

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Meziodrůdová variabilita bramboru z pohledu CNV
analýzy genů metabolické dráhy a obsahu glykoalkaloidů**

Diplomová práce

Bc. Jan Štich

Biotechnologie a šlechtění rostlin

Ing. Vladimíra Sedláková, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Meziodrůdová variabilita bramboru z pohledu CNV analýzy genů metabolické dráhy a obsahu glykoalkaloidů" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19. dubna 2024

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval své vedoucí Ing. Vladimíře Sedlákové, PhD. za cenné rady, ochotu, trpělivost a pomoc při vedení mé diplomové práce. Nadále bych chtěl poděkovat doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi a Ing. Mohamedu Nomanovi za navržení primerů a pomoc s přípravou materiálů pro experimentální část práce. Poděkování také patří Katedře genetiky a šlechtění, která mi umožnila zpracování materiálů v jejích laboratořích. Nakonec bych rád poděkoval své rodině a svým blízkým, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.

Meziodrůdová variabilita bramboru z pohledu CNV analýzy genů metabolické dráhy a obsahu glykoalkaloidů

Souhrn

Tato práce byla zaměřena na zkoumání genetických faktorů ovlivňujících obsah steroidních glykoalkaloidů (SGA) v bramborách se zaměřením na změny počtu kopií (CNV) specifických genů zapojených do biosyntézy SGA. SGA, především α -solanin a α -chaconin, jsou významné kvůli své dvojí roli, a to jako přirozené obranné látky rostlin a potenciální zdravotní nebezpečnosti ve vysokých koncentracích. Pochopení genetického základu variability obsahu SGA má zásadní význam pro šlechtění odrůd brambor s optimálními hladinami SGA – dostatečně vysokými, aby poskytovaly odolnost vůči škůdcům, ale dostatečně nízkými, aby byly bezpečné pro konzumaci.

V této práci jsme použili metodu ddPCR (Droplet Digital PCR) ke kvantifikaci CNV genů *SGT1*, *SGT2* a *SGT3* u různých odrůd brambor. Metoda ddPCR poskytla vysoce přesný a citlivý prostředek k měření počtu kopií genů, což je kritický faktor, o němž jsme předpokládali, že ovlivňuje biosyntézu SGA. Analýza odhalila nízkou variabilitu CNV těchto genů mezi zkoumanými odrůdami, kvůli které nebylo možné prokázat statisticky významnou závislost.

Studie byla provedena v kontrolovaných skleníkových podmínkách, kde byly standardizovány faktory prostředí, jako je složení půdy, dostupnost živin a zavlažování, aby se minimalizovaly vnější vlivy na výsledky. Navzdory těmto kontrolním opatřením poukázala variabilita obsahu SGA pozorovaná mezi biologickými replikáty na komplexní interakci mezi genetickými faktory a podmínkami prostředí.

Výsledky statistických analýz pomocí ANOVY neodhalily žádný významný vliv CNV na koncentrace α -solaninu a α -chaconinu. To bylo poněkud neočekávané a ukazuje to na možnost existence jiných regulačních mechanismů, které ovlivňují biosyntézu SGA v bramborách. Zdůrazňuje to složitost biosyntézy sekundárních metabolitů v rostlinách a naznačuje, že budoucí studie by měly zohlednit širší škálu genetických a environmentálních faktorů, aby bylo možné plně porozumět determinantům hladin SGA v bramborách.

Kromě toho má tento výzkum významné důsledky pro šlechtitelské programy brambor. Naznačuje, že pouhý výběr specifických CNV v genech *SGT* nemusí stačit ke spolehlivé změně obsahu SGA v pěstovaných odrůdách. Místo toho může být zapotřebí komplexnější přístup, který zahrnuje řízení prostředí a případně manipulaci s více geny zapojenými do metabolické dráhy.

Tento komplexní přístup nejen zdůraznil úlohu genetických faktorů při ovlivňování obsahu SGA, ale také podtrhl vliv typu bramborového pletiva (listů, dužniny a slupky) na obsah SGA. Tukeyovy HSD testy poskytly podrobný pohled a odhalily, že různé odrůdy brambor vykazují v různých typech pletiv různé hladiny SGA, což naznačuje jejich potenciální využití ve šlechtění nových odrůd. Odrůdy s vysokým obsahem SGA ve slupce a listech by mohly být zaměřeny na vlastnosti odolnosti vůči škůdcům, zatímco odrůdy s nižším obsahem v dužnině by mohly být vhodnější pro kulinářské využití.

Klíčová slova: *Solanum tuberosum* L., DNA, CNV, α -solanin, α -chaconin

Intervarietal variability of potatoes from the point of view of CNV analysis of metabolic pathway genes and glycoalkaloid content

Summary

This work was focused on the investigation of genetic factors affecting steroid glycoalkaloid (SGA) content in potato, with a focus on copy number variation (CNV) of specific genes involved in SGA biosynthesis. SGAs, especially α -solanine and α -chaconine, are important due to their dual role as natural plant defence substances and potential health hazards at high concentrations. Understanding the genetic basis of variation in SGA content is essential for breeding potato varieties with optimal levels of SGAs – high enough to provide resistance to pests but low enough to be safe for consumption.

In this study, we used the droplet digital PCR (ddPCR) method to quantify CNVs of *SGT1*, *SGT2* and *SGT3* genes in different potato varieties. The ddPCR method provided a highly accurate and sensitive means of measuring gene copy number, a critical factor that we hypothesized affects SGA biosynthesis. The analysis revealed low variability in the CNV of these genes among the varieties studied, due to which it was not possible to demonstrate a statistically significant relationship.

The study was conducted under controlled greenhouse conditions where environmental factors such as soil composition, nutrient availability and irrigation were standardized to minimize external influences on the results. Despite these control measures, the variability in SGA content observed among biological replicates indicated a complex interaction between genetic factors and environmental conditions.

Results of statistical analyses using ANOVA revealed no significant effect of CNV on α -solanine and α -chaconin concentrations. This was somewhat unexpected and suggests the possibility of other regulatory mechanisms affecting SGA biosynthesis in potato. It highlights the complexity of secondary metabolite biosynthesis in plants and suggests that future studies should consider a wider range of genetic and environmental factors to fully understand the determinants of SGA levels in potato.

In addition, this research has important implications for potato breeding programs. It suggests that simply selecting for specific CNVs in *SGT* genes may not be sufficient to reliably alter SGA content in cultivated varieties. Instead, a more comprehensive approach may be needed that involves environmental management and possibly manipulation of multiple genes involved in the metabolic pathway.

This comprehensive approach not only emphasized the role of genetic factors in influencing SGA content, but also highlighted the influence of potato tissue type (leaf, flesh and peel) on SGA content. Tukey's HSD assays provided a detailed insight and revealed that different potato varieties exhibit different levels of SGA in different tissue types, suggesting their potential use in breeding new varieties. Cultivars with high levels of SGA in the skin and leaves could be targeted for pest resistance traits, while cultivars with lower levels in the flesh might be more suitable for culinary use.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., DNA, CNV, α -solanine, α -chaconine

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše.....	11
3.1 Brambory a čeleď <i>Solanaceae</i>.....	11
3.1.1 Taxonomie brambor.....	11
3.1.2 Historie pěstování a šlechtění brambor.....	11
3.1.3 Morfologie a anatomie brambor	12
3.1.3.1 Hlízy a kořeny	13
3.1.3.2 Listy.....	14
3.1.3.3 Stonky.....	15
3.1.3.4 Reprodukční orgány a plody	15
3.2 Glykoalkaloidy	15
3.2.1 Typy glykoalkaloidů u <i>Solanum tuberosum</i>	16
3.2.1.1 Role glykoalkaloidů v rostlinách bramboru	17
3.2.1.2 Vliv glykoalkaloidů na rostlinné škůdce	18
3.2.1.3 Vliv glykoalkaloidů na lidské zdraví.....	18
3.2.2 Obsah glykoalkaloidů v hlízách a listech brambor.....	19
3.2.2.1 Faktory ovlivňující obsah glykoalkaloidů v hlízách a listech brambor.....	20
3.2.3 Odrůdy použité v této práci	21
3.2.3.1 Anuschka	22
3.2.3.2 Marabel.....	23
3.2.3.3 Princess.....	23
3.2.3.4 Sunshine	23
3.2.3.5 Rosara.....	24
3.2.3.6 Impala.....	24
3.2.3.7 Carrera	24
3.2.3.8 Antonia.....	24
3.2.3.9 Red Anna.....	25
3.2.3.10 Ditta.....	25
3.2.3.11 Bernina	25
3.2.3.12 Adéla	25
3.3 CNV	26
3.3.1 Mechanismy vzniku CNV	26

3.3.2	Role CNV v rámci evoluce a šlechtění	26
3.3.2.1	Přítomnost CNV u domestikovaných druhů.....	27
3.3.2.2	CNV a domestikační znaky a geny	27
3.3.2.3	CNV v post-domestikační diverzifikaci	28
3.3.2.4	Důkazy o selekci na CNV	28
3.3.2.5	Budoucí perspektivy výzkumu CNV.....	29
3.4	Metabolická dráha biosyntézy α-solaninu a α-chaconinu	29
3.4.1	Přehled biosyntézy solaninu a chaconinu	29
3.4.2	Mevalonátová cesta.....	29
3.4.3	Nemevalonátová dráha	30
3.4.4	Geny zapojené do biosyntézy solaninu a chaconinu	31
3.4.4.1	Skupina genů <i>HMG</i>	32
3.4.4.2	Rodina genů <i>SGT</i>	32
3.5	Metody stanovení obsahu glykoalkaloidů v rostlinném materiálu.....	33
3.5.1	Kapilární plynová chromatografie (GC).....	33
3.5.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kolorimetrie	33
3.5.3	Důsledky pro výzkum a zemědělství	33
3.6	Metody stanovení CNV.....	34
3.6.1	Digitální kapková PCR (ddPCR).....	34
3.6.2	Kvantitativní PCR (qPCR).....	34
3.6.3	PCR v reálném čase (rtPCR)	34
4	Metodika	35
4.1	Cíl experimentu	35
4.2	Rostlinný materiál a podmínky pěstování	35
4.2.1	Zpracování a příprava rostlinného materiálu	35
4.3	Analytické metody pro stanovení obsahu glykoalkaloidů.....	36
4.3.1	Příprava vzorků pro analýzu glykoalkaloidů	36
4.3.2	UHPLC-ESI-MS/MS analýza.....	36
4.4	Kvantifikace DNA a analýza čistoty	37
4.4.1	Extrakce DNA.....	37
4.4.2	Kvantifikace DNA	38
4.4.3	Hodnocení čistoty	38
4.5	ddPCR a analýza CNV	38
4.5.1	Výpočet vstupního množství DNA pro reakci ddPCR.....	38
4.5.2	Příprava primerů pro ddPCR	39
4.5.3	Příprava reakce ddPCR.....	40
4.5.4	Generování kapky a cyklování PCR.....	40
4.5.5	ddPCR cyklus a analýza	40
4.5.6	Zpracování po cyklování a čtení kapek	41

4.6	Statistické vyhodnocení.....	41
5	Výsledky.....	42
5.1	Kvantifikace DNA a hodnocení kvality.....	42
5.2	Glykoalkaloidy v listech brambor.....	43
5.3	Glykoalkaloidy v dužnině brambor.....	44
5.4	Glykoalkaloidy ve slupce brambor.....	45
5.5	ddPCR a CNV analýza.....	46
5.5.1	Analýza počtu dropletů pomocí ANOVY.....	47
5.5.2	Pearsonova korelační analýza – vztah obsahu glykoalkaloidů mezi sebou.....	48
5.5.3	Analýza rozptylu (ANOVA) – obsah glykoalkaloidů.....	51
5.5.3.1	Analýza ANOVA – vliv odrůdy a typu pletiva na obsah α -chaconinu.....	51
5.5.3.2	Analýza ANOVA – vliv odrůdy a typu pletiva na obsah α -solaninu.....	54
5.5.3.3	Analýza ANOVA – vliv genů <i>SGT1</i> a <i>SGT2</i> na obsah α -chaconinu.....	57
5.5.3.4	Analýza ANOVA – vliv genů <i>SGT1</i> a <i>SGT2</i> na obsah α -solaninu.....	58
6	Diskuze.....	59
7	Závěr.....	63
8	Literatura.....	64
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	71
10	Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

Snaha o zvýšení zemědělské produktivity a bezpečnosti potravin je v souvislosti s rostoucí světovou populací a měnícími se klimatickými podmínkami klíčovou výzvou. Mezi různými pěstovanými plodinami vynikají brambory (*Solanum tuberosum*) jako základní potravina konzumovaná po celém světě díky své výživové hodnotě a všestrannému kulinářskému využití. Pěstování a konzumace brambor však není bez problémů, zejména pokud jde o přítomnost steroidních glykoalkaloidů (SGA), přírodních sloučenin, které slouží jako obranný mechanismus rostlin proti škůdcům a patogenům.

SGA, především α -solanin a α -chaconin, jsou díky své dvojí povaze předmětem rozsáhlého výzkumu. Zatímco poskytují ochranu rostlině, jejich přítomnost ve vysokých koncentracích může představovat zdravotní riziko pro člověka, což vede k nutnosti pečlivého řízení obsahu SGA v komerčních odrůdách brambor. Tato práce se zaměřuje na zkoumání genetických faktorů, které ovlivňují obsah SGA v bramborách, se zvláštním důrazem na odchylky v počtu kopií (CNV) specifických genů zapojených do biosyntézy těchto sloučenin.

Význam pochopení genetického základu biosyntézy SGA nelze přeceňovat. Je klíčem ke šlechtění odrůd brambor, které udržují optimální hladiny SGA – dostatečně vysoké, aby odrazovaly škůdce, ale dostatečně nízké, aby byly bezpečné pro lidskou spotřebu. Toto úsilí vyžaduje podrobné zkoumání genetické variability mezi odrůdami brambor a identifikaci genetických markerů souvisejících s obsahem SGA.

Pro orientaci v tomto složitém genetickém prostředí se v této práci používá metoda ddPCR (Droplet Digital PCR), což je špičková technika známá svou přesností a citlivostí při kvantifikaci počtu kopií genů. Tato studie se zaměřuje na CNV genů *SGT1*, *SGT2* a *SGT3*, o nichž se předpokládá, že hrají klíčovou roli v biosyntéze SGA, a jejím cílem je odhalit genetické základy, které přispívají k rozdílům v obsahu SGA v různých tkáních brambor (listy, dužnina a slupka).

Tím se práce snaží nejen překlenout mezery v našem chápání genetických mechanismů regulujících biosyntézu SGA, ale také položit základy pro budoucí šlechtitelské programy. Tyto programy by mohly potenciálně vést k produkci odrůd brambor s žádoucími vlastnostmi, které by vyvážily potřebu odolnosti vůči škůdcům s ohledem na bezpečnost potravin. Kombinací empirické analýzy a teoretického zkoumání přispívá tato práce k širšímu úsilí o zvýšení udržitelnosti zemědělství a potravinové bezpečnosti v době poznamenané značnými environmentálními a společenskými výzvami.

V souhrnu tento úvod připravuje půdu pro komplexní zkoumání genetických determinantů obsahu SGA v bramborách. Zdůrazňuje význam tohoto výzkumu v kontextu zemědělských inovací a bezpečnosti potravin a připravuje půdu pro diskusi o metodice, zjištěních a důsledcích pro budoucí výzkum a praktické aplikace ve šlechtění brambor.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Změny v počtu kopií (CNV) v genech *SGT1*, *SGT2* a *SGT3* významně ovlivňují obsah steroidních glykoalkaloidů (SGA) v bramborách a jejich koncentraci v různých rostlinných pletivech (listy, dužnina a slupka). Tato hypotéza předpokládá, že rozdíly v počtu kopií genů jsou genetickým mechanismem, který může vysvětlit variabilitu v obsahu SGA pozorovanou u různých odrůd brambor.

Cíle práce

Cíl 1: Kvantifikovat odchylky v počtu kopií (CNV) genů *SGT1*, *SGT2* a *SGT3* u vybraných odrůd brambor pomocí digitální PCR (ddPCR) a prozkoumat jejich souvislost s obsahem SGA v různých pletivech brambor.

Cíl 2: Posoudit korelaci mezi CNV genů *SGT1*, *SGT2* a *SGT3* a obsahem SGA v listech, dužině a slupce brambor pomocí statistických analýz zahrnujících Pearsonovu korelaci, vícenásobnou regresi a ANOVU. Cílem je modelovat genetický vliv CNV na obsah SGA a poskytnout tak základ pro předpověď koncentrace SGA na základě genetické výbavy.

3 Literární rešerše

3.1 Brambory a čeled' *Solanaceae*

3.1.1 Taxonomie brambor

Brambory patří do čeledi *Solanaceae*, která se skládá z 3000 až 4000 druhů. Konkrétněji je poté zařazujeme do rodu *Solanum*, který se může pochlubit úctyhodnou rozmanitostí, která zahrnuje více než 2000 druhů. Pouze okolo 100 z těchto druhů ale tvoří hlízy. Zeměpisný výskyt rodu *Solanum* se rozprostírá po celém světě, s výjimkou nejvzdálenějších oblastí severu a jihu. Nejběžněji v Jižní a Střední Americe spolu s Austrálií. V těchto oblastech nalezneme výraznou koncentraci druhů v rámci tohoto rodu, což odráží způsob rozšíření pozorovaný v rámci širší čeledi *Solanaceae* (Machida-Hirano 2015).

V rámci rodu *Solanum* patří mezi další známé kultivary lilek (*S. melongena*), pepino (*S. muricatum*) a naranjillo (*S. quitoense*). Zatímco chilli papričky (*Capsicum spp.*) a rajčata (*Lycopersicon esculentum*) mají ve srovnání s posledními dvěma zmíněnými druhy rodu *Solanum* větší význam a rozšíření. *Solanaceae* zahrnuje nejen tyto známé plodiny, ale také méně známé plody z dalších rodů, jako jsou *Cyphomandra* a *Physalis*, spolu s okrasnými rostlinami, kterými jsou například *Petunia*, *Schizanthus*, *Salpiglossis* a *Lycium*. Naopak některé rody z čeledi *Solanaceae*, jako *Nicotiana*, *Datura*, *Atropa* a *Mandragora*, mají kvůli svým jedovatým alkaloidům horší pověst. Je však třeba poznamenat, že téměř všichni příslušníci této čeledi mají nějakou formu alkaloidů, i když často ve stopovém množství (Hawkes 1978).

Taxonomie brambor prochází neustálým vývojem, který je poháněn a podpořen pokrokem v molekulárních technikách. Bradshaw & Bonierbale (2010) zdůrazňují složitou a neustále se měnící povahu taxonomie rodu *Solanum*, zejména vlivem průlomových poznatků molekulární biologie a genetiky. Spooner et al. (2007) identifikují čtyři botanické druhy reprezentující pěstované brambory. Patří mezi ně základní kultivar *Solanum tuberosum* spolu se třemi hybridními druhy vzniklými křížením druhů domestikovaných a planě rostoucích příbuzných: *Solanum ajanhuiri* (diploid), *Solanum juzepczukii* (triploid) a *Solanum curtilobum* (pentaploid). Samotný *Solanum tuberosum* L. je tetraploidní (Bradshaw 2022).

3.1.2 Historie pěstování a šlechtění brambor

Historie šlechtění a šíření brambor je fascinujícím příběhem kulturní výměny a zemědělských inovací, které se táhnou napříč kontinenty po celá staletí. Brambory pocházejí z Jižní Ameriky, konkrétně z And, a jejich cesta do Evropy sahá až do konce 16. století. Přestože přesné zavedení brambor do země zůstává nejisté, historické zprávy hovoří o příchodu do Španělska kolem roku 1570 a do Anglie v roce 1590. Zpočátku byla brambora považována za botanickou okrasnou kuriozitu, postupně si však získala oblibu v celé Evropě a jejímu rozšíření napomohly královské dekrety a botanické burzy. Pozoruhodné je, že rané evropské brambory vykazovaly vlastnosti podobné andským poddruhům, přičemž následné selekční procesy vedly k přizpůsobení severnímu klimatu. Česká republika, historicky součást Československa, obdržela brambory z Německa, což přispělo k jejich rozšíření ve východní

Evropě koncem 18. až začátkem 19. století. Kromě toho globální expanze brambor, včetně jejich zavlečení do Severní Ameriky, Indie, Číny, Japonska, Afriky a na Nový Zéland, podtrhuje jejich pozoruhodnou proměnu z jihoamerické plodiny v základní potravinu na celém světě během čtyř století, která změnila zemědělskou krajinu a kulinářské tradice po celém světě (Harris 1992). Brambory jsou největší neobilnou potravinářskou plodinou na světě a jsou čtvrtou nejdůležitější potravinářskou plodinou na světě (Zhang et al. 2017).

Šlechtění brambor prošlo v průběhu let významným vývojem, který se výrazně posunul směrem k diploidním inbredním liniím jako potenciální strategii pro zvýšení produktivity, nutriční hodnoty a udržitelnosti. Historicky se šlechtění brambor často zaměřovalo na tetraploidní odrůdy, což vycházelo z fixace tetraploidie v Severní Americe a Evropě. Nejnovější poznatky však naznačují, že přítomnost specifických alel v heterozygotních stavech může mít větší význam pro zlepšení výnosu hlíz, zejména při zavádění nové genetické rozmanitosti ze zárodečné plazmy divokých kultivarů (Hirsch et al. 2013).

Celogenomová hodnocení SNP odhalila, že šlechtění brambor v minulém století se zaměřovalo především na složení alel ve vybraných lokusech, nikoli na celogenomové změny heterozygotnosti. Studie navíc ukázaly, že úroveň ploidie nemusí nutně korelovat s vyšším výnosem, protože diploidi opakovaně vykazovali vysoký výnosový potenciál srovnatelný s tetraploidy (Rowe 1967; Sood et al. 2024).

Přechod na diploidní šlechtitelské linie nabízí několik výhod. Samoopylení u diploidů usnadňuje rychlejší přechod k homozygotnosti, což šlechtitelům umožňuje efektivně sestavovat kombinace prospěšných alel a zároveň eliminovat ty škodlivé. Kromě toho diploidní šlechtění usnadňuje začlenění recesivních znaků, což může být u tetraploidů náročné kvůli složitosti konfigurace genomů se čtyřmi recesivními alelami (Allard 1999).

Vývoj diploidních inbredních linií je možný pomocí různých přístupů, včetně kultivace prašníků a využití přirozených inhibitorů autokompatibility přítomných v bramboru a jeho divokých příbuzných. Tyto snahy vedly k vytvoření homozygotních diploidních linií s žádanými vlastnostmi, což připravilo půdu pro vývoj diploidních prototypů hybridů F1 s jednotnou kvalitou hlíz a výnosem (Jansky et al. 2015).

Posun k diploidním šlechtitelským liniím je dán poznáním, že postupné zlepšování výnosů hlíz nebude stačit k uspokojení předpokládaného nárůstu celosvětové poptávky po plodinách. Využití inovativních šlechtitelských strategií, jako jsou diploidní inbrední linie, nabízí slibnou cestu k rychlému vývoji produktivnějších, výživnějších a udržitelnějších odrůd brambor, a tím i k řešení problémů, které přináší změna klimatu a rostoucí poptávka po potravinách (Shull 1946; Boutsika et al. 2022).

3.1.3 Morfologie a anatomie brambor

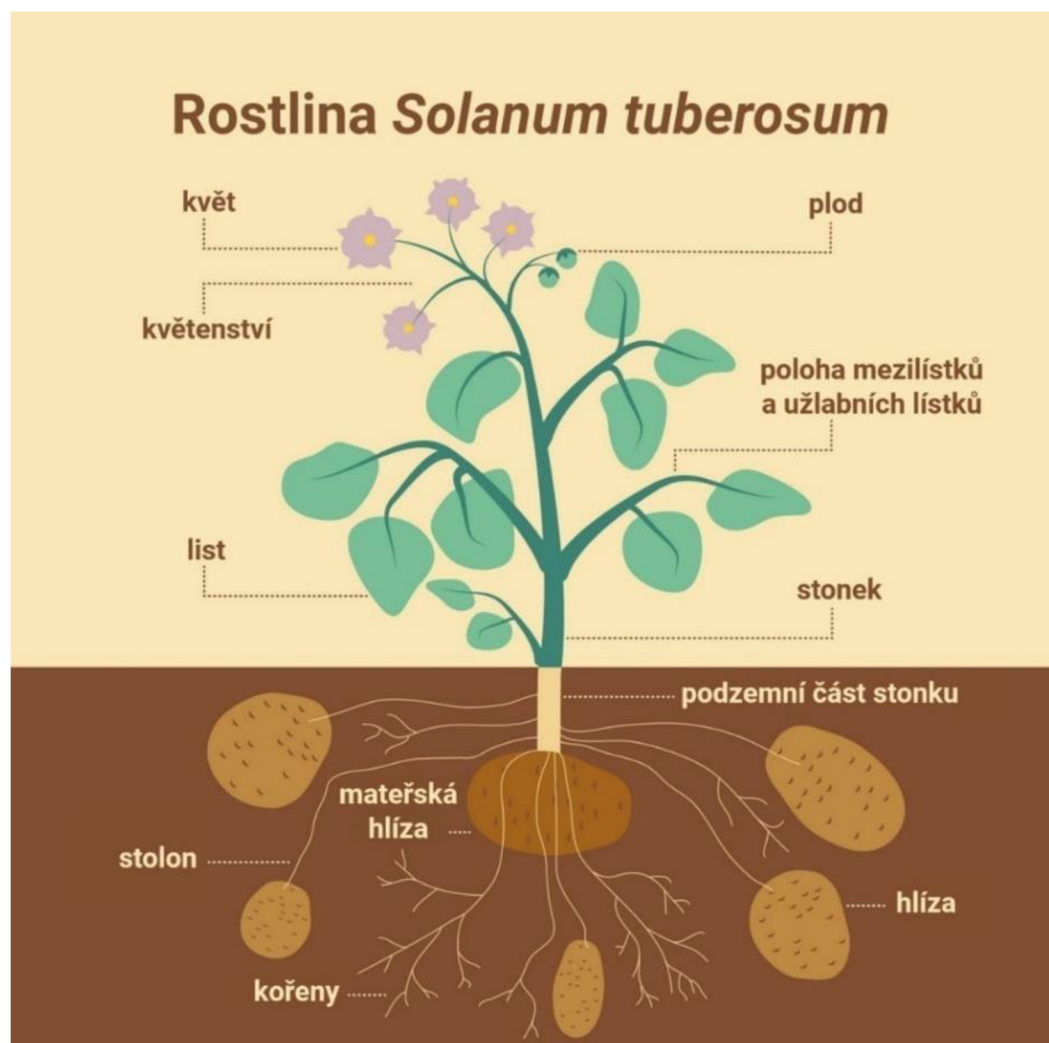
Brambory, které jsou u nás pěstovány jako jednoleté byliny, procházejí jedinečným reprodukčním procesem. Po odumření nadzemních částí na konci vegetačního období a vytvoření nových mateřských hlíz obsahujících spící pupeny, dochází ke slizni a rostlina nepokračuje dále ve svém přirozeném cyklu. Tento způsob, vegetativní, je jedním ze dvou možných pro rozmnožování brambor, tím druhým je způsob generativní. Přestože jsou oba způsoby teoreticky použitelné pro udržování brambor, v praxi vyvstávají problémy kvůli

tetrasomické dědičnosti pěstovaných odrůd brambor. Tato genetická vlastnost vede ke značné variabilitě vlastností potomstva, která je výsledkem jak samoopylení, tak záměrného křížení. V důsledku toho se pěstované tetraploidní druhy brambor, jako je *S. tuberosum*, spoléhají především na vegetativní množení prostřednictvím hlíz a jsou udržovány především vegetativním způsobem (Horáčková & Domkářová 1998).

Šlechtění brambor se tedy opírá o generativní metodu počáteční hybridizace, po níž následuje vegetativní množení, aby se zachovaly požadované vlastnosti. Pro zajištění rozmanitého výchozího materiálu pro hybridizaci a odolnostní znaky udržují genové banky po celém světě rozsáhlé sbírky genetických zdrojů rodu *Solanum*, včetně těch v USA, Evropě a v institucích ve vyspělých zemích, jako je Česká republika. Kultury in vitro z velké části nahradily tradiční metody přesazování, protože nabízejí dlouhodobé udržování, skladování bez virů a snadnou výměnu materiálu mezi genovými bankami po celém světě. Mezi společné rysy patří snadné založení kultury, dlouhodobé udržení organogenetické kapacity a zachování genetické homogenity (Carputo et al. 1995; Horáčková & Domkářová 1998).

Na Obrázku 1 je zobrazena anatomie rostlin bramboru.

Obrázek 1 - Anatomie *Solanum tuberosum* (upraveno dle <https://www.istockphoto.com/en/portfolio/Ardely/>, 2024)



3.1.3.1 Hlízy a kořeny

Kořenová soustava se skládá ze dvou částí. Prvotní částí kořenové soustavy je křlový kořen. Vytváří se ze zárodečného kořínku a má hojně větvené postranní kořeny. V pozdějším stádiu růstu rostliny se vytvářejí z podzemní části stolonů a stonků druhotné neboli adventivní kořeny. Soustava je nakonec z větší části tvořena bohatě větvenými druhotnými kořeny.

Hlíza vzniká modifikací stolonu, a to zkrácením a ztloustnutím jeho vrcholu. Podle způsobu vzniku je označujeme jako oddenkové hlízy. Hlíza je hospodářsky nejcennější částí rostliny bramboru a dále slouží k jejímu vegetativnímu rozmnožování. Hlízu dělíme na dvě části, pupkovou a vrcholovou. Pupková část se nachází u stolonu hlízy, vrcholová leží na protější straně hlízy. Pupeny neboli očka se nacházejí více na bazální straně, dále od stolonu. Pupeny jsou uspořádány do skupin, nejčastěji po 3-7 pupenech na skupinu (Diviš et al. 2010).

Rostlina v hlízách shromažďuje své zásobní látky. Podle Pelikána & Sákové (2001) jsou jimi zejména:

- voda
- škrob
- cukry
- dusíkaté látky
- vláknina
- tuky
- minerální látky
- v stopových množstvích:
 - alkaloidy, vitamíny, popeloviny, organické kyseliny

Pelikán & Sáková (2001) dále rozdělili hlízu brambor na jednotlivé části:

- Periderm: Vnější obal, tvořený slupkou ze zkorovatělých buněk. Slouží k ochraně hlíz před napadením chorobami a parazity, také zamezuje ztrátě vlhkosti. Při porušení této ochranné vrstvy se za pomoci nasycených mastných kyselin a kyslíku tvoří suberin.
- Korová vrstva: Skládá se ze 2 samostatných částí. Část nacházející se přímo pod peridermem je přibližně 2 mm silná, tvoří ji malé buňky s nízkým obsahem škrobu a vysokým obsahem bílkovin. Druhá navazující část tvořena parenchymálními buňkami bohatými na škrob sahá až k cévním svazkům.
- Cévní svazky: Obsahují floém (lýko) na vnějších okrajích, který vede organické látky. Xylém zajišťuje transport vody.
- Dřeň a velké vodnaté buňky: Navazuje na cévní svazky.
- Vnitřní dřeň: Tmavé jádro hlízy.

Hlízy brambor, životně důležité orgány bramborové rostliny, procházejí fascinujícím procesem vývoje, který se vyznačuje radiálním rozšiřováním, jež je primárně způsobeno zvětšováním buněk, nikoli jejich dělením (Peterson et al. 1985).

3.1.3.2 Listy

List bramboru je přetrhovaně lichozpeřený. Je složen z jednoho až tří párů postranních lístků a jednoho lístku vrcholového neboli terminálního. Mezi jednotlivými páry vyrůstají na větenu drobné mezilístky, a to buď jednotlivě anebo v páru. Středem lichozpeřeného listu prochází větenu, které se postupně ztenčuje směrem od báze k vrcholu. Některé odrůdy mají na řapících lístků lístečky, nebo úžlabní mezilístky (Child 1990; Hamouz 1993).

Listy jsou slabě, středně až velmi chlupaté. Barva listu je ovlivněna prostředím anebo odrůdou. Podle barvy rozlišujeme listy hnědozelené, tmavě zelené, světle zelené a zelené (Minx & Diviš 1994).

3.1.3.3 Stonky

Hamouz (1993) ve své publikaci uvádí základní dělení na dva typy, listový a stonkový, ty mají zásadní rozdíly v délce a tloušťce. Další dělení je dle postavení stonku, zda jde o typ vzpřímený, polovzpřímený, nebo rozkleslý. Bramborové stonky dělíme dle výšky na nízké (250-400 mm), středně vysoké (400-550 mm), vysoké (550-650 mm) a velmi vysoké (nad 650 mm). Dle tvaru je dělíme na oválné, tříboké a hranaté. Charakteristický znak bramborového stonku je křídlení (blanité výrůstky) na hranách stonku. Podle tvaru dále určujeme křídlení jednoduché vlnité, jednoduché rovné, dvojité vlnité a dvojité rovné. Dále určuje četnost stonků, 2 a méně je četnost velmi malá, 3 až 4 se jedná o četnost malou, 5 až 6 je četnost střední, 7 až 8 velká a pokud se na rostlině nalézá více než 9 stonků, jedná se o četnost vysokou.

