

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Expresse dehydrinových genů u lesních dřevin

Bakalářská práce

Autor: Václav Klouček

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jaroslav Čepl, Ph.D.

2021

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Václav Klouček

Lesnictví
Lesnictví

Název práce

Exprese dehydrinových genů u lesních dřevin

Název anglicky

Expression of dehydrin genes in forest trees

Cíle práce

V rámci práce "Exprese dehydrinových genů u lesních dřevin" se bude autor zabývat variabilitou genové exprese dehydrinových genů zmapovaných u různých lesních dřevin. Dehydriny jsou skupinu proteinů přítomných v rostlinách, které jsou produkovány v reakci na sucho či na mráz. Analýza exprese dehydrinových genů je v současnosti předmětem řady studií zabývajících se vlivem sucha na lesní dřeviny. Cílem práce je zmapovat již popsané rozdíly v genové expresi dehydrinů na základě různého místa původu u lesních dřevin. Zároveň bude autor zjišťovat možnosti využití analýzy exprese dehydrinů u lesních dřevin jako markerů přítomnosti stresu při porovnávání vzorků z období s dostatkem vláhy z období sucha.

Metodika

Práce se bude skládat převážně z rešeršní části, kde autor vyhledá a zpracuje relevantní studie, které byly na dané téma publikovány. Zároveň zde autor důkladně popíše laboratorní postupy extrakce RNA a zjištění genové exprese pomocí metody qPCR u vybraných druhů dřevin.

V rámci praktické části autor provede izolaci RNA, její přepis do cDNA a následnou kvantifikaci exprese dehydrinových genů metodou qPCR. Rostlinným materiálem zde budou mladé rostliny topolu osiky (*Populus tremula*) vystavené různým hydrickým režimům.

Doporučený rozsah práce

40 stran

Klíčová slova

Lesní dřeviny, genová exprese, dehydriny, odolnost vůči suchu, RNA, qPCR

Doporučené zdroje informací

- Behringer, David, et al. "Differential gene expression reveals candidate genes for drought stress response in *Abies alba* (Pinaceae)." *PLoS One* 10.4 (2015): e0124564.
- Hanin, Moez, et al. "Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms." *Plant signaling & behavior* 6.10 (2011): 1503-1509.
- Kjellsen, Trygve Devold, et al. "Dehydrin accumulation and extreme low-temperature tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*)." *Tree physiology* 33.12 (2013): 1354-1366.
- Kosová, K., P. Vítámvás, and I. T. Prášil. "The role of dehydrins in plant response to cold." *Biologia plantarum* 51.4 (2007): 601-617.
- Stival Sena, Juliana, et al. "Expansion of the dehydrin gene family in the Pinaceae is associated with considerable structural diversity and drought-responsive expression." *Tree physiology* 38.3 (2017): 442-456.
- Yakovlev, Igor A., et al. "Analysis of gene expression during bud burst initiation in Norway spruce via ESTs from subtracted cDNA libraries." *Tree Genetics & Genomes* 2.1 (2006): 39-52.
- Yakovlev, Igor A., et al. "Dehydrins expression related to timing of bud burst in Norway spruce." *Planta* 228.3 (2008): 459-472.

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FLD

Vedoucí práce

RNDr. Jaroslav Čepl, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Konzultant

Jan Stejskal

Elektronicky schváleno dne 30. 1. 2020**prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc, Ph.D.**

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 22. 2. 2020**prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.**

Děkan

V Praze dne 14. 04. 2021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma *Exprese dehydrinových genů u lesních dřevin* vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Jaroslav Čepla, Ph.D a použil jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědom, že zveřejněním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V..... dne.....

Podpis autora

Touto cestou bych rád poděkoval vedoucímu práce RNDr. Jaroslavu Čeplovi, Ph.D. za cenné rady, poznámky a pomoc s vypracováním bakalářské práce. A v neposlední řadě za vždy vstřícné a ochotné jednání.

ABSTRAKT

Dehydriny jsou proteiny, které umožňují rostlinám reagovat na změny v prostředí. Tyto změny u rostlin působí stres, který se projevuje na fyziologické i biochemické úrovni. Sledování genové exprese dehydrinů proto může sloužit jako marker hodnocení stresu u rostlin. Pro práci se použily mladé rostliny topolu osika (*Populus tremula L.*). Topol osika je široce rozšířen a často se využívá jako meliorační dřevina. Odběr listů byl prováděn jednou týdně celkem čtyřikrát. Listy poskytly rostlinný materiál pro analýzu genové exprese za využití metody qRT-PCR. Experimentální část konkrétně zahrnovala izolaci RNA, reverzní transkripci do cDNA a kvantifikaci pomocí qPCR. Z výsledků vyplývá vztah mezi stresovanými rostlinami a zvýšením syntézy exprese dehydrinových genů. Lze tak předpokládat zapojení dehydrinů do procesů zvyšující odolnost rostlin vůči suchu.

klíčová slova: genová exprese, dehydriny, abiotický stres, qRT-PCR, topol osika

ABSTRACT

Dehydrins are proteins that allow plants to respond to the environment changes. These changes in plants are caused by stress, which is shown on a physiological and biochemical level. Monitoring gene expression of the dehydrins can serve as a marker for stress assessment in plants. Young aspen poplar plants were used for the work (*Populus tremula L.*). Aspen is widely represented and often used as an ameliorative wood. The leaves were collected once per week a total of four times. The leaves provided plant material for gene expression analysis using qRT-PCR. The experimental part included RNA isolation, reverse transcription into cDNA, and quantification by qPCR. The results indicate a relationship between stressed plants and increased synthesis of dehydrin gene expression. It is thus possible to assume the involvement of dehydrins in processes increasing the resistance of plants to drought.

keywords: gene expression, dehydrins, abiotic stress, qRT-PCR, *Populus tremula*

OBSAH

1	Úvod	7
2	Cíl práce.....	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Stres a stresové faktory u rostlin	9
3.1.1	Reakce rostlin na působení stresu	9
3.1.1.1	Stres způsobený suchem.....	10
3.1.1.2	Stres způsobený nízkými teplotami.....	11
3.2	Genová exprese	12
3.2.1	Transkripce.....	12
3.2.2	Translace	12
3.2.3	Regulace genové exprese	14
3.2.3.1	Konstitutivní, indukibilní a represibilní geny.....	14
3.2.3.2	Operony	15
3.3	Stresové proteiny.....	16
3.3.1	LEA proteiny	16
3.3.2	Dehydriny	17
3.3.2.1	Struktura a vlastnosti	17
3.3.2.2	Funkce a mechanismus účinku.....	18
3.3.2.3	Dehydriny v dřevinách	19
3.4	Detekce exprese dehydrinů	20
3.4.1	Reverzní transkripce.....	20
3.4.2	PCR	20
3.4.3	Real-time PCR.....	21
3.4.4	Výhody PCR.....	22
3.5	Rostliny použité pro práci	23

3.5.1	Topol osika (<i>Populus tremula L.</i>).....	23
4	Metodika.....	25
4.1	Materiál, pomůcky a přístroje	25
4.2	Získ a příprava biologického materiálu.....	26
4.3	Izolace RNA.....	26
4.3.1	Lýza buněk z rostlinného materiálu	26
4.3.2	Izolace RNA z rostlinného materiálu	26
4.4	RT-PCR.....	27
4.4.1	Reverzní transkripce.....	27
4.4.2	qPCR	27
5	Výsledky.....	29
6	Diskuse	30
7	Závěr.....	31
8	Seznam literatury a použitých zdrojů	32

SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ, GRAFŮ

Tabulka 1. Podmínky termocyklieru pro RT

Obrázek 1. Přenos genetické informace z DNA do proteinů v eukaryotních buňkách (O'Connor et Adams, 2010).

Obrázek 2. Polymerázová řetězcová reakce spojená s reverzní transkripcí, upraveno podle Dr. Mohiuddin Kabir.

Obrázek 3. Rozšíření topolu osika. autor Giovanni Caudullo, CC BY 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>>, via Wikimedia Commons [cit. 12. 4. 2021]

Obrázek 4. Přirozené zmlazení osiky náletem semen na čerstvé holině, autor Lud'ka Čížková

Obrázek 6. Relativní genová exprese DHN u zalévaných a nezalévaných rostlin topolu osika ; chybové úsečky ukazují standardní chybu.

