

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Proteomická analýza různě odolných ozimých odrůd
pšenic vůči abiotickému stresu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Barbora Nezbedová

Obor studia: Biotechnologie a šlechtění rostlin

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Konzultant: Mgr. Pavel Vítámvás, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Proteomická analýza různě odolných ozimých odrůd pšenic vůči abiotickému stresu" jsem vypracovala 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 autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucímu své diplomové práce doc. Dr. Ing. Pavelovi Vejlovi za jeho odborné vedení, veškeré konzultace, trpělivost a pomoc. Velké poděkování patří také mému konzultantovi Mgr. Pavlu Vítámvásovi, Ph.D za jeho cenné rady a za možnost zpracování experimentální části práce na pracovišti Odboru genetiky a šlechtění rostlin VÚRV Praha, v.v.i. v laboratoři Biologie stresu a biotechnologie ve šlechtění. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Zdeňkovi Citovi za vedení při laboratorní práci a za všechny cenné rady. Práce byla podpořena projektem MZe QK1710302.

Proteomická analýza různě odolných ozimých odrůd pšenic vůči abiotickému stresu

Souhrn

Studium mechanismu stresových reakcí na molekulární a biochemické úrovni je předpokladem pro záměrné získávání odolnějších genotypů polních plodin a dalších zemědělsky významných rostlin. Cílem této diplomové práce bylo ověřit, zda odrůdy pšenice s vyšší odolností vůči chladu akumulují ve vegetativním stádiu více dehydrinů ve stresovaných pletivech. A dále zjistit, zda existuje závislost odolnosti vůči nízkým teplotám na obsahu dehydrinů u většího počtu odrůd pěstovaných v polních podmínkách.

V této diplomové práci bylo studováno 22 odrůd ozimé pšenice, které byly vybrány tak, aby byla zastoupena škála přežití v hodnocení zimovzdornosti pomocí provokační nádobové metody ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby (Prášil et al. 2018) na devítistupňovém hodnocení. Studovány byly odrůdy Annie, Baracuda, Bodyček, Bohemia, Dagmar, Elly, Frisky, Genius, Gordian, Julie, LG Imposanto, Mironovská 808, Novosibirskaya 2, Partner, Rebell, RGT Reform, RGT Sacramento, Seladon, Steffi, Sultan, Tobak, Vanessa. Odrůdy ozimé pšenice byly pěstovány na poli šlechtitelské stanice Selgen a.s., Stupice v zimním období 2018/2019. Z pole byly odebrány odnožovací uzly všech odrůd na konci listopadu (termín zvolen dle Vítámvás et al. 2019). Relativní akumulace dehydrinových proteinů byla stanovena pomocí SDS-PAGE a imunoblotu s antidehydrinovou primární protilátkou (Vítámvás et al. 2010). Relativní densita dehydrinových bandů byla vyhodnocena softwarem Quantity One.

Z naměřených dat bylo statistickou analýzou prokázáno, že odrůdy, které spadají do skupiny odrůd s vysokou zimovzdorností, se statisticky významně liší v relativní akumulaci dehydrinů od odrůd, které spadají do skupiny se střední a nízkou zimovzdorností. Ovšem odrůdy s nízkou a střední zimovzdorností se od sebe statisticky významně neliší. Další analýzou pak byla statisticky prokázána závislost relativní akumulace dehydrinů (vlastní proteomická analýza) na zimovzdornosti (hodnocení odrůd pomocí stupnice 1-9, kdy 1 - nejnižší zimovzdornost, 9 - nevyšší zimovzdornost). Z těchto výsledků lze tedy vyvodit, že velmi odolné odrůdy ozimé pšenice k chladu a mrazu mají více akumulovaných dehydrinů v období aklimatizace, než ostatní odrůdy a následně také lze konstatovat, že byla pozorována závislost mezi odolností odrůdy k nízkým teplotám a celkovému množství akumulovaných dehydrinů.

Dehydriny by tak bylo možné využít jako ukazatele (markery) odolnosti pšenic pěstovaných i v polních podmínkách. Ovšem je nutné otestovat větší sortiment genotypů v polních podmínkách i v dalších sezónách pro ověření spolehlivosti dehydrinových analýz jako markeru odolnosti vůči daným abiotickým stresům. Snáze by tak mohlo docházet k výběru genotypů pšenice odolných k nízkým teplotám pro další šlechtění.

Experimentální část práce byla řešena na pracovišti Odboru genetiky a šlechtění rostlin VÚRV Praha, v.v.i. v laboratoři Biologie stresu a biotechnologie ve šlechtění. Práce byla podpořena projektem MZe QK1710302.

Klíčová slova: dehydriny, chlad, odnožovací uzly, polní podmínky, stresové proteiny, *Triticum aestivum* L.

Proteomic analysis of differently tolerant winter wheat cultivars to abiotic stress

Summary

The study of the mechanism of stress reactions at the molecular and biochemical level is a prerequisite for the deliberate acquisition of more resistant genotypes of field crops and other agriculturally important plants. The aim of this thesis is to verify whether wheat varieties with higher resistance to cold accumulate more dehydrins in stressed plant tissue during the vegetative stage and to determine whether there exists a dependence between the resistance to low temperatures and dehydrin content in a larger number of varieties grown in field conditions.

In this thesis, 22 varieties of winter wheat were studied, which were selected to represent the survival scale for evaluation of winter hardiness using the provocative container method at the Research Institute of Plant Production (Prášil et al. 2018) based on nine point scale. The varieties Annie, Baracuda, Bodyček, Bohemia, Dagmar, Elly, Frisky, Genius, Gordian, Julie, LG Imposanto, Mironovská 808, Novosibirskaya 2, Partner, Rebell, RGT Reform, RGT Sacramento, Seladon, Steffi, Sultan, Tobak, and Vanessa were studied. Winter wheat varieties were grown in the field of the breeding station Selgen a.s., Stupice, in the winter period 2018/2019. Branching nodes of all varieties were removed from the field at the end of November (date chosen according to Vítámvás et al. 2019). The relative accumulation of dehydrin proteins was determined by SDS-PAGE and immunoblotting with an anti-dehydrin primary antibody (Vítámvás et al. 2010). The relative density of the dehydrin bands was evaluated by Quantity One software.

From the measured data, statistical analysis showed that varieties that fall into the group of varieties with higher winter hardiness differ statistically significantly from varieties that fall into the group with medium and low winter hardiness. However, varieties with low and medium winter hardiness do not differ statistically significantly from each other. Another analysis statistically proved the dependence of the relative accumulation of dehydrins (own proteomic analysis) on winter hardiness (evaluation of varieties using the scale 1-9, where 1 – the lowest winter hardiness, 9 – the highest winter hardiness). From these results it can be concluded that very resistant varieties of winter wheat to cold and frost accumulate more dehydrins during acclimatization than other varieties and subsequently it can be stated that the dependence between resistance of the variety to low temperatures and total accumulated dehydrins can be observed.

Dehydrins could thus be used as indicators (markers) of resistance of wheat grown in field conditions. However, it is necessary to test a larger range of genotypes in field conditions and in other seasons (as well) to verify the reliability of dehydrin analyses as a marker of resistance to given abiotic stresses. It could thus be easier to select genotypes resistant to low wheat temperatures for further breeding.

The experimental part of the work was solved at the workplace of the Department of Genetics and Plant Breeding VÚRV Prague, v.v.i. in the laboratory of Biology of stress and biotechnology in breeding. This thesis was supported by the project of the Ministry of Agriculture QK1710302.

Keywords: dehydrins, cold, crown, field trials, stress proteins, *Triticum aestivum* L.

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Pšenice	3
3.2	Stres u rostlin	5
3.2.1	Stresové faktory	5
3.2.2	Odpověď rostliny na stres	5
3.2.3	Význam vody pro rostlinu	7
3.2.4	Nízká teplota jako stresový faktor	7
3.2.5	Zimovzdornost	8
3.2.6	Stresové proteiny	8
3.3	Dehydriny	9
3.3.1	LEA proteiny	9
3.3.2	Struktura dehydrinů	9
3.3.3	Lokalizace a exprese dehydrinů	10
3.3.4	Funkce dehydrinů	11
3.3.5	Dehydriny u pšenice	11
4	Metodika	13
4.1	Rostlinný materiál	13
4.1.1	Lokalita a odběry vzorků	13
4.1.2	Charakteristika odrůd pšenic	15
4.1.3	Průběh počasí v místě pěstování rostlin	16
4.2	Metody realizovaného experimentu	17
4.2.1	Postup laboratorního experimentu	17
4.2.2	Chemikálie použité pro laboratorní analýzy	17
4.2.3	Roztoky použité pro laboratorní analýzy	18
4.2.4	Přístroje použité pro laboratorní analýzy	20
4.2.5	Izolace proteinů rozpustných po varu	20
4.2.6	Proteinová denaturující elektroforéza SDS-PAGE	22
4.2.7	Westernový polosuchý přenos	24
4.2.8	Imunodetekce	24
4.2.9	Kvantitativní analýza dehydrinů	26
4.2.10	Kvalitativní analýza dehydrinů	27
5	Výsledky	29
5.1	Kvantitativní analýza dehydrinů	29
5.1.1	Rozložení dat a identifikace odlehlých pozorování	29

5.1.2	Vliv odrůdy na relativní akumulaci dehydrinů.....	31
5.1.3	Vliv skupiny zimovzdornosti na relativní akumulaci dehydrinů	34
5.1.4	Vliv stupně zimovzdornosti na relativní akumulaci dehydrinů.....	37
5.2	Kvalitativní analýza dehydrinů.....	38
6	Diskuse.....	39
7	Závěr.....	42
8	Literatura	43
9	Seznam tabulek a obrázků.....	48
10.	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	49

1 Úvod

Pšenice patří k nejvýznamnějším plodinám pro člověka. Pro více než třetinu celosvětové populace tvoří základ stravy, je významnou složkou krmiva pro hospodářská zvířata a rozsahem osevních ploch také významně ovlivňuje ekonomiku většiny zemědělských podniků. S rostoucí potřebou populace celková produkce i spotřeba pšenice postupně stále stoupá. Na zabezpečení dostatečné produkce pšenice se ve světě významně podílejí různá výzkumná pracoviště zaměřená na pěstitelské systémy, šlechtění a genetiku.

V důsledku klimatických změn se setkáváme čím dál častěji s extrémními výkyvy počasí. V souvislosti s klimatickými změnami pak na rostliny více působí abiotické stresy, například sucho nebo nízká teplota. Abiotické stresy pak mohou mít za následek snížení kvality i výnosu zemědělsky významných plodin. Některé odrůdy se s těmito stresy vyrovnávají výrazně lépe než ostatní, fungují u nich lépe obranné a adaptační mechanismy. Proto je výzkum odpovědí rostlin na abiotický stres tak důležitý, aby bylo možné v budoucnu zajistit výběr a další šlechtění odolnějších genotypů, a tím omezit zhoršení kvality a snížení výnosu hospodářsky významných plodin jako je například pšenice.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce je ověřit platnost následujících vědeckých hypotéz:

1. Odrůdy pšenice s vyšší odolností vůči chladu akumulují ve vegetativním stádiu více dehydrinů ve stresovaných pletivech.
2. Akumulace dehydrinů byla zkoumána doposud na malém počtu vybraných odrůd s výrazně rozdílnou odolností vůči daným stresům. Pokud je tato vlastnost geneticky podmíněná, lze předpokládat závislost odolnosti vůči nízkým teplotám na obsahu dehydrinů u většího počtu odrůd pěstovaných v polních podmínkách.

