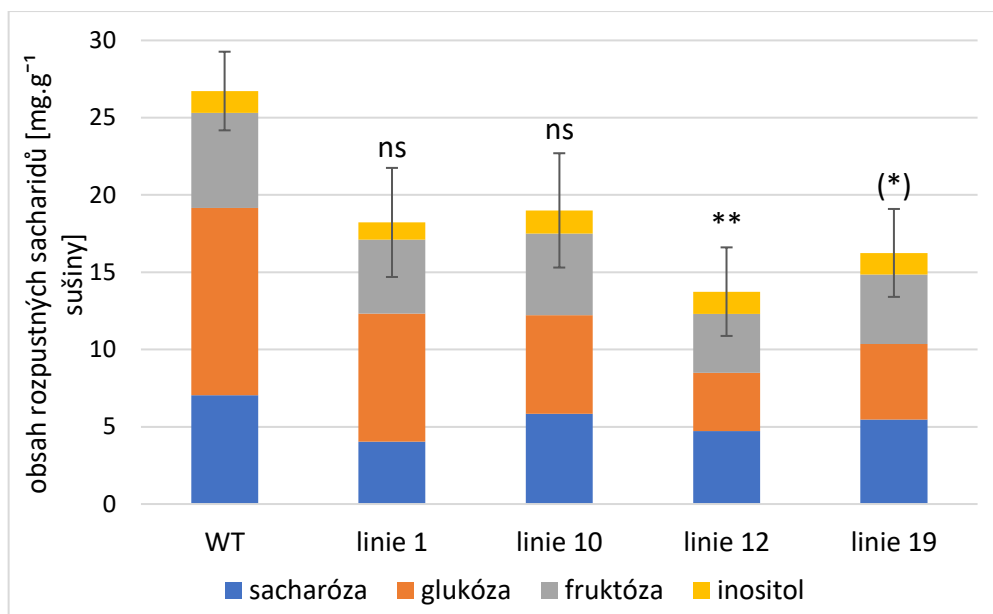


Graf 6: Celkový obsah rozpustných sacharidů v produkčních listech rostlin bramboru cv. Kamýk. A: experiment box I; B: experiment box II; C: experiment box III. WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny. Počet opakování $n = 4-8$ (každé opakování je průměrem 2 technických replikátů). Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Kruskal-Wallis multiple-comparison Z-value test [A]; Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control [B, C]). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou dle hladiny významnosti: * $p < 0,05$; ns - statisticky ne-signifikantní rozdíl oproti kontrole.



Graf 7: Obsah škrobu v produkčních listech rostlin bramboru cv. Kamýk. WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny v kultivačním boxu; experiment box III. Počet opakování n = 5-7 (každé opakování je průměrem 2 technických replikátů). Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control); ns - statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.

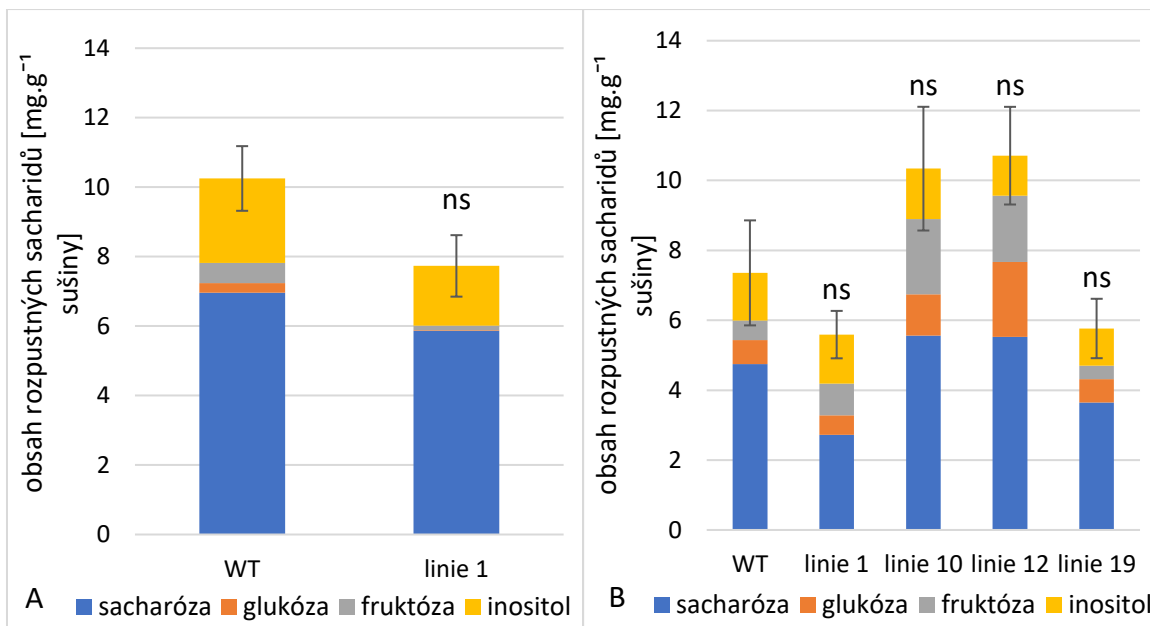
Obsah rozpustných sacharidů v řapíku může korelovat s množstvím sacharidů transportovaných z listů, proto jsem provedla i stanovení obsahu sacharidů v řapících (odběr definované délky 1,5 cm). U řapíků mutantních rostlin nastal trend snížení celkového množství rozpustných sacharidů (Graf 8). U linie 12 byl pokles průkazný dokonce na hladině významnosti $p < 0,01$.



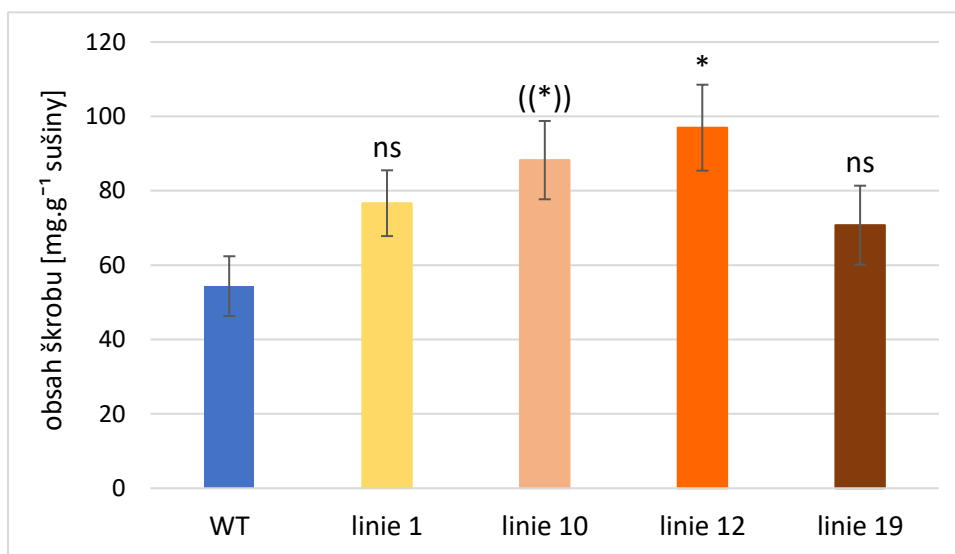
Graf 8: Celkový obsah rozpustných sacharidů v řapících rostlin bramboru cv. Kamýk. WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny v kultivačním boxu; experiment box III. Počet opakování n = 5-7. Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru celkového obsahu sacharidů. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami dle hladiny významnosti: ** p<0,01; (*) p<0,1; ns - statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.

Dále jsem sledovala akumulaci sacharidů v sinkových pletivech – apexech, kořenech, stolonech a vyvíjejících se hlízkách. Celkový obsah rozpustných sacharidů v apexu (Graf 9) byl velmi nízký, u některých sacharidů dokonce na hranici detekce. Z tohoto důvodu, a kvůli velkému rozptylu hodnot, jsem u vzorků kontroly a transgenních linií nezjistila statisticky významné rozdíly. Pouze u linie 12 z experimentu box III byl patrný trend navýšení obsahu glukózy.

Obsah škrobu v apexu se statisticky významně zvýšil u linie 12 (Graf 10). Tento trend byl patrný i u linie 10.



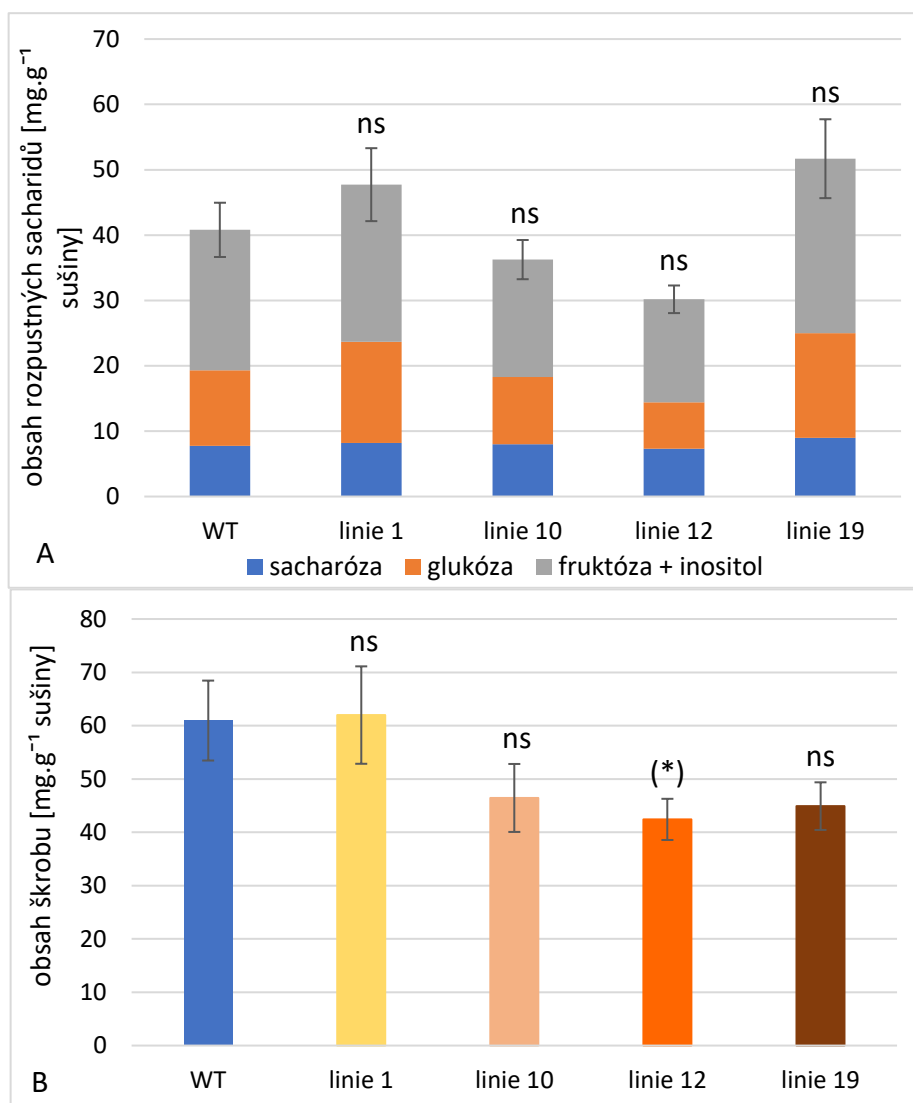
Graf 9: Celkový obsah rozpustných sacharidů v apexu rostlin bramboru cv. Kamýk. A: experiment box II; B: experiment box III. WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny. Počet opakování n = 7-8. Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control); ns - statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.



Graf 10: Obsah škrobu v apexu rostlin bramboru cv. Kamýk. WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny v kultivačním boxu, experiment box III. Počet opakování n = 5-7. Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami dle hladiny významnosti: * p<0,05; ((*)) p<0,15; ns - statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.

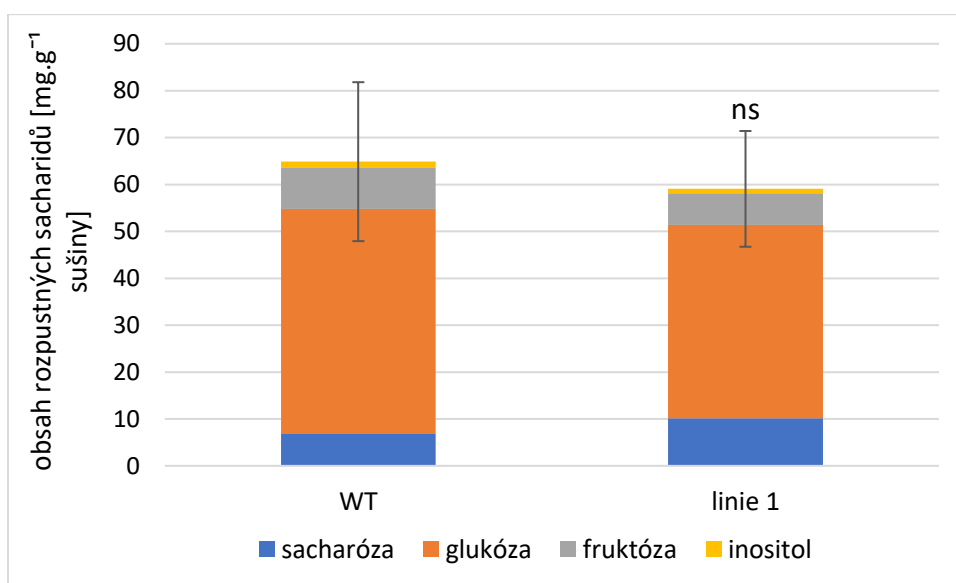
Dále jsem analyzovala podzemní sinky. U obsahu rozpustných sacharidů kořenů (Graf 11A) mutantních rostlin jsem nezaznamenala statisticky významný rozdíl oproti hodnotám WT. Zajímavé je porovnání s apexem, nadzemním sinkem. V kořenech bylo alespoň

3x více rozpustných sacharidů než v apexech jak kontroly, tak i všech transgenních linií. Obsah škrobu v kořenech (Graf 11B) nevykazoval průkazné rozdíly mezi WT a mutanty. Pouze mírně se snížil u linie 12. I v tomto případě je zajímavé porovnání s apexy – kontroly obou sinků obsahovaly stejné množství škrobu, ale u apexů došlo k navýšení obsahu až o 50 %, zatímco u kořenů hodnoty klesly až o $\frac{1}{3}$.