Obrázek 5. Relativní genová exprese poDHN u zalévaných a nezalévaných rostlin topolu osika; chybové úsečky ukazují standardní chybu.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ABA - kyselina abscisová

AMK - aminokyselina

cDNA - komplementární DNA

Ct - prahový cyklus

DHN - dehydrin

DNA - deoxyribonukleová kyselina

dNTPs - směs deoxynukleotidtrifosfátů

DTT - dithiotreitol

LEA proteiny - proteiny pozdní fáze embryogeneze

mRNA - mediátorová ribonukleová kyselina

PCR - polymerázová řetězová reakce

qPCR - kvantitativní polymerázová řetězová reakce

qRT-PCR - kvantitativní polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí

RNA - ribonukleová kyselina

RT - reverzní transkriptáza

RT-PCR - polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí

tRNA - transferová RNA

WB1 - promývací pufr 1

WB2 - promývací pufr 2

1 Úvod

Změny klimatických podmínek mohou na rostliny působit negativně a ovlivňovat jejich růst a produktivitu. Změna klimatu je stále častějším tématem odborných studií, ale i široké veřejnosti. V návaznosti na to se provádí výzkumy zaměřené na nalezení a sledování obranných mechanismů rostlin na změny prostředí (Velasco-Conde et al., 2012). Mezi nejčastěji působící abiotické stresory patří sucho a chlad.

Dehydriny (DHN) jsou skupinou proteinů, které jsou spojovány s reakcí rostlin na stres. Zejména pak na sucho, chlad a vysokou salinitu prostředí. Důsledkem těchto stresorů je změna obsahu vody v rostlinách, která vede k jejich dehydrataci. DHN hrají významnou roli ve vodním hospodářství rostlin - zamezují ztrátám vody a udržují stabilitu membrán (Velasco-Conde et al., 2012; Kjellsen et al., 2013). Nicméně se nejedná o jedinou funkci těchto proteinů, a i přes množství uskutečněných studií se nepodařilo objasnit funkce všech doposud známých skupin dehydrinů. Jednoznačně je ale označit za multifunkční proteiny, které hrají důležitou roli v toleranci rostlin na abiotický stres.

Topol osika (*Populus tremula*) patří mezi široce rozšířenou dřevinu a často je využíván jako přípravná dřevina na rozsáhlých kalamitních holinách. Proto jsou na tuto dřevinu kladeny zvýšené nároky na odolnost. Topol osika lze vysazovat na širokém spektru stanovišť, jedná se však o silně světlomilnou dřevinu a je proto dodržovat vysazování na holinách bez konkurující vegetace (Čížková et al., 2020).

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo vytvoření literární rešerše zaměřené na genovou expresi dehydrinů jako reakce na abiotický stres.

Dílčí cíle práce byly:

- kultivace rostlin topolu osika (*Populus tremula*)
- izolace ribonukleové kyseliny (RNA)
- provedení analýzy kvantitativní polymerázové řetězové reakce spojené s reverzní transkripcí (qRT-PCR)
- vyhodnocení množství dehydrinů ve vzorcích

3 Literární řešerše

3.1 Stres a stresové faktory u rostlin

Rostliny reagují na změny prostředí, které se pravidelně mění s denním i s ročním obdobím. Jsou ale také vystaveny množství faktorů, které zasahují do jejich růstu a vývoje (Fotopoulos, 2020). Neobvyklé změny v rostlinách vyvolávají stres, a tak dochází ke změně fyziologického stavu a narušení rovnováhy v rostlinném organismu (Jaleel et al., 2009).

Faktory, které nepříznivě působí na rostliny označujeme jako stresory. Často dochází k současnému působení několika faktorů vzájemně. Může se jednat např. o sucho, které je spojené s vysokou teplotou a vysokým ozářením. Dalším příkladem mohou být kyselé znečišťující látky spojené s nízkou kyselostí půdy nebo záplavy spojené s degradací půdy. Protože jsou rostliny vystaveny těmto faktorům, došlo u nich k vytvoření mechanismů, které umožňují zvládnutí stresu. Mezi konkrétní příklady přizpůsobení rostlin stresorům můžeme považovat stromy s vlnkovými korunami na hřebenech hor nebo zakrslé formy stromů a bylin na hadcových podložích, u kterých jsou kořeny ukotveny v půdě s extrémním obsahem hořčíku limitujícím jejich růst (Tomášková a Kubásek, 2016).

Činitele stresu rozlišujeme na abiotické (environmentální) a biotické (biologické). Abiotické stresory nejčastěji zahrnují změny teplot, změny množství vody, mezi něž patří sucho a záplavy, dále pak nedostatek nebo nadbytek živin, salinita, změny kyselosti půdy a ozářením. Také mezi ně řadíme mechanická poškození a poškození spojená s toxickými látkami. Abiotické stresory se výjimečně vyskytují samostatně, obvykle se jedná o současný účinek několika faktorů (Jaleel et al., 2009; Cramer et al., 2011). Mezi biotické stresové faktory patří poškození vyvolané jinými organismy např. zvěří nebo rostlinnými patogeny (Tomášková a Kubásek, 2016).

3.1.1 Reakce rostlin na působení stresu

Protože se rostliny nemohou pohybovat stejně jako živočichové, vytvořili si množství obranných mechanismů (Fotopoulos, 2020). Mezi tyto mechanismy patří fenotypové změny, někdy také označovány jako aklimace. Jedná se o důsledek krátkodobého působení stresoru a změny nejsou trvalá (Tomášková a Kubásek, 2016).

Takovou obrannou reakcí může být zvýšení aktivity některého enzymu nebo tvorba specifických metabolitů. Aklimační změny na nízké teploty zahrnují hromadění osmoticky aktivních látek, tvorbu chladových proteinů, tvorbu antioxidantních enzymů a změny chemického složení lipidové vrstvy membrán. V ní se zvyšuje množství nenasycených mastných kyselin snižujících kritické teploty přechodu lipidů do gelového stavu (Gloser, 1998).

Dlouhodobé změny označujeme jako adaptace a usnadňují přežívání populace v podmínkách daného prostředí. Tyto změny jsou geneticky podmíněné a získané během generací rostlin, které jsou pod vlivem působení stresových podmínek. Dochází k zvýšení frekvencí těch alel, které pomáhají rostlinám k lepšímu přežívání a postupnému vymizení neúčinných variant genů. (Tomášková a Kubásek, 2016). Mezi adaptivní změny při nízkých teplotách patří morfologické změny např. zmenšení nadzemních částí, ale i fyziologické změny např. snížení obsahu vody (konifera *Pinus strobus* a *P. limba*) nebo přeměna škrobu v cukr (*Betula sp.* a *Tilia sp.*) (Slavíková, 1986), případně vytvoření fytohormonů nebo regulačních mechanismů (Tomášková a Kubásek, 2016).

Sledování a pochopení reakce rostlin na stres je jedním z aktuálních témat studie rostlin. Zejména protože abiotické stresy, jako je sucho, silně ovlivňují geografickou distribuci rostlin a zemědělskou i lesní produkci (Li a Cui, 2014).

3.1.1.1 Stres způsobený suchem

Při stresu, který je způsobený suchem se jako první signál projevuje osmotický stres jako reakce na nedostatek vody. Následně dochází ke snížení turgoru buněk, který se projeví vadnutím rostliny a zastavením růstu buněk. Dlouhodobě pak může docházet až k plazmolýze buněk. Druhotný signál je komplexnější a zahrnuje oxidativní stres, poruchu buněčných komponent a metabolickou dysfunkci (Tomášková a Kubásek, 2016).

K podobným reakcím dochází i při stresu způsobeném zvýšenou salinitou nebo chladem, ten je doprovázen také snížením obsahu vody. Společným rysem těchto typů stresu je hyperosmotický signál, který zvyšuje kumulaci fytohormonu – kyseliny abscisové (ABA) (Zhu, 2016). Ta vyvolává další adaptivní odpovědi organismu jako např. uzavírání průduchů (Řepková, 2013; Zhu, 2016).

Reakcí rostlin na poškození je i snížení rychlosti fotosyntézy, a naopak se zvyšuje aktivita hydrolytických enzymů a roste množství osmoticky aktivních metabolitů (Tomášková a Kubásek, 2016) zejména polysacharidů. Jako osmotika působí i proteiny označované DHN, jejichž syntézu indukuje ABA (Řepková, 2013).

3.1.1.2 Stres způsobený nízkými teplotami

Nízké teploty patří mezi nejčastější abiotické stresory, které ovlivňují růst rostlin a jejich produktivitu (Puhakainen et al., 2004). Často ovlivňují rostliny i během vegetačního období (Tomášková a Kubásek, 2016). Většina rostlin mírného podnebí získává toleranci na chlad pomocí aklimatizace po vystavení chladu s využitím regulace genové exprese. Nejčastěji pak vzniká tolerance k extracelulární tvorbě krystalů ledu ve vegetativních tkáních (Chinnusamy et al., 2007) ke kterému dochází při snížení teploty pod bod mrazu. Nejprve se krystaly tvoří v mezibuněčných prostorech a celkově dochází ke ztrátám aktivní vody (Řepková, 2013). Aklimatizace také zahrnuje remodelaci buněk a tkání a přeprogramování metabolismu a genové exprese (Chinnusamy et al., 2007; Zhu, 2016).