Konkrétní cíle práce jsou shrnuty v následujících bodech:

1. Zpracování literární rešerše k dané tématice
2. Výběr analyzovaných odrůd ozimé pšenice
3. Experiment bude probíhat formou polního pokusu
4. Pro zjištění odpovědi rostlin na stres proběhne stanovení obsahu stresových proteinů (dehydrinů) - izolace proteinů, SDS-PAGE elektroforéza, Western Blotting, imunodetekce
5. Analýza akumulace dehydrinů

3 Literární rešerše

3.1 Pšenice

Říše:	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	cévnaté rostliny (<i>Tracheophyta</i>)
Oddělení:	krytosemenné (<i>Magnophyta</i>)
Třída:	jednoděložné (<i>Liliopsida</i>)
Řád:	lipnicotvaré (<i>Poales</i>)
Čeleď:	lipnicovité (<i>Poaceae</i>)
Rod:	pšenice (<i>Triticum</i>)
Druh:	pšenice setá (<i>Triticum Aestivum L.</i>)

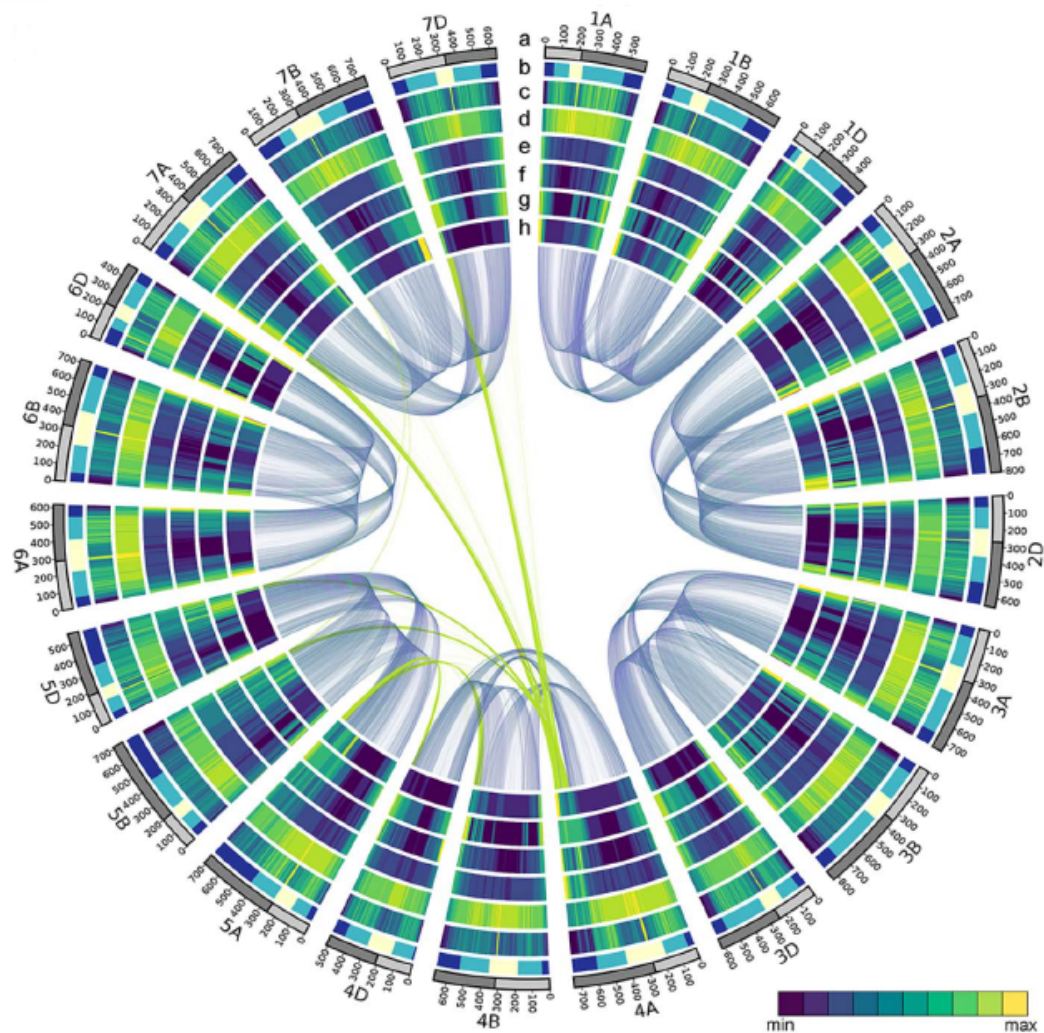
Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.; Obr. 1) je nejvíce pěstovaná plodina na orné půdě jak v České republice, tak v celosvětovém měřítku (Zimolka 2005). V České republice představuje podíl osevu na orné půdě 30 % s celkovou výměrou přes 800 000 hektarů (ČSÚ, 2019). Pšenice byla domestikována přibližně před 10 000 lety a od té doby se rozšířila po celém světě, pěstuje se ve velmi odlišných podmínkách v různých částech světa (Dubcovský et Dvořák 2016). Adaptabilita pšenice měla za následek existenci odrůd s různými růstovými návyky. Ozimá pšenice se seje na podzim, vyžaduje dlouhé vystavení rostlin nízkým teplotám během zimy (vernalizace) a sklizeň probíhá následující rok. Zatímco jarní pšenice nemají požadavek na vernalizaci a mohou být vysety na jaře. Ozimá pšenice poskytuje vyšší a stabilnější výnosy díky delší vegetační době. Adaptabilita pšenice také způsobila, že různé odrůdy mohou na abiotický a biotický stres vytvářet odlišné adaptace, obranné mechanismy nebo reakce v rozdílné intenzitě a časovém rozestupu od začátku působení (Yan et al. 2004).



Obrázek 1: Pšenice setá (*Triticum aestivum*)

Zdroj:<https://cs.wikipedia.org/wiki/Pšenice_setá#/media/Soubor:Illustration_Triticum_aestivum1.jpg>

Jedná se o jednodomou rostlinu s vysoce komplexním genomem skládajícím se z 3 sad chromozomů (subgenomů) a obsahujících 21 párů chromozomů ve dvou kopiích. Genom pšenice je z více než 85% tvořen repetitivními sekvencemi. International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) v roce 2018 publikovalo osekvenování celého genomu pšenice (Obr. 2).



Obrázek 2: Strukturální diagram genomu pšenice

Strukturální diagram představující genom pšenice s pomenováním chromozomů a jejich velikostí (Mb = megabase-pair). Světle šedá barva patří krátkému ramenu chromozomu a tmavě šedá dlouhému ramenu, ve středu diagramu je modrou čarou znázorněno propojení homologních chromozomů a zelenou barvou jsou označeny translokované úseky.

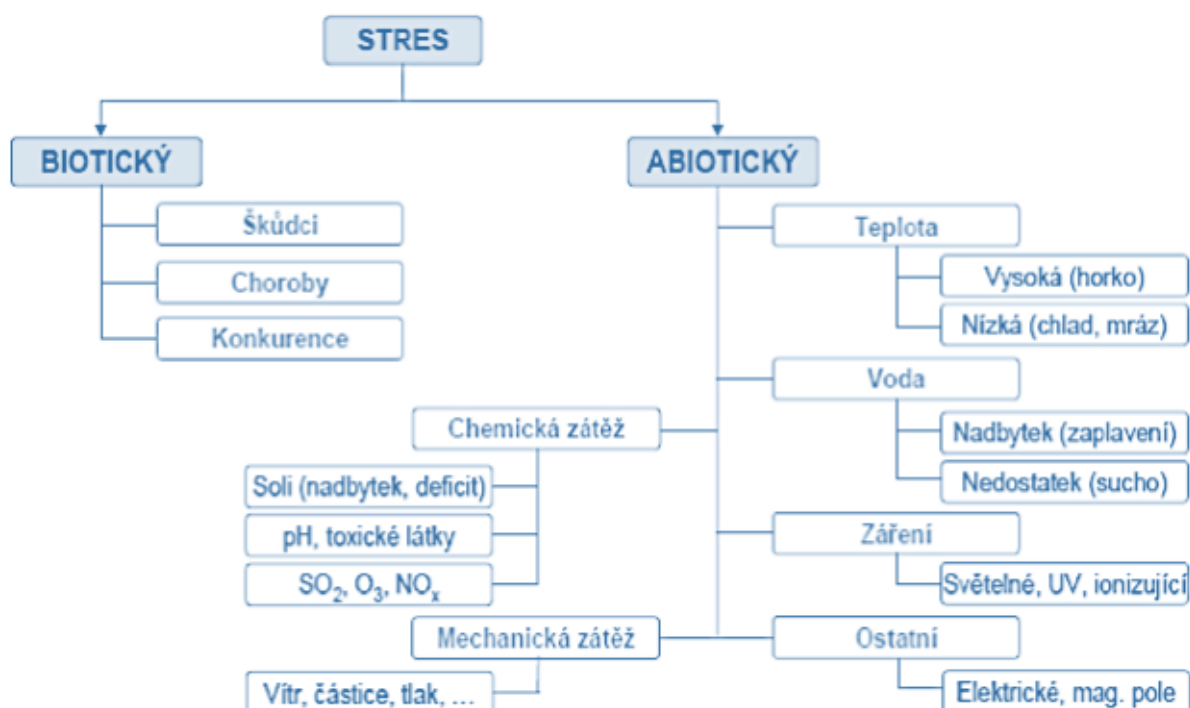
Zdroj: International Wheat Genome Sequencing 2018

Šlechtitelé se neustále snaží vyvíjet vylepšené odrůdy jemným vyladěním geneticky komplexních parametrů výnosu, kvality a přizpůsobení plodiny regionálně specifickým biotickým a abiotickým stresům (International Wheat Genome Sequencing 2018).

3.2 Stres u rostlin

3.2.1 Stresové faktory

Faktory, které mají negativní vliv na rostliny, můžeme rozdělit na abiotické a biotické (Obr. 3). Mezi biotické faktory řadíme choroby (jejichž původcem jsou viry, bakterie, houby), škůdce (háďátka, mšice, plošnice, třásněnky, atd.) a konkurenci. V oblasti abiotických faktorů se jedná především o vlivy počasí, nedostatek živin, chemickou zátěž a nevhodné technologické zásahy (Bittner 2009, Hnilička & Středa 2016). Všechny tyto faktory mohou u rostliny vyvolávat stres (Hnilička & Středa 2016). Podle Levitta (1980) se stresem u rostlin rozumí změna v podmínkách vnějšího prostředí, která může zpomalit nebo nepříznivě ovlivnit růst a vývoj rostlin.

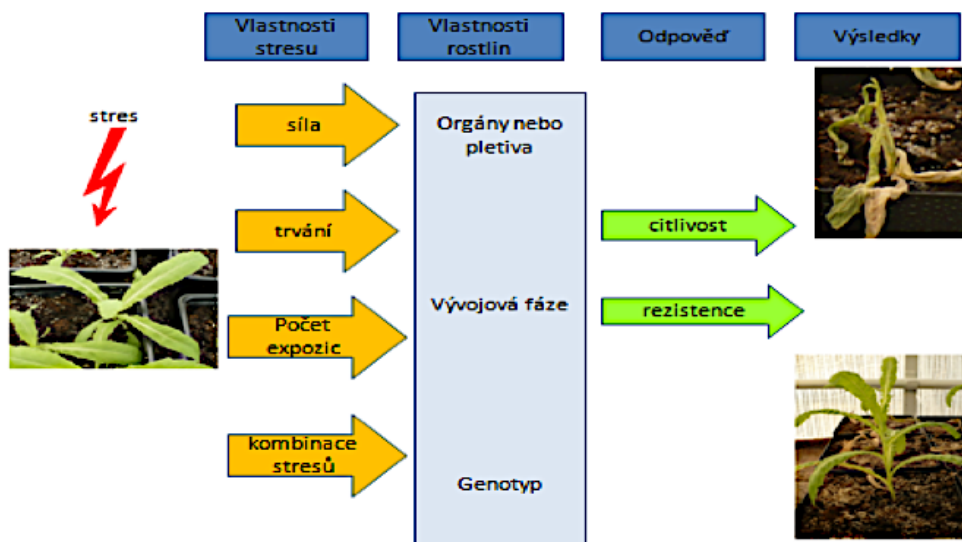


Obrázek 3: Rozdělení stresových faktorů

Zdroj: Hnilička & Středa 2016

3.2.2 Odpověď rostliny na stres

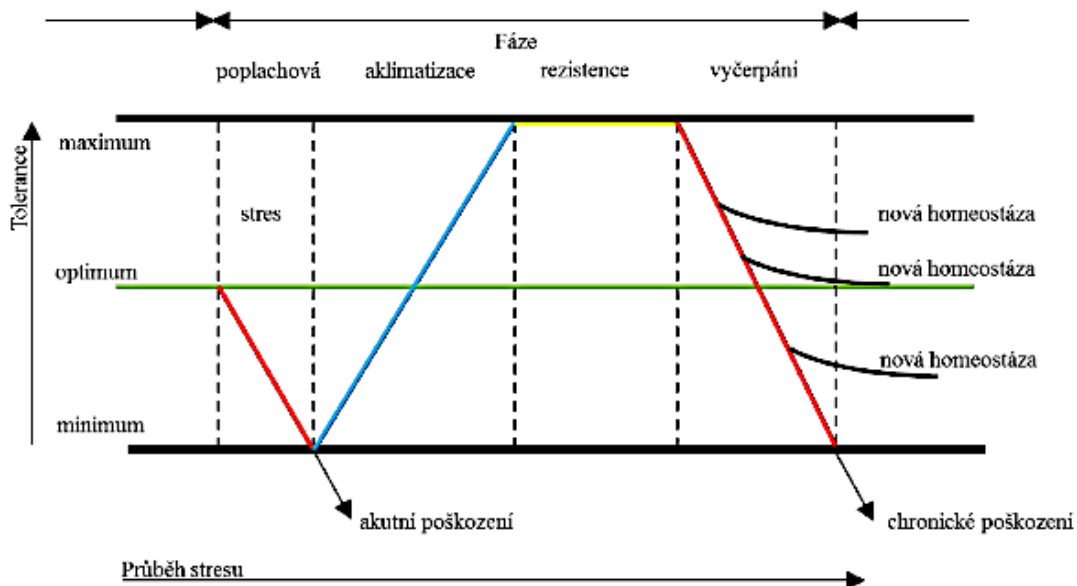
Odpověď rostliny na stres je závislá na vlastnostech stresu - intenzita, trvání, počet expozičních kombinací stresů a také na vlastnostech rostliny - místo působení stresu, vývojová fáze rostliny, genotyp, citlivost, rezistence (Hnilička & Středa 2016; Obr. 4).