Větvení, výhonky vyrůstající z axilly (paždí listů), se vyskutekuje u báze stonku, uprostřed, na vrcholu anebo po celé délce stonku. Barva stonku, taktéž ovlivněna prostředím a odrůdou je většinou světle zelená nebo zelená. Vyskytují se ale i zbarvení od modrofialové přes hnědou až po červené (Pazdera et al. 2005).

3.1.3.4 Reprodukční orgány a plody

Květ má zpravidla 5 korunních lístků. V některých případech, kdy opět závisí na odrůdě a podmínkách prostředí, se může vyskytovat větší počet, a to až osmi korunních lístků. Květenstvím u brambor je dvojitý, který se nachází na vrcholu stonku. Některé odrůdy mají dvojnásobný počet korunních lístků, vzniká u nich tzv. dvojkorunka. Brambory jsou samosprašné, mohou však být opyleny i pylem cizích rostlin přenášeným hmyzem. Rostliny brambor kvetou silně, středně nebo málo. Některé odrůdy shazují poupata, nebo nekvětou vůbec (Knapp 2012).

Po oplodnění květu se vytvářejí plody, dvoupouzdré bobule. Úspěšnost oplodnění závisí zejména na klíčivosti pylu a kvalitě blizny. V jednom plodu se nachází 50-100 semen. Semeno bývá dlouhé 1-2 mm. Je důležité pro šlechtění k získání výchozího materiálu pro nové odrůdy, pro normální množení se nevyužívá vzhledem ke komplikované genetice brambor, jejichž genom je tetraploidní (Bradshaw 2022).

3.2 Glykoalkaloidy

Glykoalkaloidy jsou skupinou chemických sloučenin odvozených od alkaloidů, ke kterým jsou připojeny cukerné skupiny. Některé z nich jsou potenciálně toxické, zejména ty, které se běžně vyskytují v rostlinném druhu *Solanum dulcamara* (lilek potměchuť) a dalších rostlinách rodu *Solanum*, včetně brambor a rajčat (Sato 2020).

Prototypem glykoalkaloidu je solanin (složený z alkaloidu solanidinu a ze sacharidové části, nejčastěji z monosacharidů glukózy a fruktózy nebo polysacharidů jako je škrob a celulóza), který se vyskytuje v bramboru. Alkaloidní část glykoalkaloidu se také obecně označuje jako aglykon. Neporušený glykoalkaloid se špatně vstřebává z trávicího traktu, a proto způsobuje jeho podráždění. U vstřebávaného aglykonu se předpokládá, že je zodpovědný za pozorované příznaky poruch nervového systému (Crews 2014).

3.2.1 Typy glykoalkaloidů u *Solanum tuberosum*

Glykoalkaloidy, které se vyskytují v bramborách, hrají významnou roli v obraně rostlin proti hmyzím škůdcům. *Solanum tuberosum* obsahuje různé typy glykoalkaloidů, z nichž každý má odlišné vlastnosti a účinky na chování a fyziologii hmyzu. Tyto sloučeniny mají kromě pesticidních vlastností i vlastnosti antimikrobiální. Určení typů a množství glykoalkaloidů přítomných v bramborách je nezbytné pro objasnění jejich úlohy v odolnosti rostlin brambor proti hmyzu (Maga & Fitzpatrick 1980).

Jedním z hlavních glykoalkaloidů vyskytujících se v *Solanum tuberosum* je solanin. Studie Tingeyho (1984) zdůrazňuje význam solaninu jako obranné sloučeniny proti hmyzím škůdcům, zejména proti brouku mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Solanin je spolu s chaconinem běžně přítomen v bramborách. Solanin a chaconin jsou sice méně inhibiční ve srovnání s jinými glykoalkaloidy, ale přesto přispívají ke snížení žravosti larev mandelinky. Tato zjištění naznačují, že solanin a chaconin, přestože jsou méně účinné, stále hrají částečnou roli při odrazování hmyzu od žíru a potenciálně snižují populaci škůdců.

Typy glykoalkaloidů přítomných v bramborách se primárně dělí do dvou hlavních skupin: solanidany a spirosolany. Tyto glykoalkaloidy jsou steroidní glykosidy (SGA) obsahující dusík. Zde je rozdělení jednotlivých typů podle Friedmana et al. (1997):

- Solanidiny:
 - α -solanin: Jedná se o jeden z hlavních glykoalkaloidů vyskytujících se v komerčních odrůdách brambor. Jedná se o glykosid steroidního alkaloidu solanidinu.
 - α -chaconin: Podobně jako α -solanin je α -chaconin dalším významným glykoalkaloidem obsaženým v bramborách. Je to rovněž glykosid solanidinu.
 - dalšími solanidiny jsou velmi příbuzné sloučeniny β -solanin, γ -solanin, β -chaconin, γ -chaconin
 - grafické znázornění solanidinu a jeho prekurzoru sterolu lze nalézt v Příloze 2 a v Příloze 1
 - složení jednotlivých solanidinů je uvedeno v Tabulce 1, graficky je znázorněno v Příloze 3

Tabulka 1 – složení glykoalkaloidů (Friedman et al. 1997)

Sloučenina	Složení
α -solanin	solanidin + galaktóza + glukóza + rhamnóza
β -solanin	solanidin + galaktóza + glukóza
γ -solanin	solanidin + galaktóza
α -chaconin	solanidin + glukóza + rhamnóza + rhamnóza
β -chaconin	solanidin + glukóza + rhamnóza
γ -chaconin	solanidin + glukóza

- Spirosolany:

- solasodin: Tato sloučenina se vyskytuje v kultivarech brambor, které byly zkříženy s planými druhy, jako jsou *Solanum berthaultii* a *Solanum vernei*
- solamarin: Vyskytuje se ve stejných kultivarech jako solasodin, tj. v těch, které byly zkříženy se *S. berthaultii* a *S. vernei*
- tomatiden: Podobně jako solasodin se tomatiden vyskytuje v bramborách, které byly zkříženy s některými planými druhy, např. *Solanum chacoense*.
- grafické znázornění lze nalézt v Příloze 9

Tyto glykoalkaloidy jsou přítomny převážně ve slupce bramborových hlíz. Kromě toho se mohou vyskytovat i některé další glykoalkaloidy, jako je demissidin, solamargin a solasonin, které jsou však ve srovnání s α -solaninem a α -chaconinem přítomny ve stopovém množství.

3.2.1.1 Role glykoalkaloidů v rostlinách bramboru

Úloha glykoalkaloidů v bramborech, jak ji objasnili Maga & Fitzpatrick (1980), Tingey (1984) a Friedman et al. (1997), zahrnuje různé fyziologické a ekologické funkce, které jsou klíčové pro přežití a obranu *Solanum tuberosum* proti biotickým a abiotickým stresům. Pochopení těchto funkcí umožňuje nahlédnout do evolučních adaptací a ekologických interakcí rostlin bramboru v jejich přirozeném prostředí. Zhao et al. (2021) popisují tyto základní funkce SGA v rostlinách bramboru:

- Obranné mechanismy:

Glykoalkaloidy slouží jako účinné obranné sloučeniny proti býložravcům, patogenům a konkurenčním druhům rostlin. Výzkum Tingeyho (1984) a Zhaoa et al. (2021) zdůrazňuje jejich úlohu při odrazování hmyzu a býložravců od žiru díky jejich toxickým vlastnostem. Zhaoova zjištění dále ukazují cytotoxické účinky glykoalkaloidů na různé linie rakovinných buněk, což naznačuje jejich potenciál jako přírodních protinádorových látek.

- Alelopatické účinky:

Friedman et al. (1997) ve své studii, popisují alelopatické vlastnosti glykoalkaloidů, které ovlivňují růst a vývoj sousedních druhů rostlin. Prostřednictvím alelopatie mohou glykoalkaloidy inhibovat klíčení a růst konkurenčních rostlin, čímž poskytují ekologickou výhodu rostlinám bramboru v soutěži o zdroje.

- Ekologické interakce:

Mimo alelopatických účinků glykoalkaloidů na okolní vegetaci studie Zhaoa et al. (2021) navíc poukazuje na antimikrobiální účinky glykoalkaloidů, které inhibují růst hub, bakterií a virů, čímž přispívají k celkovému zdraví a odolnosti rostlin brambor.

- Reakce na abiotické stresy:

Glykoalkaloidy se také podílejí na reakcích rostlin bramboru na abiotické stresy, jako je sucho, zasolení a kolísání teploty. Výzkumy Tingeyho (1984) a Zhaoa et al. (2021) naznačují, že glykoalkaloidy mohou působit jako metabolity vyvolané stresem a zvyšovat odolnost rostlin bramboru vůči výzvám prostředí.

3.2.1.2 Vliv glykoalkaloidů na rostlinné škůdce

Glykoalkaloidy, jak je popsáno v kapitole knihy Taie & Vickrucka (2022), hrají významnou roli v obraně rostlin brambor proti různým škůdcům, zejména hmyzu a býložravcům. Tyto sekundární metabolity, produkované ve vysokých hladinách v listech, vykazují toxicitu především tím, že narušují buněčné membrány a inhibují acetylcholinesterázy zapojené do neurální aktivity:

Mechanismus účinku

Glykoalkaloidy uplatňují své obranné účinky prostřednictvím interakcí s fyziologickými a biochemickými procesy rostlinných škůdců. Narušují buněčné membrány, což vede k lýzi buněk, a nakonec způsobuje jejich smrt. Inhibice acetylcholinesteráz navíc narušuje normální fungování nervového systému škůdců, což vede k paralýze a případnému úhynu (Tai & Vickruck 2022).

Specifické cíle

Vliv glykoalkaloidů na rostlinné škůdce se liší v závislosti na konkrétním přítomném glykoalkaloidu a druhu škůdce. Například solanin a chaconin, hlavní glykoalkaloidy v bramborech, jsou spojeny s odolností vůči některým škůdcům. Jejich účinnost proti všem škůdcům však není jednotná. Zatímco někteří škůdci, jako je například mandelinka bramborová, se přizpůsobili tak, aby se mohli živit rostlinami brambor i přes přítomnost glykoalkaloidů, jiní mohou být k jejich toxickým účinkům citlivější (Tai & Vickruck 2022).

3.2.1.3 Vliv glykoalkaloidů na lidské zdraví

Přítomnost glykoalkaloidů v rostlinách rodu *Solanum*, zejména v bramborách (*Solanum tuberosum*) a lilku (*Solanum melongena*), představuje potenciální zdravotní riziko pro člověka, jak je popsáno v kapitole knihy Crewse (2014):

Výskyt

Brambory, které jsou základní potravinou pro mnoho lidí na celém světě, obsahují toxické alkaloidy, jako je solanin a chaconin. Tyto alkaloidy se steroidní strukturou jsou přítomny

v různých částech bramborové rostliny, včetně hlíz, klíčků a zelených částí. Obsah glykoalkaloidů v bramborách se může během skladování zvyšovat, zejména při vystavení světlu, a jejich obsah je vyšší u ekologicky pěstovaných a planě rostoucích druhů brambor, které se dnes využívají zejména jen při šlechtění.

Toxicita

Požítí brambor s vysokým obsahem glykoalkaloidů může vést k různým příznakům, včetně bolestí žaludku, slabosti, nevolnosti, zvracení a dýchacích obtíží. Brambory se středně vysokým obsahem glykoalkaloidů mohou mít hořkou chuť, zatímco vyšší obsah může vyvolat pocit pálení. Klinické příznaky se mohou pohybovat od halucinací a deliria až po kóma. Zdá se, že toxiny jsou pro člověka toxičtější než pro ostatní živočichy, přičemž mohou mít vliv na plodnost, úmrtnost dětí a mohou také způsobovat různé neurologické vady.

Kontrola

Solanin se sice vařením neodstraní, ale lze jej zničit smažením za vysokých teplot. Při běžném tepelném zpracování je značně stabilní. Při vaření ve vodě se solanin z části vyluhuje a dochází tak k snížení jeho relativní koncentrace (množství vyluhovaného solaninu můžeme pozitivně ovlivnit přidáním malého množství kyseliny octové), při smažení za nižších teplot (průmyslová příprava hranolek a bramborových lupínků) se naopak jeho relativní koncentrace zvyšuje vlivem ztráty vody.

Kontrolní opatření proti těmto toxinům v bramborách zahrnují pečlivý výběr a šlechtění odrůd brambor, minimalizaci mechanického poškození a vystavení světlu při manipulaci a zpracování. Ke snížení tvorby toxinů může přispět i chemické ošetření, například inhibitory klíčení (Crews 2014).

3.2.2 Obsah glykoalkaloidů v hlízách a listech brambor

Obsah glykoalkaloidů v hlízách i listech brambor je významným aspektem výzkumu vzhledem k jeho potenciálním důsledkům pro lidské zdraví a jeho roli v obranných mechanismech rostlin. Glykoalkaloidy, jako je α -solanin a α -chaconin se nacházejí v různých částech bramborové rostliny v různých koncentracích (Zrůst 2004).

Obsah glykoalkaloidů v hlízách brambor

Glykoalkaloidy jsou převážně koncentrovány ve slupce bramborových hlíz, přičemž jejich obsah se liší v závislosti na faktorech, jako je odrůda brambor, způsob pěstování a podmínky skladování. Hlavními glykoalkaloidy, které jsou v bramborových hlízách předmětem zájmu, jsou α -chaconin a α -solanin. Průměrný obsah glykoalkaloidů, který se může lišit v závislosti na specifických faktorech, jako je odrůda a způsob pěstování, je uveden v Tabulce 2. Uvedené koncentrace jsou určeny ze slupky bramborových hlíz (Maga & Fitzpatrick 1980).

Tabulka 2 - Obsah glykoalkaloidů ve slupkách hlíz brambor (Maga & Fitzpatrick 1980)

Typ glykoalkaloidu	Obsah (mg/g)
α -solanin	3,0-8,0
α -chaconin	2,5-7,5

*Poznámka: Obsah je uveden na gram sušiny (DW).

Obsah glykoalkaloidů v bramborových hlízách se může během skladování zvýšit, zejména pokud jsou vystaveny světlu nebo poškozeny při manipulaci. Správné skladovací postupy a opatrná manipulace jsou nezbytné pro kontrolu obsahu glykoalkaloidů a minimalizaci možných zdravotních rizik spojených s konzumací brambor (Friedman et al. 1997).

Obsah glykoalkaloidů v listech brambor

Listy brambor také obsahují glykoalkaloidy, i když v nižších koncentracích než hlízy. Přítomny jsou sice α -chaconin a α -solanin, ale jejich obsah je obvykle nižší než v hlízách. Maga & Fitzpatrick (1980) uvádějí, že vysoké koncentrace glykoalkaloidů lze nalézt v aktivně rostoucích oblastech rostliny, jako jsou meristemické oblasti listových pupenů a mladých listů. Průměrný obsah v listech uvedený v Tabulce 3 uvádí Phillips et al. (1996) u vybraných odrůd brambor.

Tabulka 3 - Obsah glykoalkaloidů v listech brambor (Phillips et al. 1996)

Odrůda brambor	α -solanin (mg/g)	α -chaconin (mg/g)
Cara	0,10	0,32
Romano	0,09	0,24
Pink Fir Apple	0,04	0,04
Průměr	0,08	0,20

*Poznámka: Obsah je uveden na gram sušiny (DW).

3.2.2.1 Faktory ovlivňující obsah glykoalkaloidů v hlízách a listech brambor

Barceloux (2009) ve svém článku poukazuje na to, že praktické zkušenosti šlechtitelů, pěstitelů a distributorů brambor vedly k rozsáhlému zkoumání faktorů ovlivňujících obsah glykoalkaloidů v bramborách. Maga & Fitzpatrick (1980) ve své studii popisují tyto faktory:

Genetická variabilita

Obsah glykoalkaloidů v bramborách se u různých odrůd výrazně liší. Studie prokázaly značně rozdílný obsah glykoalkaloidů v různých odrůdách brambor z různých oblastí. Například norské odrůdy vykazovaly obsah glykoalkaloidů v rozmezí od 4,2 do 34,5 mg/100 g, zatímco německé odrůdy od 2 do 35 mg/100 g. Podobně kanadské a americké odrůdy vykazovaly různý obsah glykoalkaloidů, což zdůrazňuje genetický vliv na syntézu glykoalkaloidů.

Výzkum naznačuje, že obsah glykoalkaloidů je vysoce dědičný, přičemž některé odrůdy brambor dědí dominantně znaky s nízkou syntézou glykoalkaloidů. Výsledky křížení mezi

různými druhy brambor se však mohou lišit, což vede k nepředvídatelnému obsahu glykoalkaloidů v potomstvu (Maga & Fitzpatrick 1980).

Faktory prostředí

Faktory prostředí hrají významnou roli při změnách v obsahu glykoalkaloidů v bramborách během skladování. Podle výzkumu Zheng et al. (2019) ovlivňují různé podmínky skladování, jako je teplota, relativní vlhkost a doba skladování, obsah solaninu v různých odrůdách brambor. Tato zjištění zdůrazňují význam přizpůsobení podmínek skladování na základě specifických vlastností odrůd brambor pro zajištění bezpečnosti a kvality skladovaných brambor. Kromě toho mohou mít na obsah glykoalkaloidů během růstu a vývoje brambor vliv také vnější faktory prostředí, jako jsou klimatické a povětrnostní podmínky, přičemž potenciální roli hrají faktory jako délka vegetačního období, kolísání teplot, úroveň vlhkosti a nadmořská výška. Poškození rostlin brambor mrazem nebo krupobitím před dozráním hlíz bylo v některých případech spojeno se zvýšeným obsahem glykoalkaloidů, což poukazuje na složitou souhru mezi faktory prostředí a akumulací glykoalkaloidů v bramborách (Zheng et al. 2019).

Zralost a skladování

Zatímco celková zralost odrůd nemusí přímo souviset s obsahem glykoalkaloidů, byly však pozorovány rozdíly v obsahu glykoalkaloidů v rámci jedné odrůdy, které se týkají zralosti a podmínek skladování. Menší hlízy a delší doba skladování byly spojeny s vyššími hladinami glykoalkaloidů. Teplota a doba skladování hrají významnou roli, přičemž delší skladování vede ke zvýšené syntéze glykoalkaloidů, zejména při nižších teplotách (Maga & Fitzpatrick 1980).

Kulturní postupy

Hnojení má na obsah glykoalkaloidů rozporuplné účinky, přičemž studie uvádějí jak zvýšení, tak snížení v reakci na aplikaci dusíku. Podobně může tvorbu glykoalkaloidů ovlivnit vystavení světlu během skladování nebo zpracování. Vlnová délka, intenzita a délka působení světla byly podrobně studovány a odhalily jejich vliv na syntézu glykoalkaloidů v bramborách (Maga & Fitzpatrick 1980).

Světlo

Světlo hraje zásadní roli při ovlivňování obsahu glykoalkaloidů v bramborách. Jak prokázali Wolf & Duggar (1946), délka světelné expozice významně ovlivňuje tvorbu glykoalkaloidů v hlízách. Jejich výzkum ukázal, že brambory pěstované v podmínkách dlouhého dne s 18hodinovou expozicí světlu vykazovaly vyšší obsah solaninu ve srovnání s bramborami pěstovanými v podmínkách krátkého dne s pouze 10hodinovou expozicí světlu. To naznačuje, že délka světelné expozice je kritickým faktorem prostředí, který může ovlivnit syntézu glykoalkaloidů v bramborách (Wolf & Duggar 1946).

3.2.3 Odrůdy použité v této práci

V Tabulce 4 je výpis odrůd, na kterých probíhal výzkum. V tabulce je uvedeno ID odrůdy, rok registrace, rok registrace v ČR (pokud je odrůda registrována v České republice), udržovatel odrůdy, průměrná pěstební plocha za roky 2002-2022 a průměrný výnos odrůdy (v závorce je uveden rok zveřejnění průměrného výnosu). Pokud je buňka označena „-“, znamená to, že tato data nebyla Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským zveřejněna. Data pro pěstební plochu a průměrný výnos jsou uvedena v rámci ČR.

Informace o ID odrůdy a původním šlechtiteli byla čerpána z databáze Grin Global. Ostatní data byla získána z přehledů odrůd a seznamu doporučených odrůd (SDO) z let 2006 až 2022, získaných z webu <https://eagri.cz/>.

Přesná data pěstebních ploch jednotlivých odrůd jsou k dispozici v Příloze 13.

Všechny níže zmíněné odrůdy jsou tetraploidní.

Tabulka 4 - Seznam použitých odrůd (ÚKZÚZ, 2006-2023)

Název odrůdy	ID odrůdy	Země původu	Rok registrace	Rok registrace v ČR	Udržovatel	Pěstební plocha (ha)	Průměrný výnos (t/ha)
Adéla	07S0101965	Česká republika	2000	2000	Selekta Pacov, a.s.	175,29	43,9 (2022)
Antonia	07S0102258	Německo	2008	-	neregistrována v ČR	73,85	44,5 (2022)
Anuschka	07S0102264	Německo	2016	-	neregistrována v ČR	42,66	-
Bernina	07S0102274	Německo	2017	-	neregistrována v ČR	30,92	-
Carrera	PI 655314	Nizozemsko		-	neregistrována v ČR	56,91	-
Ditta	07S0101601	Rakousko	1991	1996-2017	N.O. Saatbaugenossenschaft	22,55	41,4 (2009)
Impala	07S0101538	Nizozemsko	1989	do roku 2006	neregistrována v ČR	221,31	-
Marabel	07S0101730	Německo	1994	1998	Kartoffelzucht Böhm KG, D	193,57	48,0 (2022)
Princess	-	Německo	1998	-	neregistrována v ČR	94,5	-
Red Anna	07S0102078	Česká republika	2005	2005	Vesa Velhartice, a.s.	55,9	46,6 (2022)
Rosara	07S0101670	Německo	1992	1996	SAKA-RAGIS Pflanzenzucht GbR, D	81,87	44,8 (2022)
Sunshine	07S0102272	Německo	2016	-	neregistrována v ČR	16,73	-

Následující informace o použitých odrůdách byly převzaty z již dříve zmíněných seznamů doporučených odrůd a databází European Cultivated Potato Database (Europotato), Grin Global, GrinCzech, Potato Pedigree Database a Europlant.

3.2.3.1 Anuschka

Anuschka má tmavě zelené listy a žlutohnědou slupkou kombinuje žádoucí agronomické vlastnosti a konzumní vlastnosti a je vhodná pro rané až středně rané období sklizně. Vyznačuje se odolností vůči virům bramboru Y, X, M (PVY, PVX, PVM) a výjimečně vůči chorobě vločkovitosti hlíz brambor (*Rhizoctonia solani*) a háďátku bramborovému. Vykazuje střední odolnost vůči viru S bramboru (PVS), ale vyniká silnou obranou proti strupovitosti a viru svinutky bramboru (PLRV) (GrinCzech 2024).

3.2.3.2 Marabel

Odrůda Marabel vyniká velmi vysokou odolností vůči virům bramboru Y a X (PVY, PVX) a stejně působivou odolností vůči viru M bramboru (PVM), což je staví do pozice silného soupeře proti těmto běžným hrozbám. Navzdory nízké odolnosti vůči viru S bramboru (PVS) kontruje Marabel vysokou odolností vůči strupovitosti, suché hnilobě způsobené houbami rodu *Fusarium*, vločkovitosti hlíz a háďátku bramborovému, čímž se stává odolnou proti řadě chorob přenášených půdou.

Marabel má vzpřímenou a listnatou strukturu rostlin, velké zelené listy spolu s oválnými až podlouhlými hlízami se žlutohnědou slupkou, které mají mělká očka a lysý typ slupky. Její hlízy jsou známé svou žlutou až nažloutlou dužninou a střední až velkou velikostí. I přes nižší odolnost vůči mechanickému poškození je Marabel díky svému značnému výnosovému potenciálu a označení "produkt pro zvláštní spotřebu" spolu s extrémně ranou vegetační dobou výjimečnou odrůdou pro brzkou dostupnost na trhu (Čermák 2007; GrinCzech 2024).

3.2.3.3 Princess

Vznikla vyšlechtěním z odrůd Arnika × Dunja. Jedná se o pokročilou odrůdu z Nizozemí, která se vyznačuje velmi ranou až ranou zralostí, vyniká oválnými hlízami s bílou až žlutou slupkou. Tato odrůda poskytuje vysoký počet středně velkých až velkých, rovnoměrně tvarovaných hlíz na rostlinu, vykazuje střední sekundární růst a vysokou odolnost proti vnitřnímu otláčení. Její varné vlastnosti se pohybují od poměrně pevných až po pevné, bez zčernání po vaření. Vyznačuje se vysokou odolností proti plísni bramborové a velmi vysokou odolností proti viru Y bramboru (PVY), což z ní činí robustní volbu (Europotato 2024; Potato Pedigree Database 2024).

3.2.3.4 Sunshine

Odrůda Sunshine vykazuje velmi vysokou odolnost vůči virům bramboru Y, X a M (PVY, PVX a PVM). Její odolnost vůči strupovitosti a háďátku bramborovému (*Globodera rostochiensis* i *Globodera pallida*) je označena jako velmi vysoká. Její odolnost proti viru S bramboru (PVS) je však označena jako nízká. Odolnost proti plísni bramborové se pohybuje mezi nízkou a střední.

Sunshine tvoří robustní rostliny se vzpřímenými stonky a výraznou zelenou listovou hmotou, včetně středně velkých až velkých hlíz se žlutohnědou slupkou a kolísáním barvy dužniny od žluté po bílou. Tato odrůda rovněž vykazovala stabilní vysoce kvalitní vlastnosti, jako je středně vysoký obsah škrobu a vynikající vyrovnanost hlíz, což přispělo k její uspokojivé až dobré skladovatelnosti (GrinCzech 2024).

3.2.3.5 Rosara

Vznikla vyšlechtěním z odrůd Secura × 2605 77. Německá odrůda brambor Rosara se vyznačuje velmi ranou zralostí a střední až dobrou pokryvností listů. Její hlízy se vyznačují červenou barvou slupky, žlutou dužninou a velmi dlouhými a rovnoměrně tvarovanými hlízkami s mělkými očky. Hlízy odrůdy Rosara jsou středně velké až velké a vykazují velmi hladkou až hladkou strukturu slupky.

Z hlediska výnosového potenciálu má Rosara střední až vysoký rozsah, podobný profil má i potenciál výnosu při rané sklizni. Vytváří střední počet hlíz na rostlinu. Odrůda vyniká odolností proti vnějšímu poškození (Europotato 2024; Potato Pedigree Database 2024).

3.2.3.6 Impala

Odrůda Impala, vzniklá z křížení BM 52-72 × Biranco, vykazuje robustní profil s vysokou odolností proti viru brambor A (PVA), strupovitosti obecné a háďátku bramborovému. Její odolnost dosahuje vysoké úrovně proti viru bramboru X (PVX), viru brambor Y (PVY) a viru brambor M (PVM), spolu s významnou rezistencí proti vložkovitosti. Má naopak pouze nízkou až střední rezistenci vůči plísni bramborové a nízkou odolnost proti viru svinutky bramboru (PLRV). Má nízkou odolnost vůči mechanickému poškození.

Impala vyniká velkými, oválnými až podlouhle oválnými hlízkami, které se vyznačují mělkými očky, lysou slupkou žlutohnědé barvy a mírně nažloutlou dužninou. Rostlina vyniká velkými zelenými listy s mírně lesklým leskem a robustní, vzpřímenou strukturou stonku, což svědčí o bujném růstu (GrinCzech 2024; GRIN-Global 2024; Potato Pedigree Database 2024).

3.2.3.7 Carrera

Odrůda Carrera, která vznikla křížením odrůd Allard × Concurrent, se vyznačuje vhodností pro ranou sklizeň a poskytuje velké hlízy s velmi atraktivní světlou slupkou. Tato odrůda, určená pro tradiční čerstvé konzumní brambory, dozrává brzy, přibližně za 77 dní. K jejím agronomickým vlastnostem patří střední až vysoký výnos a velmi velká velikost hlíz, které se vyznačují oválným tvarem. Carrera má obvykle 9-11 hlíz na rostlinu s jednotnou velikostí a tvarem. Barva slupky je žlutá a dužnina si po uvaření zachovává žlutý odstín, klasifikovaná jako varný typ B.

Carrera vykazuje vysokou odolnost proti plísni bramborové a strupovitosti. Její odolnost vůči rakovině bramboru je však nízká (Potato Pedigree Database 2024; VÚBHB 2024).

3.2.3.8 Antonia

Antonia je středně raná brambora salátového typu. Vyznačuje se oválnými až podlouhlými hlízami se žlutohnědou slupkou a sytě žlutou dužninou, slibuje středně velké až velké výnosy. Vykazuje vysokou odolnost vůči virům bramboru Y, X a M (PVY, PVX a PVM) a viru svinutky brambor (PLRV). Disponuje středně silnou rezistencí na plíseň bramborovou a strupovitost a velmi vysokou odolností vůči hád'átku bramborovému. Odrůda Antonia také ale trpí zranitelností vůči mechanickému poškození a nízkou odolností vůči viru S bramboru (Čermák 2023; Europlant 2024).

3.2.3.9 Red Anna

Odrůda Red Anna, významná odrůda vzniklá křížením odrůd Rosella × Pamir, byla představena v roce 2005. Vyznačuje se krátce oválnými a rovnoměrně tvarovanými hlízami a nápadnou červenou slupkou v kombinaci se sytě žlutou dužninou. Je vyhlášena pro svůj vysoký výnos a výjimečnou stolní hodnotu, vyznačuje se varným typem A/B a výhodou, že po oloupaní nebo uvaření neztmavne.

Odolnost odrůdy Red Anna je impozantní a nabízí odolnost vůči různým problémům, včetně virových chorob, mechanického poškození, hád'átku bramborového patotypu Ro1 a rakoviny brambor patotypu 1. Její odolnost se rozšiřuje i na plíseň bramborovou, což zajišťuje velmi dobrou skladovatelnost a činí z ní odolnou volbu pro pěstitele (Čermák 2007).

3.2.3.10 Ditta

Odrůda Ditta, kříženec odrůd Bintje × Quarta, se představuje jako středně raná odrůda, která je proslulá svou vysokou odolností vůči virům bramboru Y, X, M (PVY, PVX, PVM) a výjimečnou odolností proti strupovitosti a suché hnilobě způsobené houbami rodu *Fusarium*. Je to odrůda s velmi vysokou odolností proti hád'átku bramborovému. Její rezistence proti plísní bramborové však vykazuje rozmezí od nízké po střední. Odrůda Ditta se může pochlubit robustním profilem s oválnými až podlouhle oválnými hlízami, žlutohnědou slupkou a žlutou dužninou, které slibují střední až velkou velikost a střední až vyrovnanou vyrovnanost velikosti hlíz (Čermák 2007; GrinCzech 2024; Potato Pedigree Database 2024).

3.2.3.11 Bernina

Odrůda Bernina je charakteristická vzpřímeným a silným stonkem, velkými a světle zelenými listy a kulovitě oválnými hlízami se žlutohnědou slupkou a žlutou dužninou. Tato odrůda se vyznačuje zejména velmi vysokou odolností vůči mechanickému poškození, což z ní činí vynikajícího kandidáta pro různé podmínky pěstování. Navzdory nízké odolnosti vůči viru bramboru S a velmi nízké odolnosti vůči rakovině bramboru vyniká vysokou odolností proti virům bramboru Y, X a M (PVY, PVX a PVM) a silnou obranyschopností proti strupovitosti, vločkovitosti hlíz a hád'átku bramborovému (GrinCzech 2024).

3.2.3.12 Adéla

Vznikla vyšlechtěním z odrůd Zlata × HR 8.50. Vykazuje ranou zralost s vegetační dobou 71-80 dní. Má kulovité oválné hlízy se žlutohnědou slupkou a žlutou až tmavě žlutou dužninou. Odrůda vykazuje vysokou odolnost vůči virům bramboru Y, X, M (PVY, PVX, PVM) a viru svinutky bramboru (PLRV) a velmi vysokou odolnost vůči hád'átku bramborovému. Vykazuje však nízkou odolnost vůči viru S bramboru (PVS) a rakovině brambor. Adéla se vyznačuje střední až vysokou odolností proti strupovitosti a plísni bramborové a je známá svou konzumní kvalitou a odolností proti mechanickému poškození (Čermák 2007).

3.3 CNV

Vznik variant v počtu kopií jednotlivého genu, označovaný jako CNV (Copy number variation), je genomický jev charakterizovaný přítomností různého počtu opakujících se úseků v genomu u různých jedinců. CNV představují typ strukturální variability, konkrétně zahrnují duplikace nebo delece podstatných úseků párů bází (Žmieňko et al. 2014).