Během působení chladu dochází ke ztrátě schopnosti rychlého růstu, dále dochází vadnutí až uhynutí. Narušují se procesy fotosyntézy, dýchání a zastavuje se proudění cytoplazmy a dochází ke změně permeability membrán (Řepková, 2013). Stres z nízkých teplot má podobný charakter jako stres z nedostatku vody (Tomášková a Kubásek, 2016).

Mnoho rostlin na nízké teploty také reaguje expresí genů reagujících na chlad s ochrannou funkcí např. enzymů pro biosyntézu osmoprotektantů, proteinů pozdní fáze embryogeneze (LEA), protimrazových proteinů nebo chaperonů (Puhakainen et al., 2004; Řepková, 2013; Zhu, 2016). Dále se zvyšuje množství osmotických látek jako jsou cukry, prolin, organické kyseliny a aminokyseliny (Řepková, 2013; Tomášková a Kubásek, 2016). Jasná korelace mezi těmito geny a klimatickými změnami není stále jasná, navíc není identifikována ani dráha vedoucí k toleranci chladu (Puhakainen et al., 2004). Známá je regulace genů působením ABA, jejichž tvorbu podmiňují nízké teploty. ABA pak zvyšuje toleranci k chladu u širokého spektra rostlinných druhů (Řepková, 2013).

3.2 Genová exprese

Jako genová exprese se označuje přenos genetické informace v buňkách z deoxyribonukleové kyseliny (DNA) přes RNA do proteinů. Genetická informace je uložena v DNA ve formě sekvencí nukleotidů a do dalších generací je přenášena při replikaci DNA (Alberts, 1998).

DNA podmiňuje vznik proteinů, které jsou jednou ze základních složek buněk určujících jejich strukturu i funkci. Vlastnosti a funkce proteinů jsou dány pořadím aminokyselinových sekvencí, z nichž jsou složeny. Genetická informace musí tedy určovat aminokyselinovou sekvenci proteinu (Alberts, 1998).

3.2.1 Transkripce

Tvorba konkrétního proteinu začíná přepisem genetické informace z DNA do molekuly RNA. Dojde k rozvolnění dvojšroubovice DNA a jeden z řetězců složí jako templát pro tvorbu RNA. Následuje komplementární párování bází a vzniká RNA s příslušnou nukleotidovou sekvencí podle templátového řetězce DNA. Tento proces se označuje jako transkripce - přepis genetické informace z DNA do RNA (Alberts, 1998).

Vzniklá molekula RNA se označuje jako mediátorová RNA (mRNA/ také messenger RNA). Nese informaci pro strukturu a syntézu polypeptidového řetězce (Snustad et al., 2017). V buňce vznikají i další typy RNA např. ribosomální RNA (rRNA), která tvoří součásti ribosomů, na kterých z mRNA vznikají proteiny. Dalším typem je transferová RNA (tRNA), vyskytující se ve dvaceti variantách, kdy každá zapojuje jednu specifickou aminokyselinu (AMK) do polypeptidového řetězce během translace (Alberts, 1998).

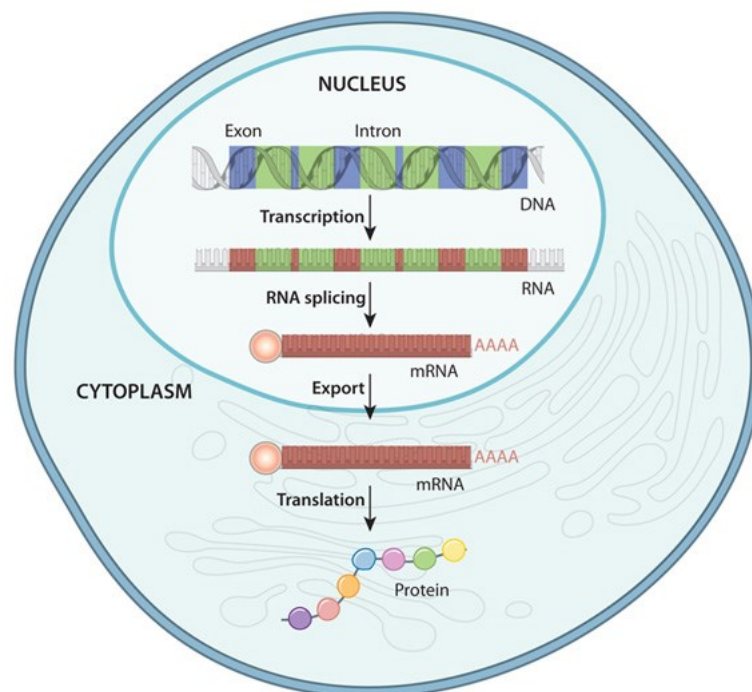
3.2.2 Translace

Jako translace se označuje přepis genetické informace z RNA do proteinové sekvence na ribozomech (Alberts, 1998). Ribozomy jsou složité makromolekulární struktury v cytoplazmě. Na translaci se podílí všechny tři výše uvedené typy RNA vzniklé během transkripce (Snustad et al., 2017). Molekula mRNA slouží k syntéze nových proteinů za přítomnosti iniciačních faktorů a příslušných tRNA, které zajišťuje správné zařazení AMK podle templátu mRNA (Snustad et al., 2017). Vznikající proteiny jsou

složeny z AMK. K zapojení AMK do proteinové sekvence dochází pomocí tzv. genetického kódu (Alberts, 1998).

Genetický kód je soubor pravidel, podle kterých se genetická informace z nukleotidové sekvence přenáší do aminokyselinové. Na ribozomech se sekvence nukleotidů čte ve formě tripletů tzv. kodonů, ty se poté překládají jako jednotlivé AMK. Několik různých kodonů může určovat stejnou AMK, ale také nemusí mít přiřazenou žádnou. Takové triplety se poté označují jako terminační (stop) kodony a určují ukončení translace, uvolnění peptidu a rozpad translačního komplexu. Triplet AUG má funkci opačnou, tj. iniciační a zahajuje translaci. Existují ale i další triplety, které mohou ve speciálních případech také fungovat iniciačně (Alberts, 1998, Snustad et al., 2017).

Po dokončení tvorby proteinů dochází k posttranslačním modifikacím např. chemická modifikace AMK, tvorba disulfidických můstků, tvorba glykoproteinů (Albert, 1998) a k jeho sbalení do přesné trojrozměrné struktury. Následně může dojít k realizaci funkce proteinů v buňce (Snustad et al., 2017). Pomocí těchto procesů uskutečňuje buňka své genetické instrukce (Alberts, 1998).



Obrázek 1. Přenos genetické informace z DNA do proteinů v eukaryotních buňkách (O'Connor et Adams, 2010).

3.2.3 Regulace genové exprese

Buňka má schopnost regulace genové exprese. Prokaryota i eukaryota jsou schopny zapínat a vypínat expresi jednotlivých genů, a zároveň mají schopnost koordinovat expresi větších celků genů. Eukaryotní buňky využívají několik regulačních proteinů ke kontrole každého genu a mohou rychle rozhodovat a kontrolovat expresi celých skupin genů. Obvykle se realizuje s využitím krátkých regulačních sekvencí DNA na chromozomu. Hlavní regulační funkci může mít ale i jen jediný regulační protein (Alberts, 1998).

Hlavní úrovní, na které se reguluje proces transkripce je její iniciace. U prokaryot dochází k vazbě promotoru na DNA, obsahující informace o začátku transkripce. Následně dojde k rozvolnění dvojšroubovice a k syntéze řetězce RNA. Až do ukončení a uvolnění obou molekul, které jsou iniciovány oblastí zvanou terminátor. Bakteriální DNA se nachází volně v cytoplazmě stejně jako ribozomy, na kterých transkripce probíhá. U eukaryot je transkripce složitější. Probíhá v jádře, kde je i DNA, ale ribozomy se nacházejí v cytoplazmě. Vznikající RNA proto musí být nejprve transportována do cytoplazmy, a to až po tzv. posttranslačních úpravách. V jádru se jedná hlavně o přidání čepičky a polyadenylaci, které mají vliv na stabilitu a translaci (Alberts, 1998; O'Connor et Adams, 2010). Eukaryotní geny ale navíc obsahují úseky, které nejsou součástí zralé RNA (O'Connor et Adams, 2010). Patří mezi ně kódující úseky tzv. exony a nekódující sekvence tzv. introny. K odstranění nekódujících intronů musí dojít dříve, než mRNA opustí jádro. Po dokončení modifikací může být RNA transportována do cytoplazmy (Alberts, 1998; O'Connor et Adams, 2010).