Obrázek 4: Působení stresorů na rostliny

Zdroj: Hnilička & Středa 2016

Po začátku působení stresu jsou aktivovány obranné reakce rostliny, které mají za cíl zabránit jejímu poškození nebo uhynutí. Zde se projeví adaptační schopnost, která závisí jak na intenzitě a délce působení stresového faktoru, tak na geneticky vázané odpovědi rostliny (Hnilička & Středa 2016). Po rozpoznání stresu rostlinou začne probíhat aklimatizace a může přechodně dojít ke zvýšení úrovně odolnosti (rezistenci) vůči stresu (Kosová et al. 2011; Obr. 5). Ke změnám úrovně odolnosti rostliny dochází především pomocí změn v expresi genů, které následně vedou ke kvalitativním nebo kvantitativním změnám proteomu. Jedná se o geny, jejichž exprese je regulovaná stresem (Ahuja et al. 2010). Dochází tedy k syntéze proteinů, které pomáhají rostlině překonávat stres a setrvávat ve stresovém prostředí, jedná se např. o LEA proteiny a HS proteiny (Jorin et al. 2007).



Obrázek 5: Schéma stresové reakce a odpovědi organismu

Zdroj: Kosová et al. 2011

3.2.3 Význam vody pro rostlinu

Ze všech abiotických faktorů se vodní stres podílí nejvíce na růstu a produktivitě rostlin. Voda je nezbytná pro metabolismus rostliny, je univerzálním rozpouštědlem látek, médiem pro rozvod organických i minerálních látek vodivým systémem rostliny. Voda je také zdrojem elektronů a protonů v procesu fotosyntézy a má významnou funkci při regulaci teploty rostliny (Procházka et al. 1998). Nedostatek vody v rostlinných pletivech narušuje buněčnou homeostázu a vede k morfologickým, fyziologickým a molekulárním změnám (Richards et al. 2011). Dochází k regulaci genové aktivity, jedná se zejména o zvyšování či snižování tvorby enzymů a strukturních proteinů i dalších metabolitů (Procházka et al. 1998).

Rostliny mohou uplatňovat několik strategií k vypořádání se s dehydratačním stresem. První z nich je únik před suchem. Jedná se o adaptační mechanismus, kdy rostliny mohou rychle dokončit svůj životní cyklus během krátkého období příznivých podmínek, nebo v období nedostatku vody (Shavrukov et al. 2017). Druhou strategií je vyvarování se suchu. Tato strategie je založená na vyšším příjmu vody a nižší spotřebě. Jedná se např. o silnou kutikulu na listech nebo prodloužení kořenů. Třetí strategií je tolerance nedostatku vody, rostlina se v takovémto případě aktivně přizpůsobuje změně prostředí např. tvorbou stresových proteinů, syntézou osmolytů, přestavbou buněčné stěny a membrány (Yan et al. 2018).

3.2.4 Nízká teplota jako stresový faktor

Nízká teplota je jedním z významných stresů omezujících růst a produktivitu ozimých obilovin. Různé fenotypové projevy v reakci na stres nízkými teplotami zahrnují špatné klíčení, zakrslé sazenice, žloutnutí listů (chloróza), vadnutí a mohou vést ke smrti tkáně (nekróza). Stres způsobený nízkými teplotami (chlad, mráz) také vážně brzdí reprodukční vývoj rostlin (Yadav 2010). Chlad (nízké teploty nad bodem mrazu) způsobuje změny fyzikálně-chemických vlastností membrán. Z polotekuté konzistence membrány se stává pevný gel a dochází k volné propustnosti membrán a k zastavení selektivního a aktivního transportu (může docházet až k odumírání buněk). Také dochází ke změně struktury cytoskeletu a poškození chloroplastů. Poškození rostlin mrazem je spojeno s tvorbou ledových krystalů ve strukturách bohatých na vodu spojených s mrazovou dehydratací buněk, při tomto procesu dochází k poškození rostlinných pletiv a jejich odumírání (Procházka 1998).

Aby se vypořádaly s nízkoteplotním stresem, vyvinuly ozimé obiloviny adaptivní mechanismy, které jsou regulovány nízkou teplotou. Ozimé obiloviny reagují na nízké teploty pomocí dvou procesů: aklimatizace a vernalizace. Aklimatizace znamená přechodně zvýšenou odolnost vůči abiotickým stresorům. Jedná se o komplex procesů zaměřených na zvýšení tolerance vůči mrazu a posílení přežití rostlin při nepříznivých nízkých teplotách. Vernalizace znamená vývojové přizpůsobení pravidelným dlouhodobým obdobím nízkých teplot v mírném podnebí, zabráňující předčasnému přechodu do citlivějšího reprodukčního stádia za nepříznivých podmínek prostředí (mráz), to je zajištěno potlačením kvetení podporujících genů (Chouard 1960; Sung & Amasino 2004). Aklimatizace je nejdůležitější mechanismus rostlin pro přežití zimy. Je regulována složitými fyzikálními a biochemickými interakcemi, které jsou závislé na genotypových a enviromentálních faktorech (Fowler et al. 1996). Aklimatizace (otužení) je kumulativní proces,

který je zahájen působením teplot okolo 10 °C. Zde existuje inverzní vztah mezi mírou aklimatizace a nízkou teplotou od 10 °C do 0 °C. Ovšem při vystavení rostliny teplotám nad 10 °C se tolerance nízkých teplot ztrácí (Limin & Fowler 1985). Odolnost vůči nízkým teplotám a mrazu má proto silně sezónní charakter. I ty druhy a odrůdy, které jsou v zimním období vysoce odolné, by byly silně poškozené při náhlém poklesu teplot (Procházka et al. 1998). Ozimá pšenice se na období nízkých teplot připravuje již od zasetí. Při standardním průběhu počasí by pšenice před začátkem zimy měla mít v ideálním případě 2-5 odnoží, kořenový krček v hloubce 2 cm pod povrchem půdy a 4-5 listů pro dostatečnou energii na přezimování. Tolerance nízkých teplot se zvyšuje postupně se zkracováním doby slunečního svitu a snižováním teplot. Dochází k fyziologickým změnám v rostlině, zvyšuje se například množství syntetizované kyseliny abscisové, cukrů, nenasycených mastných kyselin a některých proteinů (dehydrinů). V tomto období se projeví rozdíly mezi odrůdami ve schopnosti reagovat na tyto vnější faktory. Některé odrůdy jsou během zimy otužilejší a jsou tak schopny lépe snášet nízké teploty. Zimovzdornost je důležitá odrůdová geneticky podmíněná vlastnost, která může být využita pro šlechtění rostlin (Horčíčka et al. 2017).

3.2.5 Zimovzdornost

Zimovzdornost je schopnost rostliny vyrovnat se se stresovými faktory v průběhu zimy, regenerovat a úspěšně pokračovat v růstu v jarním období. Tento fyziologický proces je úzce svázán se abiotickými stresy, jako jsou přímý mráz (holomráz), zimní sucho (odpaření vody), změny teplot prostředí. Tato vlastnost se může významně lišit u odrůd jednotlivých plodin a patří mezi rozhodující faktory při registraci a doporučování nových odrůd (Horáková et Dvořáčková 2019). Zimovzdornost je možné testovat nádobovou (bedýnkovou) metodou, na jejímž základě lze získat rozlišení zimovzdornosti - provokační test. Metoda poskytuje údaje o zkoušených ozimech a víceleté vyhodnocení umožňuje zařazení odrůd do stupňů zimovzdornosti (SZ) ve stupnici od SZ 1 = nejméně odolné, do SZ 9 = nejodolnější (Prášilová & Prášil 2007).

3.2.6 Stresové proteiny

Při působení kteréhokoliv ze stresových faktorů dochází k velmi významným změnám v kvalitativním i kvantitativním zastoupení proteinů v rostlinných buňkách. Syntéza některých proteinů se zastavuje, a naopak se mohou syntetizovat proteiny, které se za normálních podmínek vůbec v rostlinných buňkách nevyskytují. K těmto změnám může docházet už během několika hodin působení stresu. Některé proteiny mohou být indukovány nesespecificky (různými stresy), u jiných je indukce specificky vázána na určitý stresový faktor. Mezi nesespecificky indukované proteiny patří chaperony, proteázy a ubikvitin. Jedná se o konstitutivní proteiny, které se nachází v buňce rostlin i bez působení stresu, ovšem při působení stresu se jejich množství mnohonásobně zvyšuje. Mezi proteiny indukované při působení jen některých stresových faktorů patří proteiny indukované zvýšenou teplotou (heat-shock proteins, HSP), proteiny indukované chladem (cold-induced proteins), proteiny indukované dehydratací (dehydration-induced proteins) a proteiny indukované sníženou koncentrací kyslíku (anaerobic stress proteins, ASP). Do skupiny proteinů, jejichž exprese je podmíněná dehydratací, patří proteiny zvané dehydriny (Procházka et al. 1998).

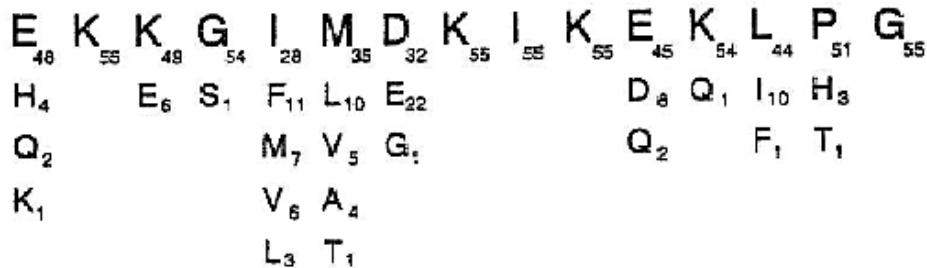
3.3 Dehydriny

3.3.1 LEA proteiny

Pojmem dehydriny je označována širší skupina proteinů. V druhé polovině 20. století Leon Dure identifikoval několik skupin proteinů, které se akumulovaly během fáze dozrávání embryogeneze bavlny (*Gossypium hirsutum*), což dalo vznik jejich názvu jako proteiny LEA (late embryogenesis abundant proteins) - proteiny pozdní fáze embryogeneze (Dure & Chlan 1981). Tato klasifikace se pak dále začala používat i pro ostatní druhy. LEA proteiny jsou přítomny v mnoha rostlinách a různých rostlinných tkáních. Jedná se o hydrofilní proteiny, které u organismů zvyšují toleranci k nedostatku vody. V současné době můžeme LEA proteiny rozdělit do pěti rodin (skupin): LEA D19 (skupina I), LEA D11 (skupina II), LEA D7 (skupina III), LEA D113 (skupina IV) a LEA D95 (skupina V), na základě podobnosti aminokyselinových sekvencí uvnitř skupiny (Ingram et Bartels 1996). Jednou z těchto skupin jsou dehydriny, ty jsou označovány jako skupina D11 neboli LEA II (Hara 2010). Dehydriny jsou akumulovány u rostlin vystavených různým stresům jako je například mráz, sucho a zasolení půdy. Tyto abiotické stresy na stejném principu vyvolávají nedostatek vody v buňce. Odolnost vůči těmto stresům je často spojována právě s dehydriny (Campbell & Close 1997, Close 1997). Dále mohou mít dehydriny zásadní funkci při zrání semen, aklimatizaci rostlin na podzim a na začátku vegetační sezóny (Rorat 2006).