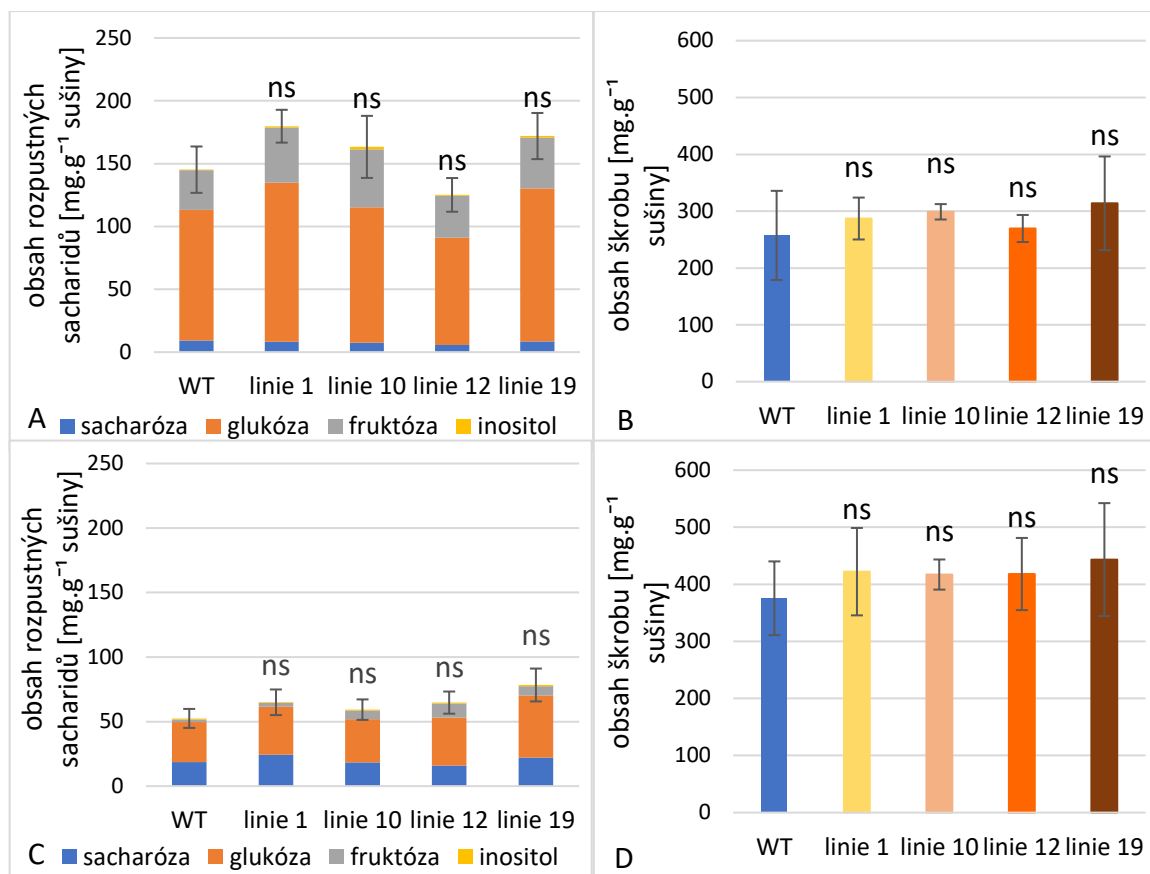


Graf 11: Celkový obsah rozpustných sacharidů (A) a škrobu (B) v kořenech rostlin bramboru cv. Kamýk. WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny v kultivačním boxu; experiment box III. Počet opakování n = 5-7 (každé opakování je průměrem 2 technických replikátů). Chybové úsečky znázorňují středních chybu průměru celkového obsahu sacharidů. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control [A]; Kruskal-Wallis multiple-comparison Z-value test [B]). Statisticky významný rozdíl je označen hvězdičkou dle hladiny významnosti: (*) p<0,1; ns - statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.

Analýzu obsahu sacharidů ve stolonech a vyvíjejících se hlízkách jsem provedla dvakrát. V experimentu box II jsem stanovila pouze obsah rozpustných sacharidů bez rozlišení vzorků stolonů a vyvíjejících se hlízek (Graf 12). V experimentu box III jsem již rozlišovala vzorky se stolony od vzorků s hlízkami (Graf 13). U kontroly jsem zaznamenala vyšší obsah rozpustných sacharidů ve stolonech (Graf 13A) oproti hlízkám (Graf 13C), zatímco u škrobu (Graf 13B, D) tomu bylo naopak. Tento posun v rozdělování mezi rozpustné sacharidy a škrob byl patrný i u všech transgenních linií, ovšem bez signifikantního rozdílu oproti kontrole.



Graf 12: Celkový obsah rozpustných sacharidů ve stolonech a ve vyvíjejících se hlízkách rostlin bramboru cv. Kamýk. WT - kontrola; linie 1 - nezávislá transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny v kultivačním boxu; experiment box II. Počet opakování n = 7-8. Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control); ns - statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.



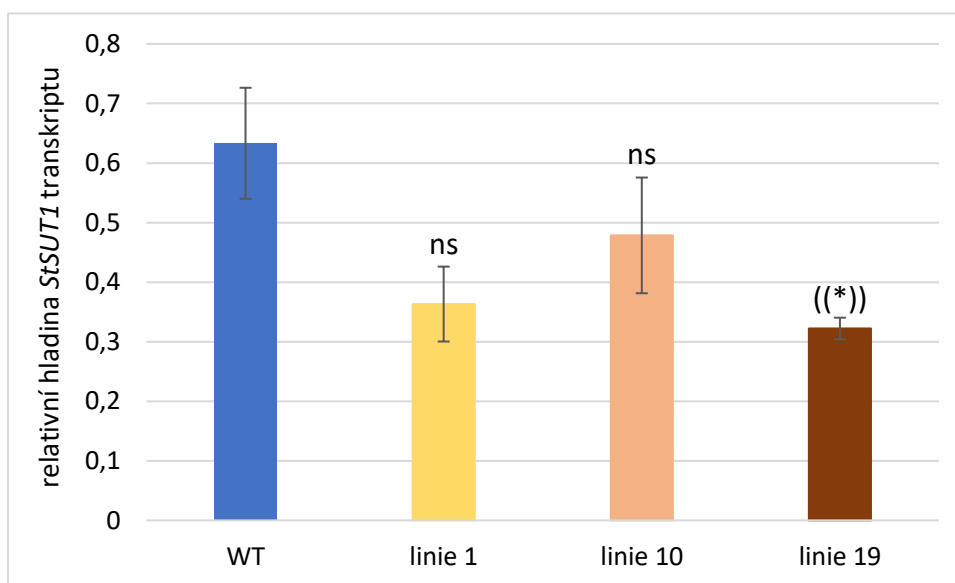
Graf 13: Celkový obsah rozpustných sacharidů a škrobu ve stolonech a ve vyvíjejících se hlízkách rostlin bramboru cv. Kamýk. A: celkový obsah rozpustných sacharidů ve stolonech; B: obsah škrobu ve stolonech; C: celkový obsah rozpustných sacharidů v hlízkách; D: obsah škrobu v hlízkách. WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní *BEL11* AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny v kultivačním boxu; experiment box III. Počet opakování $n = 5-7$. Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control [A, C]; Kruskal-Wallis multiple-comparison Z-value test [B, D]); ns - statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.

Ze získaných výsledků se zdá, že snížení hladiny *StBEL11* u transgenních linií s *StBEL11* AS systematicky neovlivnilo distribuci rozpustných sacharidů a ukládání škrobu. Nesignifikantní výsledky jsou dány také velkým rozptylem dat, který může být způsoben obtížným odečítáním množství jednotlivých sacharidů z chromatogramů kvůli interferujícím látkám.

4.2.6. Exprese *StSUT1* transportéru v listech

Zvýšená rychlost čisté fotosyntézy spolu s faktem, že se sacharidy v listu nehromadí, by mohly být dány odlišnou rychlostí transportu sacharidů z listů, což přímo souvisí s množstvím a aktivitou *SUT1* transportéru zodpovědného za nakládání sacharózy do floému.

Pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) jsem stanovila hladinu transkriptu sacharózového transportéru *StSUT1* v produkčním listu cv. Kamýk (experiment box I). Jeho hladinu jsem normalizovala na relativní množství kopií referenčního transkriptu *UBI* (*polyubiquitin*). Výsledky stanovení relativních hladin *StSUT1* transkriptu v produkčním listu (Graf 12) neukazují na navýšení, naopak překvapivě naznačují trend k jeho snížení, který nastal u linie 19.



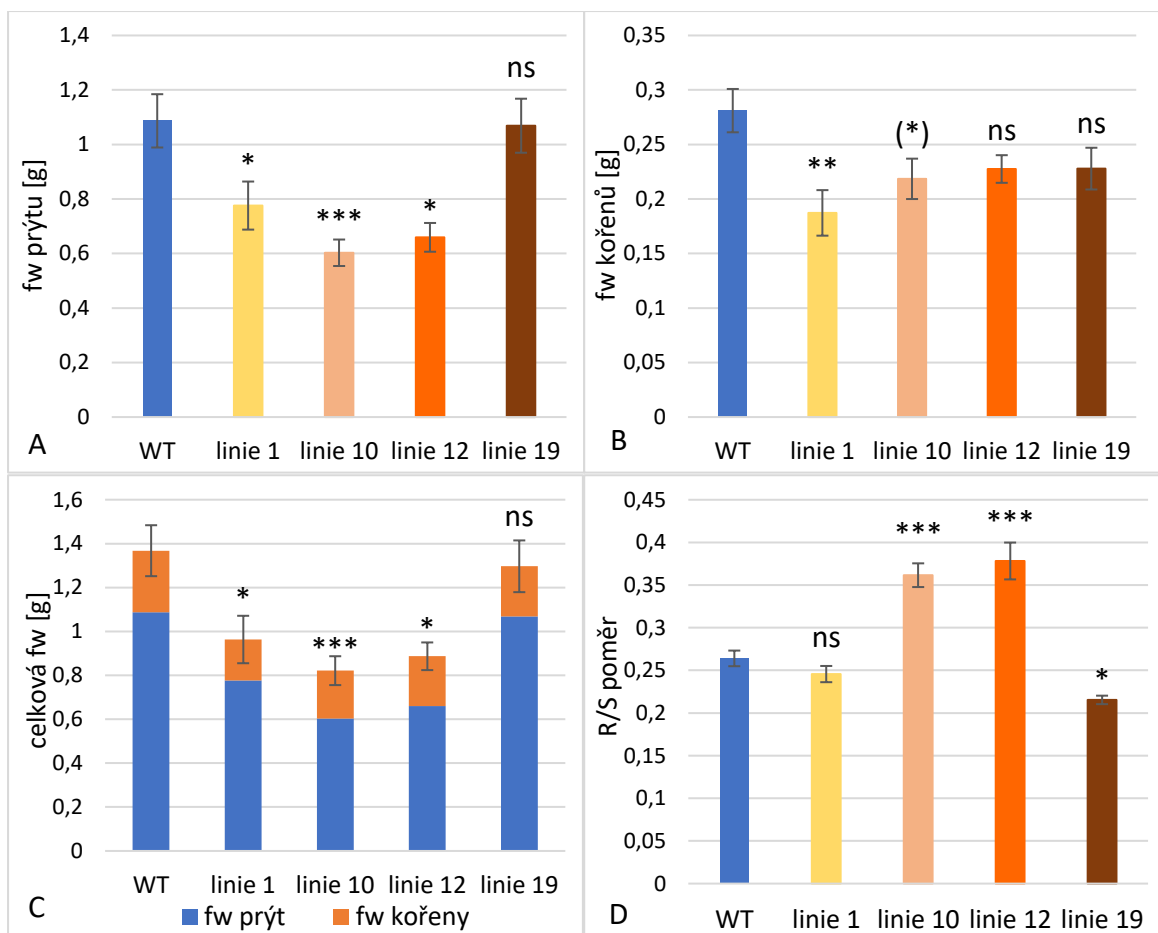
Graf 14: Relativní hodnota *StSUT1* transkriptu v listech rostlin bramboru cv. Kamýk. WT - kontrola; linie 1, 10 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *ex vitro* 3 týdny v kultivačním boxu; experiment box I. Počet opakování $n = 3$ (opakování je průměrem 2-4 technických replikátů). Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control). Statisticky významný rozdíl je označen hvězdičkou dle hladiny významnosti: ((*)) $p < 0,15$; ns - statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.