3.2.3.1 Konstitutivní, inducibilní a represibilní geny

Rozlišujeme geny podle jejich potřeby v organismu. Mezi základní geny exprimované neustále patří konstitutivní geny (také housekeeping). Zahrnují geny pro tRNA, rRNA nebo ribozomové proteiny. Jedná se o geny potřebné pro základní přežití organismu. Ostatní jsou exprimovány jen za určitých životních podmínek. Jsou zodpovědné za reakci na změny a schopnost přizpůsobit se. Označují se jako inducibilní a represibilní geny. Jejich syntéza je řízena příslušným regulačním systémem (Alberts, 1998).

3.2.3.2 Operony

Operony jsou skupiny genů, které jsou přepisovány do jedné molekuly RNA. Běžné jsou u prokaryot, u eukaryot je každý gen regulován samostatně. Zahrnují strukturní geny, operátor a promotor (Alberts, 1998).

Promotor obsahuje iniciační místo, kde začíná transkripce vazbou RNA polymerázy. Oblast operátoru se označuje jako regulační sekvence a řídí zapínání a vypínání genů, tedy zesiluje nebo inhibuje vazbu RNA polymerázy. Kratší regulační sekvence jsou obvyklé u prokaryot. Dlouhé sekvence poté u eukaryot, ty mohou odpovídat i na více různých signálu. Kontrolu transkripce řídí také regulační proteiny tzv. represory, které jsou rozpoznávány regulačními sekvencemi (Alberts, 1998; O'Connor et Adams, 2010). Některé regulační proteiny mohou ovlivnit transkripci více genů, díky existenci více regulačních vazebných míst (O'Connor et Adams, 2010). V případě inducibilních operonů, se po vazbě represoru na operátor transkripce genů vypíná. U represibilních operonů je transkripce vypnutá pouze v případě korepresoru, což je komplex represoru a efektorové molekuly (Alberts, 1998).

Příkladem regulace genové exprese je Lac operon u bakterie *E. coli*. Tento operon obsahuje geny pro enzymy umožňující transport a štěpení laktózy. Nachází-li se *E. coli* v prostředí bez laktózy, jsou tyto enzymy bez využití. Pokud tedy laktóza přítomna není, je transkripce Lac operonu utlumena Lac represorem. *E. coli* tedy využívá regulačních mechanismů podle přítomnosti nebo nepřítomnosti laktózy v médiu. Jde o příklad indukce genů, tedy zapnutí exprese genů jako podnět na látku v prostředí (Alberts, 1998).

Příkladem represibilního operonu může být Trp operon, obsahující geny pro syntézu tryptofanu. Pokud je v prostředí dostatečné množství tryptofanu, působí jako efektorová molekula a váže se na represor. Dojde ke změně struktury represoru, která umožní vazbu na operátor. Při vzniku vazby represor-operátor dochází k alosterické modulaci a k vypnutí genu pro syntézu tryptofanu (Alberts, 1998).

U eukaryot je regulace složitější, protože obsahují vysoký počet genů, které jsou exprimovány v různých tkáních (Alberts, 1998). Obecně obsahují i větší množství regulačních proteinů a jejich vazebných míst (O'Connor et Adams, 2010). Složitější je také díky obsahu chromozomů a díky rozdílnému uspořádání informací v buňce, tj. obsah DNA v jádře a regulátorů v cytoplazmě (Alberts, 1998). Expres eukaryotických genů je obvykle regulována kombinací několika regulačních proteinů, které působí společně

a umožňují tak větší flexibilitu při kontrole genové exprese (O'Connor et Adams, 2010). Takovými vnitřními signály u rostlin mohou být rostlinné hormony, auxiny, cytokininy, ABA a další. Regulačně působí přímo na úrovni transkripce, ale i na jiných úrovních např. modifikačním vlivem na regulační proteiny (Řepková, 2013).

3.3 Stresové proteiny

Reakcí rostlin na stres je spuštění složité a komplexní regulační sítě zahrnující produkci signálních molekul včetně stresových hormonů, reaktivních forem kyslíků, fytochromů a vápníku a následných regulačních faktorů, zejména pak transkripčních faktorů. Mezi nejčastější stresové hormony patří již zmiňovaná ABA, dále reaktivní formy kyslíku či oxid dusný a další. Signální molekuly spouští transkripční reakce a regulují enzymovou aktivitu. Tyto odezvy se poté podílí na obraně rostlinného organismu proti stresovým faktorům (Beck, 2007; He, 2018). Tvorba látek regulujících genovou expresi je ovlivňována vnějším prostředím rostliny (Řepková, 2013).

3.3.1 LEA proteiny

Proteiny pozdní fáze embryogeneze – *late embryogenesis abundant* (LEA) byly prvně identifikovány před 30 lety v semenech bavlníku během pozdních fází vývoje embrya. Od té doby byly detekovány v kořenech, listech, květech i ostatních tkáních rostlin. Široce rozšířené jsou u vyšších rostlin, ale byly nalezeny v lišejnících, houbách, bakteriích, a dokonce i u některých bezobratlých živočichů (Jin et al, 2019). Jsou syntetizovány zejména během embryonálního vývoje, ale také hrají důležitou roli v odpovědi na abiotický stres. Hlavně na stres způsobený salinitou a dále suchem a teplem (Puhakainen et al., 2004; Jin et al, 2019).

Podle struktury, aminokyselinových sekvencí a fylogenetického vztahu se dělí do 8 skupin. Do dnešní doby však nebylo stanoveno jednoznačné a univerzální klasifikační kritérium. Do jedné ze skupin LEA proteinů patří DHN (Puhakainen et al., 2004; Jin et al., 2019).

3.3.2 Dehydriny

Již jsme zmínili, že DHN biochemicky patří mezi stresové proteiny skupiny LEA proteinů. Charakteristickým znakem je přítomnost segment obsahující velké množství lysinu (Kosová et al., 2007). Jedná se o proteiny, které jsou přítomné v téměř všech organismech. U rostlin se obvykle vyskytují v semenech, jsou však přítomné i ve vegetativních tkáních. Vyskytují se v rozdílných buněčných kompartmentech jako jsou mitochondrie, vakuoly, nalézt je lze i v okolí plazmatické membrány. Nicméně největší zastoupení mají v cytoplazmě a jádře (Rorat et al., 2006; Hanin et al., 2014).

3.3.2.1 Struktura a vlastnosti

DHN jsou hydrofilní, termostabilní proteiny o velikosti 9-200 kD, které ve své struktuře obsahují množství glycinových a lysinových reziduí (Yang et al., 2012). Typicky obsahují sekvence označené K-, S- a Y-segmenty (Beck et al., 2007). Tyto segmenty lze identifikovat podle uspořádání aminokyselin. Obecně podle jejich počtu a uspořádání se DHN rozdělují do několika poskupin (Puhakainen et al., 2004; Rorat et al., 2006; Beck et al., 2007; Yang et al., 2012; Hanin et al., 2014)

Všechny DHN obsahují alespoň jeden K-segment, který je obvykle lokalizovaný blízko C-konce proteinu. K-segment je tvořen α -helixovou strukturou složenou z 15 aminokyselin. Helixová struktura může stabilizovat membrány a proteiny během stresových podmínek. Jedná se o segment bohatý na lysin (Kosová et al., 2007; Yang et al., 2012; Liu et al., 2017). Díky hydrofobním skupinám K-segmentu mohou DHN pravděpodobně v buňkách působit jako emulgátory nebo chaperony. Díky interakci s membránami je mohou chránit před nepříznivým působením dehydratace (Kosová et al., 2007)

Dalším specifickou částí DHN jsou S-segmenty. Ty obsahují množství serotoninu, který může být modifikován fosforylací. Fosforylace napomáhá vazbě na specifické signální peptidy a jejich translokaci do jádra (Kosová et al., 2007; Yang et al., 2012; Liu et al., 2017). Akumulace DHN byla prvně pozorována v embryonální tkáni kukuřice seté (*Zea mays*) po aplikaci ABA (Kosová et al., 2007). S-segment fosforylován proteinkinázou umožňuje tvorbu iontových vazeb, a tím získává schopnost vázat ionty kovů (Liu et al., 2017).