CNV lze obecně rozdělit do dvou hlavních skupin: krátké repetice a dlouhé repetice. Krátké repetice zahrnují převážně dinukleotidové a trinukleotidové repetice, zatímco dlouhé repetice zahrnují celé genové duplikace. Tyto rozdíly ve velikosti repetice hrají zásadní roli při určování mechanismů, které jsou základem jejich vzniku a následného dopadu na fenotyp (McCarroll & Altshuler 2007).

3.3.1 Mechanismy vzniku CNV

Mezi molekulárními mechanismy, které se podílejí na vzniku CNV, je dobře známým procesem vedoucím k duplikacím i delecím nealelická homologní rekombinace (NAHR – Non-allelic homologous recombination). K NAHR dochází během meiotické rekombinace, kdy nesprávné uspořádání homologních chromozomů vede k nerovnoměrnému křížení, což vede k duplikaci genetického materiálu (Carvalho et al. 2013).

Dalším mechanismem, který přispívá ke vzniku CNV, je nehomologní spojování konců (NHEJ – Non-homologous end joining) neboli mikrohomologické spojování konců, které zahrnuje opravu dvouřetězcových zlomů bez nutnosti rozsáhlé homologie mezi vlákny DNA. Tento mechanismus může vést k inzercím, delecím nebo duplikacím genetického materiálu, což usnadňují zejména retrotranspozonové inserce (Palacios et al. 2022).

Kromě toho se na tvorbě CNV podílejí funkce FoSTeS (fork stalling and template switching), kdy se replikační vidlice zastaví na lézích DNA, což vede k přepnutí templátu a vzniku duplikací nebo delecí, zejména v souvislosti s krátkými repeticemi, jako jsou dinukleotidové nebo trinukleotidové repetice. Chyby v aktivitě polymerázy mohou vést k replikaci repetitivních oblastí, což přispívá ke vzniku CNV (Giri & Mohapatra 2017).

3.3.2 Role CNV v rámci evoluce a šlechtění

CNV mohou hrát roli v rychlé adaptaci pod silným selektivním tlakem (Yu et al. 2023).

Ačkoli jsou CNV často považovány za škodlivé, mohou sloužit jako klíčový mechanismus usnadňující adaptaci v podmínkách silného selekčního tlaku. Tento jev popisují Lye & Purugganan (2019) na příkladech experimentálních evolučních studií zahrnujících mikroby vystavené omezení živin. V takových prostředích byly pozorovány spontánní duplikace genů pro transport živin, které poskytují selekční výhodu v podmínkách omezeného přísunu živin. Například u kvasinek vystavených omezení glukózy došlo k amplifikaci genů kódujících vysokoafinitní glukózové transportéry, zatímco podmínky omezené sírany vedly k amplifikaci genů kódujících vysokoafinitní sulfátové transportéry.

Podobné adaptivní reakce byly zaznamenány i u mnohobuněčných organismů. Experimentální evoluční studie zahrnující huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*) vystavený stresorům, jako je vysoké teplo a kyselina salicylová, odhalily zvýšení počtu CNV (DeBolt 2010). Podobně u háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*) vystaveného inbreedingu a aplikaci mutagenů byla pozorována zvýšená frekvence změn počtu kopií genů během adaptivní fáze obnovy. Pozoruhodné je, že CNV identifikované v replikovaných populacích vykazovaly opakovanou adaptaci, přičemž změny se vyskytovaly ve stejných genomických oblastech, ale s různými body zlomu (Farslow et al. 2015).

V přírodních prostředích byly pozorovány adaptivní CNV v reakci na silné selekční tlaky. Například amplifikace specifických genů (*P540*) propůjčily mšicím a různým druhům komárů přenášejících choroby odolnost vůči insekticidům. Vzhledem k tomu, že mnoho druhů podléhá během domestikace silným selektivním tlakům, zejména ve fázi diverzifikace po domestikaci, mohly CNV hrát významnou roli při vytváření genetické diverzity nezbytné pro adaptaci během domestikace (Edi et al. 2014).

3.3.2.1 Přítomnost CNV u domestikovaných druhů

Experimentální evoluční experimenty naznačují, že CNV přispívají k rychlé adaptaci spojené s domestikací a následnou populační expanzí domestikovaných druhů. Pokroky v metodikách detekce, snížené náklady na sekvenování a množství sekvenčních dat vedly k identifikaci CNV u většiny hlavních druhů plodin a domestikovaných druhů zvířat.

První studie u domestikovaných druhů poskytly první poznatky o přítomnosti CNV, i když s omezenou velikostí vzorku. Například srovnávací genomické analýzy u rýže (Ma & Bennetzen 2004) a kukuřice (Springer et al. 2009; Beló et al. 2010; Swanson-Wagner et al. 2010) identifikovaly četné CNV ovlivňující stovky genů. Následné studie s většími objemy vzorků odhalily obsáhlejší katalogy CNV a dalších strukturních variant. Například analýza kukuřice a jejího divokého příbuzného (teosinte) identifikovala tisíce CNV segregujících v obou populacích (Swanson-Wagner et al. 2010).

Rozdíly v analýzách CNV mezi různými studiiemi v rámci stejného druhu jsou však běžné, což se připisuje rozdílům ve velikosti vzorků, použitých odrůdách a metodikách detekce CNV. Tyto studie nicméně zdůrazňují všudypřítomnou povahu CNV jako zdroje genetické variability u domestikovaných taxonů a poukazují na společné rysy i rozdíly copy numberů u různých druhů rostlin a zvířat (Lye & Purugganan 2019).

3.3.2.2 CNV a domestikační znaky a geny

CNV se podílejí na evoluci domestikačních znaků, které odlišují domestikované druhy od jejich divokých předků. Tyto znaky jsou nezbytné pro soužití s lidskou společností a často zahrnují kritické změny behaviorálních znaků u zvířat a fyziologických znaků u rostlin. Analýzy genetické diferenciacce mezi divokými předky a domestikovanými druhy se tradičně zaměřují na jednonukleotidové polymorfismy (SNP), ale CNV mohou dále objasnit genetický základ domestikace (Purugganan & Fuller 2009; Larson et al. 2014).

Zatímco u domestikačních znaků se očekává, že budou v rámci domestikovaných populací fixovány, CNV segregující v těchto populacích by mohly skrývat kauzální mutace, které jsou základem domestikačních znaků. Například omezení zhoršení kvality semen během skladování jejich rozpadem, běžný domestikační znak u plodin, může být způsobena jak delecemi, tak mutacemi SNP v genu *shattering1*. U čiroku a africké rýže propůjčují polymorfni deleční CNV v genu *shattering1* tento fenotyp, což naznačuje vícenásobnou domestikaci (Lin et al. 2012; Tao et al. 2021).

Podobně se na přechodu od révového růstového habitu k determinantnímu, kompaktnímu růstu u druhů fazolí podílejí CNV ovlivňující gen *PvTFL1y*. Tyto příklady poukazují na případy paralelní evoluce a vícenásobného původu domestikovaných druhů a zdůrazňují roli CNV mutací při utváření domestikačních znaků (Bohra et al. 2022).

3.3.2.3 CNV v post-domestikační diverzifikaci

Diverzifikační znaky se objevují po domestikaci, když se domestikované druhy přizpůsobují novým prostředím nebo procházejí selektivním šlechtěním pro specifické znaky. Tyto znaky mohou zahrnovat variace barvy srsti u zvířat nebo adaptace na různé klimatické podmínky u rostlin. CNV byly zapojeny do genů řídících tyto diverzifikační znaky, přičemž významnou roli hrají genové amplifikace (Meyer & Purugganan 2013).

Například duplikace genu *ASIP* (agouti signaling protein) jsou spojeny s bílou barvou srsti u ovcí a koz, což ukazuje na nezávislé selekční události během diverzifikace druhů. Podobně genové amplifikace u fenotypu ridgeback u psů a geny pro kontrolu barvy srsti u skotu a prasat podtrhují podíl CNV na vnitrodruhové diverzifikaci (Norris & Whan 2008; Fontanesi et al. 2009).

Adaptace na nové prostředí je klíčovým aspektem post-domestikační diverzifikace, přičemž CNV se podílejí na propůjčování tolerance vůči stresu a odolnosti vůči chorobám. Geny ovlivněné CNV u domestikovaných i planě rostoucích druhů rostlin jsou spojeny s reakcemi na abiotický stres a choroby, což usnadňuje preadaptaci na různá prostředí během šíření druhů (Fontanesi et al. 2009).

3.3.2.4 Důkazy o selekci na CNV

Během domestikace a diverzifikace se frekvence CNV, které jsou základem příslušných znaků, zvyšuje v reakci na selekční tlaky. Ačkoli je zjišťování důkazů o selekci na CNV

náročné, genomické znaky, jako je vazebná nerovnováha a index fixace, mohou poskytnout náhled na úlohu CNVs v adaptivní evoluci (Vitti et al. 2013).

Například lokus *Rhg1* u sóji, zahrnující čtyři geny v rámci amplifikované sekvence, vykazuje odolnost vůči onemocnění cystotvornými houbami u genotypů se zvýšeným počtem kopií (Kandath et al. 2011). Podobně u domestikovaných psů je selekce na zvýšenou aktivitu amylázy spojenou se stravou založenou na škrobu patrná prostřednictvím variací v lokusu *AMY2B* (Reiter et al. 2016).

3.3.2.5 Budoucí perspektivy výzkumu CNV

CNV představují významnou, avšak nedoceněnou třídu mutací, které formují evoluci domestikovaných druhů. S rozvojem sekvenčních technologií a bioinformatických metod se bude zlepšovat naše chápání přesných rolí a mechanismů CNV v adaptaci a diverzifikaci. Integrace analýz CNV s přístupy systémové biologie slibuje odhalení funkčních rolí CNV v rámci genových regulačních sítí (Lye & Purugganan 2019).

Vzhledem k zásadní úloze domestikovaných druhů při zajišťování potravinové bezpečnosti může lepší pochopení přínosu CNV pomoci při cíleném šlechtitelském úsilí o vývoj odolných a produktivních odrůd rostlin a plemen zvířat. Zůstává však několik nevyřešených otázek, včetně rozsahu dědičnosti CNV od předků, rychlosti tvorby CNV a podílu CNV na komplexních domestikačních vlastnostech. Řešení těchto otázek přispěje k lepšímu pochopení evolučního významu CNV a jejich potenciálního využití při zlepšování plodin a hospodářských zvířat (Lye & Purugganan 2019).

3.4 Metabolická dráha biosyntézy α -solaninu a α -chaconinu

α -solanin a α -chaconin jsou toxické glykoalkaloidy, které se vyskytují především v bramborách (*Solanum tuberosum*) a slouží jako obranný mechanismus proti býložravcům a patogenům. Pochopení metabolické dráhy zodpovědné za biosyntézu solaninu a chaconinu má zásadní význam pro zvýšení bezpečnosti potravin a zlepšení zemědělských postupů (Cárdenas et al. 2015). Tato kapitola se zabývá genetickými a enzymatickými mechanismy, které jsou základem biosyntézy těchto sloučenin, a zaměřuje se na klíčové geny a meziprodukty, které se na tomto procesu podílejí.

3.4.1 Přehled biosyntézy solaninu a chaconinu

Biosyntéza solaninu a chaconinu zahrnuje řadu enzymatických reakcí vedoucích k přeměně prekurzorových molekul na spirosolany, které jsou dále modifikovány za vzniku solanidinů, konečných toxických glykoalkaloidů, které jsou předmětem zájmu. V biosyntéze solaninu a chaconinu byly identifikovány dvě hlavní cesty: mevalonátová a nemevalonátová. Obě cesty se sbíhají při tvorbě skvalenu, který slouží jako společný prekurzor pro další kroky v kaskádě biosyntézy (Akiyama et al. 2021).

3.4.2 Mevalonátová cesta

Mevalonátová dráha začíná přeměnou acetylkoenzymu a končí vznikem cholesterolu, sterolovou sloučeninou, která slouží jako prekurzor při biosyntéze solanidinového aglykonu, klíčového meziproduktu při výrobě solaninu. Následná transformace z cholesterolu na solanidin aglykon zahrnuje několik enzymatických reakcí probíhajících prostřednictvím mevalonátové dráhy, která je primární cestou biosyntézy sterolů v rostlinách (Bianchini et al. 1996). Grafické znázornění mevalonátové dráhy je k dispozici v Příloze 14. Proces přeměny acetyl-CoA na solanidin popisuje Nahar (2011):

Tvorba mevalonátu

Dráha mevalonátu začíná přeměnou acetyl-CoA na HMG-CoA enzymem HMG-CoA syntázou. HMG-CoA je poté přeměněn na mevalonát působením HMG-CoA reductázy. HMG-CoA reductáze je připisován negativní vliv na rychlost průběhu této metabolické dráhy.

Syntéza izoprenoidních prekurzorů

Mevalonát je následně fosforylován a dekarboxylován za vzniku isopentenylpyrofosfátu (IPP) a dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP), které jsou základními stavebními kameny pro syntézu různých isoprenoidních sloučenin, včetně sterolů.

Syntéza skvalenu

IPP a DMAPP podléhají kondenzačním reakcím za vzniku farnesylpyrofosfátu (FPP), prekurzoru skvalenu. Skvalensyntáza katalyzuje přeměnu FPP na skvalen, klíčový meziprodukt v biosyntéze sterolů.

Cyklizace oxidoskvalenu

Skvalen prochází řadou cyklizačních reakcí zprostředkovaných oxoskvalenovými cyklázami za vzniku různých triterpenových prekurzorů, včetně 2,3-oxoskvalenu.

Biosyntéza cholesterolu

Prekurzory triterpenů jsou dále modifikovány sledem enzymatických reakcí, které vedou ke vzniku cholesterolu, což je sterolová sloučenina.

Přeměna na solanidinový aglykon

Specifické enzymatické reakce, které pravděpodobně zahrnují hydroxylaci a přeskupení, dále modifikují cholesterol za vzniku solanidinového aglykonu, klíčového meziproduktu v biosyntéze solaninu.

Glykosylace

V poslední fázi je biosyntéza dokončena přidáním sacharidových skupin k molekule aglykonu za vzniku příslušných steroidních glykoalkaloidů.

3.4.3 Nemevalonátová dráha

V nemevalonátové dráze začíná biosyntéza solaninu a chaconinu přeměnou pyruvátu a glyceralddehyd-3-fosfátu (GAP) na 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát (DXP), kterou usnadňuje DXP syntáza. DXP slouží jako klíčový meziprodukt v dráze, který vede k syntéze 2-C-ethylerythriol-4-fosfátu (MEP). MEP zase slouží jako prekurzor pro výrobu isopentenylpyrofosfátu (IPP) a dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP), základních stavebních kamenů pro další kroky v dráze.

Enzymatické reakce v nemevalonátové dráze vrcholí tvorbou skvalenu, klíčového prekurzoru v biosyntéze sterolů. Po syntéze skvalenu probíhá cesta podobně jako mevalonátová cesta, zahrnující cyklizaci skvalenu na 2,3-oxoskvalen a následné modifikace vedoucí k produkci cholesterolu. Stejně jako v mevalonátové dráze je biosyntéza ukončena glykosylací aglykonu za vzniku příslušných SGA (Baur et al. 2021).

Grafické znázornění nemevalonátové dráhy je zobrazeno v Příloze 15.

3.4.4 Geny zapojené do biosyntézy solaninu a chaconinu

Několik genů kóduje enzymy zapojené do přeměny meziproduktů na cestě biosyntézy solaninu a chaconinu. Mezi tyto enzymy patří (Shi et al. 2022):

- Acetyl-CoA acetyltransferasa (ACAT) v mevalonátové dráze.
 - Kódován geny rodiny *ACAT* (*ACAT1*, *ACAT2*)
- HMG-CoA syntáza (HMGS) v mevalonátové dráze.
 - Kódován geny rodiny *HMGS* (*HMG1*, *HMG2*, *HMG3*)
- Mevalonátkináza (MVK) účastníci se přeměny mevalonátu na IPP/DMAPP.
 - Kódován genem *MVK*.
- Isopentenylpyrofosfátizomeráza (IPPI) účastníci se přeměny mevalonátu na IPP/DMAPP.
 - Kódován genem *IPPI*.
- Skvalensyntáza (SQS) uplatňující se při syntéze skvalenu.
 - Kódován geny rodiny *SQS* (*SQS1*, *SQS2*, *SQS4*).
- Skvalen epoxidáza (SQLE) uplatňující se při přeměně skvalenu na 2,3-oxoskvalen.
 - Kódován genem *SQLE*.
- Různé enzymy podílející se na přeměně cholesterolu na solanidinový aglykon, včetně reduktázy postranního řetězce sterolu (SSR) a sterol-24-C-methyltransferázy (SMT).
 - Kódovány geny rodin *SSR* a *SMT*.
- Rodina sterolglykosyltransferáz (SGT), která hraje klíčovou roli v závěrečných krocích biosyntézy α -solaninu a α -chaconinu tím, že katalyzuje glykosylaci solanidinového aglykonu.
 - Kódovány rodinou genů *SGT* (*SGT1*, *SGT2*, *SGT3*) specificky připojují jednotky glukosy, galaktosy a ramnosy k aglykonové jednotce a vytvářejí kompletní molekuly SGA.

Tyto geny hrají klíčovou roli při katalýze sekvenčních reakcí, které vedou k tvorbě α -solaninu a α -chaconinu.

3.4.4.1 Skupina genů *HMG*

Rodina genů *HMG* (3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reductázy) u *Solanum tuberosum*, zahrnující geny *HMG1*, *HMG2* a *HMG3*, hraje ústřední roli v biosyntéze SGA. *HMG* kóduje klíčový enzym v mevalonátové dráze, který označuje počátek syntézy isoprenoidů a SGA. Pochopení exprese a regulace genů *HMG* je zásadní pro řízení hladiny SGA v bramborách, zvýšení odolnosti rostlin a zajištění kvality hlíz pro bezpečnou spotřebu (Korth et al. 1997).

HMGR1/HMGR2 – rozdílná exprese v reakci na podněty prostředí

Výzkum objasnil odlišné vzorce exprese genů *HMG1* a *HMG2* v různých podmínkách prostředí. *HMG1* reaguje zejména na ošetření methyljasmonátem, což je sloučenina, která simuluje účinky poranění a může zdvojnásobit hladiny transkriptů indukovaných poraněním, což úzce souvisí s biosyntézou steroidů a glykoalkaloidů (SGA). Naopak *HMG2* vykazuje výraznou citlivost na kyselinu arachidonovou, elicitor přítomný u plísně bramborové (*Phytophthora infestans*), což naznačuje specializovanou roli v obranných mechanismech patogenu prostřednictvím indukce akumulace seskviterpenoidních fytoalexinů (Krits et al. 2007).

HMGR3 – význam a exprese

Ačkoli konkrétní podrobnosti o expresi *HMGR3* v reakci na faktory prostředí nejsou rozsáhle zdokumentovány, potvrzení jeho existence naznačuje potenciál funkční rozmanitosti v rámci rodiny genů *HMG*. Vzhledem k odlišné regulaci *HMG1* a *HMG2* v reakci na biotické a abiotické stresory může *HMGR3* nabízet další nuance kontroly nad dráhou biosyntézy isoprenoidů a potenciálně ovlivňovat složení a akumulaci SGA za různých stresových podmínek (Choi et al. 1994).

Počty kopií genů u *Solanum tuberosum*

Villano et al. (2020) ve své studii uvádějí, že jejich zjištění podporují myšlenku, že počet kopií genů *HMG* se rozšířil spíše prostřednictvím segmentálních duplikací než jinými mechanismy, jako je tandemová duplikace nebo retrotranspozice. Všechny geny rodiny *HMG* se v *Solanum tuberosum* nacházejí v osmi kopiích.

3.4.4.2 Rodina genů *SGT*

SGT katalyzují glykosylaci sterolů a steroidních alkaloidů, což je proces, který má zásadní význam pro modulaci vlastností SGA včetně jejich rozpustnosti, stability, bioaktivity a kompartmentalizace v rostlinné buňce (K.F. McCue et al. 2007).

Rozmanitost a funkční specifita

Rodina genů *SGT* vykazuje rozmanitost, přičemž členové *SGT1*, *SGT2* a *SGT3* vykazují odlišné substrátové specifity, expresní vzorce a reakce na podněty prostředí. *SGT1* kóduje enzym galaktosyltransferázu katalyzující tvorbu γ -solaninu ze solanidinu. *SGT2*, solanidin glukosyltransferáza, přeměňuje solanidin na γ -chaconin. *SGT3*, kódující rhamnosyltransferázu, usnadňuje konečnou tvorbu α -chaconinu a α -solaninu z jejich příslušných β forem. Vysoké hladiny exprese *SGT1* a *SGT3* jsou spojeny se zvýšenými hladinami SGA za stresových podmínek, což naznačuje jejich potenciální úlohu omezující rychlost syntézy SGA (Nahar 2011).

3.5 Metody stanovení obsahu glykoalkaloidů v rostlinném materiálu

Stanovení glykoalkaloidů v rostlinném materiálu v odrůdách brambor má zásadní význam vzhledem k jejich toxickým vlastnostem a potenciálním škodlivým účinkům na člověka. V průběhu let byly vyvinuty a zdokonaleny různé metody pro přesnou kvantifikaci obsahu glykoalkaloidů v bramborách, přičemž významného pokroku bylo dosaženo jak v chromatografických, tak v kolorimetrických technikách (Edwards & Cobb 1996).

3.5.1 Kapilární plynová chromatografie (GC)

Kapilární plynová chromatografie (GC) nabízí přesnou metodu pro kvantifikaci hlavních steroidních alkaloidů v druzích rodu *Solanum*, která využívá vnitřní standardizaci pro zajištění přesnosti. Lawson et al. (1992) vyvinuli metodu GC, která vyžaduje pro analýzu méně než 100 mg suché hmotnosti rostlinného pletiva a dosahuje výtěžnosti vnitřního standardu přibližně 80-95 %. Tato metoda zahrnuje souběžnou extrakci a hydrolýzu pomocí 1M HCl v methanolu, což umožňuje rozlišení nedostatečně derivatizovaných aglykonů za méně než 20 minut. Metoda optimalizovaná pro listy a hlízy *S. chacoense* a *S. tuberosum* vykazuje relativní standardní chyby obvykle menší než 2 % průměru, což zdůrazňuje její účinnost při kvantifikaci steroidních alkaloidů.

3.5.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kolorimetrie

Kirui et al. (2009) ověřili rychlý test pro kvantifikaci obsahu glykoalkaloidů v hlízách brambor pěstovaných v tropickém klimatu Keni pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kolorimetrie s bromfenolovou modří. V jejich studii byla zjištěna významná korelace mezi hodnotami TGA (celkový obsah glykoalkaloidů) získanými metodami HPLC a kolorimetrie. Tato práce zaznamenala značné rozdíly mezi odrůdami brambor, pokud jde o obsah glykoalkaloidů, přičemž koncentrace α -chaconinu, α -solaninu a solanidinu se u různých odrůd výrazně lišily. Jejich zjištění podtrhují význam přesných a rychlých metod analýzy glykoalkaloidů pro hodnocení bezpečnosti a kvality brambor ve šlechtitelských programech a při posuzování bezpečnosti potravin.

3.5.3 Důsledky pro výzkum a zemědělství

Tyto metodiky podtrhují zásadní roli analytické chemie v zemědělském výzkumu a bezpečnosti potravin. Schopnost přesně kvantifikovat obsah glykoalkaloidů v bramborách je nezbytná pro šlechtitelské programy zaměřené na vývoj bezpečnějších odrůd s nižším obsahem glykoalkaloidů. Kromě toho tyto metody usnadňují průběžné sledování obsahu glykoalkaloidů v komerčních odrůdách brambor, čímž zajišťují, že zůstane v bezpečných mezích pro lidskou spotřebu. Pokroky v GC, HPLC a kolorimetrické analýze poskytují nejen nástroje nezbytné pro toto monitorování, ale také nabízejí pohled na biochemické cesty zapojené do biosyntézy glykoalkaloidů, což nabízí potenciální cíle pro genetické manipulace a šlechtitelské strategie (Lawson et al. 1992; Kirui et al. 2009).

3.6 Metody stanovení CNV

Tato kapitola se zabývá možnostmi stanovení počtu kopií (copy number variations – CNV). Různé metodiky založené na PCR, zejména digitální kapková PCR (ddPCR), kvantitativní PCR (qPCR) a PCR v reálném čase (rtPCR), jsou metodami využívanými pro přesnou identifikaci a kvantifikaci CNV.

3.6.1 Digitální kapková PCR (ddPCR)

ddPCR je vysoce citlivá a specifická metoda detekce a kvantifikace nukleových kyselin, která nabízí několik výhod oproti tradiční qPCR. Tato technika, jak ji popsali Mazaika & Homsy (2014), rozděluje reakční směs PCR na tisíce malých kapiček, což umožňuje analýzu každé kapičky jako samostatné reakce PCR. Toto rozdělení vede k vysoké úrovni přesnosti a snižuje potenciál pro odchylky mezi jednotlivými vzorky. ddPCR je vyhlášena pro své snadné použití, které zajišťuje přesné výsledky bez potřeby standardních křivek, což z ní činí jednu z lepších voleb pro analýzu CNV, detekci vzácných variant a další genetické testy.

3.6.2 Kvantitativní PCR (qPCR)

qPCR je široce používanou technikou pro stanovení CNV díky své schopnosti přesně kvantifikovat množství cílové nukleové kyseliny. Cassinari et al. (2019) vyvinuli univerzální a nákladově efektivní metodu digitální PCR pro cílenou analýzu CNV založenou na principech qPCR. Tato metoda využívá sondy s hydrolyzou uzamčené nukleové kyseliny (LNA) a univerzální primery, díky čemuž je robustní, jednoduchá a nákladově efektivní. Univerzální qPCR test CNV kombinuje jednoduchost návrhu, kterou umožňují univerzální sondy, s výhodami relativní kvantifikace v rámci jedné reakce. Tato metoda nachází využití hlavně v genomickém výzkumu a v genomické medicíně, díky své snadné přizpůsobivosti.

3.6.3 PCR v reálném čase (rtPCR)

Techniky PCR v reálném čase (rtPCR), konkrétně TaqMan Copy Number Assays, se staly základem pro kvantifikaci variací v počtu kopií (CNV) v lidském genomu. Tato metoda, na kterou upozorňuje práce Mayo et al. (2010), usnadňuje současnou amplifikaci cílového genu nebo genomové sekvence spolu s referenčním testem v rámci diploidního genomu. S využitím srovnávací metody Ct (cycle threshold) pro relativní kvantifikaci umožňuje rtPCR stanovit počet kopií cílové sekvence vyhodnocením rozdílu Ct mezi cílovou a referenční sekvencí, porovnávaného s referenčním vzorkem, o němž je známo, že má dvě kopie cílové sekvence.

4 Metodika

4.1 Cíl experimentu

Hlavním cílem pokusu bylo porovnat variabilitu počtu kopií (CNV) vybraných genů v rámci metabolické dráhy glykoalkaloidů s obsahem glykoalkaloidů v listech, dužnině a slupce hlíz dvanácti vybraných odrůd brambor. Cílem této studie bylo zjistit korelaci mezi genetickou variabilitou těchto genů metabolické dráhy a koncentrací specifických glykoalkaloidů – α -solaninu a α -chaconinu. Cílem bylo přispět k lepšímu pochopení genetických faktorů ovlivňujících syntézu glykoalkaloidů v bramborách s možnými důsledky pro šlechtění plodin a bezpečnost potravin.

K dosažení tohoto cíle experiment využíval digitální kapkovou PCR (ddPCR) pro přesné hodnocení CNV a plynovou chromatografii pro podrobné profilování glykoalkaloidů. Rostlinný materiál pro studii byl získán ve spolupráci s VÚB Havlíčkův Brod s.r.o., přičemž DNA byla extrahována z listových pletiv a glykoalkaloidy z listových pletiv a hlíz pěstovaných v kontrolovaných skleníkových podmínkách.

4.2 Rostlinný materiál a podmínky pěstování

Biologický materiál tvořilo dvanáct odrůd brambor (Anuschka [1], Marabel [2], Princess [3], Sunshine [4], Rosara [5], Impala [6], Carrera [7], Antonia [8], Red Anna [9], Ditta [10], Bernina [11], Adéla [12]) vybraných na základě jejich běžného pěstování na českých polích. Tyto odrůdy poskytl VÚB Havlíčkův Brod s.r.o., čímž byl zajištěn konzistentní a kvalitní zdroj. Odrůdy byly očíslovány od 1 do 12 (Tabulka 7). Brambory byly pěstovány ve skleníkovém prostředí, aby se regulovaly podmínky růstu a minimalizovala variabilita prostředí. Byla zajištěna rovnoměrná kvalita půdy, dostupnost živin a řízený zavlažovací režim.

Téměř všechny odrůdy byly vysazeny ve stejném množství, tři vzorků na odrůdu (tři biologických replikátů), ve stejném množství zeminy do květináčů o stejném objemu. Biologické replikáty byly potom označeny číslem odrůdy / číslem biologického replikátu (např. odrůda číslo 1 – Anuschka: 1/1, 1/2 a 1/3). Výjimkou byla odrůda Ditta, kde bylo pěstováno celkem devět vzorků. Vysazení vzorků proběhlo 21. dubna 2022. Bylo zvoleno náhodné rozmístění rostlin v prostorech skleníku, aby se zamezilo ovlivnění nerovnoměrným osvětlením či zavlažováním.

4.2.1 Zpracování a příprava rostlinného materiálu

Vzorky rostlin byly odebrány ve dvou fázích. V první fázi se odebíraly vzorky listů, a to na začátku června. U vzorku listů bylo náhodně odebráno vždy 15 listů napříč všemi listovými patry. Vzorky listů byly použity pro analýzu CNV pomocí ddPCR a na analýzu obsahu glykoalkaloidů.

V druhé fázi jsme se zaměřili na odběr vzorků hlíz, který byl proveden ve fyziologické zralosti na přelomu září a října. U každé odrůdy byl odebrán směsný vzorek složený ze tří náhodně vybraných hlíz. Každá hlíza byla rozdělena na dužninu a slupku, odebrané vzorky byly poté rozčtvrceny. Aby byla zajištěna jednotnost a homogenita vzorků, byly z každé čtvrtky

vytvořeny 4 menší díly. Z každého dílu poté byly vybrány dva kvadranty. Ty byly poté podrobeny lyofilizaci, aby se odstranila vlhkost a zachovala se integrita biochemických látek. Po vysušení byly vzorky rozdrobeny na jemný prášek pomocí hmoždíře a tloučku, čímž byly připraveny k následné chemické analýze

4.3 Analytické metody pro stanovení obsahu glykoalkaloidů

4.3.1 Příprava vzorků pro analýzu glykoalkaloidů

Pro analýzu obsahu glykoalkaloidů byly vzorky listů i hlíz (zahrnující dužninu a slupku) podrobeny přesnému extrakčnímu procesu. Pro analýzu v listech byl každý lyofilizovaný vzorek nejprve zhomogenizován pomocí laboratorního mlýnku (IKA A11 Basic). Následně bylo přibližně 150 mg homogenizovaného vzorku odebráno do plastové odstředivé zkumavky a použito jako jeden technický replikát. Od každého vzorku byly takto odebrány 3 technické replikáty a byly označeny římskými číslicemi I, II a III (např. 1/1 I, 1/1 II, 1/1 III)., Do každého vzorku bylo poté přidáno 20 ml 80% metanolu. Směs byla poté promíchána ve vortexu (IKA Basic MS3) a umístěna na 10 minut do ultrazvukové lázně (Powersonic-Notus PS 04), aby se usnadnila důkladná homogenizace a rozpuštění glykoalkaloidů. Poté byl vzorek odstředován při 5000 otáčkách za minutu po dobu 7 minut při 20 °C v centrifuze (Eppendorf 5810R). Supernatant byl převeden do 50 ml odběrné baňky a k sedimentu bylo znovu přidáno dalších 20 ml 80% metanolu, poté byl znovu proveden proces extrakce pomocí vortexu, ultrazvuku a centrifugy. Supernatant byl poté převeden k prvnímu supernatantu do 50 ml odměrné baňky, doplněn po rysku 80 % metanolem a promíchán.

V dalším kroku byl každý vzorek převeden přes nylonový mikrofiltr NY 0,22 µm a v poměru 1:4 byl naředěn deionizovanou vodou do vialky.

Pro analýzu v dužnině a slupce hlíz byl postup upraven následujícím způsobem:

- množství homogenizovaného lyofilizovaného materiálu: 50 mg u vzorků slupky a 150 mg u vzorků dužniny, každý vzorek ve třech technických replikátech
- konečné převedení do odměrné baňky a doplnění po rysku: zvoleny baňky o objemu 25 ml, tedy 2× menší než u extrakce z listů
- poměr naředění deionizovanou vodou: zvýšen na 1:1 pro vzorky odebrané z dužniny, snížen na 1:9 pro vzorky odebrané ze slupek

Obsah α -solaninu a α -chaconinu byl poté stanoven metodou UHPLC-ESI-MS/MS.