4.3. Růstové charakteristiky transgenních linií *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Kamýk se sníženou hladinou *StBEL11*

Výsledky hodnocení fotosyntetických charakteristik ukázaly na zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy, ale hladiny nestrukturních sacharidů nebyly významně pozměněny, a to ani v produkčním listu, ani v podzemních sincipích (kořeny, stolony, hlízky). Proto jsem se rozhodla vyhodnotit, zda se v liniích exprimujících *StBEL11* AS navýšení rychlosti čisté fotosyntézy neodrazilo v růstových parametrech. Kvůli jemnému kořenovému systému brambor pěstovaných *ex vitro*, který není možné ze substrátu izolovat v celku a bez poničení, jsem zvolila autotrofní kultivaci *in vitro*. Zaměřila jsem se na tyto charakteristiky: čerstvá hmotnost prýtu a kořenového systému, R/S poměr (poměr čerstvé hmotnosti kořenového systému ku čerstvé hmotnosti prýtu), počet listů, délka stonku, plocha příčného řezu stonkem ve výšce 3 cm od báze, listová plocha a specifická listová plocha (SLA; listová plocha / čerstvá hmotnost listů).

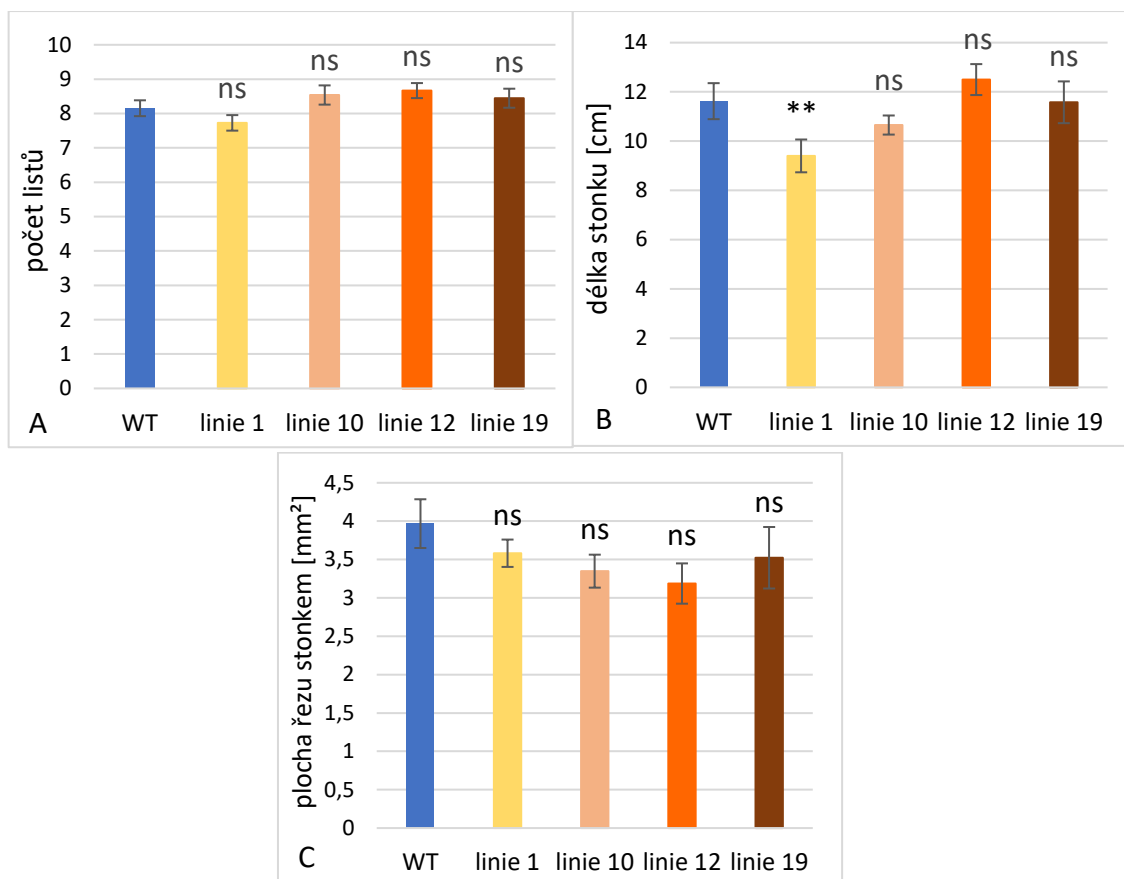
K experimentu jsem využila rostliny všech sledovaných genotypů pěstované 3 týdny v podmínkách *in vitro*. Vyhodnocení všech sledovaných parametrů přineslo zajímavé výsledky ohledně chování jednotlivých transgenních linií. Zatímco linie 1, 10 a 12 reagovaly víceméně souhlasně, linie 19 se chovala odlišně od ostatních transgenních linií a často nevykazovala výraznější odchylky od kontroly.

Čerstvá hmotnost prýtu (Graf 15A) se snížila u linií 1, 10 a 12. Linie 19 měla shodné hodnoty s WT. Čerstvá hmotnost kořenového systému (Graf 15B) se ve srovnání s WT snížila jen u linií 1 a 10. Celková hmotnost rostlin (Graf 15C) vykazovala shodný trend snížení s čerstvou hmotností prýtu. Velmi zajímavé bylo navýšení R/S poměru u linií 10 a 12, a to téměř o 50 % (Graf 15D). Statisticky významnou změnu jsem nezaznamenala u linie 1, naopak linie 19 vykazovala pokles tohoto parametru.



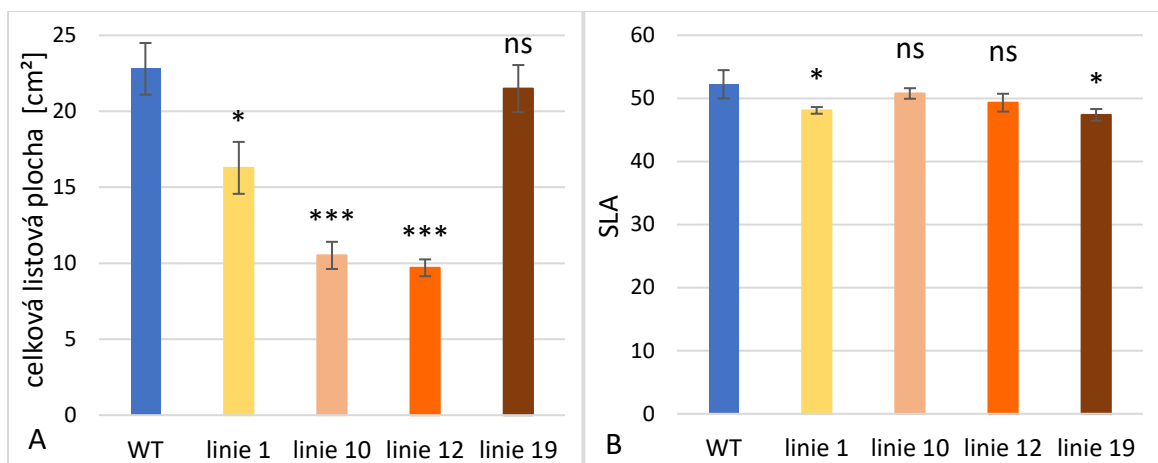
Graf 15: Růstové parametry rostlin bramboru cv. Kamýk – čerstvá hmotnost prýtu (A) a kořenového systému (B), celková čerstvá hmotnost (C) a R/S poměr (D). WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenické BEL11 AS linie; fw - čerstvá hmotnost. Kultivace *in vitro* 3 týdny. Počet opakování n = 5-13. Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnnett's two-sided multiple-comparison test with control). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami dle hladiny významnosti: *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05; (*) p<0,1; ns - statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.

Růst prýtu byl u BEL11 AS linií redukován, proto jsem věnovala pozornost podrobnější analýze prýtu a vyhodnotila počet listů a délku a tloušťku stonku. Počet listů (Graf 16A) ani délka stonku (Graf 16B) se významně nelišily od kontroly, s výjimkou stonku linie 1, který byl v porovnání s kontrolou kratší. Plocha příčného řezu stonkem (Graf 16C) se oproti WT nezměnila, což ukazuje, že ani tloušťka stonku nebyla významně ovlivněna.



Graf 16: Růstové parametry prýtu rostlin bramboru cv. Kamýk – počet listů (A), délka stonku (B) a plocha příčného řezu stonkem ve výši 3 cm od báze (C). WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *in vitro* 3 týdny. Počet opakování n = 5-13. Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnnett's two-sided multiple-comparison test with control). Statisticky významný rozdíl je označen hvězdičkami dle hladiny významnosti: ** p<0,01; ns statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.

Ačkoli se průměrný počet listů mezi variantami nelišil, celková listová plocha (Graf 17A) se oproti kontrole dramaticky snížila – u linií 10 a 12 klesla na polovinu hodnoty WT, u linie 1 byla nižší o čtvrtinu. Transgenní linie vykazovaly vyšší rychlost čisté fotosyntézy vztáženou na jednotku listové plochy, a tak mě dále zajímalo, jestli se nemění mocnost listu, což by mohlo ovlivnit právě rychlost fotosyntézy. Pro toto stanovení jsem využila parametr SLA (Graf 17B). U linií 1 a 19 došlo k poklesu SLA oproti kontrole, což pozitivně koreluje s neprůkazným nebo mírným poklesem čerstvé hmotnosti prýtu u těchto dvou linií oproti dvěma dalším transgenním liniím, přestože počet listů byl u všech linií shodný.

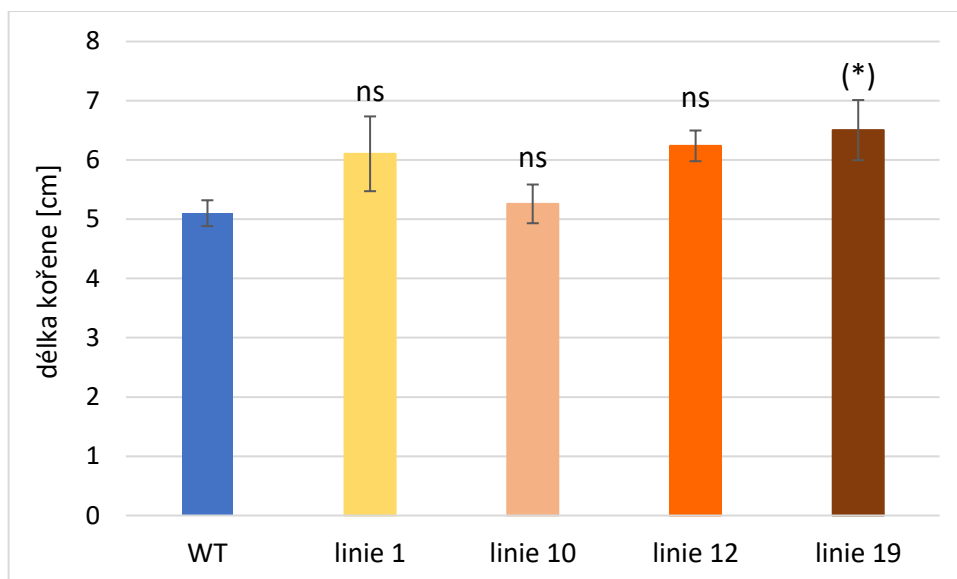


Graf 17: Růstové parametry rostlin bramboru cv. Kamýk – celková listová plocha (A) a SLA (specifická listová plocha; celková plocha listů / čerstvá hmotnost listů; B). WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kultivace *in vitro* 3 týdny. Počet opakování n = 5-13. Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami dle hladiny významnosti: *** p<0,001; * p<0,05; ns - statisticky ne-signifikantní rozdíl oproti kontrole.

Informace o délce a větvení kořenů jsem plánovala získat z kořenového systému stejných rostlin, které jsem využila k již výše zmíněným růstovým charakteristikám. Ovšem kořenový systém bramboru pěstovaného v podmínkách *in vitro* je, podobně jako u rostlin pěstovaných *ex vitro*, jemný a hustý. Vyhodnocení elektronických záznamů kořenových systémů by bylo časově velmi náročné a nepřesné. Proto jsem zvolila experiment s kořenovými kulturami, který navíc umožňuje hodnocení růstu kořene bez ovlivnění nadzemní části.

Vyhodnocené kultury kořenových špiček po 10denní kultivaci nevykazovaly téměř žádné větvení (10% větvení u linií 10, 12 a 19). Délka kořene (Graf 18) se u transgenních linií statisticky významně nelišila od délky kořene kontroly. Pouze u linie 19 bylo pozorováno navýšení délky.