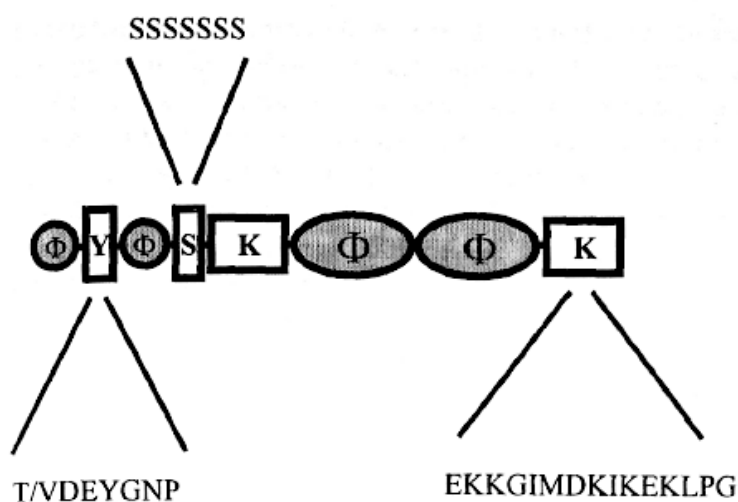
3.3.2 Struktura dehydrinů

V současné době se dehydriny definují jako proteiny, které mají alespoň jednu kopii aminokyselinové sekvence bohaté na lysin, jedná se o K-segment. Ten to K-segment má sekvenci patnácti aminokyselin EKKGIMDKIKEKLP (Close 1996, Close 1997), ta ovšem nemusí být naprosto identická u všech dehydrinů a může být přítomna až v 11 kopiích v molekule dehydrinu. K-segment je obvykle přítomen v blízkosti C-konce (Rorat 2006) a tvoří amfipatický (obsahující část hydrofilní a hydrofobní) alpha-helix, jeden ze základních motivů sekundární struktury proteinů, který je schopen interakce s membránami (Boddington et Graether 2014). Jelikož každý dehydrinový protein obsahuje K-segment, může být pro jejich detekci použita polyklonální protilátka proti K-segmentu (Close et al. 1993; Obr 6). Dalšími konzervovanými oblastmi jsou Y-segment (T/VDEEGNP), oblast bohatá na tyroxin, obvykle blízko N-konce molekuly a S-segment, sekvence tvořená řetězcem 4 až 10 serinů (Close 1996; Obr. 7). Díky zkratce "YSK", která je založena na těchto sekvencích, lze dehydriny klasifikovat (Battaglia et al., 2008). Počet a pořadí segmentů Y, S, K definuje různé biochemické podskupiny dehydrinů: Y_nSK_2 , K_n , K_nS , SK_n a Y_2K_n dehydriny. Kromě těchto segmentů se v molekulách dehydrinů vyskytují méně konzervované sekvence tzv. Φ -segmenty, obvykle bohaté na glycin a polární aminokyseliny (Close 1996; Close 1997). Tyto oblasti významně přispívají k typickým charakteristikám dehydrinů, které jsou: vysoká hydrofilita, rozpustnost ve vodných roztocích po dosažení bodu varu a vysoká afinita k detergentům, jako je dodecylsulfát sodný (SDS) (Danyluk et al. 1994). Dehydriny téměř postrádají cystein a tryptofan (Close 1997). Podle nejnovějších poznatků byl objeven nový segment pojmenovaný F-segment (název byl odvozen z přítomnosti aminokyseliny fenylalaninu), který se skládá ze sekvence aminokyselin DRGLFDLFGKK (Riley et al. 2019).



Obrázek 6: Sekvence aminokyselin K-segmentu s variacemi, aminokyseliny jsou označeny jednopísmennými zkratkami a indexy představují možnosti nalezených výskytů

Zdroj: Close 1996



Obrázek 7: Typické složení rostlinného dehydrinu

Zdroj: Close 1997

3.3.3 Lokalizace a exprese dehydrinů

Dehydriny se vyskytují u nahosemenných i krytosemenných rostlin (všechny dosud studované druhy obsahují aspoň jeden gen pro dehydriny na rostlinný genom), jejich přítomnost může korelovat s tolerancí na nedostatek vody (Close 1996). Nacházejí se převážně v rostlinných tkáních vystavených dehydrataci, jako v semenech při dozrávání nebo ve vegetativních tkáních vystavených environmentálním stresům, dehydriny se nevyskytují ve specifických buněčných strukturách (Rorat 2006). Dehydriny mohou být lokalizovány v různých částech buňky. Nejčastějším místem výskytu je jádro a cytoplazma. Dalšími místy výskytu jsou mitochondrie, chloroplasty, cytoplasmatická membrána (Boddington & Graether 2014), plastidy, tonoplast a endoplasmatické retikulum (Hara 2010). Exprese daného genu dehydrinu představuje výsledek společných účinků několika exogenních faktorů - teplota, dostupnost vody a endogenních faktorů - ABA, dalších fytohormonů - kyseliny salicylové (Allagulova et al. 2003).

3.3.4 Funkce dehydrinů

Biochemické analýzy a lokalizační experimenty naznačují několik funkcí dehydrinů, avšak ne všechny dehydriny musí mít všechny tyto funkce (Boddington & Graether 2014). Vyskytují se velké rozdíly ve funkci mezi různými dehydrinovými geny (Hara 2010). Úplná dehydratace buněk je pro organismus letální, proto existují takové proteiny, které mohou pomoci udržovat potřebné množství vody v buňce. Dehydrinové proteiny jsou vysoce hydrofilní, tj. mohou zadržovat velké množství vody a chránit jiné proteinové molekuly nebo povrchy biomembrán před podstatnou ztrátou vody, čímž mohou zabránit důsledkům dehydratace (Kosová et al. 2007).

Dehydriny se mohou vázat na makromolekuly jako (např. fosfolipidy, nukleové kyseliny a cytoskelety). Vazba na fosfolipidy je možná díky K-segmentu (amfipatický alpha-helix), což dokázaly studie interakcí těchto proteinů s buněčnými membránami. Dehydriny se specificky vážou na kyselé fosfolipidy jako je kyselina fosfatidová. To naznačuje interakci dehydrinů se specifickými oblastmi buněčných membrán. Skutečnost, že dehydriny se váží na tyto makromolekuly citlivé na stres, naznačuje, že je mohou před abiotickým stresem chránit (Hara 2010). Dále dehydriny mohou vázat malé molekuly - dvojmocné kovové ionty (zinek, mangan, nikl, měď). Vodní stres u rostlin vyvolává vylití kovových iontů z organel, což zvyšuje intracelulární koncentraci volných kovů. Bylo prokázáno, že dehydriny jsou schopné interakce s dvojmocnými ionty kovů. Předpokládá se, že takto ochraňují rostlinné buňky před škodlivými účinky kovových iontů (Svensson et al. 2000). Další funkcí je ochrana před denaturací proteinů. Denaturace je fyzikální jev, kdy proteiny ztrácí správnou sekundární strukturu vlivem nepříznivých podmínek. Denaturace je jedním z nejčastějších fyziologických jevů, které se vyskytují v rostlinných buňkách vystavených různým stresům. Denaturace může nastat například při nízkých teplotách, tehdy mohou mít dehydriny kryoprotektivní účinek. Tato funkce je pravděpodobně zásadní pro expresi dehydrinových genů (Campbell & Close 1997, Hara 2010).

3.3.5 Dehydriny u pšenice

U ozimé pšenice byly detekovány dvě hlavní skupiny dehydrinových genů vyvolaných chladem: *Wcs120* a *Wcor410* (Fowler et al. 2001). Proteinová rodina WCS120 zahrnuje 7 členů s molekulovou hmotností v rozmezí od 12 do 200 kDa: WCS200 (200 kDa), WCS180 (180 kDa), WCS66 (66 kDa), WCS120 (50 kDa), WCS40 (40 kDa), WCS726 (21 kDa) a WCS80 (12 kDa). Geny WCS120 kódující proteiny WCS120 s vysokou molekulovou hmotností (WCS200, WCS66 a WCS120) jsou umístěny na homologních chromozomech skupiny 6. Dehydriny rodiny WCS120 mají pouze několik kopií K-segmentu (proteiny patří do K_n podskupiny dehydrinů), v těchto molekulách se nenacházejí žádné Y-segmenty nebo S-segmenty (Sarhan et al. 1997). Genová rodina WCOR410 má tři homologní členy WCOR410a, WCOR410b a WCOR410c, které jsou umístěny na dlouhém rameni homologní skupiny 6 chromozomů hexaploidní pšenice. Proteiny WCOR410 jsou vysoce hydrofilní, kyselé dehydriny typu SK3, u kterých bylo zjištěno, že jsou lokalizovány v blízkosti plazmatu (Danyluk et al. 1994, 1998).

Nízké teploty představují rozhodující environmentální faktor určující přežití zimy u odrůd ozimé pšenice. Nízké teploty indukují aktivní aklimatizační reakci rostlin, která je spojena se

zvýšenou akumulací stresem indukovatelných proteinů včetně dehydrinů. Během aklimatizace na nízké teploty se proteiny WCS120 hromadí převážně v meristemických tkáních, protože přežití těchto tkání je zásadní pro přežití celé rostliny v zimě a proteiny WCS120 vykazují relativně vysokou kryoprotektivní aktivitu. Proteiny WCS120 jsou indukovatelné nízkou teplotou (v menší míře i suchem a zasolením), tyto proteiny ovšem nejsou přítomny v pšeničných tkáních za příznivých růstových teplot (Houde et al. 1992). V kontrolovaných podmínkách fytostronu (růstové komory) u mladých rostlin ve vegetativní fázi (stadium 3 listů) byla zjištěna pozitivní korelace mezi relativní akumulací dehydrinových proteinů a stupněm zimovzdornosti odrůdy, kdy odrůdy s větší zimovzdorností akumulovaly dehydriny dříve a více než méně zimovzdorné odrůdy. Více zimovzdorné rostliny ozimé pšenice mají vyšší prahové indukční teploty pro akumulaci dehydrinu, tudíž mají vyšší hladinu dehydrinových proteinů při stejné okolní teplotě ve srovnání s méně zimovzdornými odrůdami (Vítámvás et al. 2007; Kosová et al. 2012). Tato závislost byla následně pozorována i u několika odrůd ozimých pšenic v polním pokusu, ovšem pouze u vzorků odebraných před vernalizací. Po dokončení vernalizace byla tato korelace velmi slabá (Vítámvás et al. 2019).

Dehydriny lze tedy u pšenice detekovat v různých rostlinných tkáních (listech, odnožovacích uzlech), v rostlinách vystavených nízkým teplotám nebo mrazu. Lze proto dojít k závěru, že proteiny WCS120 působí jako ochrana mnoha životně důležitých buněčných proteinů v tkáni rostlin, které prošli aklimatizací (Houde et al. 1995, Sarhan et al. 1997). Díky tomu lze považovat dehydriny za markery zimovzdornosti (na úrovni transkriptu i proteinu). Ovšem musí být bráno v potaz vývojové stádium rostliny, doba aklimatizace (Kosová et al. 2011).

4 Metodika

Experimentální část práce byla řešena na pracovišti Odboru genetiky a šlechtění rostlin VÚRV Praha, v.v.i. v laboratoři Biologie stresu a biotechnologie ve šlechtění pod vedením Mgr. Pavla Vítámváse, Ph.D.