Y-segmenty jsou obvykle lokalizovány v N-terminálním konci dehydrinů. Vykazují podobnost s vazebnými místy nukleotidů pro rostlinné a bakteriální chaperony. Nicméně ještě nejsou žádné experimentální důkazy potvrzující vazbu Y-segmentů na nukleotidy (Yang et al., 2012; Liu et al., 2017).

Mezi specifické segmenty DHN patří např. segment bohatý na polární aminokyseliny. Ten se označuje jako Φ -segment. Je velmi variabilní a vyskytuje se různě v jednotlivých DHN (Hanin et al., 2006). Tento segment má nahodile zavlnitou strukturu a schopnost tvořit polární peptidové vazby. To umožňuje vázat značné množství molekul vody (Kosová et al., 2007). Mezi další objevené funkce jednotlivých segmentů patří např. schopnost vazby na DNA a RNA (Yang et al., 2012).

3.3.2.2 Funkce a mechanismus účinku

Jejich exprese je vyvolána různými faktory prostředí (Kosová et al., 2007). Jasná funkce DHN však ještě není známá. Nastíněná je schopnost některých podrodin DHN. Ty se dokážou vázat na lipidové vezikuly obsahující kyselé fosfolipidy nebo se mohou vázat na kovy a mohou fungovat jako scavengery hydroxylových radikálů, čímž přispívají k protekci lipidových membrán proti peroxidaci (Rorat et al., 2006).

Potvrzená je exprese DHN jako reakce na abiotický stres spojený s dehydratací buněk. Významnou roli hrají zejména při adaptaci rostlin na teplo a sucho, chlad a mráz nebo zvýšená salinita prostředí (Kosová et al., 2007). Akumulace byla prokázána například u rostlin *Populus popularis* vystaveným suchu (Rorat et al., 2006; Hanin et al., 2014). Přesný mechanismus ochrany rostlin před poškozením stále není jasný. Nicméně se předpokládá že působí jako chaperony, a to prostřednictvím stabilizace membrán (Yang et al., 2012; Puhakainen et al., 2004). Tím se zabrání agregaci anebo inaktivaci proteinů, které jsou způsobeny dehydratací nebo vysokými teplotami (Yang et al., 2012). Připisuje se jim funkce kryoprotektantů a osmoregulátorů. Předpokládá se i schopnost vazby iontů, zejména vápenatých, a tak mohou působit jako pufry (Puhakainen et al., 2004).

3.3.2.3 Dehydriny v dřevinách

Sledování role DHN v extrémně nízkých teplotách probíhala na jehlicích sibiřského smrku (*Picea obovata Ledeb.*). Tato studie využívala vazby DHN na protilátky K-segmentů s využitím polymerázové řetězcové reakce (PCR). Identifikovány byly DHN, které byly přítomny již během pozdního vegetačního období a rychle se kumulovaly během aklimatizace a po jejím skončení jejich hladiny naopak rychle klesaly. Jiné třídy DHN se objevily až během procesu aklimatizace a ve stejných hladinách byly detekovány po celou dobu působení nízkých teplot. Výsledky potvrdily hypotézu ochranné role DHN před extracelulárním zmrazením buněk a tkání a intracelulární dehydratací (Kjellsen et al., 2013). Akumulace DHN v chladném prostředí byla zjištěna i na jehličí borovice lesní (*Pinus sylvestris*) (Korotaeva et al., 2017). Indukce exprese DHN v reakci rostlin na stres způsobený chladem byla sledována již u mnoha druhů dřevin např. bříza bělokora (*Betula pendula*), bříza pýřitá (*Betula pubescens*) a smrk sivý (*Picea glauca*), ale také u hospodářských plodin jako je pšenice setá (*Triticum aestivum*) a brukev řepka (*Brassica napus*), či u ovocných stromů např. broskvoň obecná (*Prunus persica*) (Kosová et. al, 2007).

Studie na jehličí a kůře smrku ztepilém (*Picea abies*) odhalila korelaci mezi DHN a suchem. Některé třídy DHN byly signifikantně nadregulovány v reakci na sucho, jiné byly naopak sniženy. Poměry tříd DHN proto můžou potenciálně sloužit jako markery stresu ze sucha (Eldhuset et al., 2013). Studie Čepla et al. (2020) zjistila odlišnou expresi DHN u různých ekotypů *Picea abies* v závislosti na přírodních podmínkách. Zjištěna byla korelace mezi expresí DHN a srážkami, délkou dne a teplotou.

Signifikantní zvýšení hladin DHN bylo zaznamenáno u jedle bělokora (*Abies alba*) jako reakce na stres způsobený suchem (Behringer et al., 2015). Že DHN hrají významnou roli v toleranci vůči suchu u smrků a dalších dřevin z rodu borovicovitých (*Pinaceae*) potvrdila studie Stival Sena et al. (2017).

3.4 Detekce exprese dehydrinů

3.4.1 Reverzní transkripce

Pro detekci exprese dehydrinových genů je třeba RNA převést na DNA. Enzym reverzní transkriptáza (RT) umožňuje přepis RNA do cDNA, tj. jednořetězcová komplementární DNA (cDNA). Tu lze dále použít pro PCR. Spojení těchto metod se označuje jako PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR).

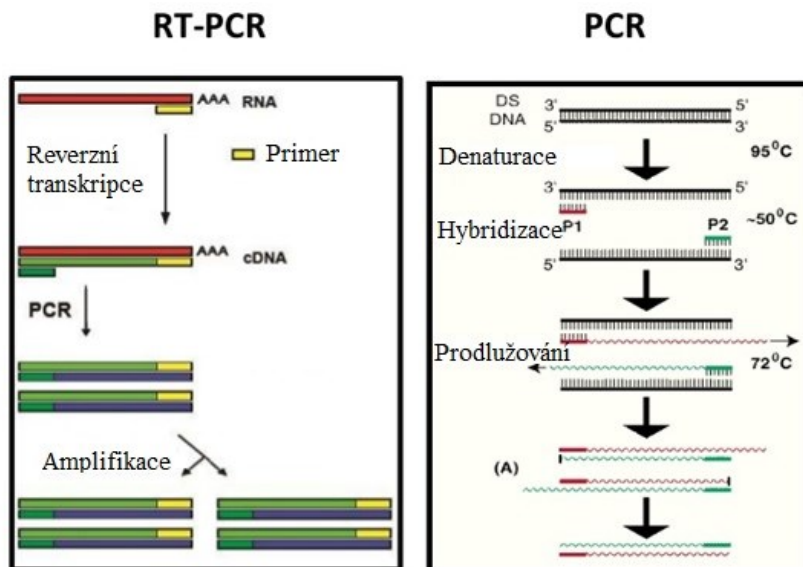
3.4.2 PCR

Polymerázová řetězcová reakce je metoda umožňující amplifikaci DNA. Lze ji využít pro DNA z různých druhů, tkání a organismů, včetně biologického materiálu. Umožňuje prakticky neomezeně zmnožit požadovaný úsek DNA, i za použití extrémně malého množství původního vzorku. Jedná se proto o velmi citlivý test. Vysokým rizikem je však kontaminace, je proto třeba pracovat za velmi přísných podmínek, tak aby bylo kontaminaci zabráněno (Garibyan et Avashia, 2013).

Principiálně využívá termostabilní DNA polymerázy, izolované z bakterie *Thermus aquaticus*, přivyklé k životu ve vysokých teplotách. Tento enzym je schopný zapojovat jednotlivé nukleotidy za vzniku nového vlákna DNA, které je komplementární k vlákně templátu. Zapotřebí je k tomu templátová DNA, primery, nukleotidy a zmiňovaná DNA polymeráza. Primery jsou krátké fragmenty DNA s definovanou sekvencí komplementární k cílové DNA. To umožňuje, pomocí konkrétních primerů, vymezit určitou sekvenci templátu, kterou chceme sledovat (Garibyan et Avashia, 2013).

PCR probíhá za pomoci cyklických změn teplot, obvykle ve třech základních krocích (~ 95 °C, ~ 60 °C, ~ 75 °C). Prvním krokem je zahřátí nad teplotu tání. To umožní oddělení řetězců DNA tzv. denaturaci. V druhém kroku se teplota sníží, aby došlo k vazbě specifických primerů na cílové segmenty DNA tzv. hybridizace. Třetím krokem je opět zvýšení teploty. Tím dojde k aktivaci DNA polymerázy, která prodlužuje primery přidáváním nukleotidů (Garibyan et Avashia, 2013). Tak se dosáhne přepisu řetězce DNA *in vitro*. S každým opakováním se počet kopírovaných molekul DNA přibližně zdvojnásobí, roste tedy exponenciálně. Obvykle se využívá 30 - 40 opakování těchto třech kroků. V prvním cyklu opakování vznikají řetězce nespecifické délky a syntéza je

ukončena při změně teploty. V dalších cyklech již vznikají řetězce specifické délky a teoreticky dochází k zmnožení geometrickou řadou.