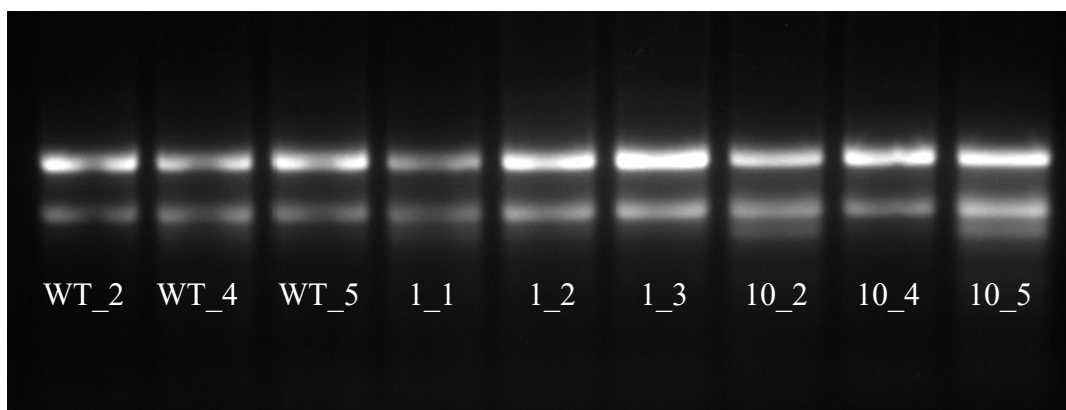
Výsledky naznačují, že menší kořenový systém pozorovaný u autotrofních rostlin kultivovaných *in vitro* může být daný vlivem prýtu, respektive rychlostí zakořenění vrcholových řízků, nikoli rychlostí prodlužování kořene, které je u všech genotypů, vyjma linie 19, srovnatelné. V tomto experimentu jsem ale zaznamenala velkou variabilitu uvnitř jednotlivých variant, pro přesnější závěry by bylo potřeba experiment zopakovat.



Graf 18: Průměrná délka kořene bramboru cv. Kamýk. WT - kontrola; linie 1, 10, 12 a 19 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie. Kořenové špičky kultivované *in vitro* 10 dní. Počet opakování $n = 7-10$. Chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru. Statistické hodnocení analýzou rozptylu (Dunnett's two-sided multiple-comparison test with control). Statisticky významný rozdíl je označen hvězdičkou dle hladiny významnosti: (*) $p < 0,1$; ns statisticky nesignifikantní rozdíl oproti kontrole.

4.3.1. Hladina *StBEL11* v kořenech

Otázku ovlivnění růstu kořenů prýtem transgenních linií by mohlo objasnit stanovení hladiny *StBEL11* v kořenech. Pokusila jsem se o to ve vzorcích rostlin z boxu I (WT, linie 1 a 10). Ovšem i přes dobrou kvalitu vyzolované RNA (Obrázek 8) se vyskytly problémy s detekcí hladin transkriptu. Problém byl způsobený pravděpodobně nečistotami v izolátu, které způsobily narušení syntézy cDNA. Po přečištění vzorků s využitím kitu RNA Clean & Concentrator (Zymoresearch) se podařilo získat kvalitní cDNA. Výsledky získané školitelkou naznačily snížení relativní hladiny transkriptu *StBEL11* v kořenech linií 1 a 10 téměř na $\frac{1}{4}$ hladiny transkriptu v kořenech kontroly.



Obrázek 8: Fotografie gelu po elektroforetické separaci izolované RNA z kořenů cv. Kamýk. WT_2/4/5 - kontrola; 1_1/2/3, 10_2/4/5 - nezávislé transgenní BEL11 AS linie 1 a 10; vzorky ze tří biologických replikátů od každého genotypu. Kultivace *ex vitro* 3 týdny v kultivačním boxu; experiment box I.

Expresce *StBEL11* AS nezpůsobila změnu architektury rostlin, ale způsobila změny v růstu. Mutantní rostliny méně investovaly do růstu prýtu, především do rozvoje listové plochy. Čerstvá hmotnost kořenového systému byla také snížena, ale méně výrazně, než tomu bylo u prýtu. R/S poměr byl u dvou linií výrazně posunut ve prospěch kořenů oproti WT. Pro komplexní obrázek růstu mutantů by byl potřeba materiál, který zahrnuje všechny orgány – zdrojové i sinkové včetně stolonů.

Výsledky mé diplomové práce ukazují, že snížení hladiny *StBEL11* u rostlin bramboru cv. Kamýk vedlo ke zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy na jednotku listové plochy u všech linií. Naproti tomu došlo ke zmenšení celkové listové plochy. Změny v těchto dvou parametrech ukazují na jistou kompenzaci celkové fotosyntetické kapacity transgenních linií. Výsledky na základě růstových změn ukazují na posílenou alokaci asimilátů do podzemních sinků.

5. Diskuse

Diplomová práce vycházela z předpokladu, že změna v rovnováze BEL transkripčních faktorů (TF) ovlivňujících tuberizaci prostřednictvím snížení hladiny *StBEL11* může ovlivnit fotosyntetické charakteristiky listu a distribuci asimilátů po rostlině. Změny by se mohly následně promítnout do růstových a vývojových charakteristik rostliny. Tato práce navazuje na předchozí práce týmu laboratoře studia regulačních faktorů morfogeneze rostlin věnované problematice regulace tuberizace bramboru.

Na našem pracovišti byl transformován brambor *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Kamýk konstruktem s *StBEL11* v antisense orientaci (AS). Transgenní linie vykazují zvýšený tuberizační potenciál (Zounková DP, 2019). Náplní mé diplomové práce bylo získat transgenní linie bramboru *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* modelového genotypu 7540 se sníženou expresí genu *StBEL11* pomocí stejného konstruktů jako v případě cv. Kamýk. Nejčastěji využívaným genotypem bramboru pro výzkum tuberizace a rolí BEL transkripčních faktorů v tomto procesu je právě ssp. *andigena* 7540, která k tuberizaci vyžaduje krátkodenní fotoperiodu (např. Hardigan et al., 2017). Získání transgenních linií ssp. *andigena* tedy nabízí možnost lepšího porovnání výsledků s daty ostatních výzkumných týmů a porovnání dat získaných na liniích ssp. *andigena* a kulturním genotypu by mohlo odpovědět na otázku, zda lze pozorované změny považovat za obecně platné. Tato diplomová práce měla za cíl charakterizovat změny fotosyntetické kapacity listu a sacharidové bilance způsobené potlačením jednoho z represorů tuberizace, *StBEL11*.

5.1. Transformace *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*

Nejprve jsem musela optimalizovat transformační protokol s využitím bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Jako výchozí jsem zvolila protokol dle Dietze et al. (1995), který byl na našem pracovišti již úspěšně využit pro transformaci kulturního bramboru (Říhová DP, 2013; Zounková DP, 2019). Z první transformace jsem sice transgenní linie nezískala kvůli infekci (nejspíše přerůstající agrobakterium), ale na listech se vytvořily kalusy a později i základy prýtů. Získané výsledky ukázaly na možný vztah mezi velikostí listů a intenzitou přerůstání – ssp. *andigena* má v podmínkách *in vitro* výrazně menší listy než kulturní brambor – tedy čím menší list, tím větší riziko kontaminace. Za účelem předejití infekci jsem při dalších transformacích po měsíci kultivace listů na médiu indukujícím prýt (SIM) zvýšila koncentraci antibiotika claforanu v médiu a pokračovala v subkultivaci každý týden.

Z mých pozorování také vyplývá, že důležitým faktorem ovlivňujícím velikost listu, a tedy i úspěšnost transformace, by mohl být způsob předpěstování rostlin. Na listech rostlin, které byly předpěstovány na MS médiu s 2 % sacharózy v baňkách uzavřených prodyšným víčkem, se kalusy začaly tvořit dříve než na listech rostlin z autotrofní kultivace nebo mixotrofní kultivace v baňkách uzavřených alobalem. V další optimalizaci pokračuje a systematicky se jí zabývá Mgr. J. Konečný, který plánuje tento genotyp využívat pro další transformace.

Z obou úspěšných transformací se mi podařilo odvodit 42 nezávislých transgenních linií s pozitivním výsledkem detekce přítomnosti vnášeného konstruktů s *StBEL11* AS. Z důvodu časové náročnosti odvození linií, nepředvídatelných nástrah a nemožnosti jinak běžné práce v laboratoři se mi v rámci diplomové práce nepodařilo stanovit hladiny transkriptu *StBEL11* v těchto liniích, a tak vybrat vhodné linie s dostatečně sníženou hladinou *StBEL11* transkriptu pro další charakterizaci. Aktuálně jsou linie udržovány v podmínkách *in vitro* a jsou postupně odebírány vzorky na stanovení hladin transkriptu. S tímto genotypem jsem tedy dále nemohla pracovat a charakterizaci jsem provedla pouze u kulturního bramboru, a to u linií cv. Kamýk se stejným konstruktem, který byl původně zamýšlený jako srovnávací materiál.

5.2. Fotosyntetické charakteristiky a distribuce asimilátů u *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Kamýk se sníženou hladinou *StBEL11*

Tuberizace bramboru je spojena s vytvořením nových silných sinků, které pro svůj růst, vývoj a ukládání zásobních látek vyžadují velké množství asimilátů, a tak rostlina podle jejich požadavků upravuje produkci a distribuci asimilátů. Při zvýšeném tuberizačním potenciálu tedy může buď stoupnout produkce asimilátů, nebo být posílena jejich distribuce ve prospěch tloušťného stolonu.

U transgenních linií cv. Kamýk s konstruktem s *StBEL11* AS byla snížena hladina *StBEL11* transkriptu v listech a navýšen tuberizační potenciál (Zounková DP, 2019). Posílení tvorby hlíz bylo již dříve docíleno u bramboru poddruhu *andigena* overexpresí *StBEL5* (Banerjee et al., 2006) a snížením hladiny *StBEL11* nebo *StBEL29* prostřednictvím RNA interference (RNAi) (Ghate et al., 2017). Výše uvedené práce se soustředily na změny v molekulárních markerech a fyziologických odpovědích stolonu. Pro děje v listu je velmi málo dat, přestože jsou fotosyntetické parametry kritické pro transport tuberigenního signálu a tvorbu a plnění hlízy. Je známo, že promotor *StBEL5* obsahuje elementy pozitivně

reagující na světlo (Chatterjee et al., 2007), exprese *StBEL5* probíhá v listu za krátkého i dlouhého dne (Sharma et al., 2014), a dále, že *StBEL5* mRNA se za krátkého dne akumuluje nejen v žilnatině, ale také v mezofylu listu (Cho et al., 2015). Ačkoli není známo, že by *StBEL5* přímo ovlivňoval fotosyntetické charakteristiky, overexprese *StBEL5* vede k rozsáhlým transkriptomickým změnám v listu (Sharma et al., 2016) a podobné změny by mohlo vyvolat i snížení hladiny *StBEL11*. Míra indukce tuberizace je pravděpodobně výsledkem interakce či kompetice *StBEL5* (induktor) a *StBEL11/29* (represory), proto je předpokládáno, že downregulace *StBEL11* se bude ve svých projevech podobat overexpresi *StBEL5*. Navýšení exprese *StBEL5* v listu ssp. *andigena* koreluje s navýšením hladiny *StSP6A* (Sharma et al., 2016). Naopak při snížení exprese *StBEL11* v listu cv. Kamýk nebyla hladina *StSP6A* ovlivněna, případně došlo k mírnému trendu snížení (Zounková DP, 2019; osobní sdělení). To ukazuje, že antagonistický vztah proteinů *StBEL5* a -11 nebude tak jednoduchý. Nezměněná až snížená hladina *StSP6A* transkriptu v listech linií cv. Kamýk by mohla být dána snížením hladiny *StBEL5* v listu transgenních linií cv. Kamýk, které stanovila Zounková et al. (2021), a kompeticí *StBEL5* a *StBEL11* o interakčního partnera POTH1, jehož mRNA nebyla v liniích cv. Kamýk změněna (Zounková DP, 2019). I přes snížení hladiny *StBEL5* došlo k posunutí poměru *StBEL5/StBEL11* v jeho prospěch (Zounková et al., 2021). Celá záležitost bude tedy daleko komplikovanější a nelze ji jednoduše vysvětlit pouhou kompeticí dvou TF.

Posun rovnováhy BEL TF, který způsobuje vyšší tuberizační potenciál, by také mohl vyvolat změny vedoucí k posílení fotosyntézy. Pro dobré zásobení silného sinku je potřebný vitální fotosyntetický aparát. Vitalitu aparátu zapojeného do světelných reakcí odráží rychlá kinetika fluorescenční indukce, zejména tvar OJIP křivky a parametr F_v/F_m . Rostliny (včetně kontroly) pěstované ve skleníku dosáhly hodnot F_v/F_m pouze do 0,68. Maximální kvantový výtěžek chlorofylu bývá u různých rostlinných druhů za nestresových podmínek okolo hodnoty 0,8 (Björkman a Demming, 1987). Nižší kvantový výtěžek se vyskytuje u rostlin s negativně ovlivněnou funkcí fotosystému II a jeho reakčního centra stresem. Snížení poměru u rostlin ze skleníku bylo zřejmě způsobeno nekontrolovatelnými kultivačními podmínkami, rostliny byly vystaveny výkyvům teplot a riziku napadení hmyzími škůdci. U stresovaných rostlin se také může měnit tvar OJIP křivky, např. při vysoké teplotě (Srivastava et al., 1997), k čemuž ale nedošlo. Kultivace rostlin v boxu s řízenými kultivačními podmínkami se ukázala jako vhodná, protože rostliny kontroly (WT) měly OJIP křivku normálního tvaru a hodnoty maximálního kvantového výtěžku chlorofylu blíží se hodnotě 0,8. Transgenní rostliny měly téměř totožné výsledky, vnesení konstruktů

ani snížení hladiny transkriptu *StBEL11* tedy nezasáhly světelné reakce primární fáze fotosyntézy.