4.1 Rostlinný materiál

4.1.1 Lokalita a odběry vzorků

Odrůdy ozimé pšenice byly pěstovány na poli šlechtitelské stanice Selgen (50.0520492N, 14.6459456E) v Sibřině, Stupice. Osivo bylo vyseto 4.10.2018. Odběry vzorků proběhly 30.11.2018 v 11h dopoledne. Termín odběru byl zvolen na základě článku Vítámvás et al. 2019, kde analýza relativní akumulace dehydrinových proteinů odhalila variabilitu akumulace v zimním období (listopad, prosinec, leden). Tato studie naznačuje pozitivní korelaci mezi schopností přežít zimu a relativní akumulací dehydrinů u ozimých pšenic ve vegetativním stádiu (před vernalizací). Ovšem je nutné, aby před odběrem a v době odběru pšenice byly rostliny vystaveny nízkým teplotám a proběhla zde exprese stresových proteinů. Jednotlivé odrůdy byly vysety na parcelky o rozloze 2m² s 5 řádky, v bloku 12 x 20 parcelek (Obr. 8). Po výsevu a uválení bylo jediným agrotechnickým opatřením postřik Cougar forte 0,35 l/ha + Glean 2 g/ha před vzejitím. Odebral se vždy 1 centrální odnožovací uzel z každé rostliny, 9 uzlů (rostlin) z jedné odrůdy představovalo jeden vzorek, u každé odrůdy proběhly tři odběry po 9 uzlech - 3 biologická opakování. Dehydriny se akumulují v listech i odnožovacích uzlech, ovšem v odnožovacích uzlech je akumulace větší (Ganeshan 2008). Centrální odnožovací uzel nejdůležitější orgán rostliny, je chráněný a podobný u všech jedinců pšenic. Listy nebyly zvoleny pro odběr také proto, že u pšenic pěstovaných na poli je větší riziko poškození listů (abiotické faktory nebo okus), dále je u odebírání listů větší riziko záměny různých listů (např. 2. list zaměněný za 3. list, nebo záměna listů hlavního stvolu za listy odnoží). Velikost rostlin při odběru byla cca 10 cm a rostlina měla cca 2 odnože (Obr. 9; Obr. 10; Obr. 11). Dle makrofenologické stupnice pro obilniny (Enz & Dachler, 1997) se odrůdy ozimé pšenice v době odběru nacházely ve 22. fenologické fázi mezinárodního značení BBCH - 2 postranní viditelné výhony. Vzorky byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a následně uchovány při -80 °C v mrazáku až do dalšího zpracování.



Obrázek 8: Parcelky různých odrůd ozimé pšenice



Obrázek 9: Ozimá pšenice při odběru vzorků



Obrázek 10: Jedna rostlina ozimé pšenice při odběru



Obrázek 11: Odebrané odnožovací uzly

4.1.2 Charakteristika odrůd pšenice

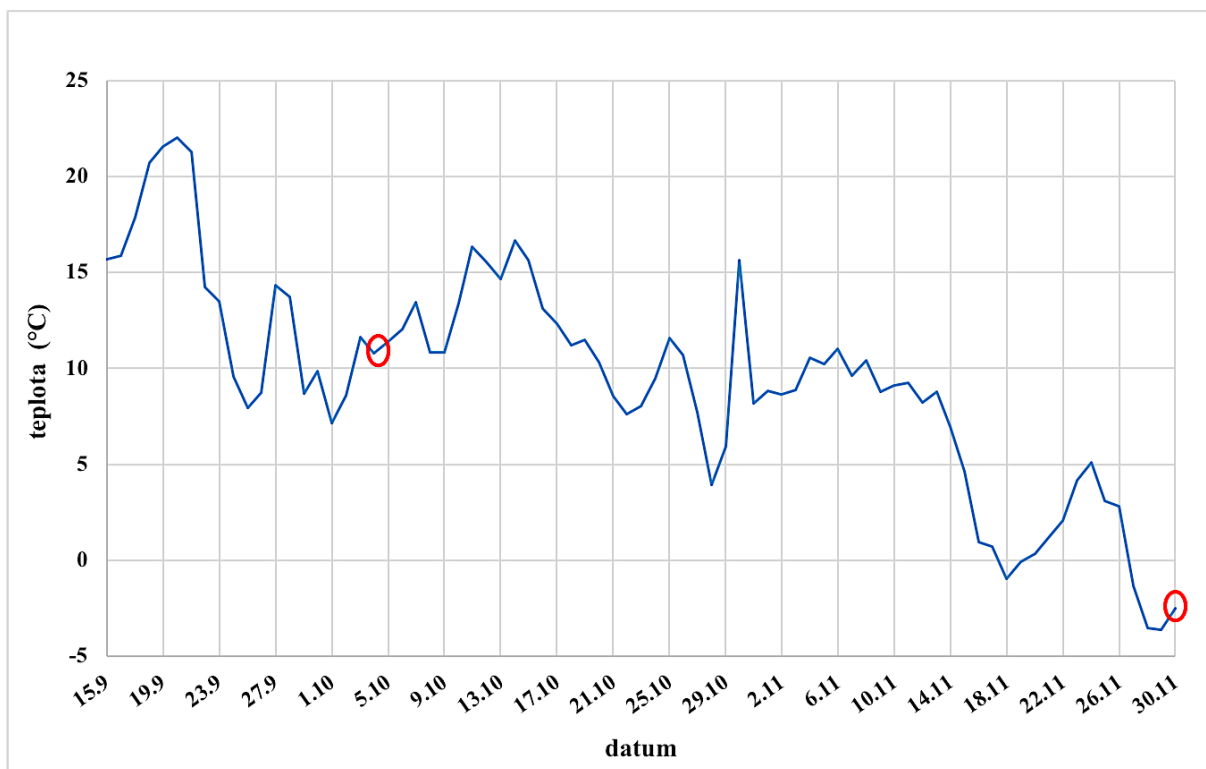
Vzorky byly odebrány z 22 odrůd ozimé pšenice, jednalo se o odrůdy Annie, Baracuda, Bodyček, Bohemia, Dagmar, Elly, Frisky, Genius, Gordian, Julie, LG Imposanto, Mironovská 808, Novosibirskaya 2, Partner, Rebell, RGT Reform, RGT Sacramento, Seladon, Steffi, Sultan, Tobak, Vanessa. Odrůdy byly vybrány tak, aby byla v tomto experimentu zastoupena v rámci možností v podobném poměru zimovzdornost nízká, střední a vysoká. Osivo každé odrůdy pocházelo z jedné mateřské rostliny z jednoho klasu, ze kterého proběhl klasový výsev. Zimovzdornost a stupeň zimovzdornosti jednotlivých odrůd pšenice pro následnou analýzu byla použita z publikace Prášil et al. 2018 (Tab. 1), kde proběhlo hodnocení zimovzdornosti dle metodiky pro praxi: Hodnocení zimovzdornosti obilnin provokační nádobovou metodou ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i (Prášilová & Prášil 2007).

Tabulka 1: Přehled zimovzdornosti odrůd pšenice ozimé, pozn. 1 - nejnižší zimovzdornost, 9 - nevyšší zimovzdornost, * není dostatečně otestováno, bude upřesněno v roce 2020 (VÚRV)

Zkratka odrůdy	Odrůda	Stupeň zimovzdornosti	Zimovzdornost	Původ odrůdy	Zdroj osiva
An	Annie	6	vysoká	CZE	SELGEN
Bar	Baracuda	3,5	nízká	DEU	SELGEN
Bdč	Bodyček	7	vysoká	CZE	SELGEN
Boh	Bohemia	7	vysoká	CZE	SELGEN
Dgr	Dagmar	5	střední	CZE	SELGEN
El	Elly	5	střední	CZE	SELGEN
Frs	Frisky	3,5	nízká	CZE	ÚKZÚZ
Gns	Genius	5,5	střední	DEU	SELGEN
Grd	Gordian	4,5	střední	DEU	SELGEN
Jul	Julie	6	vysoká	CZE	SELGEN
Imp	LG Imposanto	4,5	střední	DEU	SELGEN
Mir	Mironovská 808	8	vysoká	UA	SELGEN
Nvs	Novosibirskaya 2	8*	vysoká	RUS	VUKROM
Par	Partner	3,5	nízká	FRA	SELGEN
Rbl	Rebell	2,5	nízká	DEU	VÚRV
Ref	RGT Reform	5	střední	DEU	SELGEN
Sac	RGT Sacramento	2,5	nízká	FRA	SELGEN
Sld	Seladon	5,5	střední	CZE	SELGEN
Stf	Steffi	3,5	nízká	CZE	SELGEN
Sul	Sultan	3,5	nízká	CZE	SELGEN
Tbk	Tobak	4	střední	DEU	SELGEN
Vns	Vanessa	4	střední	CZE	SELGEN

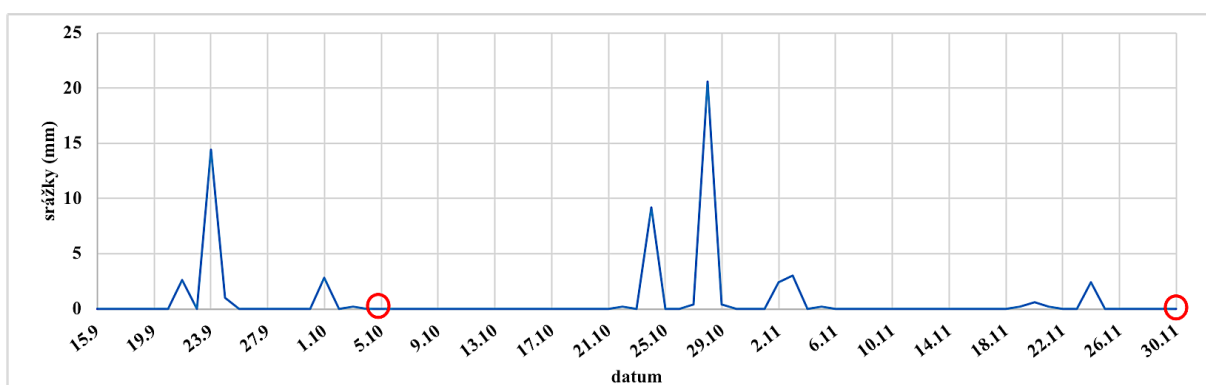
4.1.3 Průběh počasí v místě pěstování rostlin

Data byla poskytnuta Výzkumnou stanicí Uhřetěves, FAPPZ ČZU. Jedná se o nejbližší meteorologickou stanici lokalitě šlechtitelské stanice Selgen, kde byly pšenice pěstovány.



Obrázek 12: Průměrné denní teploty vzduchu ve 2 metrech, rok 2018

Průměrná denní teplota v období od výsevu do odběrů: 9,39 °C (Výzkumná stanice Uhřetěves, FAPPZ ČZU).



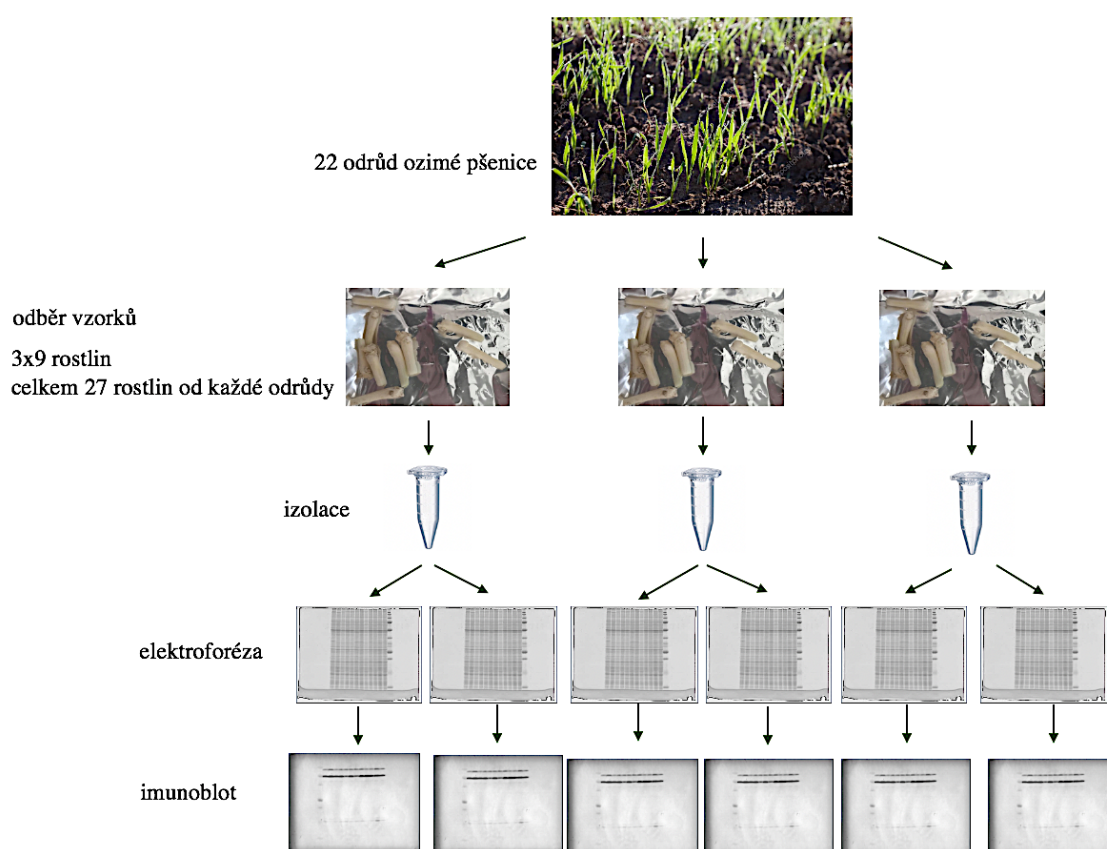
Obrázek 13: Zobrazení denních srážek, rok 2018

Průměrné denní srážky v období od výsevu do odběrů: 0,8 mm (Výzkumná stanice Uhřetěves, FAPPZ ČZU).