4.3.2 UHPLC-ESI-MS/MS analýza

Obsah α -solaninu a α -chaconinu ve vzorcích byl kvantifikován pomocí systému ultravysoce účinné kapalinové chromatografie-elektrosprejové ionizace-tandemové hmotnostní spektrometrie (UHPLC-ESI-MS/MS). Kvantifikace proběhla na přístroji Ultimate 3000 RS firmy Thermo Fisher Scientific, kvadrupólový hmotnostní spektrometr byl použit 3200 QTRAP značky AB Sciex). Analyty byly ionizovány pomocí EIS ionizace v pozitivním módu.

Systém byl kalibrován pomocí standardních roztoků známých koncentrací glykoalkaloidů, aby se stanovila základní detekční linie. Analytická kolona byla Kinnetex C18

(30×2,1 mm; 1,7 μm) od společnosti Phenomenex. Mobilní fáze se skládala z gradientové směsi acetonitrilu, methanolu, vody a pufru octanu amonného (pH=4, upraveného kyselinou octovou) v následujícím poměru: 200:100:550:50 (v/v/v/v). Průtoková rychlost byla nastavena na 0,3 ml/min, teplota kolony byla udržována na 40 °C a doba trvání analýzy byla 6 minut na vzorek. Objem vzorku nastříkovaný do kolony byl 1 μl. Postup byl shodný pro analýzu obsahu SGA v listech i v hlízách brambor.

Detekce glykoalkaloidů byla provedena v režimu pozitivních iontů a data získaná z UHPLC-ESI-MS/MS byla použita k výpočtu koncentrace glykoalkaloidů přítomných v každé odrůdě brambor. Tyto koncentrace byly poté porovnány s údaji CNV získanými z analýzy ddPCR, aby se zjistily případné korelace.

Kalibrační křivka pro α-chaconin a α-solanin byla stanovena v rozmezí 0,05-5 μg/ml, aby byla zajištěna přesná kvantifikace v rozsahu koncentrací zjištěných ve vzorcích brambor. Identifikace analytů ve vzorcích byla provedena porovnáním kvantifikačních přechodů a retenčních časů píků vzorků s píky standardů.

4.4 Kvantifikace DNA a analýza čistoty

4.4.1 Extrakce DNA

DNA byla ze vzorků listů extrahována pomocí sady DNeasy® Plant Mini Kit od společnosti Qiagen podle protokolu výrobce (Qiagen 2020). Tento systém využívá lyzační pufr na bázi CTAB (cetyltrimethylamonium bromid), který účinně odstraňuje kontaminanty a polysacharidy, čímž zajišťuje vysokou čistotu DNA pro následné PCR reakce.

Zpočátku byly pro zajištění optimálních podmínek extrakce DNA provedeny nezbytné přípravné kroky. Ty zahrnovaly nastavení odstředivky na pokojovou teplotu a přehřátí vodní lázně na 65 °C. Kromě toho byl do pufrů AW1 a AW2 přidán ethanol podle pokynů soupravy, aby se usnadnil proces promývání.

Extrakce začala mechanickým rozrušením přibližně 20 mg lyofilizované listové tkáně pomocí hmoždíře a tlouku. Tento krok byl rozhodující pro lýzu buněk a uvolnění DNA. Homogenizovaná tkáň byla poté přenesena do mikrocentrifugační zkumavky, do které bylo přidáno 400 μl pufru AP1 a 4 μl RNázy A. Směs byla promíchána a inkubována při teplotě 65°C po dobu 10 minut, což podpořilo rozklad RNA a další lýzu buněk.

Po inkubaci byl k lyzátu přidán pufr P3, aby se vysrážely nečistoty. Lyzát byl poté odstředěn při 14 000 otáčkách za minutu (RPM) (20,000 x g) po dobu 5 minut, aby se usadily zbytky. Čirý supernatant obsahující DNA byl opatrně přenesen do uzavíratelných QIAshredder zkumavek a následovala krátká centrifugace po dobu 2 minut za stejných otáček, aby se odstranily všechny zbývající částice.

Poté bylo 650 μl supernatantu obsahujícího DNA přeneseno do zkumavek DNeasy Mini, které obsahují křemíkovou membránu, na níž je DNA zachycena. Každá zkumavka byla dvakrát promyta 500 μl ethanolu obsahujícího pufr AW1 a poté AW2, vždy následovala centrifugace po dobu 1 minuty při 8000 otáčkách za minutu (≥6000 x g) a poslední centrifugace po druhém promytí AW2 po dobu 2 minut při 14 000 otáčkách za minutu (20 000 x g). Po každé centrifugaci byl průtok zlikvidován.

Nakonec byla přečištěná DNA eluována v pufru s nízkým obsahem soli (pufr AE) přidáním 50 µl pufru, ponecháním 5 minut v inkubaci při pokojové teplotě a následným odstředěním po dobu 1 minuty při 8000 otáčkách za minutu ($\geq 6000 \times g$). Tento eluční krok byl jednou opakován, aby se maximalizoval výtěžek, a výsledkem bylo celkem 100 µl vysoce kvalitního extraktu DNA. Během celého postupu byla přijata zvláštní opatření, jako je použití RNázy A a okamžité zpracování lyzátu, aby se zabránilo kontaminaci RNA a zachovala se integrita DNA. DNA byla uložena při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v jasně označené zkumavce, aby se zachovala její kvalita až do další analýzy.

4.4.2 Kvantifikace DNA

Koncentrace extrahované DNA byla měřena pomocí spektrofotometru NanoDrop, NanoPhotometer® od společnosti Implen. Byla zaznamenána absorpance při 260 nm, přičemž referenční absorpance 1 jednotky odpovídala 50 µg/ml dvouvláknové DNA. Tato kvantifikace umožnila standardizaci koncentrací DNA ve všech vzorcích.

4.4.3 Hodnocení čistoty

Čistota DNA byla vyhodnocena na základě posouzení poměru absorpací při vlnových délkách 260/280 nm a 260/230 nm. Poměry $\sim 1,8$ a $>2,0$ svědčily o vysoké čistotě bez bílkovin a jiných organických kontaminantů.

4.5 ddPCR a analýza CNV

V této studii byla k analýze variability počtu kopií (CNV) v genomech brambor použita kapková digitální PCR (ddPCR). ddPCR je typ amplifikace DNA, který umožňuje absolutní kvantifikaci cílových molekul DNA bez potřeby standardních křivek.

4.5.1 Výpočet vstupního množství DNA pro reakci ddPCR

Objem reakce ddPCR byl stanoven na 20 µl. Množství přidávané DNA bylo určeno podle jeho vztahu k počtu kopií v haploidním genomu, který se pohybuje od 1 do 120 000 kopií. K provedení tohoto výpočtu byla zapotřebí hmotnost DNA v haploidním genomu (reprezentovaná 1c). Tato hmotnost je nezbytná pro nastavení reakce s přesným počtem kopií pro ddPCR.

Výpočet 1c vychází z dokumentace společnosti Bio-Rad a z informací o velikosti genomu dostupných na webu [Ensembl](#). Délka haploidního genomu (12 chromozomů) bramboru (*Solanum tuberosum*) je 840 Mbp. Podle dokumentace společnosti Bio-Rad se používá následující vzorec:

$$\begin{aligned} m &= \text{délka genomu}[bp] \times 1,096 \times 10^{-21} \\ m &= (0,84 \times 10^9) \times (1,096 \times 10^{-21}) \\ m &= 0,92064 \times 10^{-12} g = 0,92 \text{ pg} \\ m &= 1c \end{aligned}$$

Alternativně lze využít knihovny nebo databáze, které uvádějí hodnoty $1c$ pro různé druhy. V databázi C-Value (cvalues) je uvedeno, že velikost genomu brambor je u různých odrůd proměnlivá, což naznačuje, že CNV může být také proměnlivá (Bennett & Smith 1976; Marie & Brown 1993).

Pro naše účely je empiricky ověřeným množstvím, které nepřekračuje kapacitu kapky, v ideálním případě 40 000 kopií na reakci pro diploidní genom, což u tetraploidního genomu, jako je brambor, znamená 20 000 kopií. To znamená, že na jednu reakci budeme potřebovat 20 000 c, tedy $20\,000 \times 0,92 \text{ pg DNA} = 18\,400 \text{ pg DNA} = 18,4 \text{ ng DNA}$.

4.5.2 Příprava primerů pro ddPCR

Primery pro ddPCR by měly obsahovat 50-60 % GC bází s teplotou tání (T_m) mezi 50-65 °C. Množství primerů pro použitou sadu EvaGreen Supermix droplet se pohybovalo mezi 100-250 nM. Doporučuje se začít s vyšší koncentrací primerů, například 0,25 μM .

Primery použité v této práci byly navrženy doc. Dr. Ing. Pavlem Vejlem a Ing. Mohamedem Nomanem. Na Zpočátku byl gen CZU ef-1- α použit jako referenční gen pro normalizaci v postupech ddPCR. Vzhledem k nekonzistentním výsledkům byl však nahrazen genem *Act7*, který poskytl konzistentnější amplifikaci napříč různými odrůdami (Tabulka 5). Stabilní exprese genu pro aktin 7 byla nezbytná pro přesnou normalizaci.

Tabulka 5 - Geny analyzované v experimentální části pomocí ddPCR

Název	Jméno primeru	Sekvence	Délka (bp)	Umístění (bp)	NCBI/ID – referenční sekvence
SolA-F	CZU ef-1- α F	ATTAGGTTCTAGTTCTCTGCCTTG	159	Chromozom 6: 8688968-8688991	CP055239.1
SolA-R	CZU ef-1- α R	CACCAACAACAAAAATCCTGAGC	159	Chromozom 6: 8688991-8689014	CP055239.1
SolF-F	CZU sgt 1 F	TGGGTCCCACAGCTTACGAT	170	Chromozom 7: 25054063-25054082	CP055240.1
SolF-R	CZU sgt 1 R	CCCAATCCCCTAACCTCGAC	170	Chromozom 7: 25054232-25054213	CP055240.1
SolG-F	CZU sgt 2 F	TTCCTTACTTCGCCACTGGTCA	122	Chromozom 8: 35471814-35471835	CP055241.1
SolG-R	CZU sgt 2 R	AGATCGGAAGAGGGAAGCATTG	122	Chromozom 8: 35471935-35471914	CP055241.1
SolH-F	CZU sgt 3 F	AAACTGCAATGCCGCATGTT	118	Chromozom 7: 24761166-24761147	CP055240.1
SolH-R	CZU sgt 3 R	GGGGCAATGATAGTAACCTTGAGG	118	Chromozom 7: 24761049-24761072	CP055240.1
Act7-F	Aktin F	TGACAGAATGAGCAAGGAAATTACT	330	Chromozom 6: 56585855-56585879	CP046692.1
Act-7R	Aktin R	TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC	330	Chromozom 6: 56586184-56586161	CP046692.1

*Poznámka: Sloupec „délka“ popisuje délku amplikonu, který se tvoří pomocí F (forward) a R (reverse) primerů

Délky amplikonů byly zjišťovány pomocí nástroje BLAST. Tyto délky jsou zdokumentovány v Tabulce 5 a byly nezbytné pro zajištění přesnosti vazby primerů a spolehlivosti měření CNV. ID referenčních sekvencí a umístění amplikonů bylo získáno z databáze NCBI.

Ředění primerů

Zásobní roztok 10 µM pro každý primer byl zředěn na 2,5 µM přidáním 30 µl vody k 10 µl zásobního roztoku primeru. Pro reakci ddPCR bylo 8,8 µl zředěné směsi primerů přidáno do 44 µl reakční směsi.

4.5.3 Příprava reakce ddPCR

Do testu ddPCR bylo zahrnuto celkem pět genů. Premix pro reakce byl připraven v objemech dostatečných pro pět duplicitních reakcí. Směs EvaGreen byla použita ve dvojnásobné koncentraci.

Koncentrace DNA, která se má přidat do každé ddPCR reakce, byla pečlivě vypočítána. Pro standardní reakci o objemu 20 µl je obvykle zapotřebí 18,4 ng DNA. Při přípravě premixu bylo počítáno s potenciální 10% ztrátou při manipulaci. Při přepočtu na celkový objem připravené reakce, který je 200 µl a připočtení 10 % je celkové potřebné množství DNA 202,4 ng.

$$x = \frac{18,4 \text{ ng} \times 220 \text{ µl}}{20 \text{ µl}} = 202,4 \text{ ng}$$

4.5.4 Generování kapky a cyklování PCR

Pro tuto část byl následován protokol společnosti Bio-Rad (Bio-Rad 2023). Příprava probíhala na přístroji QX200™ Droplet Generator. Generátor kapek by měl být umístěn na vodorovném povrchu. Kapky byly generovány dávkováním reakční směsi do jamek cartridge, které byly následně pokryty olejem, aby se vytvořila emulze.

Vytvořené kapičky, šedavého vzhledu, byly přeneseny na PCR destičku pomocí vícekanálové pipety nastavené na 45 µl, přičemž se zohlednilo, že skutečný objem vzorku byl 40 µl. Tyto kapičky dále sloužily jako mikroreaktory pro PCR reakci.

4.5.5 ddPCR cyklus a analýza

Po vytvoření kapiček bylo provedeno cyklování PCR pomocí systému QX200™ Droplet Digital PCR System společnosti Bio-Rad, který umožňuje rozdělení vzorku do tisíců kapiček, přičemž amplifikace PCR probíhá v každé jednotlivé kapičce.

Podmínky cyklování ddPCR byly následující, jak je uvedeno v Tabulce 6:

Tabulka 6 - ddPCR cyklus

Cyklus	Teplota	Doba trvání	Rychlost změny teploty	Opakování
Počáteční denaturace	95°C	5 minut	-	1×
Denaturace	95°C	18 sekund	2,5°C/s	39× v cyklu s annealingem
Annealing	64°C	24 sekund	2,5°C/s	39× v cyklu s denaturací
Konec	4°C	∞	-	-

*Poznámka: "∞" znamená, že cyklus „konec“ je časově neomezen a udržuje teplotu až do provedení další akce.

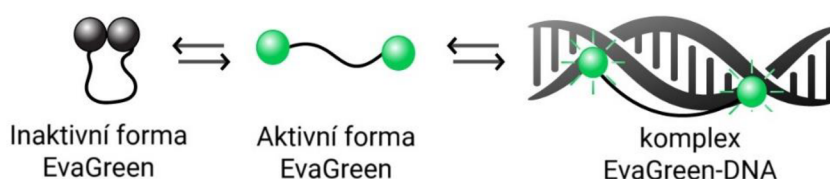
Proces kapkové digitální PCR umožňuje absolutní kvantifikaci cílové DNA, což poskytuje citlivé a přesné měření pro analýzu CNV v tomto experimentu.

4.5.6 Zpracování po cyklování a čtení kapek

Po dokončení PCR je třeba kapky obsahující amplifikovanou DNA přečíst, aby bylo možné určit přítomnost a množství cílové DNA. Tento krok se provádí pomocí QX200™ Droplet Reader, zařízení speciálně navrženého pro počítání a kategorizaci kapiček na základě fluorescence, což umožňuje kvantifikaci kopií DNA ve vzorku. Kapky jsou na základě intenzity fluorescence klasifikovány jako pozitivní nebo negativní, což umožňuje výpočet koncentrace cílové DNA v původním vzorku.

Barvivo EvaGreen je nedílnou součástí procesu ddPCR. Jak je znázorněno na Obrázku 2, barvivo EvaGreen existuje v neaktivní formě, která po navázání na minoritní drážku dvouřetězcové DNA během procesu amplifikace PCR projde konformační změnou na aktivní formu. Tato aktivní forma po interkalaci (vmezezení) s DNA vyzařuje fluorescenční signál. Tento signál je přímo úměrný množství přítomné DNA, což umožňuje kvantifikaci cílové DNA v každé kapce (Bio-Rad 2023).

Obrázek 2 - Barvivo EvaGreen® se váže na dsDNA (<https://biotium.com/technology/pcr-dna-amplification/evagreen-dye-for-pcr/>, 2024)



Před odečtením se kapková čtečka napustí kapkovým olejem, aby se zajistil optimální výkon systému. K ovládání čtečky kapek a analýze dat se používá software QuantaSoft™. Tento software umožňuje přizpůsobení parametrů analýzy a poskytuje uživatelsky přívětivé rozhraní pro interpretaci výsledků ddPCR.

Protokol společnosti Bio-Rad pro čtení z kapátka zahrnuje krok "propláchnutí" systému, aby se zajistilo, že zbytková DNA z předchozích běhů nekontaminuje aktuální analýzu. To je nezbytné pro zachování vysoké specifčnosti a citlivosti metody ddPCR, která je rozhodující pro přesnou a spolehlivou genetickou analýzu (Bio-Rad 2019).

4.6 Statistické vyhodnocení

Data byla vyhodnocena pomocí statistického programu Statistica 12 (StatSoft, Dell USA).

Pro výsledky byly použity základní statistiky, regresní a korelační analýza (jednoduchá lineární regrese), jednofaktorová ANOVA, ANOVA hlavních efektů a ANOVA s interakcemi. Grafy byly též zpracovány v programu Statistica 12.

Průkaznost výsledků byla testována k hladině významnosti 0,05. U všech dat předpokládáme normální rozdělení vycházející z centrální limitní věty ("Central Limit Theorem" 2008), protože pracujeme s dostatečně rozsáhlým náhodným výběrem vzorků.

5 Výsledky

5.1 Kvantifikace DNA a hodnocení kvality

Kvantifikace DNA a hodnocení kvality byly provedeny u různorodého souboru odrůd brambor a výsledky jsou shrnuty v Tabulce 7. Koncentrace extrahované DNA (ng DNA/ μ l) a poměry absorbance při vlnové délce 280 nm a 230 nm (poměr 280 a poměr 230) byly stanoveny spektrofotometrickou metodou.

Tabulka 7 - Kvantifikace a čistota DNA

Odrůda	Číslo vzorku	ng DNA/ μ l	280/260	230/260
Anuschka	1	27	1,7	2,24
Marabel	2	29,5	1,88	3,21
Princess	3	33,5	1,77	3,56
Sunshine	4	17,5	2,5	5,2
Rosara	5	37,2	1,76	2,54
Impala	6	59	1,88	2,62
Carrera	7	42,5	1,89	2,5
Antonia	8	30,5	1,94	2,33
Red Anna	9	22,5	1,83	3,06
Ditta	10	5	1,67	3,27
Bernina	11	57	1,89	3,07
Adéla	12	32,5	1,86	2,7

Poznámka: Poměry udávají absorbanci při 280 nm a 230 nm vzhledem k absorbanci při 260 nm, což umožňuje odhadnout kontaminaci bílkovinami (poměr 280) a dalšími organickými kontaminanty (poměr 230).

Koncentrace DNA se pohybovaly od 5,00 ng/ μ l u odrůdy Ditta do 59,00 ng/ μ l u odrůdy Impala, což ukazuje na variabilitu výtěžnosti DNA u jednotlivých odrůd. Poměr absorbance při vlnové délce 280 nm byl poměrně konzistentní, přičemž většina odrůd vykazovala hodnoty blízké optimálnímu poměru \sim 1,8 pro čistou DNA. Nejvyšší poměr 2,50 vykazovala odrůda Sunshine, což může naznačovat vyšší přítomnost bílkovin nebo jiných absorbentů při této vlnové délce.

Poměr absorbance při vlnové délce 230 nm se u jednotlivých odrůd lišil více, přičemž odrůda Sunshine rovněž vykazovala nejvyšší poměr 5,20. Poměry nad 2,0 se obecně považují za ukazatele relativně čisté DNA, bez organických kontaminantů, jako je fenol nebo chaotropní soli. Vysoký poměr pozorovaný u Sunshine může naznačovat výjimečně čistý vzorek nebo přítomnost jiných faktorů ovlivňujících měření.

Tyto výsledky poskytují základní představu o množství a kvalitě DNA mezi odebranými odrůdami, což je nezbytné pro přesné a spolehlivé následné aplikace, jako jsou analýzy ddPCR podrobně popsané v následujících částech.

5.2 Glykoalkaloidy v listech brambor

Statistická analýza glykoalkaloidů v listech brambor odhalila vyšší průměrnou koncentraci α -chaconinu ve srovnání s α -solaninem. Rozptyl těchto glykoalkaloidů, jak je uvedeno v Tabulce 8 a znázorněno na Obrázku 3, může být ovlivněn genetickou variabilitou, podmínkami prostředí a působením světla, což jsou faktory, které jsou důkladně rozebrány v kapitole 3.2.2.1 literární rešerše.

Výchozí data SGA analýzy v listech jsou dostupná v Příloze 16.

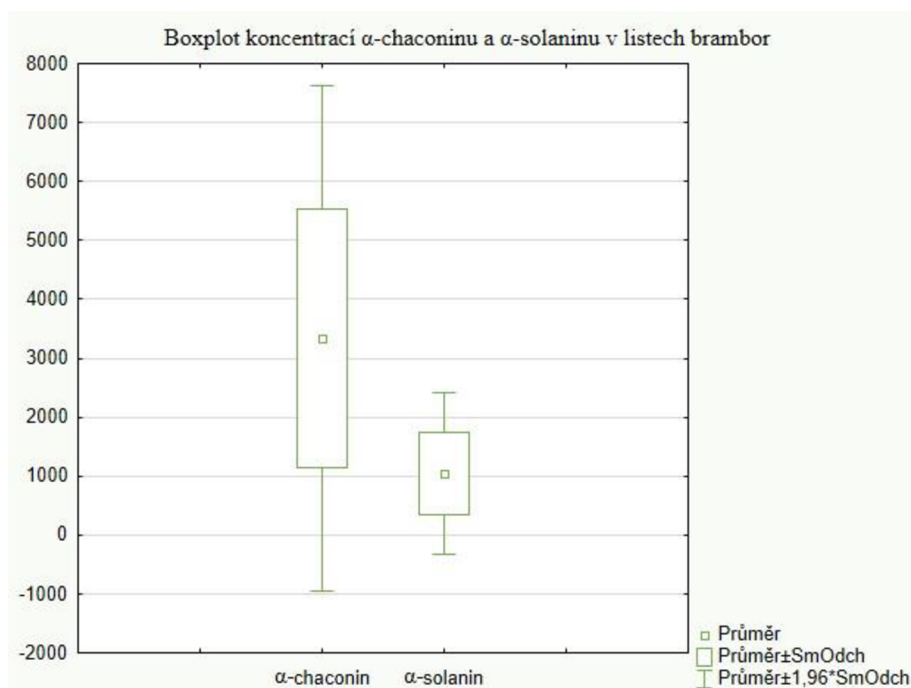
Tabulka 8 - Statistické shrnutí glykoalkaloidů v listech brambor

Statistická charakteristika	α -solanin [$\mu\text{g/g}$]	α -chaconin [$\mu\text{g/g}$]
Počet	108	108
Poměr	1	: 3,19505
Průměr	1044,35028	3336,74853
Směrodatná odchylka	695,57774	2190,98165
Minimum	236,842105	782,894737
Percentil 25	489,763234	1691,19532
Percentil 75	1375,32468	4693,64035
Maximum	3016,66667	9933,77483
Rozptyl	483828,392	4800400,61

*Poznámka: Obsah je uveden na gram sušiny (DW).

Variabilita znázorněná krabicovým grafem na Obrázku 3 podtrhuje proměnlivou povahu koncentrací glykoalkaloidů, kterou lze potenciálně přičíst výše uvedeným faktorům. Tyto rozdíly mohou také odrážet složité interakce mezi genetickou výbavou bramborových rostlin a jejich prostředím, které mohou zahrnovat vliv kolísání teplot a vlhkosti.

Obrázek 3 - Boxplot koncentrací α -chaconinu a α -solaninu v listech brambor



5.3 Glykoalkaloidy v dužnině brambor

Statistická analýza glykoalkaloidů v dužnině brambor prokázala nižší průměrné koncentrace než v listech. Výsledky, shrnuté v Tabulce 9, odrážejí obecný trend distribuce glykoalkaloidů v bramborech. Krabicový graf na Obrázku 4 poskytuje vizuální znázornění těchto distribucí.

Výchozí data SGA analýzy v dužnině jsou dostupná v Příloze 17.

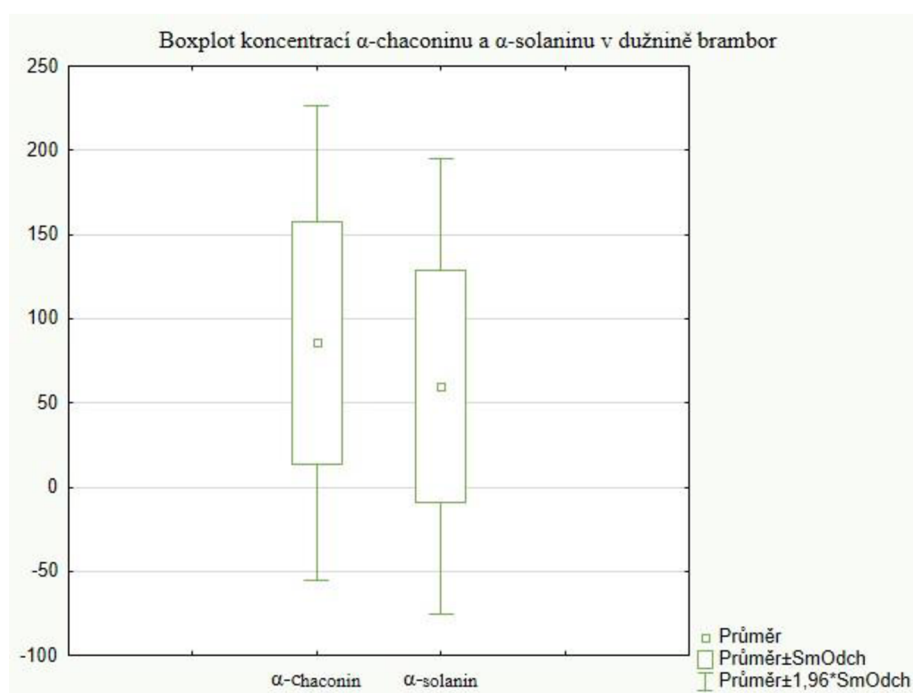
Tabulka 9 - Statistické shrnutí glykoalkaloidů v dužnině brambor

Statistická charakteristika	α -solanin [$\mu\text{g/g}$]	α -chaconin [$\mu\text{g/g}$]
Počet	108	108
Poměr	1	: 1,43106
Průměr	59,8633609	85,6680987
Směrodatná odchylka	68,9437065	71,7984967
Minimum	2,2254902	7,15686275
Percentil 25	25,8223684	43,01766
Percentil 75	58,3881579	101,810458
Maximum	397,350993	374,172185
Rozptyl	4753,23467	5155,02413

*Poznámka: Obsah je uveden na gram sušiny (DW).

Variabilita obsahu glykoalkaloidů v dužnině ve srovnání s listy naznačuje rozdílnou regulaci a způsoby akumulace v různých tkáních brambor.

Obrázek 4 - Boxplot koncentrací α -chaconinu a α -solaninu v dužnině brambor



5.4 Glykoalkaloidy ve slupce brambor

Analýza obsahu glykoalkaloidů ve slupce brambor odhalila nejvyšší obsah glykoalkaloidů ze všech sledovaných pletiv. Toto zjištění je v souladu s obecně známou skutečností, že slupky brambor často obsahují vyšší množství glykoalkaloidů ve srovnání s ostatními částmi hlízy. Relativní podíl glykoalkaloidů ve slupce ve srovnání se zbytkem hlízy se pohybuje od 30% do 80% (Wolf & Duggar 1940). Shromážděné údaje v Tabulce 10 a odpovídající rozložení znázorněné na Obrázku 5 tento bod podtrhují.

Výchozí data SGA analýzy ve slupce jsou dostupná v Příloze 18.

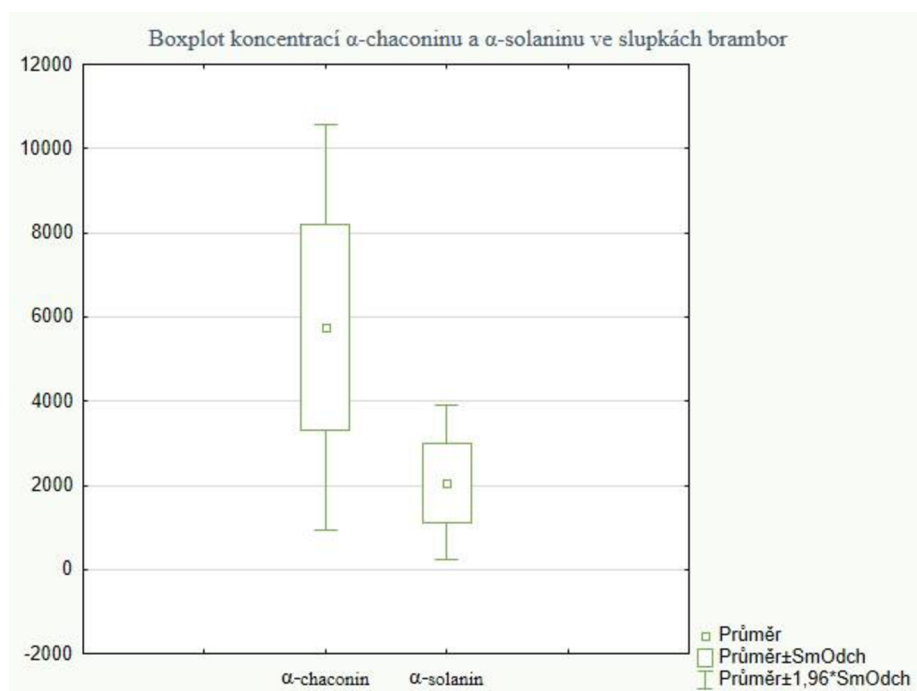
Tabulka 10 - Statistické shrnutí glykoalkaloidů ve slupce brambor

Statistická charakteristika	α -solanin [$\mu\text{g/g}$]	α -chaconin [$\mu\text{g/g}$]
Počet	108	108
Poměr	1	: 2,78425
Průměr	2066,05079	5752,40638
Směrodatná odchylka	938,858806	2452,72453
Minimum	460,645755	429,202358
Percentil 25	1514,55441	4079,32715
Percentil 75	2548,76471	7205,16176
Maximum	4323,46698	11159,0147
Rozptyl	881455,857	6015857,62

*Poznámka: Obsah je uveden na gram sušiny (DW).

Výsledky naznačují potenciální adaptivní výhodu při hromadění těchto látek ve slupce, čímž nabízejí pohled na obranné mechanismy rostlin.

Obrázek 5 - Boxplot koncentrací α -chaconinu a α -solaninu ve slupkách brambor



5.5 ddPCR a CNV analýza

V této studii byla použita metoda ddPCR k posouzení variability počtu kopií (CNV) genů klíčových pro biosyntézu glykoalkaloidů u různých odrůd brambor. Přesné počty kapiček, uvedené v Tabulce 11, odrážejí úroveň genové exprese každého analyzovaného genu napříč studovanými odrůdami brambor.

Tabulka 11 - Průměrné počty pozitivních dropletů, vypočítané z tabulky v Příloze 19

Název genu	Ditta 10/1	Ditta 10/2	Ditta 10/3	Anuschka	Marabel
SolA	709	738	831	505	723
SolF	chybí data	1699	1742	1504	1325
SolG	1397	1446	1333	1108	1177
SolH	952	955	986	879	909
Act7	745	862	923	707	787
Název genu	Princess	Sunshine	Rosara	Impala	Carrera
SolA	817	697	51	539	849
SolF	1463	1695	83	1616	1190
SolG	1130	1135	62	1097	897
SolH	896	888	58	876	803
Act7	830	669	52	775	809
Název genu	Antonia	Red Anna	Bernina	Adéla	
SolA	571	750	900	903	
SolF	921	904	1306	1478	
SolG	913	894	1320	1327	
SolH	683	710	936	905	
Act7	576	644	888	636	

Dále jsou v Tabulce 11 shrnuty průměrné počty kapiček, což je klíčová metrika při kvantifikaci ddPCR. Tyto počty poskytují srovnávací pohled na úroveň genové exprese u různých odrůd brambor.

Tabulka 12 srovnává počty kopií genů *SGT1*, *SGT2* a *SGT3*, které byly vypočítány na základě výsledků ddPCR jednotlivých genů a výsledků ddPCR genu pro aktin 7. Gen aktin 7 je lokalizován na chromozomu 6, kde se vyskytuje pouze v jedné kopii. Pro tetraploidní genom bramboru to potom znamená, že CNV pro tento gen je roven 4 (4 x chromozom 6). Tudíž počet pozitivních dropletů genu pro aktin 7 je brán jako standardní CNV = 4. Data v Tabulce 12, zejména ta zvýrazněná červeně, ukazují na rozdílný počet kopií jednotlivých genů.

Data byla získána z programu QuantaSoft společnosti Bio-rad, viz ukázka v Příloze 20.