Proces fotosyntézy je závislý na efektivitě absorpce záření během primární fáze fotosyntézy. Důležitým parametrem ovlivňujícím celkový výkon fotosyntézy je tedy množství pigmentů a jejich poměr (Bennett, 1983). Obsah pigmentů může být snížen např. abiotickým stresem (Ashraf a Harris., 2013; Xu et al., 2020). Další stresový marker je množství antokyanů, které se zvyšuje za přebytku energie a zároveň za nedostatku dusíku na zabudování uhlíku do bílkovin (Winkel-Shirley, 2001; Solfanelli et al., 2006). Stanovení obsahu antokyanů neukázalo při snížené hladině *StBEL11* změny (Graf 4). Naproti tomu došlo ke zvýšení obsahu fotosyntetických pigmentů (Graf 3), i když u některých linií/experimentů se jednalo pouze o trend. Navýšení obsahu fotosyntetických pigmentů je v souladu s prací na transgenních liniích rajčete (*Solanum lycopersicum*) se sníženou hladinou *SIBEL11* v plodech (RNAi), kde autoři pozorovali zvýšenou akumulaci chlorofylu spojenou s pomalejším dozráváním plodů (Meng et al., 2018). Autoři předpokládají, že *SIBEL11* usnadňuje dozrávání plodů přes inhibici exprese genů spojených se syntézou chlorofylu a vývojem chloroplastů. Díky příbuznosti rostlinných druhů lze spekulovat o podobné regulaci i u bramboru, kde by *StBEL11* mohl ovlivňovat účinnost primární fáze fotosyntézy. Tento předpoklad by mohlo podpořit, nebo vyvrátit, stanovení hladiny transkriptu pro CAB (chlorofyl a/b vázící protein), jehož exprese je regulována *SIBEL11* (Meng et al., 2018).

Navýšení množství fotosyntetických pigmentů bylo doprovázeno zvýšenou rychlostí čisté fotosyntézy (P_N). Zaznamenala jsem ji u všech transgenních linií (Graf 5) – linie 10 a 12 z experimentu box III s nejvyšším obsahem fotosyntetických pigmentů měly i nejvyšší P_N . Podobné výsledky zaznamenali Singh et al. (2015), kteří u dvou genotypů bramboru pozorovali při zvýšeném obsahu chlorofylu *a* a chlorofylu *b* také zvýšení P_N . V případě kultivaru Kufri Surya s výraznějším navýšením parametrů byla podpořena tuberizace pravděpodobně i díky vyšší expresi transportéru sacharózy (Singh et al., 2015). Za normálních podmínek zvýšený obsah pigmentů vede ke zvýšení rychlosti fotosyntézy. Malé, ale statisticky průkazné navýšení rychlosti čisté fotosyntézy u *BEL11 AS* linií jsem zaznamenala již při ozáření 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a s rostoucí ozářeností se rozdíl mezi transgenními liniemi a kontrolou prohluboval. Navýšení fotosyntetické kapacity již při těchto ozářenostech, které bylo doprovázeno vyšší aktivitou ribuloza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenázy (Rubisco), vykazoval i tabák (*Nicotiana tabacum*) s navýšeným obsahem trehalóza-6-fosfátu (T6P) (Pellny et al., 2004). Hladina T6P koreluje s množstvím sacharózy, účastní se sacharidové signalizace (Nunes et al., 2013) a je další možností regulace fotosyntetické

kapacity. Sacharidová signalizace propojuje změny sacharidové bilance s rychlostí fotosyntézy (Lawlor a Paul, 2014). Stanovení hladiny transkriptu malé podjednotky Rubisco jsem také zamýšlela, ale již se nevešlo do časového plánu. Při zvýšené fotosyntetické kapacitě lze očekávat změnu ve vztahu zdroj-sink, což ukazují Ahmadi-Lahijani et al. (2021) v experimentech sledujících působení atmosféry se zvýšeným obsahem CO₂ na brambor, které ukázaly posílení alokace asimilátů do podzemních orgánů ve srovnání s listy, a tak vyšší výnos hlíz. Dle autorů přizpůsobení rostliny novým podmínkám navýšenou fotosyntetickou kapacitou může zmírňovat negativní účinky aklimace fotosyntézy a zvyšovat produktivitu rostlin při zvýšené koncentraci CO₂. U mnou použitých mutantů se zvýšenou fotosyntetickou kapacitou a s posíleným tuberizačním potenciálem by tedy vyšší koncentrace CO₂ mohla ještě více podpořit růst podzemních sinků. Tuto spekulaci navrhuji také Lawlor a Paul (2014). Posílená fotosyntéza jak díky molekulárnímu zásahu, tak zvýšené koncentraci CO₂, by rostlině také mohla pomoci lépe zvládnout abiotické stresy, např. zvýšenou teplotu (Chen a Setter, 2021).

Zvýšená rychlost fotosyntézy bývá doprovázena zvýšenou tvorbou asimilátů (Drake et al., 1997). Zvýšený obsah asimilátů ale může být pozorován i v případě, kdy nedojde ke zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy, jako tomu bylo u mutantní spontánně tuberizující linie D69 odvozené z cv. Lada. I když tato linie měla srovnatelnou rychlost čisté fotosyntézy s kontrolními rostlinami cv. Lada, došlo k navýšení celkového množství rozpustných sacharidů v listech (Fischer et al., 2008; Stupecká DP, 2018). Zde bylo ovšem doprovázeno snížením obsahu škrobu v listech a celkovou změnou v alokaci sacharidů po rostlině. Ve zdrojovém listu BEL11 AS transgenních linií nedošlo k hromadění sacharidů – nezměnilo se celkové množství rozpustných sacharidů (Graf 6) a obsah škrobu se systematicky také nezměnil. Naměřená data měla ale velký rozptyl způsobený interferujícími látkami ve vzorcích zachycenými kolonou. To způsobilo obtížné odečítání dat sledovaných sacharidů z chromatogramů. Přesnější data jsem se snažila získat pomocí rozdělení vzorků na jiné koloně. Možnost odečtení se sice ve velké části případů zlepšila, ale na koloně Shodex Ca²⁺ se překrývají retenční časy fruktózy a inositolu, tedy jejich signály není možné od sebe odlišit. Ovšem ani přeměření a ani příprava dvou replikátů z jedné rostliny variabilitu dat výrazně nesnížily. Zvýšená rychlost fotosyntézy nebyla doprovázena hromaděním sacharidů ve zdrojovém listu, což naznačuje účinné odvádění asimilátů floémem do sinkových pletiv. Nakládání asimilátů do floému u bramboru probíhá přednostně přes apoplast, tedy proces nakládání floému je závislý na množství sacharidových transportérů, zejména StSUT1, ve zdrojových orgánech (Riesmeier et al., 1994). Tentýž mechanismus se

uplatňuje při vykládání floému v sinkových orgánech, hlízách (Kühn et al., 2003). Syntéza transportérů je regulovaná zejména na transkripční úrovni, tedy hladina transkriptu dobře koreluje s množstvím proteinu. Stanovila jsem tedy hladinu *StSUT1* transkriptu v listech (Graf 14). Data překvapivě naznačila trend snížení množství tohoto transkriptu v transgenních liniích oproti WT. Ovšem exprese *StSUT1* je pod pozitivní kontrolou *StSP6A*, což je v souladu se snížením hladiny transkriptu transportéru, neboť hladina *StSP6A* je v listech transgenních liniích cv. Kamýk snížena (Zounková, osobní sdělení). Promotor genu *StSUT1* obsahuje tandemové TTGAC motivy (Sharma et al., 2016), což ukazuje na možnost přímé regulace prostřednictvím TF *StBEL5*, potažmo *StBEL11*, nicméně data pro tento regulační vztah v listech chybějí. I když plnění floému je ovlivňováno také vykládáním floému v sinkových orgánech pomocí *StSUT1*, exprese *StSUT1* při narušení rovnováhy BEL TF (navýšená exprese *StBEL5* v listech) nebyla ve stolonu ovlivněna (Sharma et al., 2016). Mohlo by být zajímavé porovnat denní profil hladiny *StSUT1* v listech, protože exprese je posílena při nadbytku cukrů, a to při zvýšené rychlosti čisté fotosyntézy může být i docela brzy po začátku světelné periody. Posílené odvádění sacharidů z listu nenaznačuje ani celkový obsah rozpustných sacharidů v řapíku (Graf 8). Ovšem tento parametr nemusí těsně korelovat s množstvím odváděných sacharidů, neboť pokud by byl floémový tok urychlen, sacharidy by se v řapíku nezadržovaly a jejich hladina by nestoupla.

I přes to, že transgenní linie mají posílený tuberizační potenciál, podle dat z analýzy sacharidů v řapíku a hladiny *StSUT1* v listech to vypadá, že floémový tok, který nese mobilní signály, by nemusel být posílen. Podobné výsledky byly získány také na linii D69, která má pomalejší floémový tok než kontrolní rostliny, ale i přes to ochotněji tuberizuje. Nemusí tedy existovat přímý vztah mezi silou floémového toku, alokací a hromaděním sacharidů po rostlině, mobilitou transkriptů, jejichž proteiny pozitivně ovlivňují tuberizaci, a zvýšeným tuberizačním potenciálem (Stupecká DP, 2018). K pochopení těchto vztahů může významně pomoci detailní analýza vzorce rozdělování asimilátů po rostlině, tedy i stanovení množství sacharidů, které jsou odváděny z produkčních listů, a nalezení pletiv/orgánů, kde jsou přednostně spotřebovávány. Stanovit množství odváděných sacharidů lze pomocí analýzy floémových exudátů. Tato technika je v naší laboratoři zavedená pro stanovení sacharidů i mobilních RNA. Tento experiment by nám odhalil nejen množství odtékajících sacharidů, ale také jaká je síla toku nesoucího signály. To by ale znamenalo novou kultivaci rostlin, kterou se už do časového plánu nepodařilo zařadit.

Celkový obsah rozpustných sacharidů se v sinkových orgánech, apexu a kořenech, výrazně nelišil mezi transgenními liniemi a kontrolou, ale v kořenech (Graf 11A) bylo až

9x více rozpustných sacharidů než v apexech (Graf 9). U škrobu byla situace odlišná. Kontrolní rostliny obsahovaly podobné množství škrobu v obou zmíněných sinkových orgánech, ale v transgenních liniích došlo k protichůdným změnám – v apexu (Graf 10) se škrob navýšil a v kořenech (Graf 11B) jsem pozorovala trend snížení jeho obsahu. To naznačuje zvýšené využití sacharidů pro růst kořenů u transformantů. V případě linie D69, která oproti kontrole měla redukovaný prýt i kořenový systém, Ševčíková et al. (2017) stanovili množství rozpustných sacharidů a škrobu odpovídající zmíněnému vysvětlení rozdílů mezi apexem a kořeny – celkový obsah sacharidů byl výrazně navýšen u mutantní linie, obsah škrobu klesl v apexu a v kořenech nebyl změněn. U stolonů a vyvíjejících se hlízek jsem průkazné rozdíly v obsahu ani spektru nestrukturních sacharidů mezi transgenními liniemi a WT nezaznamenala, ale na Grafu 13 je dobře patrný rozdíl v zastoupení přítomných sacharidů mezi těmito orgány. Ve stolonech je vyšší obsah hexóz a v hlízkách je navýšen obsah sacharózy a především škrobu, což je v souladu s výsledky, které uvádějí Viola et al. (2001). Pro tyto parametry u sinkových orgánů nemám opakování z více experimentů, jejich stanovení jsem provedla pouze v experimentu box III. Pro případné ověření lze použít nezpracované vzorky linie 1 z experimentu box II. Mohlo by být zajímavé stanovit obsah nestrukturních sacharidů také v mladých sinkových listech. Hladiny jednotlivých rozpustných sacharidů stanovili také Meng et al. (2020) ve vzorcích listů a stolonů polopozdního cv. Jizhangshu 12. Obsahy rozpustných sacharidů na jednotku čerstvé hmotnosti byly srovnatelné. Tomuto výsledku má data neodpovídají – jak obsah jednotlivých rozpustných sacharidů, tak celkový obsah, se v listech výrazně liší od obsahů ve stolonech, kde jsem zaznamenala přibližně 4x více rozpustných sacharidů než v produkčních listech. Porovnání výsledků je problematické z důvodu využití jiné metody stanovení obsahu sacharidů a rozdílného způsobu odběru stolonů (až 2,5 cm oproti mému 0,5 cm), neboť obsah sacharidů se podél jejich délky mění (Viola et al., 2001).