4.2 Metody realizovaného experimentu

4.2.1 Postup laboratorního experimentu

Laboratorní experiment se skládal z několika kroků. Pro stanovení relativní akumulace dehydrinových proteinů byly ze vzorků izolovány proteiny rozpustné po varu, dále následovala SDS-PAGE elektroforéza a imunoblot s antidehydrinovou primární protilátkou. Relativní densita dehydrinových bandů byla vyhodnocena softwarem Quantity One 4.6.2 (Vítámvás et al. 2010). Analýza v laboratoři proběhla ve 3 biologických opakováních, z každého biologického opakování proběhly 2 technické opakování (Obr. 14).



Obrázek 14: Schéma experimentu

4.2.2 Chemikálie použité pro laboratorní analýzy

Izolace proteinů

- 1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8 (Bio-Rad Laboratories)
- Inhibitory proteáz (Roche Diagnostics)
- 2-merkptoethanol (Sigma-Aldrich)
- Aceton P.A. (Lach-ner, s.r.o.)

SDS-PAGE Elektroforéza

- 40% Akrylamid/bis solution 37. 5:1 (Bio-Rad Laboratories)
- 1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8 (Bio-Rad Laboratories)
- 10x koncentrovaný Tris-Glycin-SDS (TGS) (Bio-Rad Laboratories)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Sigma-Aldrich)
- Persulfát amonný (APS) (Sigma-Aldrich)
- *N,N,N',N'*-tetramethyl-ethylendiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich)
- 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8 (Bio-rad Laboratories)
- Hmotnostní standard Precision Plus Protein™ All Blue Standards (Bio-Rad Laboratories)
- Barvivo Bio-Safe™ Coomassie G250 (Bio-Rad Laboratories)
- 2x koncentrovaný Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories)

Western Blotting

- Trizma® hydrochlorid (Sigma-Aldrich)
- Glycin (Sigma-Aldrich)
- Methanol (VWR International, s.r.o.)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Sigma-Aldrich)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich)
- 99,8% Kyselina octová (Lachner)
- 10x koncentrovaný Tris-pufrovaný fyziologický roztok (TBS) (Bio-Rad Laboratories)
- Tween 20 (polyoxyetylen sorbitan monolaurát) (Bio-Rad Laboratories)
- Sušené nízkotučné mléko Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad Laboratories)
- Primární protilátka Dehydrin (Plant) pAb (polyklonální protilátka) (Enzo Life Sciences)
- Sekundární protilátka Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-AP Conjugate (alkalická fosfatasa) (Bio-Rad Laboratories)
- 25x koncentrovaný AP Color Development Buffer (Bio-Rad Laboratories)
- AP Color Reagent A (Bio-Rad Laboratories)
- AP Color Reagent B (Bio-Rad Laboratories)

4.2.3 Roztoky použité pro laboratorní analýzy

2-merkapt ethanol v acetonu

- 80% aceton
- 0,1% (v/v) 2-merkapt ethanol

Extrakční pufr

- 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 8,8
- 1 tableta inhibitorů proteáz / cca 40-50 ml pufru

Vzorkový pufr

- Laemmli Sample Buffer
- 2,5% (v/v) 2-merkapt ethanol

Rozdělovací gel (12,5 %)

- 12,48% (v/v) Akrylamid/bis solution 37. (5:1)
- 0,375 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 8,8
- 0,1% (w/v) SDS
- 0,026% (w/v) APS
- 0,08% (v/v) TEMED

Zaostřovací gel

- 3,07% (v/v) Akrylamid/bis solution 37. (5:1)
- 0,123 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 6,8
- 0,1% (w/v) SDS
- 0,095% (w/v) APS
- 0,15% (v/v) TEMED

Blotovací pufr

- 0,036 mol·l⁻¹ Trizma® hydrochlorid
- 0,039 mol·l⁻¹ Glycin
- 20% (v/v) Methanol
- 0,13% (w/v) SDS

TTBS

- TBS
- 0,05% (v/v) Tween 20

Blokovací pufr

- Sušené mléko: 4,5 g / 100 ml
- TBS

Roztok vyvíječe

- 3,71 % (v/v) AP color development pufer
- 0,93 % (v/v) AP color reagent A
- 0,93 % (v/v) AP color reagent B

Pufr na protilátky

- Sušené mléko: 1,7 g / 100 ml
- TTBS

Roztok primární protilátky

- 0,1% (v/v) Primární protilátka, pAb
- Pufr na protilátky

Roztok sekundární protilátky

- 0,033% (v/v) Sekundární protilátka
- Pufr na protilátky

4.2.4 Přístroje použité pro laboratorní analýzy

Izolace proteinů

- Analytické váhy (Sartorius)
- Centrifuga Heracus Megafuge 8R Centrifuge (Thermo Scientific)
- Vortex Mixer (Labnet)
- Vortex P-LAB (Velo Scientifica)

SDS-PAGE Elektroforéza

- Zdroj elektrického napětí Standard Power Pack P25 (Biometra)
- Aparatura Typ: G47, Model: Multigel-long (Whatman Biometra)
- Inkubátor Dry Bath Incubator, Model MD-02 (Mayor Science)

Western Blotting

- Blotovací přístroj TE 77 PWR Semi-dry Transfer UN (Amersham Biosciences)
- Zdroj elektrického napětí Standard Power Pack P25 (Biometra)
- Automatická míchačka C-MAG HS 7 (IKA®)
- Třepačka KS 130 Basic (IKA®)

4.2.5 Izolace proteinů rozpustných po varu

Pozn.: Je nutné pracovat v rukavicích a vzorky držet, pokud možno, stále na ledu.

Rozrušení buněk

Pozn: Rozbití buněk, pletiv, tkání a zamezení degradaci proteinů (přidání inhibitorů proteáz).

- 1) Byly dopředu připravené sterilní misky s tloučky zabalené v alobalu (sterilizace probíhá suchým vzduchem při teplotě 160 °C, 1h) předchlazené v mrazáku (-50 °C), byl donesen dostatek tekutého dusíku, v jedné nádobce s tekutým dusíkem byly doneseny vzorky (do té doby držené v -80 °C), dále byl připraven extrakční pufr (0.1 M Tris-HCl pH 8,8 s inhibitory proteáz [1 tableta inhibitorů na 40-50 ml]).
- 2) Misky s tloučky byly vychlazené pomocí tekutého dusíku, do každé misky s tekutým dusíkem byl vložen jeden vzorek, u každého vzorku byla označena odrůda a hmotnost.
- 3) Vzorky byly rozdrceny tloučkem na jemný prášek a do misky byl doplňován tekutý dusík, aby vzorky nerozmrzly. Vzorek byl drcen 3x.
- 4) Do rozdrcených vzorků zalitých tekutým dusíkem byl přidán extrakční pufr o objemu 4,5x větším, než hmotnost vzorků (4,5 ml pufru na 1 g vzorku), dále byly vzorky rozdrceny se zmraženým extrakčním pufrem na prach.

Příklad:

Odrůda	g	ml
ANNIE	0,338	1,520
BARACUA	0,229	1,030
BODYČEK	0,28	1,260

BOHEMIA 0,39 1,755

DAGMAR 0,345 1,555

5) Misky s rozdrčenými vzorky a extrakčním pufrem se nechaly roztát na při pokojové teplotě.

Centrifugace

6) Po roztátí byly přeneseny vzorky do 15 ml zkumavek a dány na led.

7) Vzorky byly centrifugovány (5 000 RPM, 20 min, 4 °C; nebo taky 12 000 RPM a 10 min) a 1,8 ml supernatantu byl přenesen do 2 ml zkumavek. Zkumavky byly vloženy na led.

8) Vzorky byly opět centrifugovány (14 000 RPM, 20 min, 4 °C) a 1,7 ml supernatantu byl přenesen do nových 2 ml zkumavek. Zkumavky byly vloženy na led. (V případě přenesení nečistot do nové zkumavky byla opakována centrifugace a bylo přeneseno 1,6 ml.)

Vložení do vroucí vody

Pozn.: Zachování pouze termostabilních proteinů.

9) Vzorky byly vloženy do vroucí vody na 15 min.

10) Vzorky byly dány na 5 min na led a každou minutu se zkumavky otočily o 180 ° a zpátky, pro odlepení sedimentu ode dna (neodlepený sediment od zpodku zkumavky bylo nutné odlepit).

Centrifugace

11) Vzorky byly centrifugovány (14 000 RPM, 20 min, 4 °C) a supernatant byl přelit do nových 2 ml zkumavek.

12) Z takto připravených vzorků bylo odebráno 3x 300 μ l do třech 2 ml zkumavek. Ke každému vzorku byl přidán pětinašobek ledového 1% merkptoethanolu rozpuštěného v acetonu (1,5 ml), následně byl vzorek zvortexován.

Pozn.: Merkptoethanol (beta-merkptoethanol) funguje jako redukční činidlo -stabilizace vzorku.

13) Vzorky byly inkubovány přes noc v mrazáku při teplotě -50 °C.

Pozn.: Inkubovat pro vysrážení termostabilních proteinů.

14) Další den byly vzorky centrifugovány (14 000 RPM, 20 min, 4 °C).

15) Ke každé peletě byl přidán 1 ml vychlazeného 80% acetonu, vzorek byl zvortexován a inkubován v mrazáku -50 °C, 20 min.

Pozn.: Aceton je použit na propláchnutí od možných nečistot.

16) Vzorky byly centrifugovány (14 000 RPM, 15 min, 4 °C), v digestoři byl vylil supernatant, a peleta byla ponechána na dně zkumavky.

17) Pelety se nechaly sušit v zapnuté digestoři několik hodin.

18) Vzorky bylo možné ihned použít (elektroforéza) nebo skladovat při teplotě -80 °C.

Rozpuštění vzorku

19) Každá vysušená peleta byla smíšena s 70 μ l vzorkového pufru a vortexována do rozpuštění.

vzorkový pufr:

950 μ l 2x Laemmli Sample Buffer přilít

50 μ l 2,5 % merkaptoethanolu

1000 μ l nano H₂O.

Pozn.: 2x Laemmli vzorkový pufr je použit pro rozpuštění vzorku a kompatibilitu s SDS systémem, obsahuje bronfenolovou modř pro zviditelnění vzorku při migraci gelem. Bronfenolová modř je negativně nabitá a migruje spolu s proteiny k anodě, má malou molekulovou hmotnost, takže migruje rychleji než nejmenší proteiny, glycerol pro zatížení vzorků, aby klesly do jamky gelu. Merkaptoethanol je redukční činidlo (rozvolnění disulfidických můstků).

20) Vzorky byly 5 min inkubovány při teplotě 95 °C a stočeny (kvůli kapkám zkondenzovaným na víčku).

4.2.6 Proteinová denaturující elektroforéza SDS-PAGE

(Sodium dodecylsulfát - Protein Acrylamide Gel Electrophoresis)

Pozn.: Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS. Jedná se o separaci proteinů (dehydrinů) na základě délky polypeptidového řetězce pomocí migrace v gelu v elektrickém poli. Délka fragmentů 10 - 250 kD.

- 1) Byla sestavena dvojice skel pro elektroforézu.
- 2) Byl připraven 12,5 % rozdělovací (resolving) gel (asi 12,5 ml na 1 gel).