Tabulka 12 - Počty CNV jednotlivých genů u vybraných odrůd brambor

Číslo vzorku	Odrůda	SGT1 CNV (SolF primery)	SGT2 CNV (SolG primery)	SGT3 CNV (SolH primery)
1 / 1	Anuschka	8	6	4
2 / 1	Marabel	8	6	4
3 / 1	Princess	8	6	4
4 / 1	Sunshine	8	6	4
5 / 1	Rosara	6	4	4
6 / 1	Impala	8	6	4
7 / 1	Carrera	6	4	4
8 / 1	Antonia	6	6	4
9 / 1	Red Anna	6	6	4
11 / 1	Bernina	6	6	4
12 / 1	Adéla	8	6	4
10 / 1	Ditta	chybí data	6	4
10 / 2	Ditta	8	6	4
10 / 3	Ditta	8	6	4

Pochopení vztahu mezi CNV genů a koncentrací glykoalkaloidů by mohlo poskytnout cenné poznatky o regulačních mechanismech těchto sloučenin v bramborách. Díky těmto znalostem by se mohl realizovat potenciální vývoj odrůd brambor s optimalizovaným obsahem glykoalkaloidů pro potravinovou bezpečnost či odolnost vůči škůdcům, což by mohlo být vodítkem pro budoucí šlechtitelské programy.

5.5.1 Analýza počtu dropletů pomocí ANOVY

Předpoklad, že tyto geny jsou v různých podmínkách konzistentní, je pro spolehlivost analýz CNV zásadní. Dalším předpokladem je, že variabilita v počtu dropletů přímo souvisí s expresí genů a vlivem environmentálních faktorů.

Výsledky testů jednofaktorové ANOVY, kde závisle proměnná je počet pozitivních dropletů pro daný gen a třídícím faktorem je vzorek (odrůda nebo biologický replikát), potvrzují, že různé odrůdy i biologické replikáty jedné odrůdy (Ditta) mají statisticky významnou variabilitu v počtu pozitivních dropletů, viz Tabulka 13. Počet dropletů u biologických replikátů, vzhledem k tomu, že se jedná o klony, je pak ovlivněn různými vlivy, například přípravou ddPCR reakce, pipetováním, homogenizací vzorku.

P-hodnota u genu *Act7*, která je nižší než 0,05 nám potvrzuje, že je nutné provést měření referenčního genu pro každou odrůdu zvlášť a k ní pak vztahovat ostatní geny v daném vzorku, pro zajištění správných výsledků. Měření pomocí referenčního genu pro *Act7* se tudíž musí vždy opakovat i u biologických replikátů.

Tabulka 13 - jednofaktorová ANOVA výsledků metody ddPCR (závisle proměnná – počet pozitivních dropletů pro daný gen; faktor – vzorek)

Gen	Stupně volnosti	Rozptyl	F hodnota	p-hodnota
SolF	13	417472,24	132,08	$1,538 \times 10^{-11}$
SolG	13	240689,00	322,03	$5,301 \times 10^{-15}$
SolH	13	110809,56	549,88	$1,273 \times 10^{-16}$
Act7	13	92162,30	17,36	2×10^{-6}

5.5.2 Pearsonova korelační analýza – vztah obsahu glykoalkaloidů mezi sebou

Biochemická cesta syntézy steroidních glykoalkaloidů (SGA) v bramborách naznačuje možný vzájemný vztah mezi dvěma primárními glykoalkaloidy, α -chaconinem a α -solaninem. Za tímto účelem byla provedena Pearsonova korelační analýza s cílem zjistit, do jaké míry jsou hladiny těchto glykoalkaloidů v tkáních brambor vzájemně závislé.

Analýza přinesla silné pozitivní korelace ve všech typech tkání. Výsledky naznačují, že s rostoucí koncentrací α -chaconinu roste i koncentrace α -solaninu. Tento konzistentní vzorec napříč různými typy tkání naznačuje silnou biochemickou vazbu v cestě jejich biosyntézy nebo koordinovanou regulaci obou SGA. Specifika korelace v jednotlivých typech tkání brambor jsou podrobně popsána níže:

Listy

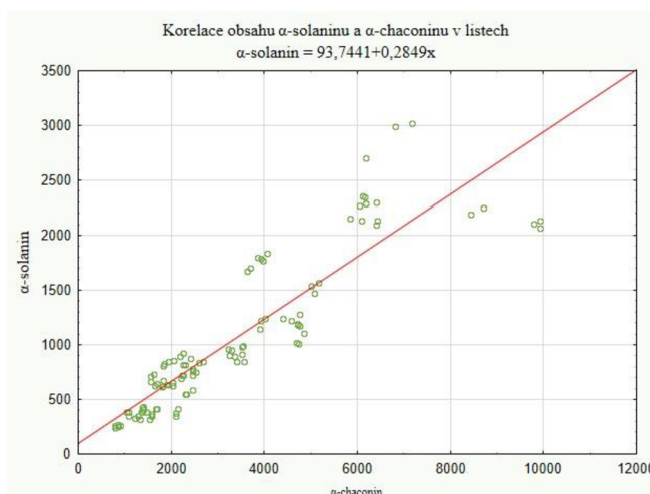
V případě listů je korelační koeficient (R) 0,897 s hodnotou koeficientu determinace (R^2) 0,805, což naznačuje, že přibližně 80 % variability obsahu α -solaninu lze vysvětlit jeho korelací s obsahem α -chaconinu.

Analýza vykazuje významnou p-hodnotu $1,88 \times 10^{-39}$, což potvrzuje, že korelace je vysoce statisticky významná. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 14 a na Obrázku 6.

Tabulka 14 – Korelace obsahu α -chaconinu a α -solaninu v listech brambor

Korelace	R	R^2	Absolutní člen (a)	Směrnice (b)	p-hodnota
α-chaconin \times α-solanin	0,89736731	0,80526808	93,7440535	0,284889982	$1,88 \times 10^{-39}$

Obrázek 6 – Korelace obsahu α -chaconinu a α -solaninu v listech brambor



Dužnina

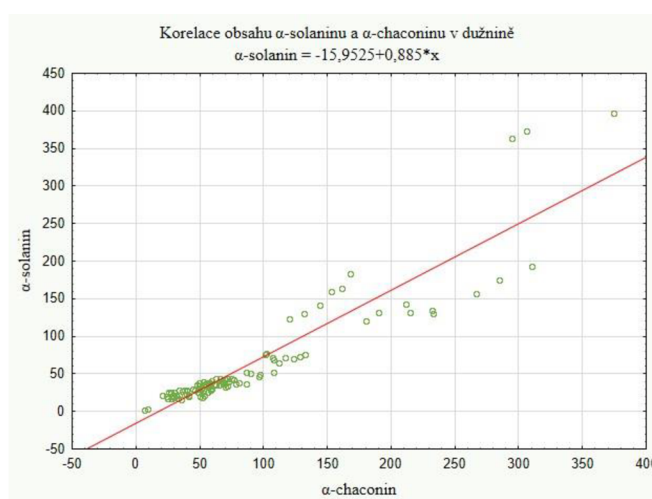
Korelační koeficient (R) pro dužninu je 0,922 a hodnota koeficientu determinace (R^2) 0,849 ukazuje na velmi silný pozitivní vztah, kdy hladiny jednoho glykoalkaloidu mohou s vysokou spolehlivostí předpovědět hladiny druhého.

P-hodnota $2,80 \times 10^{-45}$ dále naznačuje, že pozorovaná korelace je opět statisticky průkazná. Tabulka 15 uvádí podrobnější výsledky statistické analýzy, grafické znázornění lze nalézt na Obrázku 7.

Tabulka 15 – Korelace obsahu α -chaconinu a α -solaninu v dužnině brambor

Korelace	R	R^2	Absolutní člen (a)	Směrnice (b)	p-hodnota
α -chaconin \times α -solanin	0,92164035	0,84942094	-15,9524677	0,884994878	$2,80 \times 10^{-45}$

Obrázek 7 – Korelace obsahu α -chaconinu a α -solaninu v dužnině brambor



Slupka

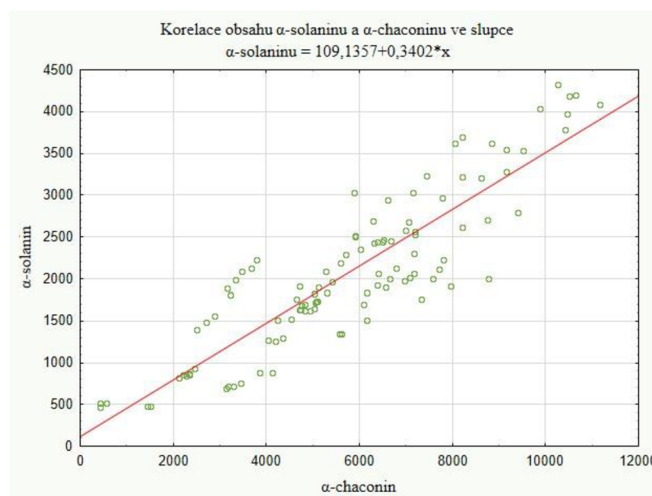
U slupky brambor je korelační koeficient (R) 0,889 a hodnota koeficientu determinace (R^2) 0,790 znovu naznačuje, že podstatná část variability obsahu α -solaninu souvisí s variabilitou obsahu α -chaconinu.

P-hodnota $1,08 \times 10^{-37}$ blížící se nule potvrzuje statistickou významnost. Tabulka 16 a Obrázek 8 shrnují korelační analýzu ve slupce.

Tabulka 16 – Korelace obsahu α -chaconinu a α -solaninu ve slupce brambor

Korelace	R	R^2	Absolutní člen (a)	Směrnice (b)	p-hodnota
α -chaconin \times α -solanin	0,88873221	0,78984494	109,135671	0,340190694	$1,08 \times 10^{-37}$

Obrázek 8 – Korelace obsahu α -chaconinu a α -solaninu ve slupce brambor



Celkový pohled

Při komplexní analýze celkové korelace mezi α -chaconinem a α -solaninem ve všech studovaných typech pletí jsou zjištěny nejprůkaznější. Tabulka 17 tento vztah vystihuje a uvádí extrémně vysoký korelační koeficient (R) 0,952. Hodnota koeficientu determinace (R^2) je 0,907, což znamená, že přibližně 90,7 % variability obsahu α -solaninu lze předpovědět z obsahu α -chaconinu v různých typech pletí nebo naopak.

Absolutní člen (a) 25,774 naznačuje, že i bez přítomnosti α -chaconinu lze v tkáních očekávat základní hladinu α -solaninu. Směrnice (b) 0,337 naznačuje mírnou rychlost nárůstu obsahu α -solaninu ve vztahu k obsahu α -chaconinu. Na každou jednotku zvýšení obsahu α -chaconinu připadá odpovídající zvýšení obsahu α -solaninu o 0,337 jednotky.

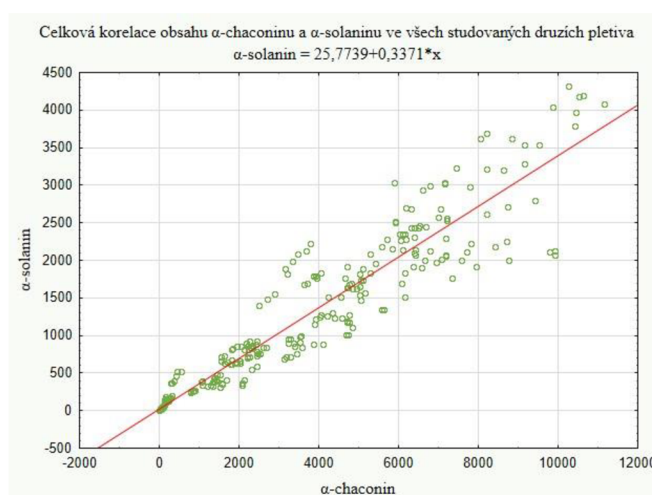
P-hodnota 0 je v tomto kontextu obzvláště nápadná a znamená mimořádně silnou úroveň statistické významnosti. To naznačuje, že korelace mezi obsahem α -chaconinu a α -solaninu je vysoce předvídatelná a prakticky vylučuje možnost, že by byla způsobena náhodnou variabilitou.

Tato zastřešující korelace zdůrazňuje vnitřní vazbu v biosyntéze a regulaci těchto glykoalkaloidů, která odráží společnou biologickou dráhu.

Tabulka 17 – Celková korelace obsahu α -chaconinu a α -solaninu ve všech studovaných druzích pletiva

Korelace	R	R^2	Absolutní člen (a)	Směrnice (b)	p-hodnota
α -chaconin \times α -solanin	0,95232325	0,90691957	25,7738823	0,337111984	0

Obrázek 9 – Celková korelace obsahu α -chaconinu a α -solaninu ve všech studovaných druzích pletiva



Tyto silné korelace svědčí o společné regulaci a propojené biosyntetické dráze α -chaconinu a α -solaninu v bramborách.

Závěrem lze říci, že Pearsonova korelační analýza podtrhuje robustní propojení mezi hladinami α -chaconinu a α -solaninu v rostlinách brambor a poskytuje prediktivní nástroj pro odhad koncentrací těchto sloučenin. Podle vysoké úrovně statistické významnosti můžeme předpokládat, že tato zjištění jsou vysoce spolehlivá.

5.5.3 Analýza rozptylu (ANOVA) – obsah glykoalkaloidů

5.5.3.1 Analýza ANOVA – vliv odrůdy a typu pletiva na obsah α -chaconinu

Analýza ANOVA uvedená v tabulkách 1 až 4 nabídla komplexní zkoumání obsahu α -chaconinu v různých odrůdách brambor a typech rostlinných pletiv. Provedením ANOVY hlavních efektů a ANOVY s interakcemi bylo cílem studie pochopit vliv odrůdy a typu tkáně na obsah α -chaconinu, klíčového glykoalkaloidu v bramborách.

ANOVA hlavních efektů (Tabulka 18 a Tabulka 19)

ANOVA hlavních efektů hodnotila hlavní účinky faktorů odrůda brambor a typ tkáně na obsah α -chaconinu bez zohlednění jejich případné interakce. Analýza odhalila významné účinky obou faktorů. Každá odrůda vykazovala jedinečný obsah α -chaconinu a tato variabilita byla statisticky významná, p-hodnoty se blížily nule. To naznačuje, že odrůda brambor je faktorem ovlivňujícím obsah α -chaconinu. Obdobné výsledky poskytl i faktor pletiva. Tabulka 18 uvádí podrobnější výsledky analýzy.

Tabulka 18 - Jednorozměrné testy významnosti pro α -chaconin – ANOVA hlavních efektů

Efekt	Součet čtverců	Stupně volnosti	F hodnota	p-hodnota
Abs. člen	3030385582	1	1050,080	0
Odrůda	263274032	11	8,294	$9,04 \times 10^{-13}$
Typ pletiva	1746606584	2	302,614	0

Následná analýza využívající Tukeyův HSD test (Tabulka 19) rozdělila odrůdy do shluků známých jako "homogenní skupiny" na základě podobnosti jejich obsahu α -chaconinu. Homogenní skupina označuje odrůdy, které se od sebe významně neliší v obsahu glykoalkaloidů, a lze je tedy statisticky považovat za součást stejné skupiny. Například odrůdy Rosara, Princess, Bernina, Anuschka a Ditta mají společně **** v rámci homogenní skupiny 1, což znamená, že jejich hladiny α -chaconinu se od sebe statisticky neliší. Absence **** ve sloupcích týkajících se ostatních homogenních skupin znamená, že obsah α -chaconinu v těchto odrůdách se významně liší od odrůd uvedených v těchto sloupcích. Tento způsob seskupení poskytuje jasné vizuální znázornění toho, které odrůdy mají podobné profily glykoalkaloidů, což nabízí cenné poznatky pro šlechtění a výzkum, kde je požadován nebo vyžadován specifický obsah glykoalkaloidů.

Tabulka 19 - Tukeyův HSD test; proměnná α -chaconin, odrůdy

Číslo	Odrůda	Průměr	Homogenní skupina 1	Homogenní skupina 2	Homogenní skupina 3	Homogenní skupina 4	Homogenní skupina 5
12	Adéla	1477,5	-	****	-	-	-
8	Antonia	1912,5	-	****	****	-	-
5	Rosara	2409,7	****	****	****	-	-
3	Princess	2716,7	****	****	****	-	-
11	Bernina	2722,8	****	****	****	-	-
1	Anuschka	2924,7	****	****	****	****	-
10	Ditta	2967,1	****	****	****	****	-
2	Marabel	3173,4	****	-	****	****	-
9	Red Anna	3472,7	****	-	-	****	****
6	Impala	3835,3	****	-	-	****	****
4	Sunshine	4362,7	-	-	-	****	****
7	Carrera	4723,5	-	-	-	-	****

Analýza uvedená v Tabulce 20 zkoumá obsah α -chaconinu v různých typech pletiv brambor a odhaluje významné rozdíly v koncentraci glykoalkaloidů v listech, dužnině a slupce. Značné rozdíly, zvýrazněné odlišnými homogenními skupinami, potvrzují akumulaci α -chaconinu specifickou pro jednotlivé tkáně. Například listové pletivo vykazuje mimořádně vysoké hladiny glykoalkaloidů ve srovnání s dužninou a slupkou, jak znázorňuje zařazení do samostatné homogenní skupiny.

Tabulka 20 - Tukeyův HSD test; proměnná α -chaconin, pletiva

Číslo	Typ pletiva	Průměr	Homogenní skupina 1	Homogenní skupina 2	Homogenní skupina 3
2	dužnina	85,668	****		
1	list	3336,749		****	
3	slupka	5752,406			****

ANOVA s interakcí (Tabulka 21 a Tabulka 22)

ANOVA s interakcí zohlednila, jak může kombinovaný vliv odrůdy a typu pletiva ovlivnit obsah α -chaconinu. Významný efekt interakce, indikovaný p-hodnotami blízkými nule, poukazuje na přítomnost „odrůdovo-pletivové“ variability. Z toho vyplývá, že obsah α -chaconinu v bramborách může být výsledkem komplexní souhry mezi genetickými faktory spojenými s odrůdou a fyziologickými úlohami různých pletiv v rostlině.

Tabulka 21 - Jednorozměrné testy významnosti pro α -chaconin – ANOVA s interakcemi

Efekt	Součet čtverců	Stupně volnosti	F hodnota	p-hodnota
Abs. člen	3030385582	1	4087,395	0
Odrůda	263274032	11	32,282	0
Typ pletiva	1746606584	2	1177,915	0
Odrůda*Typ pletiva	681094629	22	41,757	0

Post-Hoc analýza - Tukeyův HSD test

Post-hoc analýza pomocí Tukeyho HSD testu umožnila párové srovnání průměrů různých skupin. Výsledky ukázaly, že konkrétní dvojice odrůd a typů tkání mají významně odlišné hladiny α -chaconinů. Například odrůda Sunshine v pletivu slupky zaznamenala nejvyšší obsah α -chaconinu, čímž se se statistickou spolehlivostí odlišila od ostatních skupin.

Tabulka 22 - Tukeyův HSD test; proměnná α -chaconin – ANOVA s interakcemi

Č.	Odrůda	Typ pletiva	Průměr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
23	Antonia	dužnina	27,36	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Adéla	dužnina	31,46	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Anuschka	dužnina	38,99	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Marabel	dužnina	45,10	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Rosara	dužnina	55,02	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Princess	dužnina	65,76	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Carrera	dužnina	69,53	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Ditta	dužnina	71,98	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Impala	dužnina	74,22	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	Bernina	dužnina	155,86	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Red Anna	dužnina	186,71	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Sunshine	dužnina	206,05	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Princess	list	1346,55	****	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Adéla	list	1573,44	****	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Bernina	slupka	1686,99	-	****	****	****	-	-	-	-	-	-	-
4	Marabel	list	1911,37	-	-	****	****	-	-	-	-	-	-	-
28	Ditta	list	1996,03	-	-	****	****	-	-	-	-	-	-	-
13	Rosara	list	2273,09	-	-	****	****	****	-	-	-	-	-	-
1	Anuschka	list	2467,46	-	-	****	****	****	-	-	-	-	-	-
22	Antonia	list	2511,59	-	-	****	****	****	-	-	-	-	-	-
10	Sunshine	list	2734,35	-	-	****	****	****	-	-	-	-	-	-
36	Adéla	slupka	2827,63	-	-	****	****	****	-	-	-	-	-	-
24	Antonia	slupka	3198,76	-	-	-	****	****	-	-	-	-	-	-
25	Red Anna	list	3774,41	-	-	-	-	****	****	-	-	-	-	-
15	Rosara	slupka	4901,22	-	-	-	-	-	****	****	-	-	-	-
16	Impala	list	5374,23	-	-	-	-	-	-	****	****	-	-	-
18	Impala	slupka	6057,59	-	-	-	-	-	-	****	****	****	-	-
3	Anuschka	slupka	6267,90	-	-	-	-	-	-	****	****	****	****	-
31	Bernina	list	6325,73	-	-	-	-	-	-	****	****	****	****	-
21	Carrera	slupka	6348,32	-	-	-	-	-	-	****	****	****	****	-
27	Red Anna	slupka	6457,13	-	-	-	-	-	-	****	****	****	****	-
9	Princess	slupka	6738,04	-	-	-	-	-	-	-	****	****	****	-
30	Ditta	slupka	6833,47	-	-	-	-	-	-	-	****	****	****	-
6	Marabel	slupka	7563,94	-	-	-	-	-	-	-	-	****	****	-
19	Carrera	list	7752,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	****	-
12	Sunshine	slupka	10147,88											****

5.5.3.2 Analýza ANOVA – vliv odrůdy a typu pletiva na obsah α -solaninu

ANOVA hlavních efektů pro obsah α -solaninu v různých odrůdách brambor a typech pletiv odhalila významné rozdíly. Každá odrůda brambor vykazovala jedinečný profil obsahu α -solaninu a rozdíly byly statisticky významné, jak naznačuje téměř nulová hodnota p. Faktor

typ pletiva se rovněž ukázal jako statisticky významný. Tato výrazná variabilita naznačuje, že jak druh brambor, tak část rostliny významně ovlivňují obsah α -solaninu. Tabulka 23 uvádí podrobnější výsledky analýzy.

Tabulka 23 - Jednorozměrné testy významnosti pro α -solanin – ANOVA hlavních efektů

Efekt	Součet čtverců	Stupně volnosti	F hodnota	p-hodnota
Abs. člen	361820756	1	951,3365	0
Odrůda	28692054	11	6,8582	$2,37 \times 10^{-10}$
Typ pletiva	217363479	2	285,7573	0

Hlubší zkoumání dat pomocí Tukeyova HSD testu (Tabulka 24) pro faktor odrůda seskupil odrůdy do odlišných homogenních skupin na základě obsahu α -solaninu a vyznačil, které odrůdy mají statisticky nerozlišitelné hladiny od sebe navzájem. Například odrůdy, které spadají do stejné skupiny - označené stejným počtem hvězdiček - se v obsahu α -solaninu významně neliší, zatímco odrůdy v různých skupinách ano.

Tabulka 24 - Tukeyův HSD test; proměnná α -solanin

Č.	Odrůda	Průměr	Homogenní skupina 1	Homogenní skupina 2	Homogenní skupina 3	Homogenní skupina 4	Homogenní skupina 5
12	Adéla	385,1	-	-	****	-	-
3	Princess	693,4	****	-	****	****	-
5	Rosara	872,6	****	-	****	****	-
8	Antonia	919,7	****	-	****	****	-
11	Bernina	1108,4	****	****	-	****	****
2	Marabel	1125,7	****	****	-	****	****
1	Anushka	1129,9	****	****	-	****	****
6	Impala	1192,6	****	****	-	****	****
9	Red Anna	1196,8	****	****	-	****	****
7	Carrera	1214,3	****	****	-	****	****
10	Ditta	1214,8	****	****	-	****	****
4	Sunshine	4723,5	-	****	-	-	****

Rozložení α -solaninu v různých pletivech brambor znázorňuje Tabulka 25. Dužnina vykazuje nejnižší koncentraci α -solaninu. Naproti tomu listy vykazují výrazně vyšší hladiny, přičemž nejvyšší koncentraci vykazuje slupka. Tento vzorec poukazuje na strategické rozdělení glykoalkaloidů, které potenciálně odráží úlohu jednotlivých pletiv v obraně rostlin.

Tabulka 25 - Tukeyův HSD test; proměnná α -solanin, pletiva

Číslo	Typ pletiva	Průměr	Homogenní skupina 1	Homogenní skupina 2	Homogenní skupina 3
2	dužnina	59,863	****		
1	list	1044,350		****	
3	slupka	2066,051			****

Kromě toho byly významné i interakční účinky mezi odrůdou a typem pletiva (Tabulka 26), což naznačuje, že vliv odrůdy na obsah α -solaninu se může lišit v závislosti na typu pletiva. Například jedna odrůda může mít vysoký obsah α -solaninu v dužnině, ale ne ve slupce nebo listech, a naopak.

Tabulka 26 - Jednorozměrné testy významnosti pro α -solanin – ANOVA s interakcemi

Efekt	Součet čtverců	Stupně volnosti	F hodnota	p-hodnota
Abs. člen	361820756	1	4203,538	0
Odrůda	28692054	11	30,303	0
Typ pletiva	217363479	2	1262,636	0
Odrůda*Typ pletiva	93112271	22	49,171	0

Tabulka 27 - Tukeyův HSD test; proměnná α -solanin – ANOVA s interakcemi

Č.	Odrůda	Typ pletiva	Průměr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
35	Adéla	dužnina	13,37	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Antonia	dužnina	23,44	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Anuschka	dužnina	27,93	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Marabel	dužnina	28,33	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Rosara	dužnina	29,71	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Princess	dužnina	35,62	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Impala	dužnina	36,97	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Carrera	dužnina	37,77	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Ditta	dužnina	50,44	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	Bernina	dužnina	91,06	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Red Anna	dužnina	117,49	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Sunshine	dužnina	226,25	****	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Princess	list	334,45	****	****	****	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Adéla	list	467,35	****	****	****	****	-	-	-	-	-	-	-
28	Ditta	list	564,54	-	****	****	****	****	-	-	-	-	-	-
36	Adéla	slupka	674,58	-	-	****	****	****	-	-	-	-	-	-
10	Sunshine	list	686,69	-	-	****	****	****	-	-	-	-	-	-
4	Marabel	list	722,47	-	-	****	****	****	-	-	-	-	-	-
33	Bernina	slupka	743,86	-	-	****	****	****	-	-	-	-	-	-
22	Antonia	list	894,33	-	-	-	****	****	-	-	-	-	-	-
13	Rosara	list	911,36	-	-	-	****	****	-	-	-	-	-	-
1	Anuschka	list	1007,29	-	-	-	-	****	-	-	-	-	-	-
25	Red Anna	list	1047,49	-	-	-	-	****	-	-	-	-	-	-
16	Impala	list	1612,02	-	-	-	-	-	****	-	-	-	-	-
15	Rosara	slupka	1676,59	-	-	-	-	-	****	-	-	-	-	-
9	Princess	slupka	1710,14	-	-	-	-	-	****	-	-	-	-	-
19	Carrera	list	1793,88	-	-	-	-	-	****	-	-	-	-	-
21	Carrera	slupka	1811,31	-	-	-	-	-	****	-	-	-	-	-
24	Antonia	slupka	1841,32	-	-	-	-	-	****	****	-	-	-	-
18	Impala	slupka	1928,83	-	-	-	-	-	****	****	****	-	-	-
3	Anuschka	slupka	2354,39	-	-	-	-	-	-	****	****	****	-	-
27	Red Anna	slupka	2425,31	-	-	-	-	-	-	-	****	****	-	-
31	Bernina	list	2490,33	-	-	-	-	-	-	-	-	****	-	-
6	Marabel	slupka	2626,16	-	-	-	-	-	-	-	-	****	****	-
30	Ditta	slupka	3029,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	****	-
12	Sunshine	slupka	3970,69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	****

5.5.3.3 Analýza ANOVA – vliv genů *SGT1* a *SGT2* na obsah α -chaconinu

Při zkoumání genetických determinantů obsahu α -chaconinu v bramborách tento výzkum hodnotil vliv CNV genů *SGT1* a *SGT2*. Cílem analýzy, která je uvedena v Tabulce 28 a 29, bylo odhalit jakoukoli statistickou významnost variability těchto genů, která by mohla souviset s obsahem α -chaconinu.

Tabulka 28 - Jednorozměrné testy významnosti pro α -chaconin – jednofaktorová ANOVA (*SGT1*)

Efekt	Součet čtverců	Stupně volnosti	F hodnota	p-hodnota
Abs. člen	2943462458	1	326,32	0
CNV <i>SGT1</i>	23041	1	0,00	0,96

Tabulka 29 - Jednorozměrné testy významnosti pro α -chaconin – jednofaktorová ANOVA (*SGT2*)

Efekt	Součet čtverců	Stupně volnosti	F hodnota	p-hodnota
Abs. člen	1914874942	1	214	0
CNV <i>SGT2</i>	16747265	1	2	0,172725242

Naše zjištění neodhalila žádnou podstatnou závislost obsahu α -chaconinu na počtu kopií genů *SGT1* a *SGT2* napříč vzorky. V Tabulce 28 byla pomocí jednofaktorové ANOVY pro faktor gen *SGT1* zjištěna p-hodnota nápadně vysoká 0,96, což nenaznačuje žádnou statistickou významnost. Tento trend se opakoval i při analýze faktoru gen *SGT2*, jak je vidět v Tabulce 29, kde p-hodnota 0,172725 podobně naznačovala nedostatek významných rozdílů.

Absence rozdílů byla přičítána nízké variabilitě v počtu CNV těchto genů napříč studovanými odrůdami. Taková uniformita v počtu kopií genů neposkytuje diferenční faktor, který by mohl vysvětlit rozdíly v obsahu α -chaconinu. Je důležité zdůraznit, že gen *SGT3* nebyl do analýzy zahrnut z důvodu jeho naprosté absence variability, což z něj v kontextu této práce fakticky činí konstantu, nikoli proměnnou.

Tyto výsledky zdůrazňují složitost genetických vlivů na obsah sekundárních metabolitů v rostlinách. Absence rozdílů mezi jednotlivými CNV genů *SGT1* a *SGT2* v obsahu α -chaconinu podtrhuje mnohostrannou povahu metabolických drah rostlin. Naznačuje, že v biosyntéze a akumulaci glykoalkaloidů hrají roli i jiné faktory než odchylky v počtu kopií genů.

Tato kapitola zdůrazňuje potřebu širšího zkoumání genetického prostředí, případně začlenění rozmanitějších genetických markerů a zohlednění vlivů prostředí. Ačkoli CNV může být mocným genetickým nástrojem, jeho užitečnost je omezena rozsahem variability přítomné v rámci genů, které jsou předmětem zájmu. Stálost pozorovaná u genu *SGT3* toto tvrzení dále podporuje a naznačuje možný regulační mechanismus, který udržuje jeho stabilitu napříč odrůdami.

Z této analýzy vyplývá, že regulace obsahu glykoalkaloidů je pravděpodobně řízena komplexní genetickou sítí, nikoliv přímým vlivem CNV vybraných genů. Anebo, že zvolený výběr odrůd nebyl dostatečně velký a reprezentativní.

5.5.3.4 Analýza ANOVA – vliv genů *SGT1* a *SGT2* na obsah α -solaninu

Analýza obsahu α -solaninu ve vztahu k CNV genů *SGT1* a *SGT2* využívá k rozlišení statisticky významných účinků metodu jednofaktorové ANOVY. Údaje týkající se těchto účinků jsou podrobně uvedeny v Tabulce 30 a 31.

Jednofaktorová ANOVA pro vliv faktoru CNV genu *SGT1* na obsah α -solaninu je uvedena v Tabulce 30. Analýza ukazuje absolutní člen s významným vlivem, jak naznačuje hodnota F 311,6949 a p-hodnota menší než 0,0001, což potvrzuje celkovou platnost modelu. Specifický vliv faktoru *SGT1* CNV na hladiny α -solaninu byl však zanedbatelný. F-hodnota pro *SGT1* CNV byla pouze 0,0064 s p-hodnotou 0,936232, což naznačuje, že neexistují statisticky významné rozdíly v obsahu α -solaninu mezi různými počty kopií genu *SGT1*.

Tabulka 30 - Jednorozměrné testy významnosti pro α -solanin – jednofaktorová ANOVA (*SGT1*)

Efekt	Součet čtverců	Stupně volnosti	F hodnota	p-hodnota
Abs. Člen	352302572	1	311,6949	0
CNV <i>SGT1</i>	7246	1	0,0064	0,936232

Jednofaktorová ANOVA pro vliv faktoru CNV genu *SGT2* na obsah α -solaninu je shrnuta v Tabulce 31. Podobně i absolutní člen v ANOVA pro gen *SGT2* naznačil významnou shodu modelu s hodnotou F 176,0555 a p-hodnotou blízkou nule. Přesto byl stejně jako u genu *SGT1* vliv CNV genu *SGT2* na obsah α -solaninu minimální a statisticky nevýznamný. Hodnota F pro *SGT2* CNV činila 0,0102 a p-hodnota 0,919731, což opět neukazuje žádný významný vliv na obsah α -solaninu.