Zvýšená rychlost fotosyntézy nevedla ke zvýšení obsahu nestrukturních sacharidů v listech. Asimiláty zde tedy musí být efektivně spotřebovávány, nebo odváděny a spotřebovávány v sinkových pletivech, kde mohou být využity k posílení růstu (Basu a Minhas, 1991; Lawlor a Paul, 2014), neboť ani v nich jsem zvýšení obsahu nestrukturních sacharidů nepozorovala. Změna v rovnováze BEL TF expresí *StBEL11* AS způsobuje změny ve fyziologických procesech v listu, které se projevují vyšší fotosyntetickou kapacitou. Zaměřila jsem se tedy na růstové charakteristiky, abych zjistila, jestli v liniích nedochází ke změnám v rozdělování biomasy. Zvolila jsem autotrofní kultivaci *in vitro* z důvodu obtížného hodnocení kořenového systému rostlin kultivovaných *ex vitro*, neboť je velmi jemný,

rozvětvený a nelze jej efektivně preparovat. Z celkového hodnocení vyjímám linii 19, protože se jako jediná nelišila v růstu od kontroly. Pravděpodobně došlo transformací k nějakému zásahu do dalších regulačních drah. Ostatní transgenní linie vykazovaly sníženou čerstvou hmotnost prýtu (Graf 15A), což Ghate et al. (2017) u bramboru ssp. *andigena* s konstruktem *StBEL11* AS nepozorovali. Dokonce v případě overexpresie *StBEL5* (pod 35S CaMV promotorem) došlo u ssp. *andigena* k vyšší rychlosti růstu prýtu (Chen et al., 2003). Čerstvá hmotnost prýtu může být ovlivněna změnami v biomase listů (počet, plocha) anebo stonku (délka, tloušťka). Je zajímavé, že u transgenních linií s *StBEL11* AS nedošlo ke snížení počtu listů, ani ke zkrácení či ztenčení stonku oproti kontrole (Graf 16), ale výrazně se snížila celková plocha listů (Graf 17A). Zmenšení plochy listů by mohlo souviset s vyšší podporou růstu podzemních sinků. Ovšem nižší vklad do listové plochy snižuje fotosyntetickou kapacitu, která by mohla být kompenzována navýšením rychlosti fotosyntézy, kterou jsem zaznamenala u *ex vitro* rostlin, aby méně dotovaný prýt uspokojil požadavky sinků. Ke snížení listové plochy došlo také např. u transgenního tabáku s nadprodukcí T6P, který měl zvýšenou rychlost čisté fotosyntézy, a tak i zvýšenou fotosyntetickou kapacitu na jednotku listové plochy (Pellny et al., 2004). Vliv metabolismu sacharidů na rovnováhu mezi fotosyntetickou kapacitou a produkcí listové plochy byl dosud málo prozkoumán. Hypotéza, kterou uvádějí Hesketh et al. (1981), považuje vyrovnávání listové plochy s fotosyntetickou kapacitou za ústřední strategii regulace fotosyntézy na úrovni celé rostliny. Ačkoli jsem nezaznamenala průkazné změny ve stavbě stonku, určitý trend snížení jeho tloušťky byl patrný. Snížit průměr stonku může nízká dostupnost sacharózy v pletivech stonku, ke které může dojít např. při overexpresi *StSP6A* pod kontrolou listově/stonkově specifického promotoru (Lehretz et al., 2021). *StSP6A* zabráňuje radiálnímu výdeji sacharózy z floému během transportu stonkem prostřednictvím inhibice sacharózového transportéru SWEET11 (Abelenda et al., 2019). Do terminálních sinků je pak dopraveno více sacharózy díky redukcí jejího unikání a je tak podpořena jak tvorba stolonů, tak tuberizace (Lehretz et al., 2021).

U kořenového systému došlo ke snížení čerstvé hmotnosti (Graf 15B). U linií poddruhu *andigena* overexprimující GAS:BEL5 (promotor galaktinolsyntázy cílicí expresi do průvodních buněk žilnatiny listu; Ayre et al. [2003]) došlo k navýšení tohoto parametru oproti kontrole (Lin et al., 2013). Jelikož kořeny bramboru jsou velmi jemné a husté i v podmínkách *in vitro*, délku kořenů a jejich větvení nebylo možné spolehlivě vyhodnotit. Rozhodla jsem se tedy kopírovat experiment z práce Lin et al. (2013) a stanovit délku a větvení kořenů v kořenové kultuře. U délek kořenů transgenních linií byl patrný mírný trend

nárůstu. Lin et al. (2013) u linií ssp. *andigena* s GAS:BEL5 konstruktem pozorovali u kořenových kultur častější větvení kořenů a delší laterální kořeny než u WT. Větvení kořenů jsem pozorovala u minimálního počtu vzorků, WT a jedna linie se nerozvětvyly vůbec. S ohledem na použitý promotor GAS, který je exprimován v průvodních buňkách žilek vyšších řádů, a tak navyšuje transportní pool *StBEL5* mRNA, by kořenové kultury neměly být tímto konstruktem vůbec ovlivněny. Je tedy zvláštní, že ve studii Lin et al. (2013) takový experiment použili a že došlo k ovlivnění růstu kořenů. Hladina *StBEL11* mRNA v kořenech intaktních transgenních rostlin zahrnuje expresi přímo v kořeni (konstitutivní 35S CaMV promotor), ale také dotransportovanou mRNA z prýtu floémem. V kořenech BEL11 AS linií je stanovený pokles *StBEL11* transkriptu srovnatelný s hladinou *StBEL11* v listu (kapitola 4.3.1.; Zounková et al., 2021). V kořenových kulturách hladina *StBEL11* může být tedy jiná, a tak při porovnání dat kořenů intaktních rostlin mohou být data kořenových kultur tímto faktem ovlivněna.

I když došlo ke snížení čerstvé hmotnosti prýtu i kořenů transgenních linií oproti WT, R/S poměr byl navýšen (Graf 15D), což může souviset se změnou v rozdělování asimilátů po rostlině. To by odpovídalo výsledkům studie Lehretz et al. (2021), ve které byla u rostlin cv. Solara bez stolonů nebo hlíz (2 týdny od vysazení do podmínek *ex vitro*) s overexpresí *StSP6A* také zaznamenána vyšší alokace asimilátů do kořenů. Možnou podporu alokace asimilátů do kořenů při absenci stolonů, jakožto jediného podzemního sinkového orgánu, bylo možné očekávat i na základě zvýšeného výnosu hlíz u bramboru ssp. *andigena* s konstruktem s *StBEL11* AS (Ghate et al., 2017). Bohužel kořeny v tomto případě nebyly analýze podrobeny i přesto, že *StBEL11* transkript je druhým nejabundantnějším transkriptem BEL (hned po *StBEL29*) v kořenech (Sharma et al., 2014). Jeho hladina za krátkého dne je srovnatelná s hladinou *StBEL5* v listech. V řapících a stolonech je transkript *StBEL11* přítomen výrazně méně (Sharma et al., 2014).

Expresí *StBEL11* u ssp. *andigena* vedla k navýšení výnosu hlíz, což Ghate et al. (2017) vysvětlují ovlivněním signalizační tuberizační dráhy, kdy ve stolonech transgenních rostlin došlo k trojnásobnému navýšení hladiny *StSP6A* transkriptu oproti WT. V listech cv. Kamýk se sníženou hladinou *StBEL11* k ovlivnění hladiny *StSP6A* nedošlo (Zounková DP, 2019; osobní sdělení), tedy tuberigenní signál tvořený listy může být u transgenních linií slabší. Pokud dochází k navýšení hladiny *StSP6A* transkriptu ve stolonech, u transformantů by tedy bylo možné vysvětlit navýšení tvorby hlíz posílením autoregulační smyčky exprese *StSP6A* ve stolonech, jak bylo pozorováno u ssp. *andigena* (Navarro et al., 2011). Pro zmapování síly jednoho z klíčových tuberigenních signálů, jehož exprese je částečně

pod kontrolou BEL TF, v současnosti probíhá stanovení hladin *StSP6A* ve stolonech a výhledově také v kořenech.

Ne vždy konzistentní výsledky s prací Ghate et al. (2017) mohou být dány tím, že autoři vybrali pro všechny analýzy pouze linie se sníženou hladinou *StBEL11* v listech i stolonech, ale zároveň ukázali, že oproti WT více tuberizují také linie se sníženou expresí pouze v listech nebo pouze ve stolonech. Zvolený způsob kultivace, kde lze snadno preparovat kořeny, bohužel neumožňuje tvorbu klíčových sinků – stolonů, resp. hlíz. Během sepisování práce Mgr. A. Zounková testovala možnost kultivace bramboru v hydroponii, která umožňuje vytvoření všech relevantních sinků. Pokus byl úspěšný a v současnosti probíhá experiment se všemi transgenními liniemi a kontrolou, který poskytne materiál pro hodnocení růstových charakteristik, včetně stolonů a hlíz.

Na základě dat získaných v rámci této diplomové práce, dalších výsledků naší laboratoře a literárních dat lze navrhnout hypotetický model, který postihuje roli *StBEL11* v regulaci nástupu tvorby hlíz. Snížená hladina *StBEL11* transkriptu podpořila navýšení síly podzemních sinků, která přes změnu sacharidové signalizace posílila distribuci asimilátů právě do podzemních sinků. O uhlík a energii byl tedy ochuzen prýtl, což se projevilo především sníženou plochou listů. Aby celková fotosyntetická kapacita na rostlinu byla zachována, možná i posílena, byla zvýšena rychlost čisté fotosyntézy. *StBEL11* je exprimován v listech, odkud je jeho mRNA jako mobilní signál transportována (Ghate et al., 2017). Místo translace *StBEL11* není přesně známo. Mohla by probíhat nejen ve stolonu, ale i v listech, kde by *StBEL11*, resp. *StBEL5* (prostřednictvím kompetice *StBEL11* a *StBEL5* o svého interakčního partnera *POTH1*) mohl ovlivňovat např. fotosyntetický aparát, aby jeho výkon koreloval s poptávkou sinků. Je pravděpodobné, že *StBEL11* působí jako signál jak v sinkovém, tak ve zdrojovém orgánu, neboť roubovací experiment neukázal na dominantní efekt roubu (Zounková, osobní sdělení).

Ačkoli je zřejmá souvislost mezi rychlostí asimilace CO_2 , produkcí asimilátů a hmotností člověkem sklízeného orgánu, nemusí mezi nimi existovat jednoduchá vztahová linka (Reynolds et al., 2011), neboť rostlina stále podřizuje produkci a spotřebu asimilátů potřebám zachování jedince, případně přečkání nepříznivých podmínek.

6. Závěr

Odvodila jsem 42 nezávislých transgenních linií *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* a ověřila přítomnost *StBEL11* AS konstruktů. V rámci časové dotace se bohužel nepodařilo stanovit hladiny *StBEL11* transkriptu u odvozených linií, což znemožnilo další charakterizaci materiálu. Pro další charakterizaci bylo tedy možné využít pouze rostliny *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Kamýk a jeho ověřených transgenních linií se sníženou hladinou *StBEL11* transkriptu.

Z vybraných fotosyntetických charakteristik transgenní linie oproti kontrole:

- nevykazovaly ovlivněnou fluorescenci chlorofylu *a*, a tak snížením hladiny *StBEL11* není zasažena primární fáze fotosyntézy,
- ukázaly zvýšený obsah fotosyntetických pigmentů (chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, karotenoidy; kromě 1 linie) a nezměněný obsah antokyanů v listech,
- vykazaly vyšší rychlost čisté fotosyntézy,
- nevykazaly systematické změny v obsahu a distribuci rozpustných sacharidů a škrobu,
- vykazaly trend snížení hladiny *StSUT1* transkriptu v listech.

Z vybraných růstových charakteristik transgenní linie (vyjma linie 19) oproti kontrole:

- vykazaly sníženou čerstvou hmotnost prýtu i kořenového systému (průkazné u 2 linií),
- vykazaly R/S poměr posunutý ve prospěch kořenů (průkazné u 2 linií),
- nevykazaly jiný počet listů a ani změnu délky a tloušťky stonku,
- vykazaly sníženou celkovou listovou plochu a trend ke snížení specifické listové plochy,
- nevykazaly změnu v délce kořenů.

Snížená hladina *StBEL11* podpořila alokaci asimilátů do podzemních orgánů (kořenů) a zvýšenou rychlostí čisté fotosyntézy kompenzovala snížení celkové listové plochy rostlin.

7. Seznam použité literatury

Abe M., Kobayashi Y., Yamamoto S., Daimon Y., Yamaguchi A., Ikeda Y., Ichinoki H., Noh-taguchi M., Goto K. a Araki T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, **309** (5737): 1052-1056.

Abelenda J. A., Cruz-Oró E., Franco-Zorilla J. M. a Prat S. (2016). Potato StCONSTANS-like1 suppresses storage organ formation by directly activating the FT-like *StSP5G* repressor. *Current Biology*, **26** (7): 872-881.

Abelenda J. A., Bergonzi S., Oortwijn M., Sonnewald S., Du M., Visser R. G. F., Sonnewald U. a Bachem Ch. W. B. (2019). Source-Sink regulation is mediated by interaction of an FT homolog with a SWEET protein in potato. *Current Biology*, **29** (7): 1178-1186.

Ahmadi-Lahijani M. J., Kafi M., Nezami A., Nabati J. a Erwin J. E. (2021). ABA and BAP improve the accumulation of carbohydrates and alter carbon allocation in potato plants at elevated CO₂. **27** (2): 313-325.