Pozn.: TEMED (tetramethylethylendiamin) a APS (peroxydisíran amonný) - přidat až těsně před nalitím gelu, protože spustí jeho polymeraci (katalyzátory polymerace). SDS (dodecylsírán sodný) zajišťuje (denaturaci) a záporný náboj všech proteinů. Tris-HCl slouží pro upravení požadovaného pH. Poměr bisakrylamidu a akrylamidu určuje porozitu gelu.

rozdělovací gel:

5,3 ml H₂O

3,9 ml 40% směsi akrylamid-bisakrylamid

3,125 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)

0,125 ml 10 % SDS

33,12 μ l 10 % APS

9,75 μ l TEMED

Pozn.: 10 % APS připravíme tak, že na každý mg APS přidáme 10 μ l H₂O.

- 3) Rozdělovací gel byl 10x promíchán obrácením a pipetou postupně naléván do prostoru mezi skly, dokud nebyl jeho horní okraj asi 1 cm pod okrajem skla (cca 11,7 ml gelu).

- 4) Stříčkou byl nastříkán 0,1 % SDS roztok nad gel tak, aby tento roztok vyplnil zbývající prostor (asi 1 cm) nad gelem (zamezení přístupu vzduchu zrychlí polymeraci)
- 5) Gel se nechal polymerovat 60 min.
- 6) Dále byl připraven 3 % zaostřovací (stacking) gel (asi 5 ml na 1 gel).

zaostřovací gel:

3,285 ml H₂O

0,375 ml 40 % směsi akrylamid-bisakrylamid

1,125 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

0,05 ml 10 % SDS

32 μ l 10 % APS

8 μ l TEMED

Pozn.: TEMED a APS přidat až těsně před nalitím gelu, protože spustí jeho polymeraci.

- 7) Z prostoru mezi skly byl vylit 0,1 % SDS. Pipetou do prostoru mezi skly bylo nalito tolik zaostřovacího gelu, aby zcela zaplnil zbývající prostor (asi 4 ml). Do zaostřovacího gelu byl vložen hřebínek, gel se nechal polymerovat 30 min.

Pozn.: Diskontinuální systém – jsou použity dva typy gelů o rozdílném pH a koncentraci akrylamidu. V zaostřovacím gelu je menší odpor a menší napětí, urychluje pohyb proteinů a tím se zaostří bandy.

- 8) Byla sestavena aparatura pro elektroforézu, každý pár skel (1 gel) byl připnut pomocí dvou svorek k elektroforéze, do aparatury byl nalit running pufr.

Pozn.: Running pufr stabilizuje pH během elektroforézy

- 9) Do jamek byly napipetovány vzorky

6 μ l standardu – komerčně dostupný, směs proteinů o známé velikosti

8 μ l interního standardu

8 μ l od každého vzorku

Pozn.: Na každém kraji bylo ponecháno několik volných jamek, do nich napipetovat vzorkový pufr o stejném objemu (8 μ l). Vzorky se nenanáší hned do jamek na krajích kvůli okrajovému efektu („smiling effect“) – vzniká zahříváním a jiným proudem po stranách gelu.

- 10) Elektroforéza byla zapojena, bylo spuštěno chlazení a nastaven proud 15 mA na 1 gel. Nyní bylo potřeba počkat, než se přední část mobilní fáze dostane na začátek rozdělovacího gelu.
- 11) Hodnota proudu byla zvýšena na 25 mA na 1 gel.
- 12) Dále se počkalo až barva (bromfenolová modř) dojde téměř ke konci rozdělovacího gelu a pak byl vypnut proud i chlazení.

4.2.7 Westernový polosuchý přenos

(Semi-dry Western Blotting)

Pozn.: Proteiny jsou separovány SDS-PAGE a následně přeneseny z gelu na nitrocelulózovou membránu.

- 1) Pomocí řezačky byly připraveny blotovací papíry (6 papírů na 1 gel) tak, že jsou v každé ose o 0,2 cm kratší než gel. Obdobným způsobem byly nakrájeny i nitrocelulózové membrány (1 membrána na 1 gel).
- 2) Blotovací papíry, nitrocelulózové membrány i gely byly zality blotovacím pufrem a dány třepat na 20 min.

Připravit 300 ml (1 gel) blotovacího pufru.

blotovací pufr 300 ml (1 gel):

1,745 g Tris-HCl

0,879 g glycin

60 ml methanol

1,125 ml 10 % SDS

- 3) Gel byl vyjmut z elektroforézy.
- 4) Do přístroje pro Semi-dry blot byl vyskládán „sendvič“, který se skládá z 3 blotovacích papírů, 1 membrány, 1 gelu a dalších 3 blotovacích papírů. Každá vrstva se zalévá blotovacím pufrem, aby nedocházelo k vysušování a důkladně se vytlačují válečkem vzduchové bublinky.
- 5) Podmínky blotování 0,8 mA/cm² po dobu 55 min.

Pozn.: Jedná se o polosuchý western eletroblotting, hnací silou pro přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu je síla elektrického pole.

- 6) Nitrocelulózové membrány byly vyjmuty z přístroje a zality nanovodou, třepány 5 min.
- 7) Membrány byly nechány oschnout a byly přeneseny do suchých plastových petriho misek.

4.2.8 Imunodetekce

Pozn.: Zviditelnění separovaných proteinů přenesených na membránu probíhá pomocí primárních a sekundárních protilátek.

- 1) Na 1 membránu bylo připraveno 350 ml TBS. 100 ml TBS odlít a ze zbylých 250 ml TBS připravit TTBS. S využitím TBS a TTBS byly připraveny blokovací pufr a antibody pufr.

TBS (na 1 membránu):

315 ml deionizované vody

35 ml 10x TBS

TTBS (na 1membránu):

250 ml TBS

0,125 ml Tween 20

Pozn.: TBS (Tris Buffered Saline) a TTBS (Tris Tween Buffer Saline) - promývací roztoky.

blokovací roztok - blocking solution (na 1 membránu):

1,35 g sušeného mléka

30 ml TBS

Pozn.: Blokování – použití nízkotučného sušené mléka pro zablokování zbývajících vazebných míst pro proteiny na membráně, aby zde nedocházelo k navázání nechtěných proteinů.

antibody pufr – pufr pro protilátku (na 1 membránu):

0,75 g sušeného mléka

50 ml TTBS

Pozn.: Nosič protilátky.

- 2) Membrány v miskách byly zality deionizovanou a třepány 5 min. Deionizovaná voda byla vylita.
- 3) Na každou membránu bylo nalito 25 ml TBS, třepáno 5 min. TBS byl vylit.

Pozn.: Příprava membrány na blocking solution.

- 4) Na každou membránu bylo v misce nalito 30 ml blokovacího pufru, třepáno 40 min. Blokovací pufr byl vylit.
- 5) Na každou membránu v misce bylo nalito 25 ml TTBS, třepáno 5 min. TTBS byl vylit. Tento krok by proveden celkem 2x.
- 6) Smíchat antibody pufr s primární protilátkou, na každou membránu bylo nalito 20 ml této směsi, třepáno 3 h.

primární protilátka (na 1 membránu):

20 ml antibody pufru

20 μ l primární protilátky (Plant dehydrin)

Pozn.: Primární protilátky se váží na oblast KIKEKLPG, což je část konzervativního K-segmentu, který je charakteristický a jedinečný pro všechny dehydriny. Polyklonální protilátka pochází z králíčího séra.

- 7) Na každou membránu v misce bylo nalito 30 ml TTBS, třepáno 5 min. TTBS byl vylit. Tento krok byl proveden celkem 2x.

Pozn.: Příprava membrány na antibody pufr.

- 8) Antibody pufr byl smíchán se sekundární protilátkou, na každou membránu bylo nalito 25 ml této směsi, třepáno 1,5 h.

sekundární protilátka (na 1 membránu):

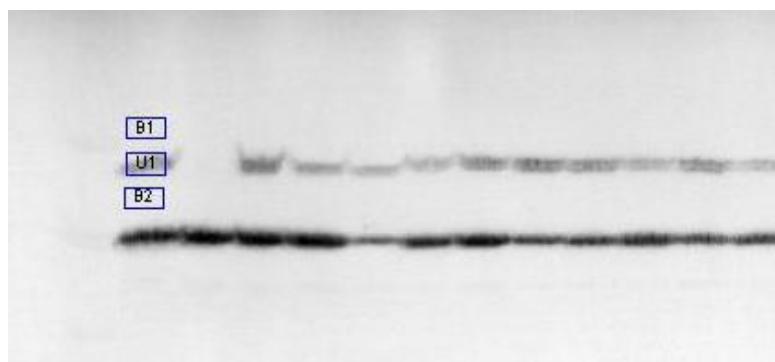
- 25 ml antibody pufru
- 8,25 μ l sekundární protilátky

Pozn.: Sekundární protilátka se váže na primární protilátku, jedná se o Goat Anti-Rabbit IgG AP conjugate.

- 9) Membrány v miskách byly zality TTBS, třepáno 5 min. TTBS byl vylit. Tento krok byl proveden celkem 2x.
- 10) Membrány v miskách byly zality TBS, třepáno 5 min. TBS byl vylit.
- 11) Na každou membránu v misce bylo nalito 20 ml vyvíječe, třepáno 10 min.
vyvíječ (25 ml na 1 membránu):
24 ml deionizované vody
1 ml AP color development pufru
0,25 ml AP color reagent A
0,25 ml AP color reagent B
- 12) Membrány v miskách byly zality deionizovanou vodou, třepáno 5 min. Deionizovaná voda byla vylita.
- 13) Membrány v byly miskách zality deionizovanou vodou, třepány 5 min a oskenovány na skeneru.

4.2.9 Kvantitativní analýza dehydrinů

Relativní densita dehydrinových bandů byla vyhodnocena softwarem Quantity One 4.6.2 (Bio-Rad). Určení hodnoty intenzity jednotlivých bandů proběhlo označením bandů a k němu příslušné dvě pozadí. Půměr intenzity dvou pozadí (B1, B2) byl odečten od intenzity bandu (U1), tímto způsobem byla určena intenzita bandu (Obr. 15). Dále byla provedena matematická transformace dat s cílem standardizovat a kvantifikovat akumulaci dehydrinů a současně eliminovat vliv pozadí. Měření proběhlo ve 3 biologických a 2 technických opakováních, jednalo se tedy celkem o 6 opakování. Bandy každé odrůdy byly sečteny a tím vznikla celková relativní akumulace dehydrinů u každé odrůdy (viz tabulka přílohy č.1).



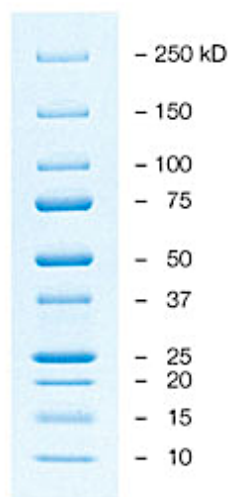
Obrázek 15: Ukázka označení bandu (U1) a jeho pozadí (B1, B2)

Statistické zpracování výsledků proběhlo pomocí programu R (verze 3.6.2):