Obrázek 2. Polymerázová řetězcová reakce spojená s reverzní transkripcí, upraveno podle Dr. Mohiuddin Kabir.

3.4.3 Real-time PCR

Kvantitativní nebo-li real-time PCR (qPCR) umožňuje detekci i kvantifikaci vznikajícího produktu PCR, a to v reálném čase během syntézy DNA. Nejčastější metodou je detekce fluorescence. S pomocí fluorescenčních látek, které mohou být nespecifické nebo sekvenčně specifické. Záření je z nich uvolněno v závislosti na množství produktu (Garibyan et Avashia, 2013).

Během procesu amplifikace DNA se monitoruje fluorescenční signál, a to během každého cyklu PCR. Z počátku je fluorescenční odezva malá, protože je ve vzorku malé množství DNA. Zároveň je třeba zvolit prahovou hodnotu odpovídající hluku na pozadí. Postupně dochází k exponenciálnímu růstu množství produktu (obvykle 1,8 - 1,9 znásobení) a fluorescenční signál prudce stoupá. Později se dosáhne tzv. plató fáze a signál je relativně konstantní, to může být díky vyčerpání stavebních jednotek ve vzorku (Holden et Wang, 2008). Po překročení prahové fluorescence lze odečíst původní množství RNA. Pro absolutní kvantifikace lze využít standardů DNA nebo RNA. Typicky se využívá tzv. housekeeping genů s více méně stálou hladinou exprese.

3.4.4 Výhody PCR

Výhodou PCR je její jednoduchost a rychlost. Jedná se o vysoce citlivou metodu s velkým množstvím vzniklého produktu. A má velice široké využití. Metoda má však i svá omezení. Patří mezi ně vysoké riziko kontaminace vzorku i stopovým množstvím DNA, které následně může vést k nepřesným výsledkům. Náročná je i příprava primerů, kterému musí předcházet znalost sekvence dat. PCR lze proto využít pouze k identifikaci již známých genů. Dále se primery mohou navázat na sekvence, které jsou podobné, ale ne zcela identické s cílovou sekvencí DNA. Riziko, i když velmi nízké, přináší i nukleotidy, které mohou být DNA polymerázou nesprávně zařazeny do sekvencí (Garibyan et Avashia,2013).

Výhodou využití qPCR pro detekci exprese dehydrinových genů je rychlost, specifita a spolehlivost. Míra exprese genů odpovídá na aktuální stresové podmínky působící na rostlinu. Zároveň lze odhalit stres, který ještě není zjistitelný na jiných úrovních.

3.5 Rostliny použité pro práci

3.5.1 Topol osika (*Populus tremula* L.)

Topol osika patří do čeledi vrbovité (*Salicaceae*). Jedná se o druh rozšířený téměř po celé Evropě, dále v Malé Asii a severní Africe, přes střední Asii až na Dálný Východ. V České republice roste v nížinách i v horských oblastech a nejrozšířenější je v pahorkatinách (Dorušková, 2009; Horáček, 2007). Mezi topoly patří osika k nejrozšířenějšímu druhu.



Obrázek 3. Rozšíření topolu osika. autor Giovanni Caudullo, CC BY 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>>, via Wikimedia Commons [cit. 12. 4. 2021]

Jedná se o poměrně odolnou dřevinu, která roste i na obnažených půdách a pasekách. Je světlomilný, odolný mrazu a k půdním změnám. Roste na vlhkých i suchých půdách, nejčastěji na písčitohlinitých a na živiny bohatých (Dorušková, 2009).

Je to strom vysoký 15 - 35 m s řídkou korunou. Borka v mládí je hladká. Listy jsou okrouhlé až okrouhle vejčité a 3 - 12 cm dlouhé. Zubaté listy jsou při rašení plstnaté, ale velmi brzy celé lysé. Na rubu jsou modravé a na podzim žluté nebo červené. Kvete na konci března a v dubnu. Roste velmi rychle a dožívá se i 150 let (Dorušková, 2009; Horáček, 2007).

Z domácích topolů má nejkvalitnější dřevo. Používá k výrobě dých, zápalek a celulózy. Využívá se k výsadbě na rekultivované plochy (Dorušková, 2009). Využití má zejména jako dřevina přípravná na kalamitních holinách. Pěstována je na plochách, kde není možné dosáhnout úspěšné obnovy a odrůstání cílových dřevin. Hlavní funkcí je

biologická příprava ploch nebo může být využívána při zalesňování zemědělské půdy. Obnova cílovými dřevinami poté probíhá pod porostem osiky, nebo po jejich smýcení (Čížková et al., 2020).



Obrázek 4. Přirozené zmlazení osiky náletem semen na čerstvé holině, autor
Lud'ka Čížková

4 Metodika

4.1 Materiál, pomůcky a přístroje

- automatické pipety, reakční destičky, rukavice, špičky, mikrozkušavky, homogenizační kuličky, psací potřeby, pinzety
- centrifuga, homogenizátor, inkubátor, laminární box, termocykler, třepačka
- ethanol, dithiotreitol (DTT)
- GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit, #K0801, Thermo Fisher Scientific
 - lyzační roztok rostlinné RNA
 - promývací pufr 1 (WB1)
 - promývací pufr 2 (WB2)
 - sběrné zkumavky s filtry
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Thermo Fisher Scientific
 - pufr
 - směs deoxynukleotidtrifosfátů (dNTPs)
 - směs primerů
 - RT 50 U/ μ L
 - inhibitor RNáz 100 μ L
- biologický materiál
 - Topol osika (*Populus tremula L.*)

4.2 Zisk a příprava biologického materiálu

Použité rostliny topolu osika byly jednoleté, koupené ze školky. Následně byly přesazené do sadbovačů a jako substrát se použila rašelina. Rostliny byly zalévány dvakrát týdně. Stresované rostliny byly zcela bez zalévání. Vzorky byly odebírány po týdnu po dobu jednoho měsíce.

Rostlinný materiál - list se ihned po utrnutí vložil do tekutého dusíku (-80 °C), z důvodu rychlé degradace RNA. Při této teplotě se v hlubokomrazícím boxu materiál udržoval až do provedení analýzy. I zde ale RNA po několika měsících bez stabilizátorů degraduje.

4.3 Izolace RNA

4.3.1 Lýza buněk z rostlinného materiálu

Do připravených zkumavek se vloží rostlinná tkáň spolu s homogenizačními kuličkami. Zkumavky se zmrazí v tekutém dusíku a následně vloží do homogenizátoru na 1 min, kde dojde k nadrcení rostlinné tkáně.

4.3.2 Izolace RNA z rostlinného materiálu

Pro izolaci RNA se využila souprava Thermo Scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit.

Připraví se roztok pro extrakci RNA s dithiotreitem (DTT), a to z 10 µl 2M DTT a 500 µl lyzačního roztoku pro rostlinnou RNA. Vzniklá směs nesmí obsahovat sraženiny. Pokud je obsahuje, roztok se zahřeje na 37 °C a následně zchladí zpět na 25 °C.

Do mikrozkušavek se k homogenizované rostlinné tkáni přidá 500 µl lyzačního roztoku RNA s DTT. Následně se zkumavky zvertexují a inkubují po dobu 3 min při teplotě 56 °C. Poté se na centrifuze stáčí 5 min při 14 000 rpm. Vzniklý supernatant (450 - 550 µl) se přenesení do zkumavky a smísí s 250 µl 96 % ethanolu. Směs se napipetuje do filtrů ve sběrných zkumavkách. Ty se stočí 1 min při 11 000 rpm. Roztok, který přejde přes filtr se odstraní. Molekuly RNA jsou nyní navázané na strukturu filtru. Na filtr se přidá 700 µl promývacího pufru WB1 a opět se stočí 1 min při 11 000 rpm. Roztok, který přejde přes filtr se odstraní. Stejný postup se dvakrát zopakuje s 500 µl

promývacího pufru WB2, pro druhé stočení se použije 14 000 rpm. Promytý filtr se vloží do 1,5 ml sběrné zkumavky bez RNáz. Ke vzorku se přidá 50 μ l vody čisté nukleáz pro uvolnění RNA a zkumavky se stočí 1 min při 11 000 rpm. Tím se molekuly RNA z filtru uvolní. Po odstranění filtru se přečištěná RNA použije okamžitě nebo se může skladovat při -20 °C. Při další práci se RNA udržuje na ledu.