Ainsworth E. A. a Bush D. R. (2011). Carbohydrate export from the leaf: A highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiology*, **155** (1): 64-69.

Appeldoorn N. J. G., de Bruijn S. M., Koot-Gronsveld E. A. M., Visser R. G. F., Vreugdenhil D., van der Plas L. H. W. (1997). Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexose-phosphate during early tuberisation of potato. *Planta*, **202** (2): 220-226.

Ashraf M. a Harris P. J. C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, **51** (2): 163-190.

Aukerman M. J. a Sakai H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. *The Plant Cell*, **15** (11): 2730-2741.

Ayere B. G., Blair J. E. a Turgeon R. (2003). Functional and phylogenetic analyses of a conserved regulatory program in the phloem of minor veins. *Plant Physiology*, **133** (3): 1229-1239.

Banerjee A. K., Chatterjee M., Yu Y., Suh S.-G., Miller W. A. a Hannapel D. J. (2006). Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway. *The Plant Cell*, **18** (12): 3443-3457.

Barker L., Kühn C., Weise A., Schulz A., Gebhardt C., Hirner B., Hellmann H., Schulze W., Ward J. M. a Frommer W. B. (2000). SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *The Plant Cell*, **12** (7): 1153-1164.

Basu P. S. a Minhas J. S. (1991). Heat tolerance and assimilate transport in different potato genotypes. *Journal of Experimental Botany*, **42** (7): 861-866.

Bellaoui M., Pidkowich M. S., Samach A., Kushalappa K., Kohalmi S. E., Modrusan Z., Crosby W. L. a Haughen G. W. (2001). The Arabidopsis BELL1 and KNOX TALE homeodomain proteins interact through a domain conserved between plants and animals. *The Plant Cell*, **13** (11): 2455-2470.

Bennett J. (1983). Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. *Biochemical Journal*, **212** (1): 1-13.

Bhogale S., Mahajan A. S., Natarajan B. V., Rajabhoj M., Thulasiram H. a Banerjee A. K. (2014). *MicroRNA156*: A potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant Physiology*, **164** (2): 1011-1027.

Björkman O. a Demming B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, **170** (4): 489-504.

- Bou-Torrent J., Marínez-García J. F., García-Martínez J. L., Prat S. a Blazquez M. A.** (2011). Gibberellin A1 metabolism contributes to the control of photoperiod-mediated tuberization in potato. *PLoS ONE*, **6** (9): e24458.
- Buhr F., El Bakkouri M., Valdez O., Pollmann S., Lebedev N., Reinbothe S. a Reinbothe C.** (2008). Photoprotective role of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105** (34): 12629-12634.
- Bürglin T. R.** (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Research*, **25** (21): 4173-4180.
- Bürkle L., Hibberd J. M., Quick W. P., Kühn C., Hirner B. a Frommer W. B.** (1998). The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology*, **118** (1): 59-68.
- Carrera E., Bou J., Garcia-Martinez J. L. a Prat S.** (2000). Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *The Plant Journal*, **22** (3): 247-256.
- Celis-Gamboa C., Struik P. C., Jacobsen E. a Visser R. G. F.** (2003). Temporal dynamics of tuber formation and related processes in a crossing population of potato (*Solanum tuberosum*). *Annals of Applied Biology*, **143** (2): 175-186.
- Chatterjee M., Banerjee A. K. a Hannapel D. J.** (2007). A *BELLI*-like gene of potato is light activated and wound inducible. *Plant Physiology*, **145** (4): 1435-1443.
- 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 Physiology*, **132** (3): 1391-1404.
- Chen H., Banerjee A. K. a Hannapel D. J.** (2004). The tandem complex of BEL and KNOX partner sis required for transcriptional repression of *ga20ox1*. *The Plant Journal*, **38** (2): 276-284.
- Chen L.-Q., Qu X.-Q., Hou B.-H., Sosso D., Osorio S., Fernie A. R. a Frommer W. B.** (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*, **335** (6065): 207-211.
- Chen C.-T. a Setter T. L.** (2021). Role of tuber developmental processes in response of potato to high temperature and elevated CO₂. *Plants*, **10** (5): 871.
- Chincinska I., Liesche J., Krügel U., Michalska J., Geigenberger P., Grimm B. a Kühn C.** (2008). Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiology*, **146** (2): 323-324.
- Chincinska I., Gier K., Krügel U., Liesche J., He H., Grimm B., Harrn F. J. M., Cristescu S. M. a Kühn C.** (2013). Photoperiodic regulation of the sucrose transporter StSUT4 affects the expression of circadian-regulated genes and ethylene production. *Frontiers in Plant Science*, **4**: 26.
- Cho S. K., Sharma P., Butler N., Kang I.-H., Shah S., Rao A. G. a Hannapel D. J.** (2015). Polypyrimidine tract-binding proteins of potato mediate tuberization through an interaction with *StBEL5* RNA. *Journal of Experimental Botany*, **66** (21): 6835-6847.
- Corbesier L., Lejeune P. a Bernier G.** (1998). The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparisson between the wild type and a starchless mutant. *Planta*, **206** (1):131-137.
- Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C. a Coupland G.** (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, **316** (5827): 1030-1033.

- Dietze J., Blau A. a Willmitzer L.** *Agrobacterium*-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*). V: Potrykus, I., Spangenberg, G. (eds.): *Gen Transfer to Plants*. Springer-Verlag, Berlin, 1995, 24-29.
- Drake B. G., Gonzàle-Meler M. A. a Long S. P.** (1997). MORE EFFICIENT PLANTS: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48** (1): 609-639.
- 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. *Current Biology*, **23** (12): 1057-1064.
- Faivre-Rampant O., Cardle L., Marshall D., Viola R. a Taylor M. A.** (2004). Changes in gene expression during meristem activation processes in *Solanum tuberosum* with a focus on the regulation of an auxin response factor gene. *Journal of Experimental Botany*, **55** (397): 613-622.
- Ferreira S. J., Senning M., Sonnewald S., Keßling P.-M., Goldstein R. a Sonnewald U.** (2010). Comparative transcriptome analysis coupled to X-ray CT reveals sucrose supply and growth velocity as major determinants of potato tuber starch biosynthesis. *BMC Genomics*, **11** (1): 93.
- Fischer L., Lipavská H., Hausman J.-F. a Opatrný Z.** (2008). Morphological and molecular characterization of a spontaneously tuberizing potato mutant: an insight into the regulatory mechanisms of tuber induction. *BMC Plant Biology*, **8** (1): 117.
- Fu D.-Q., Meng L.-H., Zhu B.-Z., Zhu H.-L., Yan H.-X. a Luo Y.-B.** (2016). Silencing of the *SINAP7* gene influences plastid development and lycopene accumulation in tomato. *Scientific Reports*, **6** (1): 38664.
- Gao Y., Jia L., Hu B., Alva A. a Fan M.** (2014). Potato stolon and tuber growth influenced by nitrogen form. *Plant Production Science*, **17** (2): 138-143.
- Gehring W. J., Qian Y. Q., Billeter M., Furukubo-Tokunaga K. a Schier A. F.** (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, **78** (2): 211-223.
- 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 Molecular Biology*, **93** (6): 563-578.
- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P. B., Puech-Pagès V., Dun E. A., Pillot J.-P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J.-C., Bouwmeester H., Bécard G., Beveridge C. A., Rameau C. a Rochange S. F.** (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, **455** (7210): 189-194.
- Gou J., Strauss S. H., Tsai Ch. J., Fang K., Chen Y., Jing X. a Busov V. B.** (2010). Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *The Plant Cell*, **22** (3): 623-639.
- Gregory L. E.** (1965). Some factors for tuberization in the potato plant. *American Journal of Botany*, **43** (4): 281-288.
- Hannapel D. J., Sharma P. a Lin T.** (2013). Phloem-mobile messenger RNAs and root development. *Frontiers in Plant Science*, **4**: 257.
- Hardigan M. A., Laimbeer F. P. E., Newton L., Crisovan E., Hamilton J. P., Vaillancourt B., Wiegert-Rininger K., Wood J. C., Douches D., Farré E. M., Veilleux R. E. a Buell C. R.** (2017). Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, **114** (46): E9999-E10008.

- He H., Chincinska I., Hackel A., Grimm B. a Kühn C.** (2008). Phloem mobility and stability of sucrose transporter transcripts. *The Open Plant Science Journal*, **2** (1): 1-14.
- Hesketh J. D., Ogren W. L., Hageman M. E. a Peters D. B.** (1981). Correlations among leaf CO₂-exchange rates, areas and enzyme activities among soybean cultivars. *Photosynthesis Research*, **2** (1): 21-30.
- Huang S., Zheng C., Zhao Y., Li Q., Liu J., Deng R., Lei T., Wang S. a Wang X.** (2021). RNA interference knockdown of the brassinosteroid receptor BRI1 in potato (*Solanum tuberosum* L.) reveals novel functions for brassinosteroid signaling in controlling tuberization. *Scientia Horticulturae*, **290**: 110516.
- Imaizumi T., Schultz T. F., Harmon F. G., Ho L. A. a Kay S. A.** (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Science*, **309** (5732): 293-297.
- Jackson S. D., Heyer A., Dietze J. a Prat S.** (1996). Phytochrome B mediates the photoperiodic control of tuber formation in potato. *The Plant Journal*, **9** (2): 159-166.
- Jung J.-H., Seo Y.-H., Seo P. J., Reyes J. L., Yun J., Chua N.-H. a Park C.-M.** (2007). The *GIGANTEA*-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **19** (9): 2736-2748.
- Kim D., Cho Y., Ryu H., Kim Y., Kim T.-H. a Hwang I.** (2013). BLH1 and KNAT3 modulate ABA responses during germination and early seedling development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **75** (5): 755-766.
- Kloosterman B., Navarro C., Bijsterbosh 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: Role for a GA 2-oxidase in potato tuber development. *The Plant Journal*, **52** (2): 362-373.
- Kloosterman B., Abelenda J. A., del Mar Carretero Gomez M. Oortwijn M., de Boer J. M., Kowitzanich K., Horvath B. M., van Eck H. J., Smaczniak C., Prat S., Visser R. G. a Bachem C. W. B.** (2013). Naturally occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes. *Nature*, **495** (7440): 246-250.
- Kofroňová M., Hrdinová A., Mašková P., Tremlová J., Soudek P., Petrová Š., Pinkas D. a Lipavská H.** (2020). Multi-component antioxidative systém and robust carbohydrate status, the essence of plant arsenic tolerance. *Antioxidants*, **9** (4): 283.
- Kühn C., Franceschi V. R., Schulz A., Lemoine R. a Frommer W. B.** (1997). Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science*, **257** (5304): 1298-1300.
- Kühn C., Hajirezaei M.-R., Fernie A. R., Roessner-Tunali U., Czechowski T., Hirner B. a Frommer W. B.** (2003). The sucrose transporter *StSUT1* localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiology*, **131** (1): 102-113.
- Kumar R., Kushalappa K., Godt D., Pidkowich M. S., Pastorelli S., Hepworth S. R. a Haughn G. W.** (2007). The *Arabidopsis* BEL1-LIKE HOMEODOMAIN proteins SAW1 and SAW2 to regulate *KNOX* expression spatially in leaf margins. *The Plant Cell*, **19** (9): 2719-2735
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H. a Kyojuka J.** (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, **445** (7128): 652-655.
- Lawlor D. W. a Paul M. J.** (2014). Source/sink interactions underpin crop yield: the case for trehalose 6-phosphate/SnRK1 in improvement of wheat. *Frontiers in Plant Science*, **5**: 418.

- Lehretz G. G., Sonnewald S. a Sonnewald U.** (2021). Assimilate highway to sink organs – Physiological consequences of SP6A overexpression in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Plant Physiology*, **266**: 153530.
- Lemoine R., Kühn C., Thiele N., Delrot S. a Frommer W. B.** (1996). Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: effects on amount and activity. *Plant, Cell and Environment*, **19** (10): 1124-1131.
- Liesche J., Schulz A., Krügel U., Grimm B. a Kühn C.** (2008). Dimerization and endocytosis of the sucrose transporter StSUT1 in mature sieve elements. *Plant Signaling & Behavior*, **3** (12): 1136-1137.
- Lin T., Sharm P., Gonzalez D. H., Viola I. L. a Hannapel D. J.** (2013). The impact of the long-distance transport of a *BEL1*-like messenger RNA on development. *Plant Physiology*, **161** (2): 760-772.
- Liu Y., You S., Taylor-Teeples M., Li W. L., Schuetz M., Brady S. M. a Douglas C. J.** (2014). BEL1-LIKE HOMEODOMAIN6 and KNOTTED ARABIDOPSIS THALIANA7 interact and regulate secondary cell wall formation via repression of *REVOLUTA*. **26** (12): 4843-4861.
- Lunn J. E., Feil R., Hendriks J. H. M., Gibon Y., Morcuende R., Osuna D., Scheible W.-R., Carillo P., Hajirezaei M.-R. a Stitt M.** (2006). Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, **397** (1): 139-148.
- Lunn J. E., Delorge I., Figueroa C. M., van Dijck P. a Stitt M.** (2014). Trehalose metabolism in plants. *79* (4): 544-567.
- 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 Molecular Biology*, **79** (6): 595-608.
- Mancinelli A. L., Yang C.-P. H., Lindquist P., Anderson O. R. a Rabino I.** (1975). Photocontrol of anthocyanin synthesis: III. The action of streptomycin on the synthesis of chlorophyll and anthocyanin. *Plant Physiology*, **55** (2): 251-257.
- Martin A., Adam H., Díaz-Mendoza M., Zurczak M., González-Schain N. D. a Suárez-López P.** (2009). Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA *miR172*. *Development*, **136** (17): 2873-2881.
- Mauk C. S. a Langille A. R.** (1978). Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L.: cis-zeatin riboside in the potato plant: Its identification and changes in endogenous levels as influenced by temperature and photoperiod. *Plant Physiology*, **62** (3): 438-442.
- Meng L., Fan Z., Zhang Q., Wang C., Gao Y., Deng Y., Zhu B., Zhu H., Chen J., Shan W., Yin X., Zhong S., Grierson D., Jiang C.-Z., Luo Y a Fu D.-Q.** (2018). BEL1-LIKE HOMEODOMAIN 11 regulates chloroplast development and chlorophyll synthesis in tomato fruit. *The Plant Journal*, **94** (6): 1126-1140.
- Meng L., Zhang T., Chen Y., Zhang Y., Wang X., Qin J. a Meng M.** (2020). The influence of endogenous sugar on potato tuberization in *in vivo* conditions. *American Journal of Potato Research*, **97** (3): 297-307.
- Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.-H., Liu Y.-X., Hwang I., Jones T. a Sheen J.** (2003). Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, **300** (5617): 332-336.