Tabulka 31 - Jednorozměrné testy významnosti pro α -solanin – jednofaktorová ANOVA (*SGT2*)

Efekt	Součet čtverců	Stupně volnosti	F hodnota	p-hodnota
Abs. člen	198989781	1	326,32	0
CNV <i>SGT1</i>	11496	1	0,00	0,919731

Tato zjištění přesvědčivě ukazují, že změny v počtu kopií *SGT1* a *SGT2* nemají významný vliv na obsah α -solaninu v pletivech brambor. Zanedbatelné F hodnoty a vysoké p-hodnoty pro oba geny v příslušných analýzách podtrhují nedostatek přímé korelace mezi jejich CNV a obsahem glykoalkaloidů.

Tento výsledek lze přičíst nízké variabilitě napříč hodnotami CNV pro tyto geny mezi studovanými vzorky, což dokazují minimální změny ve statistických výstupech. Byla také zaznamenána absence variability u *SGT3* CNV, což vedlo k jeho úplnému vyloučení z analýzy, což naznačuje, že tyto *SGT* geny mohou být pod přísnou genetickou kontrolou nebo přirozeně stabilní napříč testovanými odrůdami.

Tyto výsledky zdůrazňují složitost biosyntézy glykoalkaloidů v bramborách a naznačují, že zatímco počet kopií genů může ovlivňovat určité znaky, regulace obsahu glykoalkaloidů, konkrétně α -solaninu, pravděpodobně zahrnuje širší spektrum genetických a environmentálních interakcí.

6 Diskuze

V naší studii jsme zkoumali meziodrůdovou variabilitu steroidních glykoalkaloidů (SGA) u 12 odrůd brambor, přičemž jsme analyzovali koncentrace α -solaninu a α -chaconinu v kontrolovaných skleníkových podmínkách. Cílem tohoto výzkumu bylo především prozkoumat souvislost mezi koncentrací SGA a variabilitou počtu kopií (CNV) rodiny genů *SGT*, která se podílí na metabolické dráze těchto glykoalkaloidů. Zaměřením na tyto genetické a biochemické aspekty jsme se snažili pochopit genetický základ koncentrace SGA u různých odrůd brambor v různých druzích pletiv.

Abychom zajistili spolehlivost našich zjištění, pečlivě jsme kontrolovali podmínky prostředí, jako je složení půdy, dostupnost živin a míra zavlažování. Tento přístup byl navržen tak, aby minimalizoval vnější vlivy a zvýšil opakovatelnost výsledků. Rozmístění rostlin ve skleníku bylo náhodné, aby se zabránilo zkreslení na základě místa, které by mohlo ovlivnit reprezentativnost výsledků. Toto uspořádání nám umožnilo přesněji určit vliv genetických faktorů, konkrétně CNV rodiny genů *SGT*, na metabolickou syntézu a koncentraci SGA ve vybraných odrůdách brambor.

Nicméně faktory prostředí ve skleníku, jako je vystavení světlu (Wolf & Duggar 1940), pohyb vzduchu a teplota regulovaná klimatizací (Zheng et al. 2019), mohly různě ovlivnit biologické replikáty. Důsledek je vidět v Příloze 16, Příloze 17 a Příloze 18, kde každý biologický replikát stejné odrůdy měl u některých odrůd různé koncentrace glykoalkaloidů v daném pletivu. Je známo, že tyto faktory významně ovlivňují fyziologii rostlin, včetně obsahu SGA. Předchozí studie naznačily (Wolf & Duggar 1940; Zheng et al. 2019), že tyto podmínky mohou měnit metabolické profily rostlin, což může vést k rozdílům v koncentracích sekundárních metabolitů v různých částech téže rostliny nebo rostlinných klonů, kterými biologické replikáty brambor jsou.

Dále byl zkoumán vliv velikosti hlíz na koncentraci SGA, přičemž se vycházelo z historických údajů autorů Wolf & Duggar (1940), kteří naznačili, že menší hlízy mají tendenci koncentrovat SGA více než větší, pravděpodobně v důsledku efektu ředění s rostoucí hmotností hlíz. Koncentrace glykoalkaloidů obvykle dosahuje vrcholu v raných fázích vývoje hlíz a postupně klesá, jak hlízy dozrávají. Různá ranost brambor mohla také ovlivnit velikost hlíz, jelikož všechny odrůdy byly sklizeny ve stejném termínu.

Rozdílné odrůdy mohou pak také mít ve skleníkových podmínkách hlízy jinak různé velikosti, než když jsou pěstovány na poli (Dimenstein et al. 1997; Ozkaynak 2021). Tento aspekt byl klíčový pro pochopení rozdílů v našich experimentálních výsledcích, kdy rozdíly ve velikosti hlíz mohly vést k pozorované variabilitě v obsahu SGA v rámci biologických replikátů jedné odrůdy.

Výsledky Tukeyho HSD testů zdůraznily významné rozdíly v obsahu α -solaninu a α -chaconinu mezi odrůdami a mezi různými typy pletiv (listy, dužnina a slupka). Například vysoké koncentrace SGA v listech a slupkách odrůd jako například Sunshine mohou naznačovat potenciál pro šlechtění zaměřené na zvýšenou přirozenou odolnost vůči škůdcům.

Tato odolnost je zásadní, protože snižuje závislost na chemických pesticidech a nabízí udržitelnější přístup k zemědělství. Vysoký obsah glykoalkaloidů působí jako přirozený

odstrašující prostředek proti různým škůdcům a chorobám, čímž zvyšuje schopnost rostliny chránit se. Tento přirozený obranný mechanismus může být zvláště výhodný v ekologickém zemědělství, kde jsou omezeny chemické vstupy (Birch et al. 2002).

Obsah glykoalkaloidů v bramborách jako potravině zmiňuje vyhláška Ministerstva zdravotnictví ČR č. 305/2004, která stanovuje maximální obsah glykoalkaloidů v konzumních bramborách na 200 mg/kg čerstvých hlíz i se slupkou. Všechny pěstované odrůdy by měly tuto normu splňovat. Odrůdy z našeho pokusu s nižšími koncentracemi SGA v dužnině byly Adéla a Antonia (průměrný obsah byl 45 mg/g a 51 mg/g – celkový obsah α -chaconinu a α -solaninu v dužnině/hmotnost sušiny). Odrůdy s vyšším obsahem glykoalkaloidů ve slupce byly Marabel a Sunshine (průměrný obsah byl 10 190 mg/g a 14 119 mg/g – celkový obsah α -chaconinu a α -solaninu ve slupce/hmotnost sušiny), u kterých by bylo vhodné je před kulinářským zpracováním oloupat.

Toto zkoumání genetických a environmentálních faktorů spolu s kontrolovaným experimentálním designem nabízí pohled na složitost koncentrace SGA v bramborách, která je ovlivněna nejen genetickou výbavou odrůdy, ale také významně podmínkami prostředí a vývojovými stádii hlíz.

Metabolická dráha steroidních glykoalkaloidů (SGA), jako jsou α -solanin a α -chaconin, je složitý a přísně regulovaný systém. Obsah glykoalkaloidů v bramborách je ovlivněn nejen variací počtu kopií (CNV) specifických biosyntetických genů, ale také úrovní jejich exprese, regulačními mechanismy a interakcemi s dalšími geny v rámci této dráhy (Mariot et al. 2016; Mali et al. 2023).

V této práci jsme se zaměřili na rodinu genů *SGT* - zejména *SGT1* a *SGT2*, které jsou známé svou rolí v závěrečných fázích biosyntézy glykoalkaloidů, konkrétně v glykosylačních procesech, při nichž vznikají konečné sekundární metabolity. Tyto geny byly vybrány proto, že modifikace v koncových fázích dráhy mají pravděpodobně přímý vliv na obsah glykoalkaloidů v hlízách, což potenciálně nabízí strategický cíl pro genetickou regulaci a šlechtění (Mariot et al. 2016).

Regulace biosyntézy SGA však přesahuje pouhou přítomnost genů či jejich kopií, ale zahrnuje i post-transkripční a post-translační modifikace, nebo různé systémy regulace exprese. Například přítomnost cis-prvků v promotorových oblastech těchto genů naznačuje schopnost reagovat na různé biotické a abiotické stresy, což může vést ke kolísání hladin glykoalkaloidů (Mariot et al. 2016). To podtrhuje složitost metabolické kontroly, kdy faktory prostředí mohou vyvolat změny v genové expresi, což dále ovlivňuje obsah SGA.

Interakce genů rodiny *SGT* s dalšími geny v dráze navíc zdůrazňuje integrovanou povahu metabolických drah. Úrovně exprese těchto genů nepůsobí izolovaně, ale jsou součástí koordinované reakce, která zahrnuje více kroků dráhy biosyntézy glykoalkaloidů. Tato komplexnost je důvodem, proč jednoduché korelace mezi CNV a obsahem SGA nemusí plně vysvětlit rozdíly pozorované u různých odrůd brambor (Mali et al. 2023).

Ačkoli jsou *SGT* geny klíčové pro závěrečné kroky biosyntézy glykoalkaloidů, pochopení jejich vlivu na koncentraci SGA vyžaduje holistický přístup, který zohledňuje regulaci genové exprese, vliv faktorů prostředí a širší genetickou síť, v níž tyto geny působí. Toto komplexní pochopení je nezbytné pro vývoj odrůd brambor s optimalizovaným obsahem glykoalkaloidů pro bezpečnost spotřebitelů i obranu rostlin.

Pro začlenění analýzy CNV *SGT* genů a jejich vlivu na obsah α -chaconinu a α -solaninu v bramborách je třeba se zaměřit na statistické údaje poskytnuté výsledky ANOVY, které nenaznačily žádnou významnou korelaci v důsledku nízké variability CNV mezi testovanými odrůdami brambor. To naznačuje, že ačkoli se předpokládalo, že CNV rodiny genů *SGT* významně ovlivňuje obsah glykoalkaloidů v pletivech rostlin *Solanum tuberosum*, skutečná variabilita v rámci konkrétních kopií genů mezi zkoumanými odrůdami byla příliš rovnoměrná na to, aby takový vliv prokázala.

Zjištění ANOVA zdůrazňují složitost genetické regulace v biosyntéze glykoalkaloidů a podtrhují, že v řízení metabolismu mohou hrát zásadní roli i jiné výše zmíněné faktory než pouhé rozdíly v počtu kopií genů.

Vzhledem k širšímu kontextu genetiky brambor a výzkumu sekundárních metabolitů, jak je uvedeno ve studii Hardigan et al. (2016), je zřejmé, že zatímco CNV mohou zásadně ovlivnit fenotypy rostlin změnou dávkování genů, jejich vliv na specifické znaky, jako je obsah glykoalkaloidů, je podmíněn přítomností variabilních CNV, které ovlivňují klíčové biosyntetické dráhy. Studie Hardigana zdůrazňuje, že CNV nejsou jen rozšířené, ale mohou být spojeny s adaptivními znaky rostlin. To posiluje představu, že v případech, kdy existuje významná variabilita CNV, tak by skutečně počet kopií mohl ovlivňovat komplexní znaky, jako je obsah glykoalkaloidů.

Souhrnně lze říci, že nedostatek významných zjištění z analýzy ANOVA CNV genů *SGT* ve vztahu k obsahu α -chaconinu a α -solaninu lze přičíst nízké variabilitě CNV ve zkoumaných genech. To poukazuje na potřebu širšího výzkumu, který by zohlednil širší škálu genetických prvků, jako jsou jiné geny a faktory regulace jejich exprese a podmínky prostředí, které by mohly ovlivňovat biosyntézu SGA. Takové studie by mohly poskytnout komplexnější pochopení vzájemného působení mezi genetickou výbavou a fenotypovými projevy u brambor, zejména pokud jde o produkci sekundárních metabolitů.

Pokud jde o budoucí směry výzkumu a důsledky pro šlechtění, nedávné pokroky, jako například ty, které popsali (Zheng et al. 2021) s využitím technologie CRISPR/Cas9, nabízejí různé možnosti. V jejich studii byla metoda CRISPR/Cas9 využita k editaci genů, v genomu bramboru, zapojených do biosyntézy SGA, zejména k zacílení na gen *StSSR2* (sterol side chain reductase 2). Tato úprava vedla k výraznému snížení hladin SGA, což zvýšilo bezpečnost a kvalitu brambor snížením jejich potenciální toxicity.

Na základě těchto výsledků by další výzkum mohl zkoumat komplexní využití CRISPR/Cas9 k modifikaci dalších genů v dráze biosyntézy SGA. Takové genetické modifikace by mohly být navrženy tak, aby optimalizovaly hladiny glykoalkaloidů pro splnění bezpečnostních norem a zároveň zachovaly nebo dokonce zvýšily přirozenou odolnost vůči škůdcům. Tento přístup by se dobře aplikoval ve srovnání s tradičními šlechtitelskými technikami (které jsou limitované složitou genetickou stavbou brambor, které jsou polyploidní a vysoce heterozygotní) a nabízel by metodu zavádění prospěšných vlastností bez rozsáhlého zpětného křížení, které je často vyžadováno při konvenčním šlechtění (Mali et al. 2023).

Použití CRISPR/Cas9 pro multiplexní editaci genů by navíc mohlo umožnit současné cílení na geny více drah. Zkoumání funkce a interakce genů v rámci těchto drah prostřednictvím vyřazení nebo nahrazení genů by také mohlo objasnit mechanismy metabolismu a reakce rostlin

na stres. Takové studie by měly zásadní význam pro vývoj strategií řízení hladin SGA prostřednictvím moderních postupů.

Složitost genetiky brambor vzhledem k jejich tetraploidnímu založení naznačuje potřebu dalšího zdokonalení aplikací CRISPR/Cas9, aby se zvýšila účinnost cílené editace a omezily se potenciální vedlejší účinky.

7 Závěr

V rámci této práce jsme zkoumali meziodrůdovou variabilitu steroidních glykoalkaloidů (SGA) u dvanácti odrůd brambor se zaměřením na koncentrace α -solaninu a α -chaconinu. Primárním cílem bylo prozkoumat vztah mezi koncentracemi těchto glykoalkaloidů a variabilitou počtu kopií (CNV) rodiny genů *SGT*, která hraje klíčovou roli v metabolické dráze těchto sloučenin. Tento výzkum byl veden hypotézou, že odchylky v CNV rodiny genů *SGT* významně ovlivní koncentrace SGA v hlízách brambor.

Výsledky tohoto experimentu poskytly cenné poznatky o genetických a environmentálních faktorech ovlivňujících koncentrace SGA. Ačkoli řízené podmínky a náhodné rozmístění rostlin ve skleníku minimalizovaly vlivy vnějšího prostředí, ukázalo se, že nelze zabránit všem faktorům, jako je například délka světelné expozice, pohyb vzduchu a teplota, které mají vliv na koncentraci glykoalkaloidů v rostlinách *Solanum tuberosum*. Tato zjištění potvrzují složitost biosyntézy SGA, kterou ovlivňují nejen genetické faktory, ale také podmínky prostředí.

Oproti naší původní hypotéze statistická analýza odhalila, že CNV genů *SGT1* a *SGT2* nemá významný vliv na koncentrace α -solaninu a α -chaconinu. Tento výsledek naznačuje, že v biosyntéze a akumulaci SGA v bramborách mohou hrát dominantnější roli jiné genetické faktory nebo faktory prostředí. K těmto výsledkům mohla přispět nízká variabilita CNV mezi testovanými odrůdami, což naznačuje potřebu širší genetické základny (vyšší počet odrůd), a kontrolovanějších podmínek prostředí v budoucích studiích.

Z praktického hlediska tento výzkum poukazuje na potenciál pro šlechtění odrůd brambor s optimalizovaným obsahem SGA, které vyvažují potřebu odolnosti vůči škůdcům a bezpečnosti potravin. Získané poznatky o genetické regulaci SGA mohou být vodítkem pro šlechtitelské programy zaměřené na vývoj odrůd, které splňují regulační normy bezpečnosti glykoalkaloidů a zároveň zvyšují přirozenou odolnost vůči škůdcům.

Výsledky této práce rovněž naznačují směry budoucího výzkumu. Další výzkumy by mohly zahrnovat širší škálu odrůd brambor a rozšířené genetické markery, aby bylo možné lépe porozumět interakcím mezi CNV specifických genů metabolické dráhy biosyntézy steroidních glykoalkaloidů a jejich koncentrací. Kromě toho by se mohlo prozkoumat použití nových technologií, jako je CRISPR/Cas9, k přímé manipulaci s geny zapojenými do metabolismu SGA, což by mohlo vést k průlomu ve vývoji odrůd brambor s žádanými vlastnostmi.

Závěrem lze říci, že ačkoli tato studie nepotvrdila původní hypotézu týkající se vlivu CNV genů *SGT* na koncentrace SGA, významně přispěla k našemu pochopení složitých interakcí, které regulují hladiny glykoalkaloidů v bramborách. Výsledky doporučují komplexnější přístup ke studiu biochemie brambor, který by kombinoval genetické, environmentální a technologické hledisko s cílem zvýšit bezpečnost i zemědělskou životaschopnost odrůd brambor.

8 Literatura

- Akiyama R, Watanabe B, Nakayasu M, Lee HJ, Kato J, Umemoto N, Muranaka T, Saito K, Sugimoto Y, Mizutani M. 2021. The biosynthetic pathway of potato solanidanes diverged from that of spirosolanes due to evolution of a dioxygenase. *Nature Communications* **12**:1300. Nature Publishing Group.
- Allard RW. 1999. History of Plant Population Genetics. *Annual Review of Genetics* **33**:1–27.
- Barceloux DG. 2009. Potatoes, Tomatoes, and Solanine Toxicity (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L.). *Disease-a-Month* **55**:391–402.
- Baur S, Frank O, Hausladen H, Hückelhoven R, Hofmann T, Eisenreich W, Dawid C. 2021. Biosynthesis of α -solanine and α -chaconine in potato leaves (*Solanum tuberosum* L.) – A ¹³CO₂ study. *Food Chemistry* **365**:130461.
- Beló A, Beatty MK, Hondred D, Fengler KA, Li B, Rafalski A. 2010. Allelic genome structural variations in maize detected by array comparative genome hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* **120**:355–367.
- Bennett MD, Smith JB. 1976. Nuclear dna amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **274**:227–274.
- Bianchini GM, Stermer BA, Paiva NL. 1996. Induction of early mevalonate pathway enzymes and biosynthesis of end products in potato (*Solanum tuberosum*) tubers by wounding and elicitation. *Phytochemistry* **42**:1563–1571.
- Bio-Rad. 2019. QX200 Droplet Reader and QuantaSoft Software - Instruction manual. Bio-Rad. Available from <https://bio-rad.com/ddPCRsmxEvaG>.
- Bio-Rad. 2023. QX200TM Droplet Generator Instruction Manual. Available from <https://bio-rad.com/ddPCRsmxEvaG>.
- Birch AE, Geoghegan IE, Griffiths DW, McNICOL JW. 2002. The effect of genetic transformations for pest resistance on foliar solanidine-based glycoalkaloids of potato (*Solanum tuberosum*). *Annals of Applied Biology* **140**:143–149.
- Bohra A, Tiwari A, Kaur P, Ganie SA, Raza A, Roorkiwal M, Mir RR, Fernie AR, Smýkal P, Varshney RK. 2022. The Key to the Future Lies in the Past: Insights from Grain Legume Domestication and Improvement Should Inform Future Breeding Strategies. *Plant and Cell Physiology* **63**:1554–1572.
- Boutsika A, Tanou G, Xanthopoulou A, Samiotaki M, Nianiou-Obeidat I, Ganopoulos I, Mellidou I. 2022. Insights and advances in integrating multi-omic approaches for potato crop improvement. *Scientia Horticulturae* **305**:111387.
- Bradshaw JE. 2022. A Brief History of the Impact of Potato Genetics on the Breeding of Tetraploid Potato Cultivars for Tuber Propagation. *Potato Research* **65**:461–501.
- Bradshaw JE, Bonierbale M. 2010. Potatoes. Pages 1–52 in Bradshaw JE, editor. *Root and Tuber Crops*. Springer, New York, NY. Available from https://doi.org/10.1007/978-0-387-92765-7_1.
- Cárdenas PD, Sonawane PD, Heinig U, Bocobza SE, Burdman S, Aharoni A. 2015. The bitter side of the nightshades: Genomics drives discovery in *Solanaceae* steroidal alkaloid metabolism. *Phytochemistry* **113**:24–32.

- Carputo D, Cardi T, Chiari T, Ferraiolo G, Frusciante L. 1995. Tissue culture response in various wild and cultivated *Solanum* germplasm accessions for exploitation in potato breeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **41**:151–158.
- Carvalho CMB, Pehlivan D, Ramocki MB, Fang P, Alleva B, Franco LM, Belmont JW, Hastings PJ, Lupski JR. 2013. Replicative mechanisms for CNV formation are error prone. *Nature Genetics* **45**:1319–1326. Nature Publishing Group.
- Cassinari K et al. 2019. A Simple, Universal, and Cost-Efficient Digital PCR Method for the Targeted Analysis of Copy Number Variations. *Clinical Chemistry* **65**:1153–1160.
- Central Limit Theorem. 2008. Pages 66–68 *The Concise Encyclopedia of Statistics*. Springer, New York, NY. Available from https://doi.org/10.1007/978-0-387-32833-1_50 (accessed April 19, 2024).
- Čermák V. 2007. Přehled odrůd 2007 - Brambor. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno.
- Čermák V. 2023. Seznam doporučených odrůd bramboru. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno.
- Child A. 1990. A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (G. D ON) (D' A RCY) (*Tuberarium* (D UN .) B ITTER (s. 1.)). *Feddes Repertorium* **101**:209–235.
- Choi D, Bostock RM, Avdiushko S, Hildebrand DF. 1994. Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:2329–2333.
- Crews C. 2014. Natural Toxicants: Alkaloids. Pages 251–260 in Motarjemi Y, editor. *Encyclopedia of Food Safety*. Academic Press, Waltham. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012378612800175X>.
- DeBolt S. 2010. Copy Number Variation Shapes Genome Diversity in Arabidopsis Over Immediate Family Generational Scales. *Genome Biology and Evolution* **2**:441–453.
- Dimenstein L, Lisker N, Kedar N, Levy D. 1997. Changes in the content of steroidal glycoalkaloids in potato tubers grown in the field and in the greenhouse under different conditions of light, temperature and daylength. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**:391–402.
- Diviš J, Jůza J, Moudrý J, Vondrys J, Bárta J, Štěřba Z. 2010. Pěstování rostlin. JČU, České Budějovice. Available from <http://rv.zf.jcu.cz/wp-content/uploads/2019/11/Pestovani-rostlin-ZF-JU-ucebni-texty.pdf>.
- Edi CV et al. 2014. CYP6 P450 Enzymes and ACE-1 Duplication Produce Extreme and Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *PLOS Genetics* **10**:e1004236. Public Library of Science.
- Edwards EJ, Cobb AH. 1996. Improved High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Potato (*Solanum tuberosum*) Glycoalkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**:2705–2709. American Chemical Society.
- Ensembl. 2024. Ensembl genome browser 111. Available from <https://www.ensembl.org/index.html> (accessed April 17, 2024).

- Europlant. 2024. Quality seed potatoes - EUROPLANT Pflanzenzucht GmbH. Available from <https://www.europlant.biz/en/home/> (accessed April 17, 2024).
- Europotato. 2024. The European Cultivated Potato - Home. Available from <https://www.europotato.org/> (accessed April 17, 2024).
- Farslow JC, Lipinski KJ, Packard LB, Edgley ML, Taylor J, Flibotte S, Moerman DG, Katju V, Bergthorsson U. 2015. Rapid Increase in frequency of gene copy-number variants during experimental evolution in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* **16**:1044.
- Fontanesi L, Beretti F, Riggio V, Gómez González E, Dall'Olio S, Davoli R, Russo V, Portolano B. 2009. Copy Number Variation and Missense Mutations of the Agouti Signaling Protein (ASIP) Gene in Goat Breeds with Different Coat Colors. *Cytogenetic and Genome Research* **126**:333–347.
- Friedman M, McDonald GM, Filadelfi-Keszi M. 1997. Potato Glycoalkaloids: Chemistry, Analysis, Safety, and Plant Physiology. *Critical Reviews in Plant Sciences* **16**:55–132. Taylor & Francis.
- Giri P, Mohapatra B. 2017. Copy Number Variant (CNV). Pages 1–4 in Vonk J, Shackelford T, editors. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer International Publishing, Cham. Available from https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_8-1.
- GrinCzech. 2024. Search Accessions GRIN-Global. Available from <https://grinczech.vurv.cz/gringlobal/search.aspx> (accessed April 17, 2024).
- GRIN-Global. 2024. GRIN-Global. Available from <https://www.grin-global.org/> (accessed April 17, 2024).
- Hamouz K. 1993. *Cvičení z rostlinné výroby*. H & H, Praha.
- Hardigan MA et al. 2016. Genome Reduction Uncovers a Large Dispensable Genome and Adaptive Role for Copy Number Variation in Asexually Propagated *Solanum tuberosum*. *The Plant Cell* **28**:388–405.
- Harris PM, editor. 1992. *The Potato Crop: The scientific basis for improvement*. Springer Netherlands, Dordrecht. Available from <http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-2340-2>.
- Hawkes JG. 1978. History of the potato. Pages 1–14 in Harris PM, editor. *The Potato Crop: The scientific basis for improvement*. Springer US, Boston, MA. Available from https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7210-1_1.
- Hirsch CN et al. 2013. Retrospective view of North American potato (*Solanum tuberosum* L.) breeding in the 20th and 21st centuries. *G3 (Bethesda, Md.)* **3**:1003–1013.
- Horáčková V, Domkářová J. 1998. *Metody konzervace genofondu rostlin a možnosti jejich využití v ČR*.
- Jansky SH, Dawson J, Spooner DM. 2015. How do we address the disconnect between genetic and morphological diversity in germplasm collections? *American Journal of Botany* **102**:1213–1215.
- Kandoth PK, Ithal N, Recknor J, Maier T, Nettleton D, Baum TJ, Mitchum MG. 2011. The Soybean *Rhg1* Locus for Resistance to the Soybean Cyst Nematode *Heterodera glycines* Regulates the Expression of a Large Number of Stress- and Defense-Related Genes in Degenerating Feeding Cells. *Plant Physiology* **155**:1960–1975.
- K.F. McCue, P.V. Allen, L.V.T. Shepherd, A. Blake, D.R. Rockhold, R.G. Novy, D. Stewart, H.V. Davies, W.R. Belknap. 2007. MANIPULATION AND COMPENSATION OF

STEROIDAL GLYCOALKALOID BIOSYNTHESIS IN POTATOES. *Acta Horticulturae*:343–350.

- Kirui GK, Misra AK, Olanya OM, Friedman M, El-Bedewy R, Ewell PT. 2009. Glycoalkaloid content of some superior potato (*Solanum tuberosum* L) clones and commercial cultivars. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **42**:453–463. Taylor & Francis.
- Knapp K. 2012. *The Solanaceae as Food: A Natural History of the Potato Family*. Natural History Museum, Londýn.
- Korth KL, Stermer BA, Bhattacharyya MK, Dixon RA. 1997. HMG-CoA reductase gene families that differentially accumulate transcripts in potato tubers are developmentally expressed in floral tissues. *Plant Molecular Biology* **33**:545–551.
- Krits P, Fogelman E, Ginzberg I. 2007. Potato steroidal glycoalkaloid levels and the expression of key isoprenoid metabolic genes. *Planta* **227**:143–150.
- Larson G et al. 2014. Current perspectives and the future of domestication studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**:6139–6146. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Lawson DR, Erb WAlan, Miller ARaymond. 1992. Analysis of *Solanum* alkaloids using internal standardization and capillary gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**:2186–2191. American Chemical Society.
- Lin Z et al. 2012. Parallel domestication of the *Shattering1* genes in cereals. *Nature Genetics* **44**:720–724. Nature Publishing Group.
- Lye ZN, Purugganan MD. 2019. Copy Number Variation in Domestication. *Trends in Plant Science* **24**:352–365. Elsevier.
- Ma J, Bennetzen JL. 2004. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**:12404–12410. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Machida-Hirano R. 2015. Diversity of potato genetic resources. Available from https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsbbs/65/1/65_26/_article.
- Maga JA, Fitzpatrick TJ. 1980. Potato glycoalkaloids. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **12**:371–405. Taylor & Francis.
- Mali S, Dutta M, Zinta G. 2023. Genome editing advancements in potato (*Solanum tuberosum* L.): operational challenges and solutions. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **32**:730–742.
- Marie D, Brown SC. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell* **78**:41–51.
- Mariot RF, de Oliveira LA, Voorhuijzen MM, Staats M, Hutten RCB, van Dijk JP, Kok EJ, Frazzon J. 2016. Characterization and Transcriptional Profile of Genes Involved in Glycoalkaloid Biosynthesis in New Varieties of *Solanum tuberosum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**:988–996. American Chemical Society.
- Mayo P, Hartshorne T, Li K, McMunn-Gibson C, Spencer K, Schnetz-Boutaud N. 2010. CNV Analysis Using TaqMan Copy Number Assays. *Current Protocols in Human Genetics* **67**:2.13.1-2.13.10.
- Mazaika E, Homsy J. 2014. Digital Droplet PCR: CNV Analysis and Other Applications. *Current Protocols in Human Genetics* **82**:7.24.1-7.24.13.

- McCarroll SA, Altshuler DM. 2007. Copy-number variation and association studies of human disease. *Nature Genetics* **39**:S37–S42. Nature Publishing Group.
- Meyer RS, Purugganan MD. 2013. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature Reviews Genetics* **14**:840–852. Nature Publishing Group.
- Minx L, Diviš J. 1994. *Rostlinná výroba - III. VŠZ, Praha.*
- Nahar N. 2011. Regulation of sterol and glycoalkaloid biosynthesis in potato (*Solanum tuberosum* L.): identification of key genes and enzymatic steps. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*. Available from <https://res.slu.se/id/publ/33263>.
- Norris BJ, Whan VA. 2008. A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. *Genome Research* **18**:1282–1293.
- Ozkaynak E. 2021. TUBER SIZE EFFECTS ON YIELD AND NUMBER OF POTATO MINITUBERS OF COMMERCIAL VARIETIES IN A GREENHOUSE PRODUCTION SYSTEM. *Turkish Journal Of Field Crops* **26**:123–128. Society of Fields Crop Science.
- Palacios R, Gonzaga-Jauregui C, Flores M, Palacios-Flores K. 2022. Copy Number Variation. Page Reference Module in Life Sciences. Elsevier. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128225639000494>.
- Pazdera J, Štolcová M, Dolejší J, Sus J, Hakl J, Kocourková D. 2005. *Cvičení ze speciální fytotechniky. ČZU, Praha.*
- Pelikán M, Sáková L. 2001. *Jakost a zpracování rostlinných produktů. Jihočeská univerzita.*
- Peterson LR, George Barker W, Howarth MJ. 1985. CHAPTER 4 - Development and Structure of Tubers. Pages 123–152 in Li PH, editor. *Potato Physiology*. Academic Press. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124476608500090>.
- Phillips BJ, Hughes JA, Phillips JC, Walters DG, Anderson D, Tahourdin CSM. 1996. A study of the toxic hazard that might be associated with the consumption of green potato tops. *Food and Chemical Toxicology* **34**:439–448.
- Potato Pedigree Database. 2024. Potato Pedigree Database. Available from <https://www.plantbreeding.wur.nl/PotatoPedigree/index.html> (accessed April 17, 2024).
- Purugganan MD, Fuller DQ. 2009. The nature of selection during plant domestication. *Nature* **457**:843–848. Nature Publishing Group.
- Qiagen. 2020. DNeasy® Plant Handbook. Available from <https://qiagen.com/HB-1166>.
- Reiter T, Jagoda E, Capellini TD. 2016. Dietary Variation and Evolution of Gene Copy Number among Dog Breeds. *PLOS ONE* **11**:e0148899. Public Library of Science.
- Rowe PR. 1967. Performance and variability of diploid and tetraploid potato families. *American Potato Journal* **44**:263–271.
- Sato F. 2020. 2.26 - Plant Alkaloid Engineering. Pages 700–755 in Liu H-W (Ben), Begley TP, editors. *Comprehensive Natural Products III*. Elsevier, Oxford. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095472146967>.
- Shi M, Huang Q, Wang Y, Wang C, Zhu R, Zhang S, Kai G. 2022. Genome-wide survey of the GATA gene family in camptothecin-producing plant *Ophiorrhiza pumila*. *BMC Genomics* **23**:256.