4.4 RT-PCR

4.4.1 Reverzní transkripce

Pro práci se využila souprava High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits.

Na ledu se připraví RT směs: 2 μ l RT pufr, 0,8 μ l 0,1M směs deoxynukleotidtrifosfátů (dNTPs), 2 μ l různých primerů, 1 μ l RT, 1 μ l inhibitor RNáz, 3,2 μ l vody čisté nukleáz. Napipetuje se 10 μ l RT směsi do každé jamky na reakční destičce. Ke každé se přidá stejné množství (10 μ l) vzorku RNA a promísí se. Destička se uzavře a krátce stočí. Do vlastního měření se destička uchovává na ledu.

Reverzní transkripce probíhá v termocykleru ve čtyřech krocích dle tabulky č. 1. Vzniklá cDNA se může hned použít pro qPCR nebo může být uchována dlouhodobě při teplotě -15 °C až -25 °C.

Tabulka 1. Podmínky termocykleru pro RT

	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4
Teplota [°C]	25	37	85	4
Čas [min]	10	120	5	∞

4.4.2 qPCR

Pro reakci qPCR se použijí housekeeping referenční geny pro aktin, DHN a poDHN. Dehydrinové geny poDHN patří do skupiny genů analyzovaných v topolu. Tyto referenční geny byly připravené podle Bae et al. (2009).

Do každé mikrokumavky na 96 jamkové destičce se přidá 6 μl qPCR 2x SYBR Master Mixu (Top-Bio), dále specifické primery 1,2 μl 5' primerů a 1,2 μl 3' primerů (5 pmol/ μl), dále 1 μl analyzované cDNA, 2,1 μl vody a 0,5 μl ROX (Top-Bio). Pro každý vzorek se připraví tři technické replikáty. Destička se vloží do termocykleru, který je nastaven na optimalizované podmínky: 10 min při 95 °C, 15 s při 94 °C a 1 min při 60 °C. Poslední dva kroky se opakují 40krát. Všechny úrovně genové exprese jsou normalizovány na genovou expresi aktinu, vybraného jako vnitřní standard.

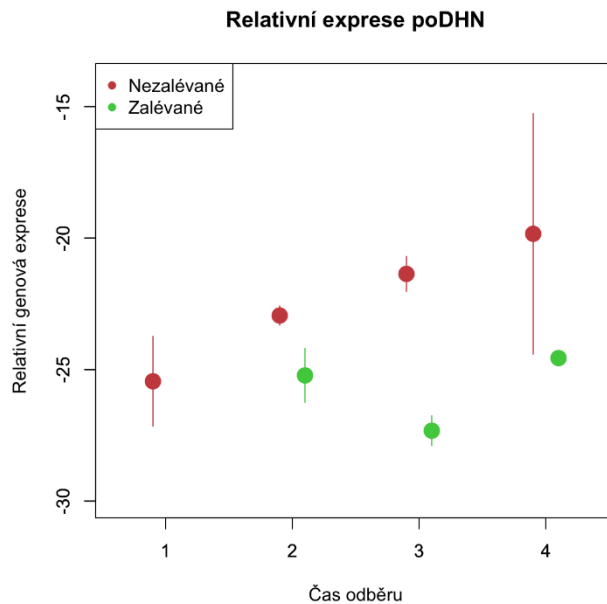
Hodnoty prahového cyklu (C_t) se vypočítají podle rovnice:

$$dCt = Ct_{dehydrin} - Ct_{actin}.$$

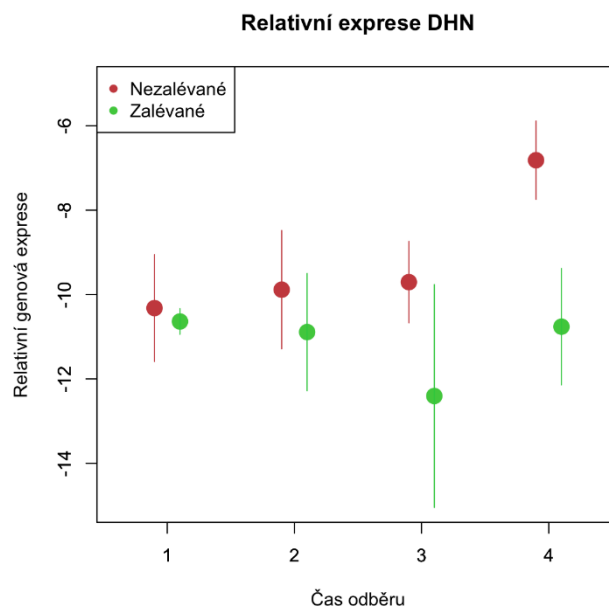
Následně se vytvoří křivka tání s pomocí kontinuálního zvyšování teploty z 60 °C na 95 °C. Během toho se zaznamenává fluorescence SYBR Green, to umožní odhalit případný výskyt různě dlouhých sekvencí, díky rozdílným teplotám tání.

5 Výsledky

Sledování exprese dehydrinových genů probíhalo na topolu osika vystaveném stresu - sucho. Platí, že čím je nižší hodnota Ct, tím více se ve vzorku nachází templátové DNA. Z počátku jsou hodnoty u zalévaných a nezalévaných rostlin stejné. S postupem času, lze v obou případech (poDHN, DHN) sledovat zvýšení exprese.



Obrázek 6. Relativní genová exprese poDHN u zalévaných a nezalévaných rostlin topolu osika; chybové úsečky ukazují standardní chybu.



Obrázek 5. Relativní genová exprese DHN u zalévaných a nezalévaných rostlin topolu osika; chybové úsečky ukazují standardní chybu.

6 Diskuse

Abiotický stres na rostliny působí různými způsoby. V rostlinách důsledkem toho dochází k množství fyziologických i morfologických změn, s cílem přizpůsobit se změněným podmínkám. Mezi takové ochranné mechanismy patří i indukce genové exprese dehydrinů. Předpokládá se, že DHN mají mnoho funkcí. Mezi hlavní funkce patří ochrana rostlin během nedostatku vody. To může být způsobeno suchem, mrazem nebo půdními změnami.

Pro studii byl vybrán topol osika (*Populus tremula*), jako často využívaná meliorizační dřevina. Protože se neustále diskutuje o globálním oteplování, jako stresor bylo vybráno sucho. Navíc sucho lze snadno dosáhnout i v laboratorních podmínkách. Rostliny topolu tedy nebyly zalévány a po dobu měsíce se každý týden odebral vzorek, konkrétně list.

Byly pozorovány změny na úrovni exprese dehydrinových genů. Skutečně, jak se předpokládalo, byla zaznamenána zvýšená exprese u rostlin, které byly delší dobu bez zalévání. Zpočátku byla hladina genů pro DHN stejná jako u kontrolních (zalévaných) rostlin. Stejných výsledků bylo dosaženo na rostlinách z čeledi borovicovitých (*Pinaceae*) např. *Pinus pinaster*, v ovocných stromech - jabloň, broskvoň, ale také v rýži nebo eukalyptu (Stival Sena, 2015) či v jiných odrůdách topolu - *Populus euramericana* (Velasco-Conde, 2012). Přestože se nejedná o kompletní výčet rostlin, u nichž byl pozorován stejný trend, lze potvrdit aktivaci genové exprese a zapojení dehydrinů do procesu zvyšování odolnosti vůči stresu. Navíc se potvrzuje zapojení metabolických procesů, ještě před změnami morfologickými. Sledování exprese dehydrinových genů, proto může přispět k odhalení stresových faktorů dříve, než dojde k nevratným morfologickým změnám.

7 Závěr

Bakalářská práce v úvodní části popisuje působení stresorů na rostliny a jejich odpověď. Zaměřuje se na genovou expresi dehydrinů v reakci na abiotický stres. Popsána je metoda analýzy genové exprese - RT-qPCR.

V praktické části bylo dosaženo následujícího:

- Kultivovali jsme sazenice topolu osika (*Populus tremula*). Část rostlin byla dostatečně zásobena vodou a část nebyla zalévána vůbec, tím bylo nasimulováno sucho. Z rostlin jsme odebrali listy pro další analýzu.
- Z odebraných vzorků jsme izolovali RNA.
- Provedli jsme analýzu qRT-PCR podle optimalizované metodiky.
- Vyhodnotili jsme množství dehydrinů v analyzovaných vzorcích. Výsledky potvrdily přítomnost dehydrinových genů a postupný nárůst jejich exprese v závislosti na dobu trvání sucha.

8 Seznam literatury a použitých zdrojů

ALBERTS, Bruce. Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. 2. vyd. Přeložil Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-2-0.