- Morris W. L., Hancock R. D., Ducreux L. J. M., Morris J. A., Usman M., Verrall S. R., Sharma S. K., Bryan G., Mencil 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: System biology of tuberization in potato. *Plant, Cell & Environment*, **37** (6): 1351-1363.
- Mukherjee K., Brocchieri L. a Bürglin T. R.** (2009). A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Molecular Biology and Evolution*, **26** (12): 2775-2794.
- Muñiz García M. N., Giammaria V., Grandellis C., Téllez-Iñón M. T., Ulloa Rita M. a Capiati D. A.** (2012). Characterization of StABF1, a stress-responsive bZIP transcription factor from *Solanum tuberosum* L. that is phosphorylated by StCDPK2 *in vitro*. *Planta*, **235** (4): 761-778.
- Muñiz García M. N., Stritzler M. a Capiati D. A.** (2014). Heterologous expression of Arabidopsis *ABF4* gene in potato enhances tuberization through ABA-GA crosstalk regulation. *Planta*, **239** (3): 615-631.
- Murashige T. a Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15** (3): 473-497.
- Navarro C., Abelenda J. A., Cruz-Oró E., Cuéllar 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*, **478** (7367): 119-122.
- Niemann M. C. E., Weber H., Hluska T., Leonte G., Anderson S. M., Novák O., Senes A. a Werner T.** (2018). The cytokinin oxidase/dehydrogenase CKX1 is a membrane-bound protein requiring homooligomerization in the endoplasmic reticulum for its cellular activity. *Plant Physiology*, **173** (3): 2024-2039.
- Nunes C, O'Hara L. E., Primavesi L. F., Delatte T. L., Schlupe H., Somsen G. W., Silva A. B., Feveireiro P. S., Wingler A. a Paul M. J.** (2013). The trehalose 6-phosphate/SnRK1 signaling pathway primes growth recovery following relief of sink limitation. *Plant Physiology*, **162** (3): 1720-1732.
- Passner J. M., Ryoo H. D., Shen L., Mann R. S. a Aggarwal A. K.** (1999). Structure of a DNA-bound Ultrathorax-Extradenticle homeodomain complex. *Nature*, **397** (6721): 714-719.
- Paul M. J. a Foyer C. H.** (2001). Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **52** (360): 1383-1400.
- Pellny T. K., Ghannoum O., Conroy J. P., Schlupe H., Smeekens S., Andralojc J., Krause K. P., Goddijn O. a Paul M. J.** (2004). Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnology Journal*, **2** (1): 71-82.
- Raices M., Ulloa R. M., MacIntosh G. C., Crespi M. a Téllez-Iñón M. T.** (2003). *StCDPK1* is expressed in potato stolon tips and is induced by high sucrose concentration. *Journal of Experimental Botany*, **54** (392): 2589-2591.
- Rapoport H. F. a Loomis R. S.** (1985). Interaction of storage root and shoot in grafted sugarbeet and chard. *Crop Science*, **25** (6): 1079-1084.
- Raspor M., Motyka V., Žižková E., Dobrev P. I., Trávníčková A., Zdravković-Korać S., Simonović A., Ninković S a Dragičević I. Č.** (2012). Cytokinin profiles of *AtCKX2*-overexpressing potato plants and the impact of altered cytokinin homeostasis on tuberization *in vitro*. *Journal of Plant Growth Regulation*, **31** (3): 460-470.
- Raspor M., Motyka V., Ninković S., Malbeck J., Dobrev P. I., Zdravković-Korać S., Simonović A., Čosić T., Cingel A., Savić J., Zahajská L., Tadić V a Dragičević I. Č.** (2021). Overexpressing *AtCKX1* in potato plants grown *in vitro*: The effects on cytokinin composition and tuberization. *Journal of Plant Growth Regulation*, **40** (1): 37-47.

- Reinders A., Schulze W., Kühn C., Barker L., Schulz A., Ward J. M. a Frommer W. B.** (2002). Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element. *The Plant Cell*, **14** (7): 1567-1577.
- Ribeiro R. V., Machado E. ., Magalhães Filho J. R., Lobo A. K. M., Martins M. O., Silveira J. A. G., Yin X. a Struik P. C.** (2016). Increased sink strength offsets the inhibitory effect of sucrose on sugarcane photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, **208**: 61-69.
- Riesmeier J. W., Hirner B. a Frommer W. B.** (1993). Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *The Plant Cell*, **5** (11): 1591-1598.
- Riesmeier J. W., Willmitzer L a Frommer W. B.** (1994). Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *The EMBO Journal*, **13** (1): 1-7.
- Rodríguez-Falcón M., Bou J. a Prat S.** (2006). SEASONAL CONTROL OF TUBERIZATION IN POTATO: Conserved elements with the flowering response. *Annual Review of Plant Biology*, **57** (1): 151-180.
- Rolland F., Baena-Gonzalez E. a Sheen J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, **57** (1): 675-709.
- Roumeliotis E., Kloosterman B., Oortwijn M., Kohlen W., Bouwmeester H. J., Visser R. G. F. a Bachem C. W. B.** (2012). The effect of auxin and strigolactones on tuber initiation and stolon architecture in potato. *Journal of Experimental Botany*, **63** (12): 4539-4547.
- 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 Physiology*, **132** (1): 106-117.
- Rutjens B., Bao D., van Eck-Stouten E., Brand M., Smeekens S. a Proveniers M.** (2009). Shoot apical meristem function in *Arabidopsis* requires the combined activities of three BEL1-like homeodomain proteins. *The Plant Journal*, **58** (4): 641-654.
- ŘÍHOVÁ Barbora.** Transformace lilku bramboru genem kódujícím proteázový inhibitor SPI-2. Praha 2013. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin. Vedoucí práce: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.
- 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*, **318** (5848): 261-265.
- Schwab R., Palatinik J. F., Riester M., Schommer C., Schmid M. a Weigel D.** (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, **8** (4): 517-527.
- Sharma P., Lin T., Grandellis C., Yu M. a Hannapel D. J.** (2014). The BEL1-like family of transcription factors in potato. *Journal of Experimental Botany*, **65** (2): 709-723.
- Sharma P., Lin T. a Hannapel D. J.** (2016). Targets of the *StBEL5* transcription factor include the FT ortholog *StSP6A*. *Plant Physiology*, **170** (1): 310-324.
- Singh A., Siddappa S., Bhardwaj V., Singh B., Kumar D. a Singh B. P.** (2015). Expression profiling of potato cultivars with contrasting tuberization at elevated temperature using microarray analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, **97**: 108-116.
- Smith H. M. S., Boschke I. a Hake S.** (2002). Selective interaction of plant homeodomain proteins mediates high DNA-binding affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99** (14): 9579-9584.
- Smith H. M. S. a Hake S.** (2003). The interaction of two homeobox genes, *BREVIPEDICELLUS* and *PENNYWISE*, regulates internode patterning in the *Arabidopsis* inflorescence. *The Plant Cell*, **15** (8): 1717-1727.

- Solfanelli C., Poggi A., Loreti E., Alpi A. a Perata P.** (2006). Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **140** (2): 637-646.
- Song Y. H., Smith R. W., To B. J., Millar A. J. a Imaizumi T.** (2012). FKF1 conveys timing information in photoperiodic flowering. *Science*, **336** (6084): 1045-1049.
- Stirbet A. a Govindjee** (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **104** (1-2): 236-257.
- STUPECKÁ Lenka.** Indukce tvorby hlíz u spontánně tuberizující linie bramboru: úloha sacharidů a mobilních transkriptů. Praha, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin. Vedoucí práce: RNDr. Petra Mašková, Ph.D.
- Ševčíková H., Mašková P., Tarkowská D., Mašek T. a Lipavská H.** (2017). Carbohydrates and gibberellins relationship in potato tuberization. *Journal of Plant Physiology*, **214**: 53-63.
- Taoka K., Ohki I., Tsuji H., Furuita K., Hayashi K., Yanase T., Yamaguchi M., Nakashima C., Purwestri Y. A., Tamaki S., Ogaki Y., Shimada C., Nakagawa A., Kojima C. a Shimamoto K.** (2011). 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature*, **476** (7360): 332-335.
- Teo C.-J., Takahashi K., Shimizu K., Shimamoto K. a Taoka K.** (2017). Potato tuber induction is regulated by interactions between components of a tuberigen complex. *Plant and Cell Physiology*, **58** (2): 365-374.
- Viola R., Roberts A. G., Haupt S., Gazzani S., Hancock R. D, Marmioli N., Machray G. C. a Oparka K. J.** (2001). Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *The Plant Cell*, **13** (2): 385-398.
- Weise A., Barker L., Kühn C., Lalonde S., Buschmann H., Frommer W. B. a Ward J. M.** (2000). A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *The Plant Cell*, **12** (8): 1345-1355.
- Wellburn A. R.** (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, **144** (3): 307-313.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., van Onckelen H. a Schmölling T.** (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, **15** (11): 2532-2550.
- White A. C., Rogers A., Rees M a Osborne C. P.** (2015). How can we make plants grow faster? A source-sink perspective on growth rate. *Journal of Experimental Botany*. **67** (1): 31-45.
- Wigge P. A., Kim M. C., Jaeger K. E., Busch W., Schmid M., Lohmann J. U. a Weigel D.** (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, **309** (5737): 1056-1059.
- Winkel-Shirley B.** (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, **126** (2): 485-493.
- Wise A. A., Liu Z. a Binns A. N.** (2006). Culture and maintenance of *Agrobacterium* strains. In: Kan W. (Ed). *Agrobacterium Protocols*, Humana Press, New Jersey: 3-14.
- Wu G., Park M. Y., Conway S. R., Wang J.-W., Weigel D. a Poethig R. S.** (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, **138** (4): 750-759.

- Xiao W., Sheen J. a Jang J.-C.** (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology*, **44** (4): 451-461.
- Xu X., Vreugdenhil D. a van Lammeren A. A. M.** (1998a). Cell division and cell enlargement during potato tuber formation. *Journal of Experimental Botany*, **49** (320): 573-582.
- Xu X., van Lammeren A. A. M., Vermeer E. a Vreugdenhil D.** (1998b). The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant Physiology*, **117** (2): 575-584.
- Xu C., He C. G., Wang Y. J., Bi Y. F. a Jiang H.** (2020). Effect of drought and heat stresses on photosynthesis, pigments, and xanthophyll cycle in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Photosynthetica*, **58** (5): 1226-1236.
- Yu Y. Y., Lashbrook C. C. a Hannapel D. J.** (2007). Tissue integrity and RNA quality of laser microdissected phloem of potato. *Planta*, **226** (3): 797-803.
- Zhu W. J., Chen F., Li P. P., Chen Y. M., Chen M. a Yang Q.** (2019). Identification and characterization of brassinosteroid biosynthesis and signaling pathway genes in *Solanum tuberosum*. *Russian Journal of Plant Physiology*, **66** (4): 628-636.
- Zierer W., Rüscher D., Sonnewald U. a Sonnewald S.** (2021). Tuber and tuberous root development. *Annual Reviews of Plant Biology*, **72** (1): 551-580.
- ZOUNKOVÁ Andrea.** Změna v rovnováze BELL transkripčních faktorů jako nástroj posílení tuberizace u vybraných kultivarů bramboru. Praha, 2019. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin. Vedoucí práce: RNDr. Petra Mašková, Ph.D.
- Zounková A., Mašková P. a Dybová M.** (2021). The role of *StBEL11* transcription factor in potato (*Solanum tuberosum*) tuber formation. *Plant Biology Europe* (International conference, online).
- Zrenner R., Salanoubat M., Willmitzer L. a Sonnewald U.** (1995). Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *The Plant Journal*, **7** (1): 97-107.