- Shull GH. 1946. Hybrid Seed Corn. *Science* **103**:547–550. American Association for the Advancement of Science.
- Sood S, Bhardwaj V, Mangal V, Kumar A, Singh B, Dipta B, Kaundal B, Kumar V, Singh B. 2024. Genome-wide association mapping to identify genetic loci governing agronomic traits and genomic prediction prospects in tetraploid potatoes. *Scientia Horticulturae* **328**:112900.
- Spooner DM, Núñez J, Trujillo G, del Rosario Herrera M, Guzmán F, Ghislain M. 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:19398–19403. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Springer NM et al. 2009. Maize Inbreds Exhibit High Levels of Copy Number Variation (CNV) and Presence/Absence Variation (PAV) in Genome Content. *PLOS Genetics* **5**:e1000734. Public Library of Science.
- Swanson-Wagner RA, Eichten SR, Kumari S, Tiffin P, Stein JC, Ware D, Springer NM. 2010. Pervasive gene content variation and copy number variation in maize and its undomesticated progenitor. *Genome Research* **20**:1689–1699.
- Tai HH, Vickruck J. 2022. Chapter 14 - Potato resistance against insect herbivores. Pages 277–296 in Alyokhin A, Rondon SI, Gao Y, editors. *Insect Pests of Potato (Second Edition)*. Academic Press. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128212370000147>.
- Tao Y et al. 2021. Extensive variation within the pan-genome of cultivated and wild sorghum. *Nature Plants* **7**:766–773. Nature Publishing Group.
- Tingey WM. 1984. Glycoalkaloids as pest resistance factors. *American Potato Journal* **61**:157–167.
- Villano C, D'Amelia V, Esposito S, Adelfi MG, Contaldi F, Ferracane R, Vitaglione P, Aversano R, Carputo D. 2020. Genome-Wide HMG Family Investigation and Its Role in Glycoalkaloid Accumulation in Wild Tuber-Bearing *Solanum commersonii*. *Life* **10**:37. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Vitti JJ, Grossman SR, Sabeti PC. 2013. Detecting Natural Selection in Genomic Data. *Annual Review of Genetics* **47**:97–120. Annual Reviews.
- VÚBHB. 2024. VÚB HB - výzkum, ochrana a pěstování brambor. Available from <https://www.vubhb.cz/cs> (accessed April 17, 2024).
- Wolf MJ, Duggar BM. 1940. Solanine in the potato and the effects of some factors on its synthesis and distribution. *Amer. J. Bot* **27**:20.
- Wolf MJ, Duggar BM. 1946. Estimation and physiological role of solanine in the potato. *Journal of Agricultural Research* **73**:1–32.
- Yu S et al. 2023. Resequencing of a Pekin duck breeding population provides insights into the genomic response to short-term artificial selection. *GigaScience* **12**:giad016.
- Zhang H, Xu F, Wu Y, Hu H, Dai X. 2017. Progress of potato staple food research and industry development in China. *Journal of Integrative Agriculture* **16**:2924–2932.
- Zhao D-K, Zhao Y, Chen S-Y, Kennelly EJ. 2021. *Solanum* steroidal glycoalkaloids: structural diversity, biological activities, and biosynthesis. *Natural Product Reports* **38**:1423–1444. The Royal Society of Chemistry.

- Zheng X, Liu J, Sun Y, Wang S, Zhao L, Li MinMin, Lu J, Huang Y, Fan B. 2019. Main environmental factors of solanum during storage for different potato varieties. *Journal of Food Safety and Quality* **10**:2481–2493.
- Zheng Z, Ye G, Zhou Y, Pu X, Su W, Wang J. 2021. Editing sterol side chain reductase 2 gene (StSSR2) via CRISPR/Cas9 reduces the total steroidal glycoalkaloids in potato. *All Life* **14**:401–413. Taylor & Francis.
- Żmieńko A, Samelak A, Kozłowski P, Figlerowicz M. 2014. Copy number polymorphism in plant genomes. *Theoretical and Applied Genetics* **127**:1–18.
- Zrůst J. 2004. Glykoalkaloidy u brambor a ostatních komodit. VÚBHB, Praha. Available from <http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-19-03.pdf>.

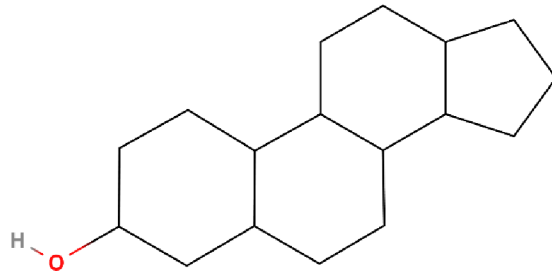
Literatura byla generována pomocí volně dostupného citačního manažeru Zotero - <https://www.zotero.org/>

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

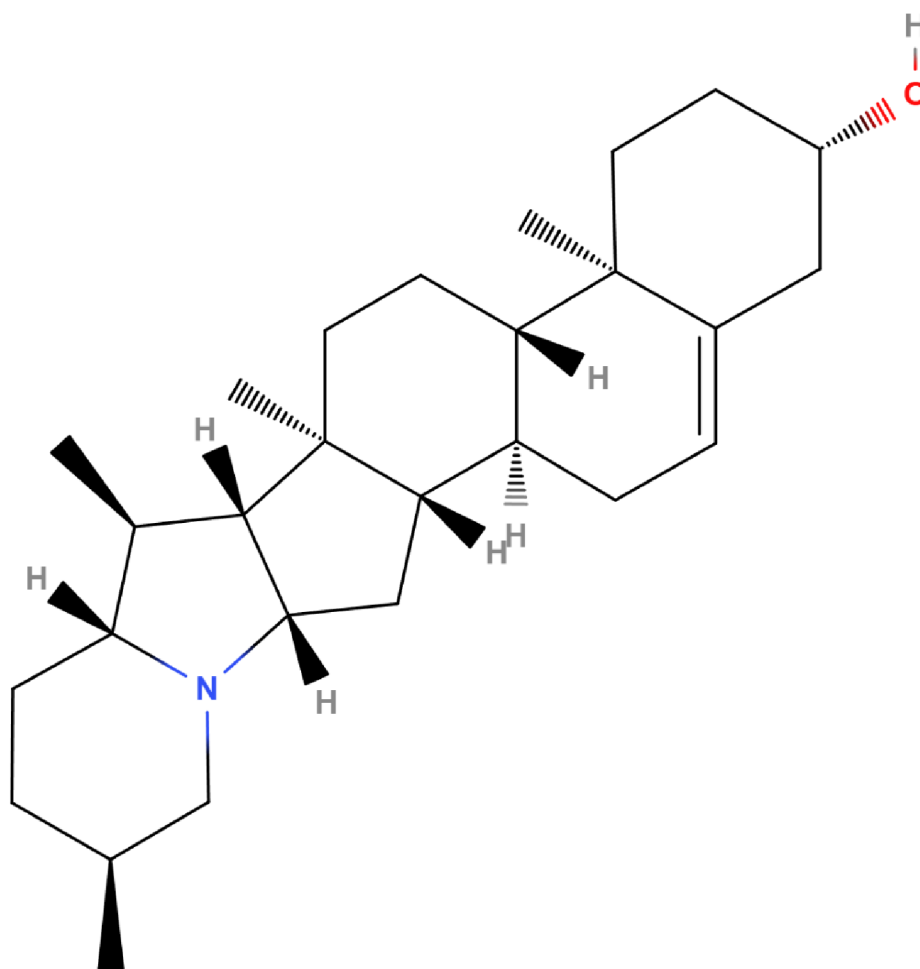
- Acetyl-CoA – acetylkoenzym A
CNV – copy number variation
Ct – cyklus prahu (cycle threshold)
ČR – Česká republika
ddPCR – digitální kapková PCR (digital droplet PCR)
df – stupně volnosti (degrees of freedom)
DMAPP – dimethylallylpyrofosfát
DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DW – hmotnost sušiny (dry weight)
ESI – elektrosprejová ionizace (electrospray ionization)
EvaGreen – barvivo využívané v ddPCR (Bio-Rad)
FoSTeS – zpoždění replikační vidlice a přepínání templátu (fork stalling and template switching)
FPP – farsenylpyrofosfát
GC – "obsah GC" v sekvencích DNA (procento guaninových a cytosinových bází)
GC – plynová chromatografie (gas chromatography)
HMG-CoA – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
HMGR - 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktáza
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid ch.)
IPP – isopentenylpyrofosfát
LNA – uzamčená nukleová kyselina (locked nucleic acid)
MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spectrometry)
NAHR – nealelická homologní rekombinace (non-allelic homologous recombination)
NCBI – Národní centrum pro biotechnologické informace (National Center for Biotechnology Information)
NHEJ – nehomologní spojování konců (non-homologous end joining)
PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
post-hoc – po tomto (z latiny)
qPCR – kvantitativní PCR (quantitative PCR)
rtPCR – PCR v reálném čase (Real-Time PCR)
SDO – seznam doporučených odrůd
SGA – steroidní glykoalkaloidy (steroidical glycoalkaloids)
SGT – sterolglykosyltransferáza
SNP – jednonukleotidový polymorfismus (single-nucleotide polymorphism)
Tm – teplota tání (melting temperature)
UHPLC – ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie (ultra-high-performance liquid chromatography)

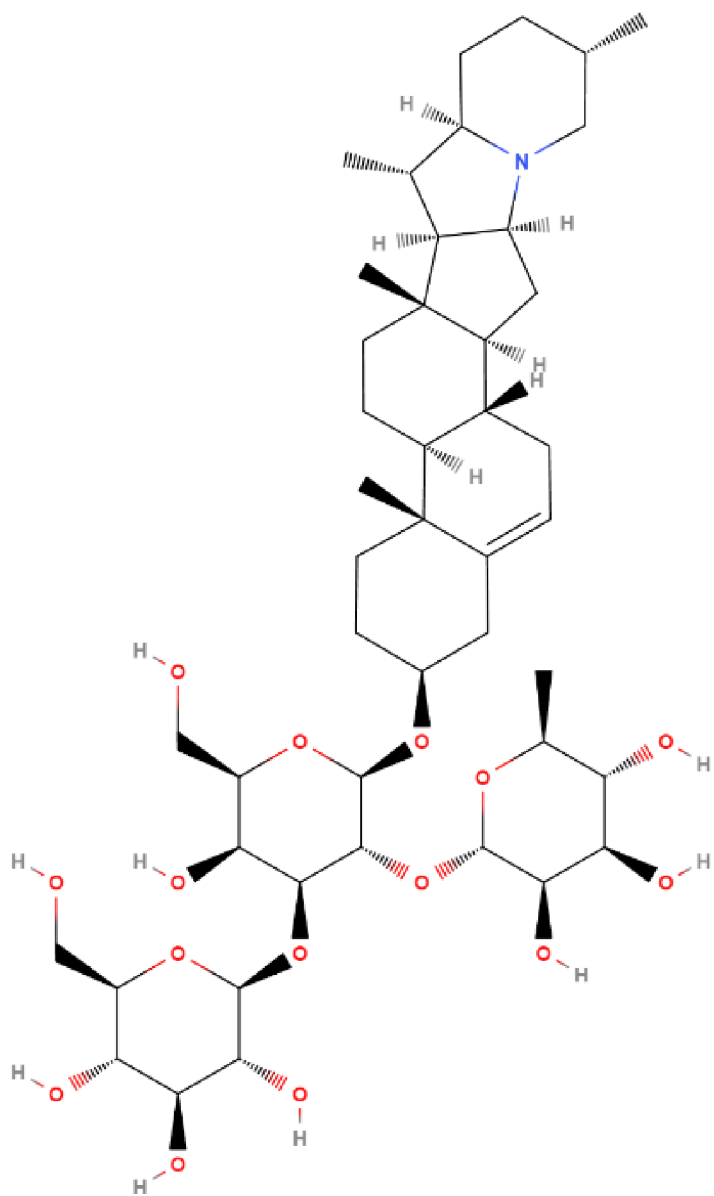
10 Samostatné přílohy

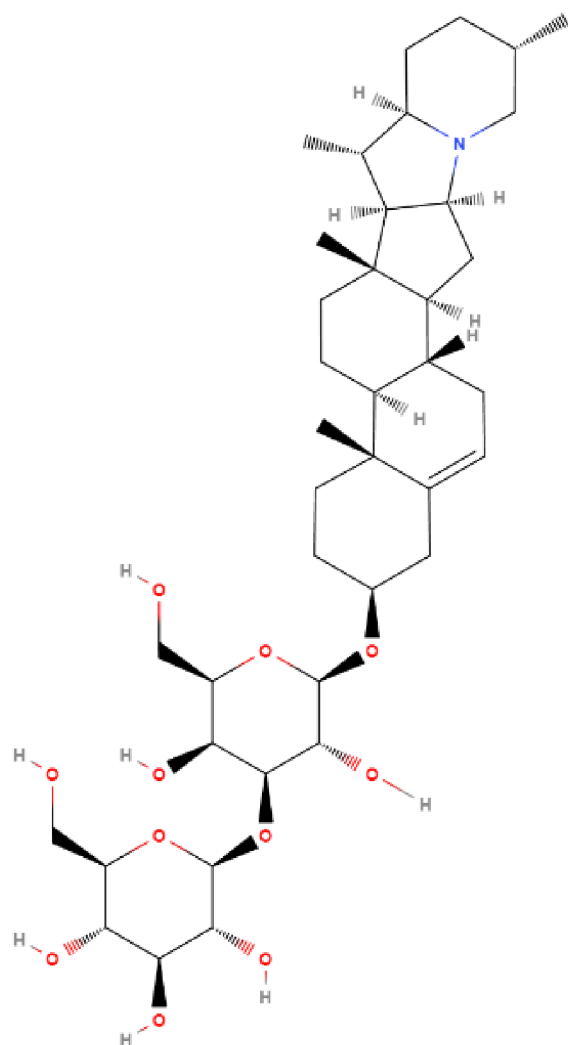
Příloha 1 - Sterol (vytvoreno volně dostupným nástrojem na molview.org)

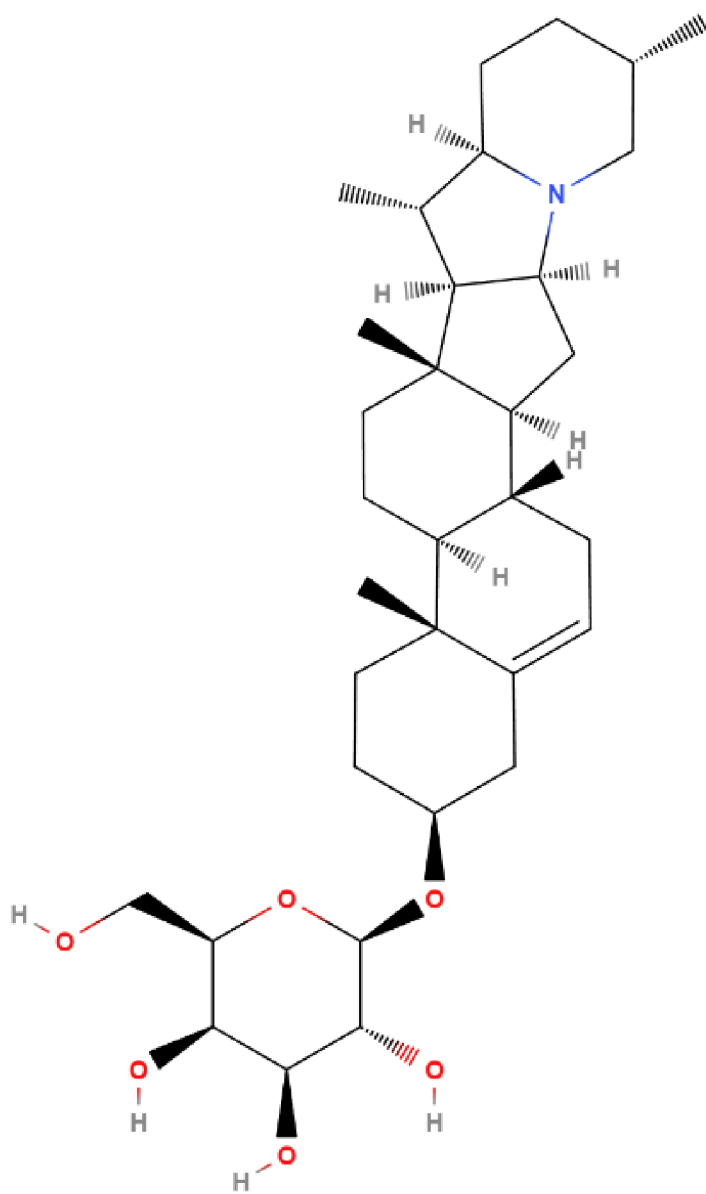


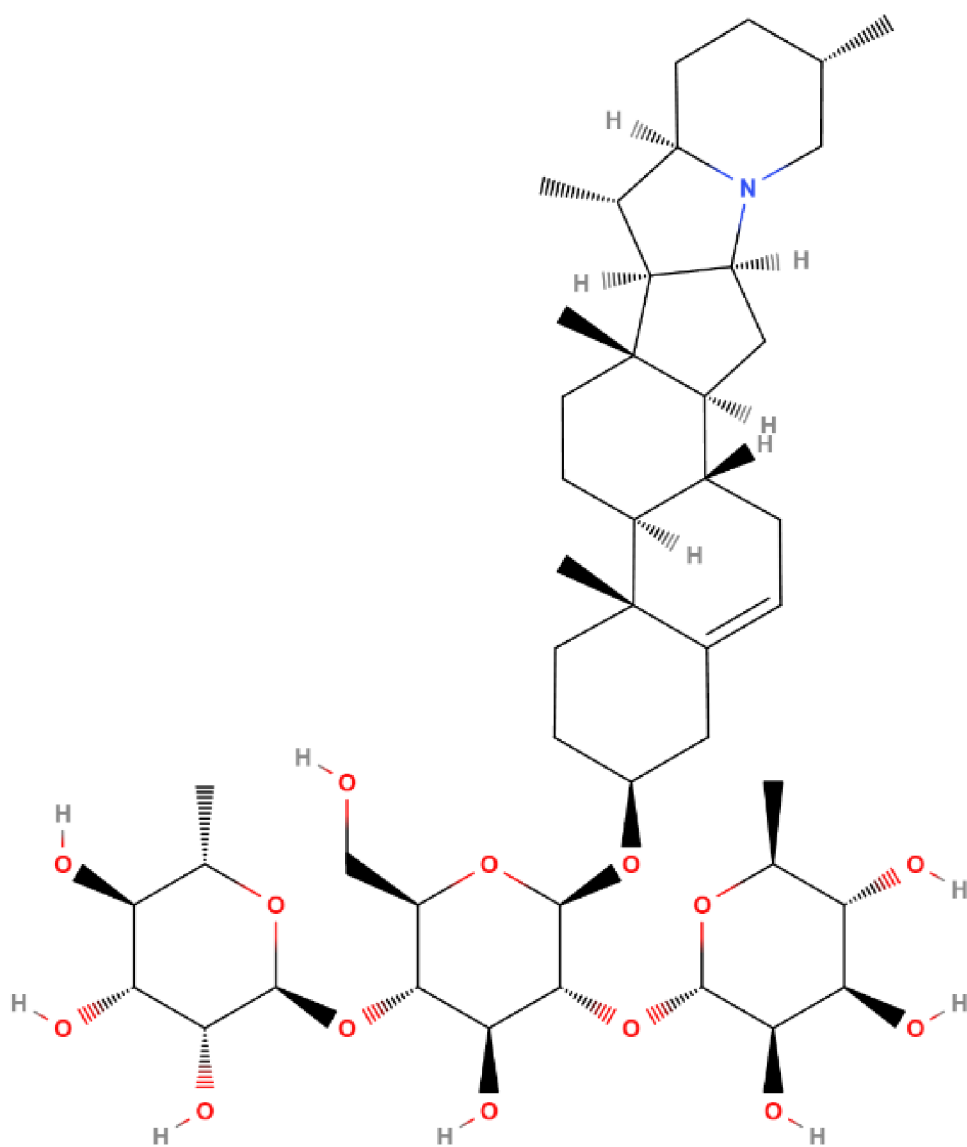
Příloha 2 - Solanidin (vytvoreno volně dostupným nástrojem na molview.org)