BAE, Eun-Kyung, Hyo-Shin Lee, Jae-Soon Lee a Eun-Woon Noh. Differential expression of a poplar SK 2 -type dehydrin gene in response to various stresses. BMB Reports. 2009, 42(7), 439-443. ISSN 1976-6696. doi:10.5483/BMBRep.2009.42.7.439

BECK, Erwin H, Sebastian Fettig, Claudia Knake, Katja Hartig a Tribikram Bhattarai. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. Journal of Biosciences. 2007, 32(3), 501-510. ISSN 0250-5991. doi:10.1007/s12038-007-0049-5

BEHRINGER, David, Heike Zimmermann, Birgit Ziegenhagen, Sascha Liepelt a Manoj Prasad. Differential Gene Expression Reveals Candidate Genes for Drought Stress Response in *Abies alba* (Pinaceae). PLOS ONE. 2015, 10(4). ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0124564

CRAMER, Grant R, Kaoru Urano, Serge Delrot, Mario Pezzotti a Kazuo Shinozaki. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. BMC Plant Biology. 2011, 11(1).

ČEPL, Jaroslav, Jan Stejskal, Jiří Korecký, Jakub Hejtmánek, Zuzana Faltinová, Milan Lstibůrek a Salvador Gezan. The dehydrins gene expression differs across ecotypes in Norway spruce and relates to weather fluctuations. Scientific Reports. 2020, 10(1). ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-020-76900-x

ČÍŽKOVÁ, Luďka, Helena Cvrčková, Pavlína Máchová. Možnosti využití domácích druhů rodu *Populus* v lesnické praxi: certifikovaná metodika. Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, 2020. Lesnický průvodce. ISBN 978-80-7417-202-1.

DORUŠKOVÁ, Věra. POPULUS TREMULA L. – topol osika. In: Botany.cz [online]. Praha: Botany.cz, 2009 [cit. 2021-04-07]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/populus-tremula/>

ELDHUSET, Toril Drabløs, Nina Elisabeth Nagy, Daniel Volařík, Isabella Børja, Roman Gebauer, Igor A. Yakovlev a Paal Krokene. Drought affects tracheid

structure, dehydrin expression, and above- and belowground growth in 5-year-old Norway spruce. *Plant and Soil*. 2013, 366(1-2), 305-320. ISSN 0032-079X. doi:10.1007/s11104-012-1432-z

FOTOPOULOS, Vasileios. Welcome to the new journal *Plant Stress*. *Plant Stress*. 2020. ISSN 2667064X. doi:10.1016/j.stress.2020.100001

GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, 133(3), 1-4. ISSN 0022202X. doi:10.1038/jid.2013.

GLOSER, Jan. *Fyziologie rostlin*. 2. rozš. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1998. ISBN 80-210-1789-9.

HANIN, Moez, Faiçal Brini, Chantal Ebel, Yosuke Toda, Shin Takeda a Khaled Masmoudi. Plant dehydrins and stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* . 2014, 6(10), 1503-1509. ISSN 1559-2324. doi:10.4161/psb.6.10.17088

HE, Mei, Cheng-Qiang He a Nai-Zheng Ding. Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*. 2018, 9. ISSN 1664-462X. doi:10.3389/fpls.2018.01771

HOLDEN, Marcia J. a Lili Wang. Quantitative Real-Time PCR: Fluorescent Probe Options and Issues. Resch-Genger, Ute, ed. *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008, s. 489-508. Springer Series on Fluorescence. ISBN 978-3-540-70570-3. doi:10.1007/4243_2008_046

HORÁČEK, Petr. *Encyklopedie listnatých stromů a keřů*. Brno: Computer Press, 2007. ISBN 978-80-251-1708-8.

CHINNUSAMY, Viswanathan, Jianhua zhu a Jian-Kang zhu. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*. 2007, 12(10), 444-451. ISSN 13601385. doi:10.1016/j.tplants.2007.07.002

JALEEL, C.A., P. Manivannan, A. Wahid, M. Farooq, R. Somasundaram and R. Panneerselvam, 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11: 100–105

JIN, Xiaofang, Dan Cao, Zhongjie Wang, et al. Genome-wide identification and expression analyses of the LEA protein gene family in tea plant reveal their involvement in seed development and abiotic stress responses. *Scientific Reports*. 2019, 9(1). ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-019-50645-8

KJELLEN, T. D., I. A. Yakovlev, C. G. Fossdal a G. R. Strimbeck. Dehydrin accumulation and extreme low-temperature tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*). *Tree Physiology*. 2013, 33(12), 1354-1366. ISSN 0829-318X. doi:10.1093/treephys/tpt105

KJELLEN, T. D., I. A. Yakovlev, C. G. Fossdal a G. R. Strimbeck. Dehydrin accumulation and extreme low-temperature tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*). *Tree Physiology*. 2013, 33(12), 1354-1366. ISSN 0829-318X. doi:10.1093/treephys/tpt105

KOROTAEVA, N. E., M. V. Oskorbina, L. D. Kopytova, G. G. Suvorova, G. B. Borovskii a V. K. Voinikov. Variations in the content of stress proteins in the needles of common pine (*Pinus sylvestris* L.) within an annual cycle. *Journal of Forest Research*. 2017, 17(1), 89-97. ISSN 1341-6979. doi:10.1007/s10310-011-0260-y

KOSOVÁ, K., P. Vitámvás a I. T. Prášil. The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia plantarum*. 2007, 51(4), 601-617. ISSN 00063134. doi:10.1007/s10535-007-0133-6

LI, Wei a Xiaofeng CUI. A Special Issue on Plant Stress Biology: From Model Species to Crops. *Molecular Plant*. 2014, 7(5), 755-757. ISSN 16742052. doi:10.1093/mp/ssu040

LIU, Yang, Qiping Song, Daxing Li, Xinghong Yang a Dequan Li. Multifunctional Roles of Plant Dehydrins in Response to Environmental Stresses. *Frontiers in Plant Science*. 2017, 8. ISSN 1664-462X. doi:10.3389/fpls.2017.01018

O'CONNOR, C. M. & Adams, J. U. *Essentials of Cell Biology*. Cambridge, MA: NPG Education, 2010

PUHAKAINEN, Tuula, Michael W. Hess, Pirjo mäkelä, Jan svensson, Pekka heino a E. Tapio palva. Overexpression of Multiple Dehydrin Genes Enhances

Tolerance to Freezing Stress in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*. 2004, 54(5), 743-753. ISSN 0167-4412. doi:10.1023/B:PLAN.0000040903.66496.a4

RORAT, Tadeusz. Plant dehydrins — Tissue location, structure and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2006, 11(4). ISSN 1689-1392. doi:10.2478/s11658-006-0044-0

ŘEPKOVÁ, Jana. *Genetika rostlin*. 1 vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2013. 189 s. ISBN 978-80-210-6408-9

SLAVÍKOVÁ J. (1986): *Ekologie rostlin*. – Praha.

SNUSTAD, D. Peter a Michael J. Simmons, Relichová, Jiřina, ed. *Genetika*. 2. aktualizované vydání. Přeložil Jiří Doškař, Jiří Fajkus, Petr Hořín, Aleš Knoll, Petr Kuglík, Jan Šmarda, Jana Šmardová, Renata Veselská, Boris VYSKOT. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 9788021086135.

STIVAL SENA, Juliana, Isabelle Giguère, Philippe Rigault, Jean Bousquet a John Mackay. Expansion of the dehydrin gene family in the Pinaceae is associated with considerable structural diversity and drought-responsive expression. *Tree Physiology*. 2018, 38(3), 442-456. ISSN 1758-4469. doi:10.1093/treephys/tpx125

TOMÁŠKOVÁ, Ivana a Jiří KUBÁSEK. Fyziologie lesních dřevin I.: fyziologie, produkce a stresy rostlin. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin, 2016. ISBN 978-80-213-2608-8.

VELASCO-CONDE, Tania, Igor Yakovlev, Juan Pedro Majada, Ismael ARANDA a Øystein JOHNSEN. Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response. *Tree Genetics & Genomes*. 2012, 8(5), 957-973. ISSN 1614-2942. doi:10.1007/s11295-012-0476-9

YANG, Yazhou, Mingyang He, Ziguozhu, Shuxiu Li, Yan Xu, Chaohong Zhang, Stacy D Singer a Yuejin Wang. Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biology*. 2012, 12(1). ISSN 1471-2229. doi:10.1186/1471-2229-12-140

ZHU, Jian-Kang. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. Cell. 2016, 167(2), 313-324. ISSN 00928674. doi:10.1016/j.cell.2016.08.029