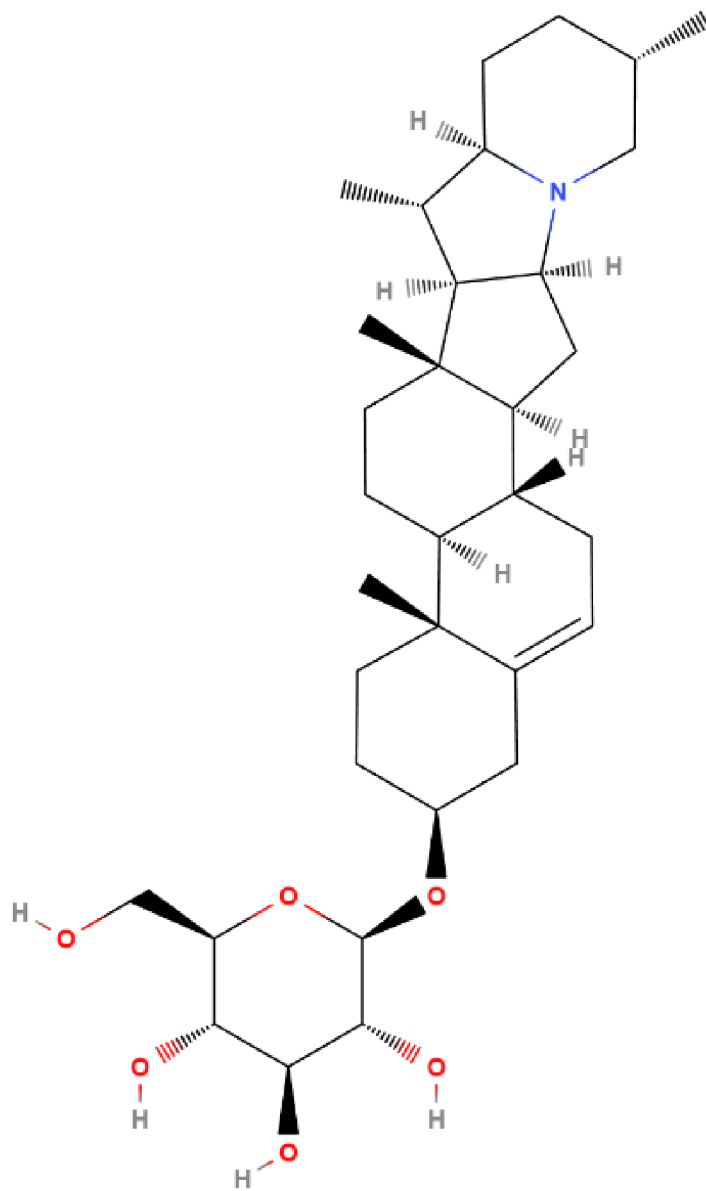


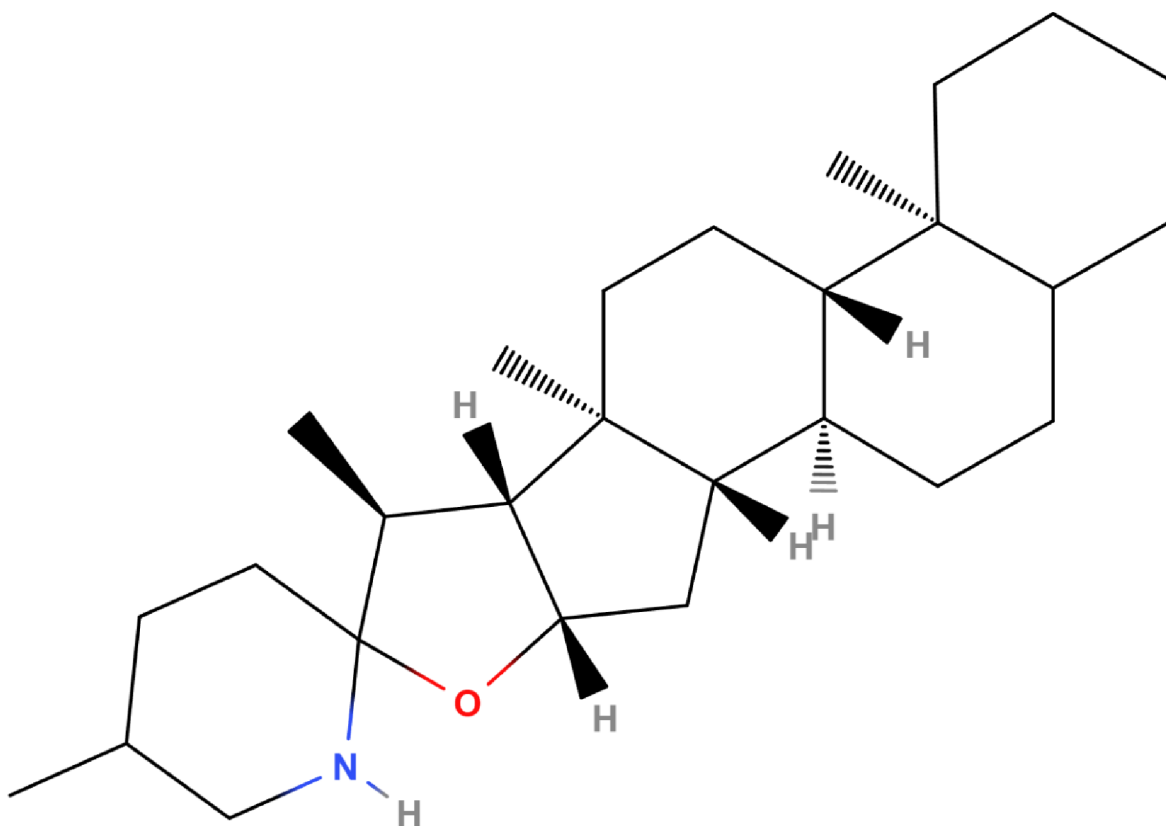


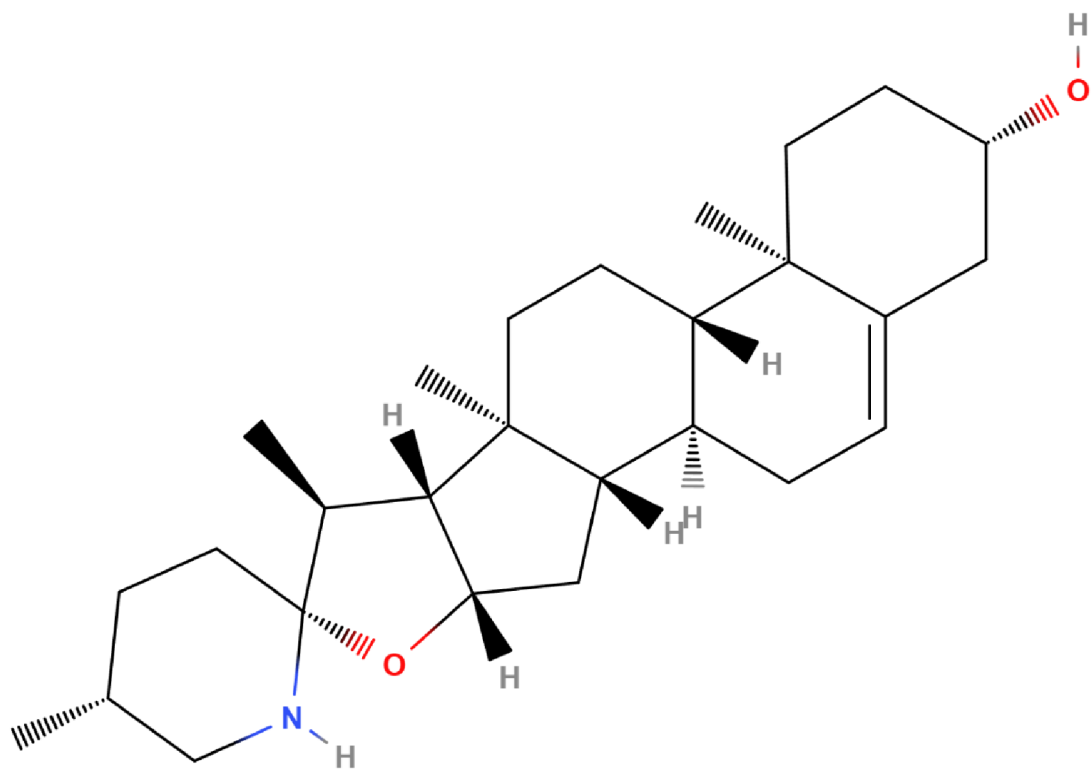


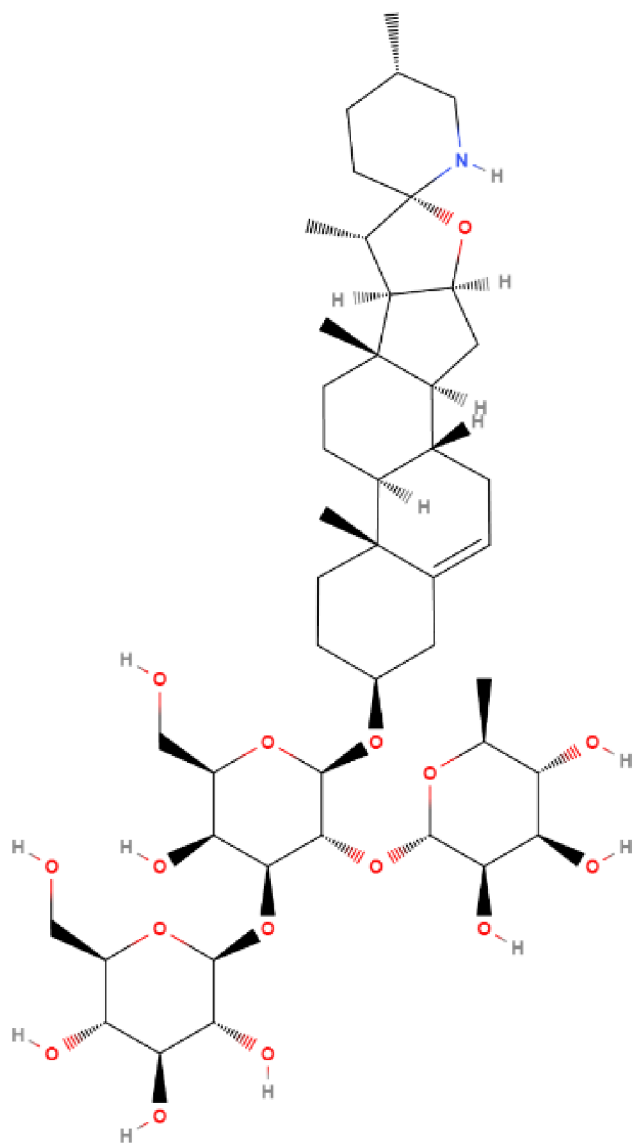


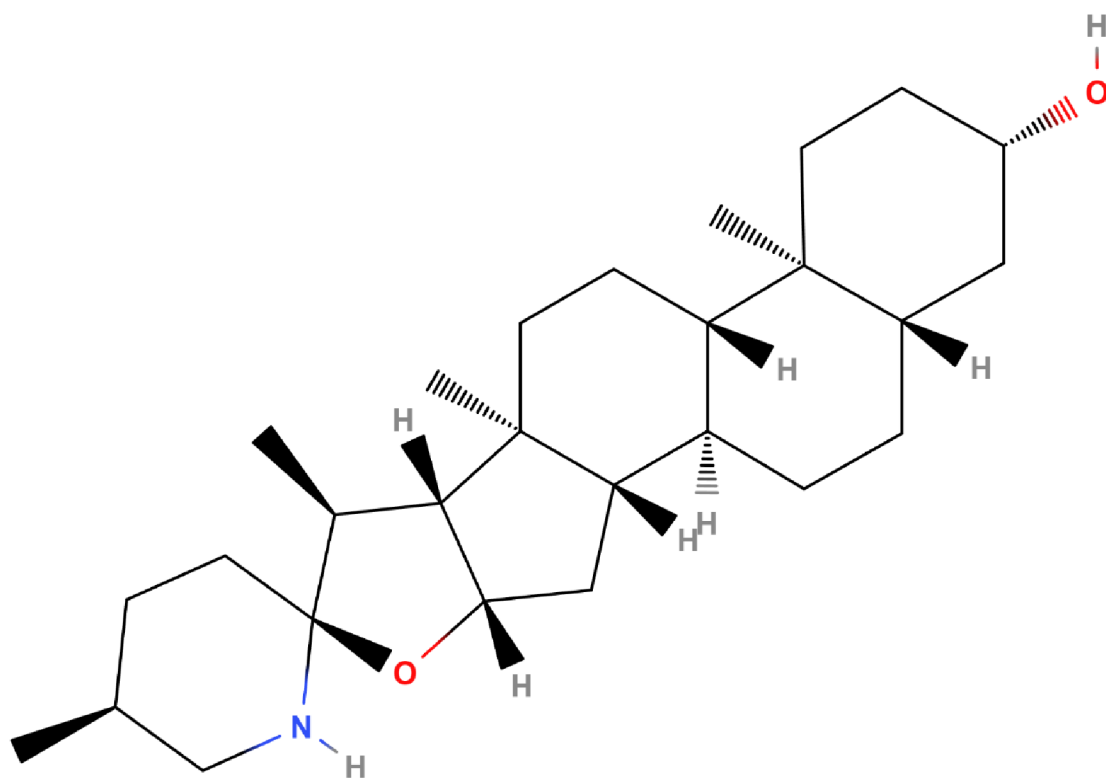






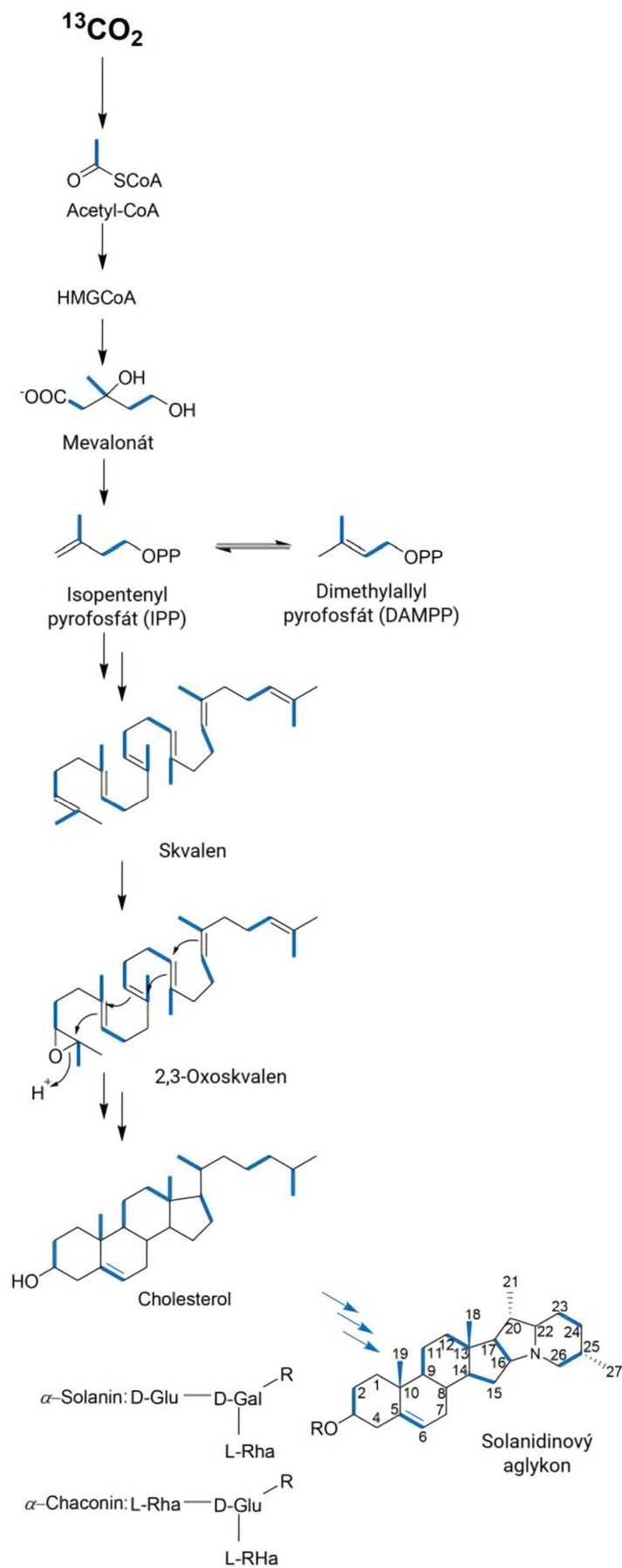


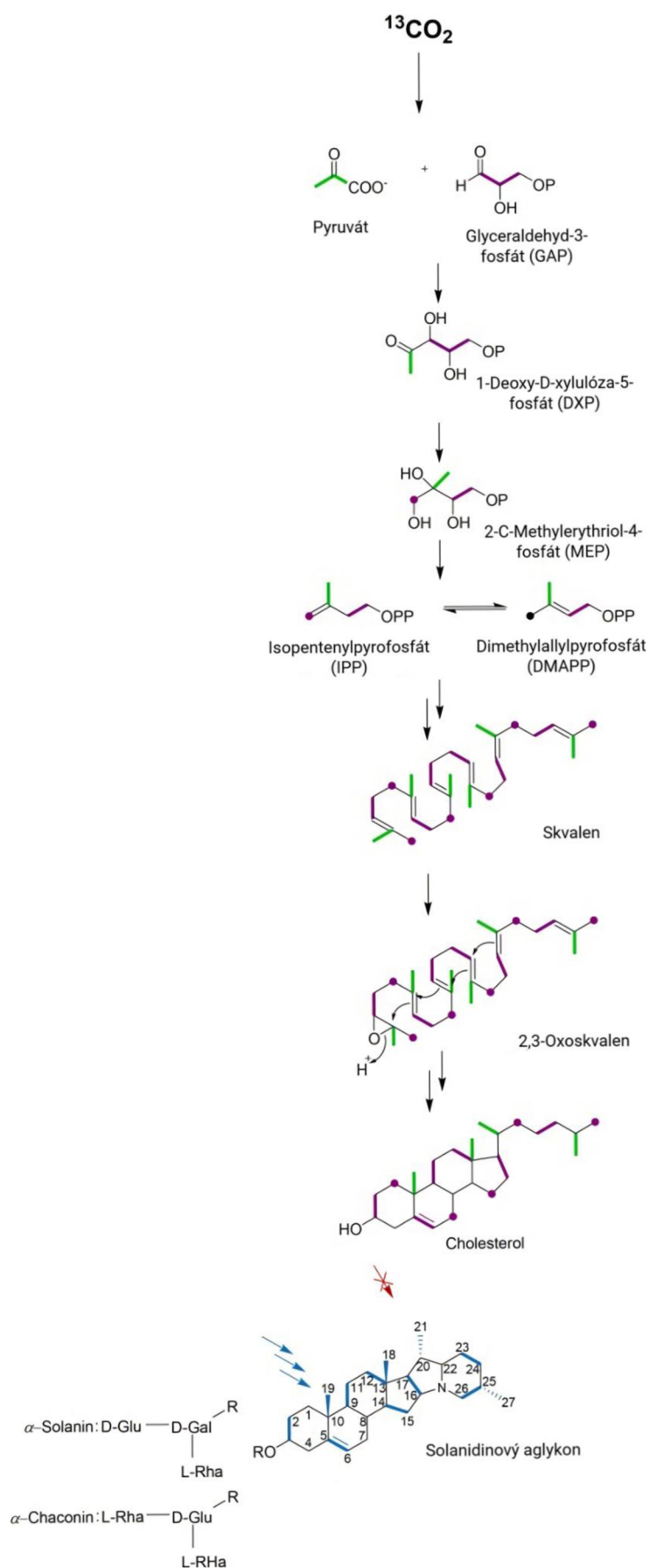




Příloha 13 - Pěstební plocha použitých odrůd v letech 2002-2022, data jsou uvedena v ha (ÚKZÚZ, 2006-2022)

Název odrůdy	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Adéla	65,4	59,5	102,5	123,6	128,6	171,5	233,9	209,0	219,2	270,4
Antonia	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	5,8
Anuschka	-	-	-	-	0,5	5,0	11,3	19,6	25,9	29,4
Bernina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carrera	-	-	6,7	19,9	30,8	27,1	44,0	40,9	70,8	78,0
Ditta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Impala	573,0	477,9	507,9	529,1	363,9	223,2	185,9	246,6	272,4	183,4
Marabel	280,6	312,3	323,3	324,2	235,6	268,2	265,7	234,9	211,0	214,5
Princess	-	30,4	69,0	82,4	96,3	154,7	175,3	169,2	149,3	134,8
Red Anna	0,5	8,0	17,8	28,9	43,0	71,2	80,1	66,7	63,1	78,8
Rosara	197,3	187,0	192,9	169,5	126,5	144,0	141,7	64,2	47,5	66,7
Sunshine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
251,1	247,3	283,5	278,2	285,9	256,4	175,5	115,2	65,3	77,9	61,1
12,7	19,1	50,3	71,6	75,1	81,8	103,0	111,3	141,0	142,1	145,6
27,8	39,8	52,2	58,6	58,7	54,5	57,2	73,1	79,3	74,3	58,1
-	-	1,1	0,3	2,9	5,9	10,2	38,1	82,2	71,6	66,0
85,3	73,4	73,5	65,3	71,2	83,8	76,8	66,4	72,4	59,9	35,1
51,3	32,3	31,0	23,6	24,4	16,9	20,2	12,0	15,0	12,9	8,5
117,9	196,9	140,6	130,5	126,7	96,7	61,0	60,1	60,0	50,9	43,0
211,8	180,7	159,2	127,2	122,0	114,3	116,0	105,8	96,6	84,7	76,3
114,7	109,1	111,1	83,4	57,7	51,9	55,1	61,6	64,8	50,0	69,2
56,2	80,1	87,3	57,8	62,5	64,0	60,4	64,2	67,7	58,6	57,1
61,3	40,3	38,0	34,1	36,2	33,6	30,0	25,1	36,4	25,5	21,5
-	-	1,0	3,7	2,7	12,7	16,6	27,3	42,3	26,8	17,5





Příloha 16 - Tabulka obsahu GA změřených pomocí HPLC v listech brambor

Vzorek	Navážka	α -chaconin	α -solanin	α -chaconin (DW)	α -solanin (DW)
1/1 I	0,150	0,729	0,198	1215	330
1/1 II	0,154	0,823	0,197	1336	320
1/1 III	0,152	0,781	0,209	1285	344
1/2 I	0,151	1,320	0,540	2185	894
1/2 II	0,151	1,360	0,557	2252	922
1/2 III	0,153	1,260	0,523	2059	855
1/3 I	0,154	2,500	1,130	4058	1834
1/3 II	0,153	2,360	1,100	3856	1797
1/3 III	0,154	2,440	1,090	3961	1769
2/1 I	0,153	1,480	0,537	2418	877
2/1 II	0,153	1,410	0,503	2304	822
2/1 III	0,150	1,350	0,491	2250	818
2/2 I	0,152	1,110	0,379	1826	623
2/2 II	0,151	1,140	0,385	1887	637
2/2 III	0,154	1,110	0,381	1802	619
2/3 I	0,150	0,972	0,437	1620	728
2/3 II	0,152	0,941	0,405	1548	666
2/3 III	0,153	0,947	0,435	1547	711
3/1 I	0,153	0,485	0,147	792	240
3/1 II	0,151	0,483	0,157	800	260
3/1 III	0,152	0,476	0,144	783	237
3/2 I	0,154	0,976	0,216	1584	351
3/2 II	0,150	0,944	0,219	1573	365
3/2 III	0,150	0,919	0,189	1532	315
3/3 I	0,152	1,030	0,253	1694	416
3/3 II	0,154	1,040	0,256	1688	416
3/3 III	0,154	1,030	0,253	1672	411
4/1 I	0,152	1,630	0,516	2681	849
4/1 II	0,154	1,600	0,517	2597	839
4/1 III	0,153	1,540	0,461	2516	753
4/2 I	0,153	2,160	0,559	3529	913
4/2 II	0,154	2,200	0,522	3571	847
4/2 III	0,150	2,040	0,511	3400	852
4/3 I	0,150	1,280	0,246	2133	410
4/3 II	0,153	1,280	0,210	2092	343
4/3 III	0,152	1,270	0,227	2089	373
5/1 I	0,152	1,230	0,383	2023	630

5/1 II	0,150	1,170	0,379	1950	632
5/1 III	0,152	1,230	0,398	2023	655
5/2 I	0,150	0,645	0,206	1075	343
5/2 II	0,150	0,654	0,233	1090	388
5/2 III	0,153	0,641	0,235	1047	384
5/3 I	0,152	2,380	1,090	3914	1793
5/3 II	0,152	2,210	1,020	3635	1678
5/3 III	0,150	2,220	1,020	3700	1700
6/1 I	0,151	3,880	1,290	6424	2136
6/1 II	0,150	3,840	1,260	6400	2100
6/1 III	0,152	3,710	1,300	6102	2138
6/2 I	0,151	2,880	0,709	4768	1174
6/2 II	0,154	2,910	0,737	4724	1196
6/2 III	0,152	2,860	0,720	4704	1184
6/3 I	0,154	3,120	0,909	5065	1476
6/3 II	0,152	3,140	0,951	5164	1564
6/3 III	0,150	3,010	0,924	5017	1540
7/1 I	0,150	2,910	0,663	4850	1105
7/1 II	0,150	2,810	0,610	4683	1017
7/1 III	0,152	2,880	0,616	4737	1013
7/2 I	0,153	5,990	1,290	9788	2108
7/2 II	0,151	6,000	1,250	9934	2070
7/2 III	0,150	5,960	1,280	9933	2133
7/3 I	0,153	5,330	1,380	8709	2255
7/3 II	0,153	5,330	1,380	8709	2255
7/3 III	0,153	5,160	1,340	8431	2190
8/1 I	0,150	1,090	0,406	1817	677
8/1 II	0,150	0,982	0,376	1637	627
8/1 III	0,150	1,020	0,386	1700	643
8/2 I	0,151	1,170	0,514	1937	851
8/2 II	0,150	1,110	0,497	1850	828
8/2 III	0,152	1,110	0,493	1826	811
8/3 I	0,150	2,340	0,686	3900	1143
8/3 II	0,153	2,400	0,750	3922	1225
8/3 III	0,150	2,410	0,746	4017	1243
9/1 I	0,153	2,170	0,608	3546	993
9/1 II	0,152	2,140	0,598	3520	984
9/1 III	0,153	2,060	0,546	3366	892
9/2 I	0,151	1,960	0,544	3245	901

9/2 II	0,150	1,980	0,574	3300	957
9/2 III	0,153	1,980	0,587	3235	959
9/3 I	0,150	2,750	0,736	4583	1227
9/3 II	0,152	2,680	0,754	4408	1240
9/3 III	0,150	2,860	0,765	4767	1275
10/1 I	0,154	1,360	0,429	2208	696
10/1 II	0,150	1,360	0,434	2267	723
10/1 III	0,154	1,370	0,445	2224	722
10/2 I	0,151	0,847	0,262	1402	434
10/2 II	0,154	0,868	0,248	1409	403
10/2 III	0,151	0,835	0,256	1382	424
10/3 I	0,153	1,410	0,334	2304	546
10/3 II	0,150	1,390	0,328	2317	547
10/3 III	0,154	1,510	0,361	2451	586
11/1 I	0,150	4,300	1,810	7167	3017
11/1 II	0,154	4,190	1,840	6802	2987
11/1 III	0,151	3,740	1,630	6192	2699
11/2 I	0,153	3,700	1,390	6046	2271
11/2 II	0,150	3,700	1,410	6167	2350
11/2 III	0,150	3,510	1,290	5850	2150
11/3 I	0,151	3,740	1,380	6192	2285
11/3 II	0,152	3,890	1,400	6398	2303
11/3 III	0,152	3,720	1,430	6118	2352
12/1 I	0,151	0,540	0,159	894	263
12/1 II	0,152	0,523	0,163	860	268
12/1 III	0,154	0,526	0,155	854	252
12/2 I	0,151	1,480	0,471	2450	780
12/2 II	0,151	1,490	0,458	2467	758
12/2 III	0,154	1,510	0,446	2451	724
12/3 I	0,154	0,899	0,240	1459	390
12/3 II	0,150	0,807	0,230	1345	383
12/3 III	0,152	0,839	0,236	1380	388

**Poznámka: Navážka je uvedena v gramech [g], sloupce α -chaconin a α -solanin mají data ohledně koncentrace uvedené v [$\mu\text{g/ml}$] a sloupce α -chaconin (DW) a α -solanin (DW) uvádějí obsah glykoalkaloidů ve vzorku ve formátu [$\mu\text{g/g}$] DW. DW je zkratkou pro hmotnost sušiny.*

Příloha 17 - Tabulka obsahu GA změřených pomocí HPLC v dužnině hlíz brambor

Vzorek	Navážka	α -chaconin	α -solanin	α -chaconin (DW)	α -solanin (DW)
1/1 I	0,152	0,111	0,0827	36,5	27,2
1/1 II	0,151	0,0749	0,0536	24,8	17,7
1/1 III	0,15	0,0938	0,0629	31,3	21,0
1/2 I	0,153	0,116	0,0879	37,9	28,7
1/2 II	0,151	0,12	0,0854	39,7	28,3
1/2 III	0,153	0,103	0,0657	33,7	21,5
1/3 I	0,15	0,148	0,115	49,3	38,3
1/3 II	0,15	0,145	0,105	48,3	35,0
1/3 III	0,153	0,151	0,103	49,3	33,7
2/1 I	0,152	0,172	0,103	56,6	33,9
2/1 II	0,153	0,191	0,133	62,4	43,5
2/1 III	0,153	0,177	0,103	57,8	33,7
2/2 I	0,151	0,135	0,0897	44,7	29,7
2/2 II	0,15	0,14	0,0845	46,7	28,2
2/2 III	0,151	0,166	0,103	55,0	34,1
2/3 I	0,151	0,0841	0,0529	27,8	17,5
2/3 II	0,152	0,0903	0,0546	29,7	18,0
2/3 III	0,152	0,0764	0,0502	25,1	16,5
3/1 I	0,152	0,212	0,128	69,7	42,1
3/1 II	0,153	0,2	0,109	65,4	35,6
3/1 III	0,151	0,205	0,118	67,9	39,1
3/2 I	0,15	0,234	0,112	78,0	37,3
3/2 II	0,15	0,186	0,109	62,0	36,3
3/2 III	0,153	0,209	0,111	68,3	36,3
3/3 I	0,151	0,176	0,0877	58,3	29,0
3/3 II	0,152	0,161	0,0866	53,0	28,5
3/3 III	0,153	0,212	0,111	69,3	36,3
4/1 I	0,152	0,467	0,486	153,6	159,9
4/1 II	0,152	0,4909	0,4999	161,5	164,4
4/1 III	0,151	0,508	0,552	168,2	182,8
4/2 I	0,15	0,919	1,12	306,3	373,3
4/2 II	0,151	0,891	1,1	295,0	364,2
4/2 III	0,151	1,13	1,2	374,2	397,4
4/3 I	0,152	0,438	0,43	144,1	141,4
4/3 II	0,153	0,367	0,376	119,9	122,9
4/3 III	0,152	0,4	0,395	131,6	129,9
5/1 I	0,153	0,206	0,126	67,3	41,2
5/1 II	0,15	0,226	0,133	75,3	44,3
5/1 III	0,153	0,19	0,111	62,1	36,3

5/2 I	0,15	0,124	0,06	41,3	20,0
5/2 II	0,15	0,124	0,0662	41,3	22,1
5/2 III	0,153	0,121	0,0694	39,5	22,7
5/3 I	0,152	0,171	0,0785	56,3	25,8
5/3 II	0,152	0,159	0,0789	52,3	26,0
5/3 III	0,15	0,179	0,0872	59,7	29,1
6/1 I	0,152	0,295	0,148	97,0	48,7
6/1 II	0,152	0,292	0,143	96,1	47,0
6/1 III	0,152	0,328	0,159	107,9	52,3
6/2 I	0,153	0,157	0,0889	51,3	29,1
6/2 II	0,153	0,163	0,0885	53,3	28,9
6/2 III	0,152	0,148	0,0756	48,7	24,9
6/3 I	0,151	0,217	0,104	71,9	34,4
6/3 II	0,151	0,212	0,0999	70,2	33,1
6/3 III	0,15	0,215	0,103	71,7	34,3
7/1 I	0,151	0,243	0,115	80,5	38,1
7/1 II	0,152	0,181	0,0958	59,5	31,5
7/1 III	0,151	0,262	0,112	86,8	37,1
7/2 I	0,151	0,271	0,153	89,7	50,7
7/2 II	0,152	0,2199	0,121	72,3	39,8
7/2 III	0,153	0,202	0,132	66,0	43,1
7/3 I	0,152	0,151	0,0912	49,7	30,0
7/3 II	0,153	0,192	0,107	62,7	35,0
7/3 III	0,153	0,179	0,106	58,5	34,6
8/1 I	0,152	0,0735	0,0608	24,2	20,0
8/1 II	0,152	0,0896	0,0772	29,5	25,4
8/1 III	0,152	0,0856	0,0602	28,2	19,8
8/2 I	0,152	0,0789	0,0785	26,0	25,8
8/2 II	0,153	0,105	0,0866	34,3	28,3
8/2 III	0,153	0,0837	0,0736	27,4	24,1
8/3 I	0,153	0,084	0,0764	27,5	25,0
8/3 II	0,15	0,0613	0,0621	20,4	20,7
8/3 III	0,152	0,0878	0,0666	28,9	21,9
9/1 I	0,15	0,636	0,427	212,0	142,3
9/1 II	0,153	0,583	0,401	190,5	131,0
9/1 III	0,153	0,552	0,368	180,4	120,3
9/2 I	0,153	0,266	0,159	86,9	52,0
9/2 II	0,152	0,234	0,13	77,0	42,8
9/2 III	0,15	0,216	0,13	72,0	43,3
9/3 I	0,15	0,93	0,579	310,0	193,0
9/3 II	0,151	0,86	0,53	284,8	175,5
9/3 III	0,152	0,811	0,478	266,8	157,2
10/1 I	0,15	0,304	0,229	101,3	76,3

10/1 II	0,152	0,326	0,217	107,2	71,4
10/1 III	0,153	0,313	0,235	102,3	76,8
10/2 I	0,15	0,173	0,114	57,7	38,0
10/2 II	0,15	0,159	0,12	53,0	40,0
10/2 III	0,153	0,166	0,111	54,2	36,3
10/3 I	0,152	0,181	0,125	59,5	41,1
10/3 II	0,152	0,169	0,108	55,6	35,5
10/3 III	0,152	0,173	0,117	56,9	38,5
11/1 I	0,152	0,375	0,212	123,4	69,7
11/1 II	0,152	0,391	0,223	128,6	73,4
11/1 III	0,15	0,399	0,227	133,0	75,7
11/2 I	0,153	0,658	0,401	215,0	131,0
11/2 II	0,153	0,712	0,397	232,7	129,7
11/2 III	0,153	0,71	0,413	232,0	135,0
11/3 I	0,152	0,342	0,196	112,5	64,5
11/3 II	0,15	0,325	0,207	108,3	69,0
11/3 III	0,151	0,354	0,216	117,2	71,5
12/1 I	0,152	0,0269	0,0118	8,8	3,9
12/1 II	0,151	0,027	0,0105	8,9	3,5
12/1 III	0,153	0,0219	0,00681	7,2	2,2
12/2 I	0,152	0,101	0,0523	33,2	17,2
12/2 II	0,15	0,0986	0,0533	32,9	17,8
12/2 III	0,152	0,108	0,0496	35,5	16,3
12/3 I	0,153	0,16	0,0567	52,3	18,5
12/3 II	0,151	0,153	0,0604	50,7	20,0
12/3 III	0,152	0,163	0,0635	53,6	20,9

**Poznámka: Navážka je uvedena v gramech [g], sloupce α -chaconin a α -solanin mají data ohledně koncentrace uvedená v [$\mu\text{g}/\text{ml}$] a sloupce α -chaconin (DW) a α -solanin (DW) uvádějí obsah glykoalkaloidů ve vzorku ve formátu [$\mu\text{g}/\text{g}$] DW. DW je zkratkou pro hmotnost sušiny.*

Příloha 18 - Tabulka obsahu GA změřených pomocí HPLC ve slupce hlíz brambor

Vzorek	Navážka	α -chaconin	α -solanin	α -chaconin (DW)	α -solanin (DW)
1/1 I	0,053	4,150	1,570	6525	2468
1/1 II	0,052	3,300	1,300	5288	2083
1/1 III	0,052	4,060	1,520	6506	2436
1/2 I	0,051	2,950	1,040	4820	1699
1/2 II	0,052	3,180	1,080	5096	1731
1/2 III	0,051	3,130	1,160	5114	1895
1/3 I	0,052	5,120	2,010	8204	3221
1/3 II	0,050	4,240	1,610	7066	2683
1/3 III	0,051	4,770	1,820	7793	2974
2/1 I	0,051	5,760	1,710	9411	2794
2/1 II	0,052	5,460	1,690	8749	2708
2/1 III	0,052	5,130	1,630	8220	2612
2/2 I	0,052	5,380	2,000	8621	3205
2/2 II	0,051	5,610	2,010	9166	3284
2/2 III	0,050	5,710	2,120	9516	3533
2/3 I	0,051	2,880	1,170	4705	1912
2/3 II	0,051	2,850	1,080	4656	1765
2/3 III	0,053	3,200	1,160	5031	1824
3/1 I	0,053	3,920	1,170	6163	1839
3/1 II	0,051	4,260	1,210	6960	1977
3/1 III	0,053	3,870	1,080	6084	1698
3/2 I	0,053	3,550	0,855	5581	1344
3/2 II	0,052	3,510	0,843	5624	1351
3/2 III	0,051	3,770	0,922	6160	1506
3/3 I	0,053	5,580	1,270	8773	1997
3/3 II	0,053	5,060	1,220	7955	1918
3/3 III	0,053	4,670	1,120	7342	1761
4/1 I	0,053	6,690	2,660	10518	4182
4/1 II	0,052	6,160	2,520	9871	4038
4/1 III	0,053	6,530	2,750	10266	4323
4/2 I	0,050	6,250	2,270	10416	3783
4/2 II	0,051	6,830	2,500	11159	4085
4/2 III	0,051	6,400	2,430	10456	3970
4/3 I	0,053	6,770	2,670	10644	4198
4/3 II	0,053	5,620	2,300	8836	3616
4/3 III	0,052	5,720	2,210	9166	3541
5/1 I	0,051	3,100	1,060	5065	1732
5/1 II	0,050	3,180	1,100	5299	1833
5/1 III	0,050	3,250	1,180	5416	1966
5/2 I	0,051	2,600	0,926	4248	1513

5/2 II	0,051	2,960	0,997	4836	1629
5/2 III	0,051	2,890	0,999	4722	1632
5/3 I	0,051	3,080	1,010	5032	1650
5/3 II	0,051	2,780	0,928	4542	1516
5/3 III	0,051	3,030	0,990	4950	1617
6/1 I	0,053	4,320	1,350	6792	2122
6/1 II	0,052	4,000	1,290	6410	2067
6/1 III	0,053	4,570	1,460	7185	2295
6/2 I	0,053	3,210	1,100	5047	1729
6/2 II	0,052	2,950	1,020	4727	1634
6/2 III	0,052	2,970	1,050	4759	1683
6/3 I	0,052	3,980	1,200	6378	1923
6/3 II	0,053	4,180	1,210	6572	1902
6/3 III	0,052	4,150	1,250	6650	2003
7/1 I	0,053	4,510	1,280	7090	2012
7/1 II	0,051	4,390	1,260	7172	2059
7/1 III	0,052	4,480	1,290	7179	2067
7/2 I	0,052	4,730	1,250	7579	2003
7/2 II	0,051	4,780	1,360	7810	2222
7/2 III	0,053	4,910	1,340	7719	2107
7/3 I	0,053	2,570	0,807	4040	1269
7/3 II	0,052	2,620	0,788	4198	1263
7/3 III	0,051	2,660	0,796	4346	1301
8/1 I	0,050	1,930	1,090	3216	1816
8/1 II	0,050	1,900	1,130	3166	1883
8/1 III	0,050	2,010	1,190	3350	1983
8/2 I	0,052	1,800	0,972	2884	1558
8/2 II	0,050	1,630	0,893	2716	1488
8/2 III	0,052	1,560	0,873	2500	1399
8/3 I	0,051	2,320	1,360	3790	2222
8/3 II	0,051	2,130	1,280	3480	2091
8/3 III	0,052	2,300	1,330	3686	2131
9/1 I	0,051	4,090	1,500	6682	2451
9/1 II	0,051	3,910	1,490	6388	2434
9/1 III	0,050	3,790	1,460	6316	2433
9/2 I	0,051	3,420	1,340	5588	2189
9/2 II	0,052	3,760	1,470	6025	2356
9/2 III	0,051	3,490	1,400	5702	2287
9/3 I	0,051	4,410	1,570	7205	2565
9/3 II	0,052	4,370	1,610	7003	2580
9/3 III	0,051	4,410	1,550	7205	2532
10/1 I	0,051	4,930	2,220	8055	3627
10/1 II	0,053	5,220	2,350	8207	3695

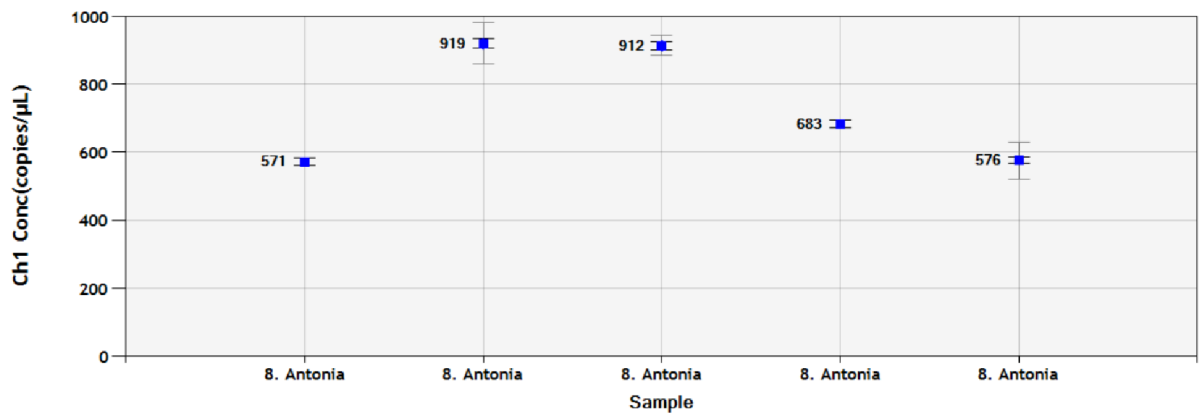
10/1 III	0,051	4,560	1,980	7450	3235
10/2 I	0,053	4,010	1,710	6304	2688
10/2 II	0,051	3,620	1,540	5914	2516
10/2 III	0,052	3,690	1,560	5913	2500
10/3 I	0,053	4,210	1,870	6619	2940
10/3 II	0,052	4,460	1,890	7147	3029
10/3 III	0,042	2,970	1,530	5892	3035
11/1 I	0,052	0,349	0,326	559	522
11/1 II	0,053	0,273	0,293	429	461
11/1 III	0,052	0,272	0,322	436	516
11/2 I	0,052	1,460	0,538	2340	862
11/2 II	0,052	1,330	0,512	2131	820
11/2 III	0,053	1,400	0,547	2201	860
11/3 I	0,053	1,450	0,540	2280	849
11/3 II	0,052	1,530	0,581	2452	931
11/3 III	0,052	1,470	0,545	2356	873
12/1 I	0,052	2,060	0,444	3301	711
12/1 II	0,052	1,960	0,430	3141	689
12/1 III	0,052	1,980	0,446	3173	715
12/2 I	0,053	0,915	0,307	1439	483
12/2 II	0,052	0,945	0,298	1514	478
12/2 III	0,053	0,914	0,306	1437	481
12/3 I	0,052	2,570	0,548	4118	878
12/3 II	0,053	2,200	0,480	3459	755
12/3 III	0,053	2,460	0,561	3868	882

**Poznámka: Navážka je uvedena v gramech [g], sloupce α -chaconin a α -solanin mají data ohledně koncentrace uvedené v [$\mu\text{g}/\text{ml}$] a sloupce α -chaconin (DW) a α -solanin (DW) uvádějí obsah glykoalkaloidů ve vzorku ve formátu [$\mu\text{g}/\text{g}$] DW. DW je zkratkou pro hmotnost sušiny.*

Příloha 19 - Tabulka s detailním počtem dropletů

Název genu	Ditta 10/1	Ditta 10/2	Ditta 10/3	Anuschka	Marabel
SolA	699	728	826	509	725
SolA	719	747	836	500	720
SolF	chybí data	1693	1770	1370	1346
SolF	chybí data	1704	1714	1638	1303
SolG	1445	1454	1362	1099	1190
SolG	1349	1438	1303	1116	1164
SolH	951	952	981	896	920
SolH	953	958	990	862	897
Act7	716	860	926	707	769
Act7	774	864	920	707	805
Název genu	Princess	Sunshine	Rosara	Impala	Carrera
SolA	825	693	51,1	517	865
SolA	808	700	51,4	561	833
SolF	1450	1708	83,1	1613	1191
SolF	1476	1682	82,6	1619	1188
SolG	1127	1105	59,5	1082	908
SolG	1132	1165	63,9	1112	886
SolH	885	902	59,8	868	813
SolH	906	873	56,0	884	793
Act7	823	486	50,4	694	810
Act7	837	821	54,3	856	808
Název genu	Antonia	Red Anna	Bernina	Adéla	
SolA	570	756	898	877	
SolA	571	743	902	928	
SolF	891	907	1314	1482	
SolF	950	901	1298	1473	
SolG	898	906	1316	1316	
SolG	928	882	1324	1337	
SolH	689	690	942	902	
SolH	676	729	929	907	
Act7	546	643	897	617	
Act7	605	645	878	654	

Příloha 20 – Výstup počtu dropletů programu QuantaSoft (odrůda Antonia)



*Poznámka: Hodnoty v jednotlivých sloupcích viditelné na grafu, jsou průměry dvou měření – reakce byla vždy připravena v duplikátech. Body v jednotlivých sloupcích znázorňují hodnoty pozitivního počtu dropletů pro měření jednotlivých genů (SolA, SolF, SolG, SolH, Act7).