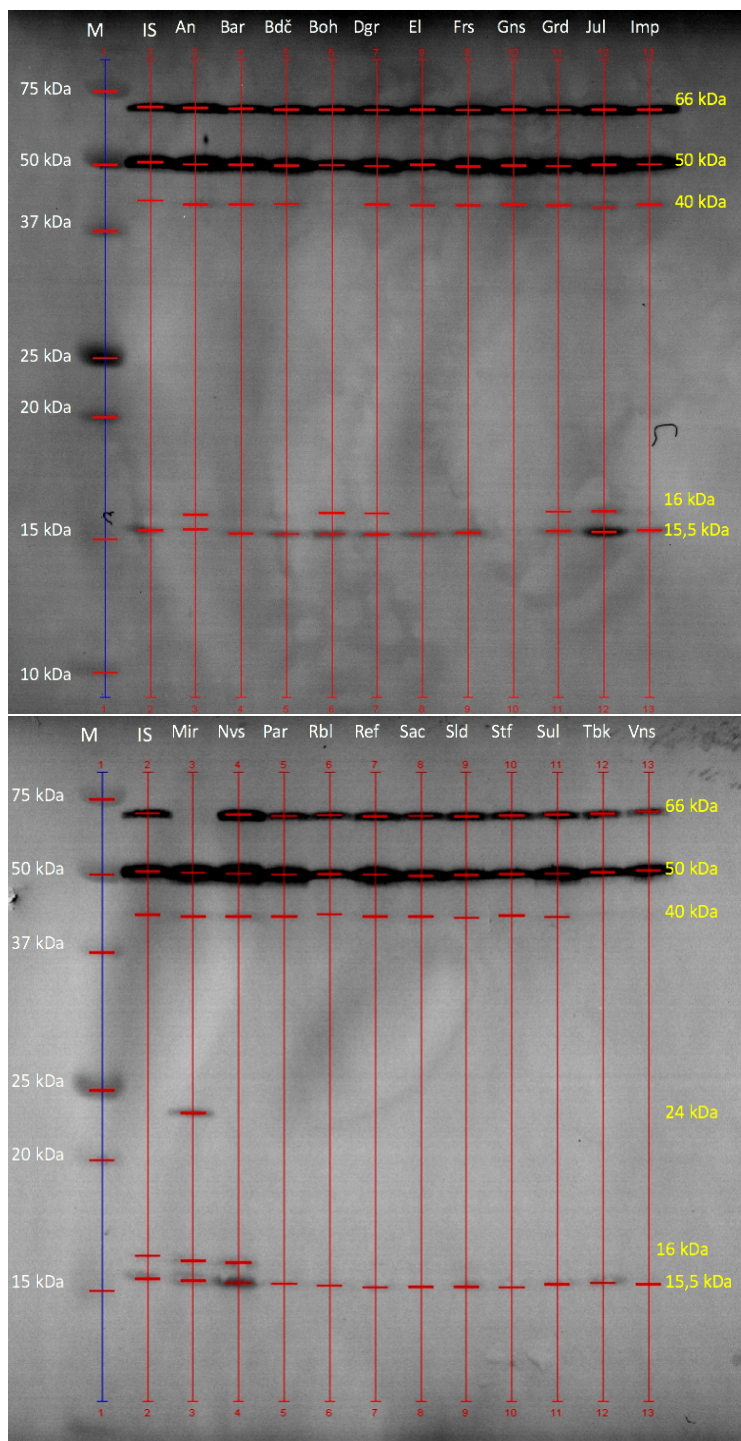
- Zobrazení rozložení dat, identifikace a vyřazení odlehlých pozorování v naměřených datech
- **Testování vlivu odrůdy na relativní akumulaci dehydrinů**
Analýza rozptylu (ANOVA), pro hodnocení normality byl použit Shapiro-Wilkův test, studentizovaná verze Bresch-Paganova testu byla použita pro testování homoskedasticity (shodnost rozptylů), dále byla použita Tukeyho procedura mnohonásobného porovnávání
- **Testování vlivu skupiny zimovzdornosti na relativní akumulaci dehydrinů**
Analýza rozptylu (ANOVA), pro hodnocení normality byl použit Shapiro-Wilkův test, pro testování homoskedasticity (shodnost rozptylů) byla použita studentizovaná verze Bresch-Paganova testu s Whiteovu HC3 úpravou, pro mnohonásobné porovnání byla použita Hothorn-Bretz-Westfalova procedura s Whiteovou HC3 úpravou
- **Testování vlivu stupně zimovzdornosti na relativní akumulaci dehydrinů**
Shapiro-Wilkův test normality, studentizovaný Breusch-Paganův test homoskedasticity reziduí, lineární regrese

4.2.10 Kvalitativní analýza dehydrinů

Analýza vyhodnocení molekulární hmotnosti jednotlivých dehydrinů u 22 odrůd pšenice byla uskutečněna pomocí softwaru Quantity One 4.6.2. Určení molekulové hmotnosti proběhlo pomocí standardu ALL Blue Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad; Obr. 16), který byl nanesen společně se vzorky na gel pro elektroforézu, od známých velikostí proteinů standardu byla odečtena velikost analyzovaných dehydrinů (Obr. 17).



Obrázek 16: Zobrazení směsi deseti modře zbarvených rekombinantních proteinů 10–250 kD (Bio-Rad)



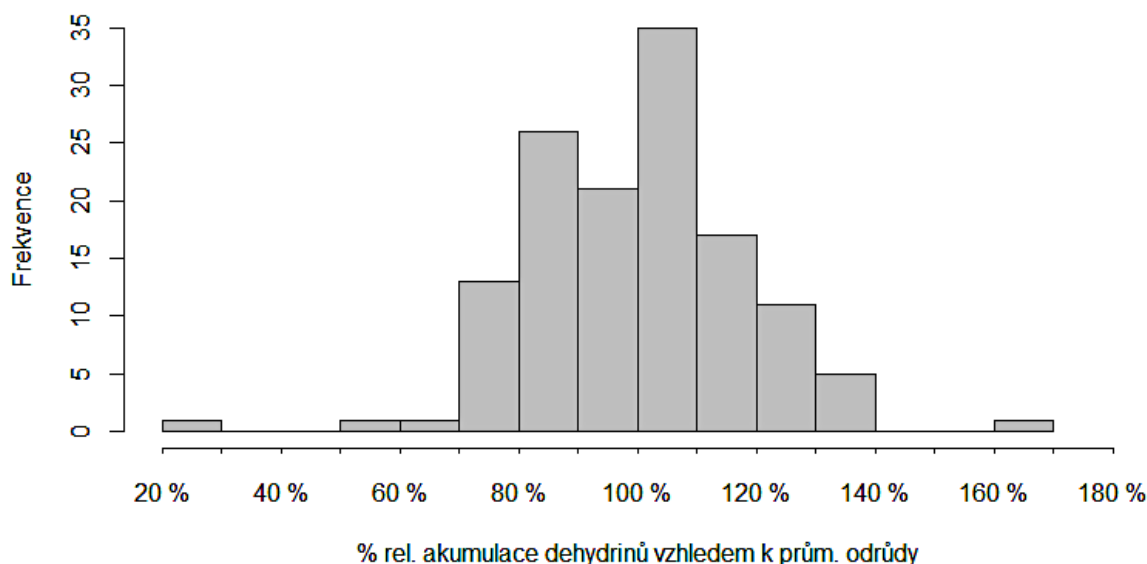
Obrázek 17: Reprezentativní imunoblotty 22 testovaných odrůd, M - ALL Blue Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad), IS – interní standard (směsný vzorek) nutný pro normalizaci kvantit mezi gely

5 Výsledky

5.1 Kvantitativní analýza dehydrinů

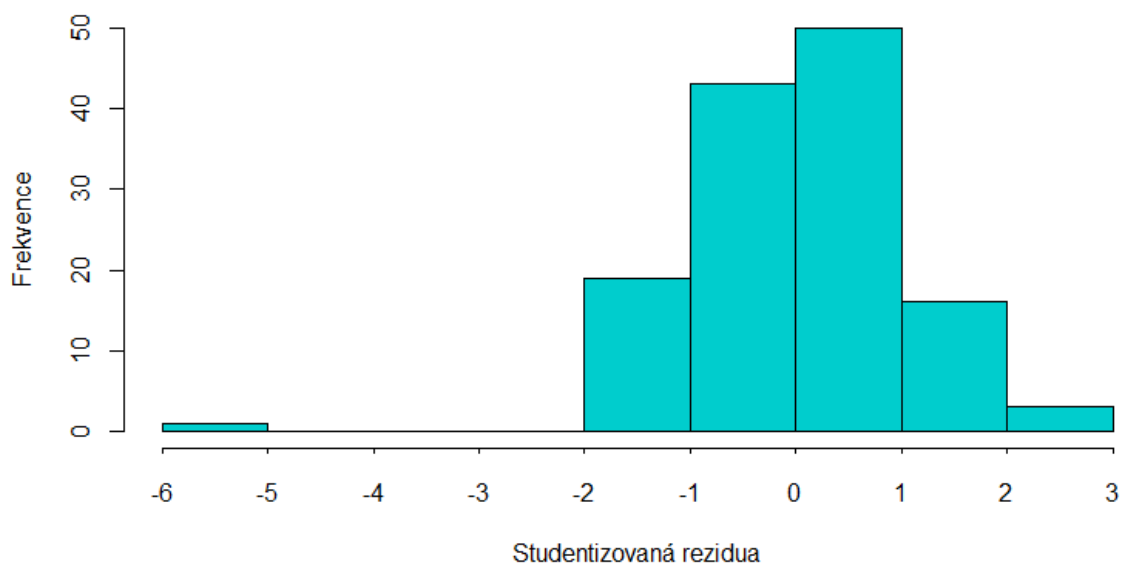
5.1.1 Rozložení dat a identifikace odlehlých pozorování

Vzhledem k charakteru měření je možné, že v některých případech nebyla relativní akumulace dehydrinů změřena správně. Je tedy žádoucí z dat vyřadit potenciální odlehlá pozorování, jejichž ponechání by mohlo (chybně) ovlivnit výsledky statistické analýzy. Nejdříve byly zobrazeny procentní rozdíly jednotlivých měření relativní akumulace dehydrinů vzhledem k průměru pro každou zkoumanou odrůdu pšenice zvlášť (u každé odrůdy byl spočítán průměr a analyzováno, jak se pozorování liší od průměru dané odrůdy). Na krajích histogramu níže vidíme 2 podezřelá měření (Obr. 18). Konkrétně se jedná o 3. měření u odrůdy Elly a 3. měření v datech u odrůdy Mironovská (viz příloha č. 1).



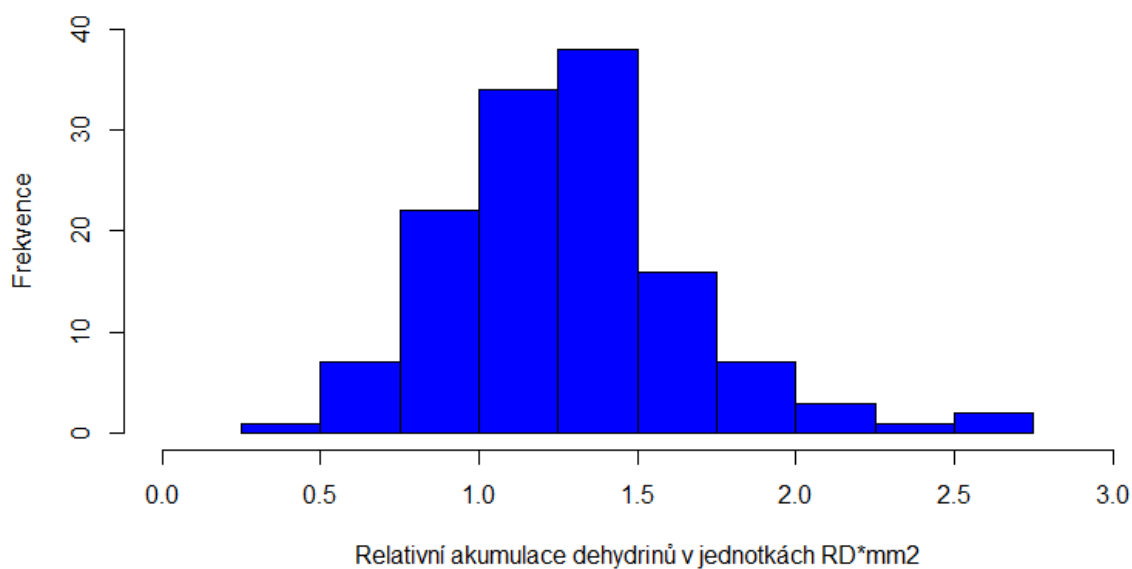
Obrázek 18: Histogram podílu hodnot relativní akumulace dehydrinů pozorování a průměru dané odrůdy

Vzhledem k charakteru této analýzy byl důležitý především vliv odlehlého pozorování na odhad lineárního modelu. Pro otestování byl odhadnutý lineární model relativní akumulace dehydrinů v závislosti na odrůdě pšenice a byly analyzovány hodnoty jeho studentizovaných reziduí. Tato rezidua by měla mít Studentovo t-rozdělení s určitým počtem volnosti (závislým na počtu pozorování a počtu vysvětlujících proměnných, resp. jejich kategorií). Důležitý poznatek je však v tom, že t-rozdělení by mělo mít střední hodnotu 0 a histogram podobný normálnímu rozdělení. Při pohledu na histogram studentizovaných reziduí našeho modelu je velmi zřetelně vidět jedno odlehlé pozorování. Jednalo se o pozorování 3. měření v datech u odrůdy Mironovská a vzhledem k druhému potvrzení jeho odlehlosti bylo z dat vyloučeno, 3. měření u odrůdy Elly není třeba vyloučit (Obr. 19).



Obrázek 19: Histogram studentizovaných reziduí pro určení odlehlých pozorování

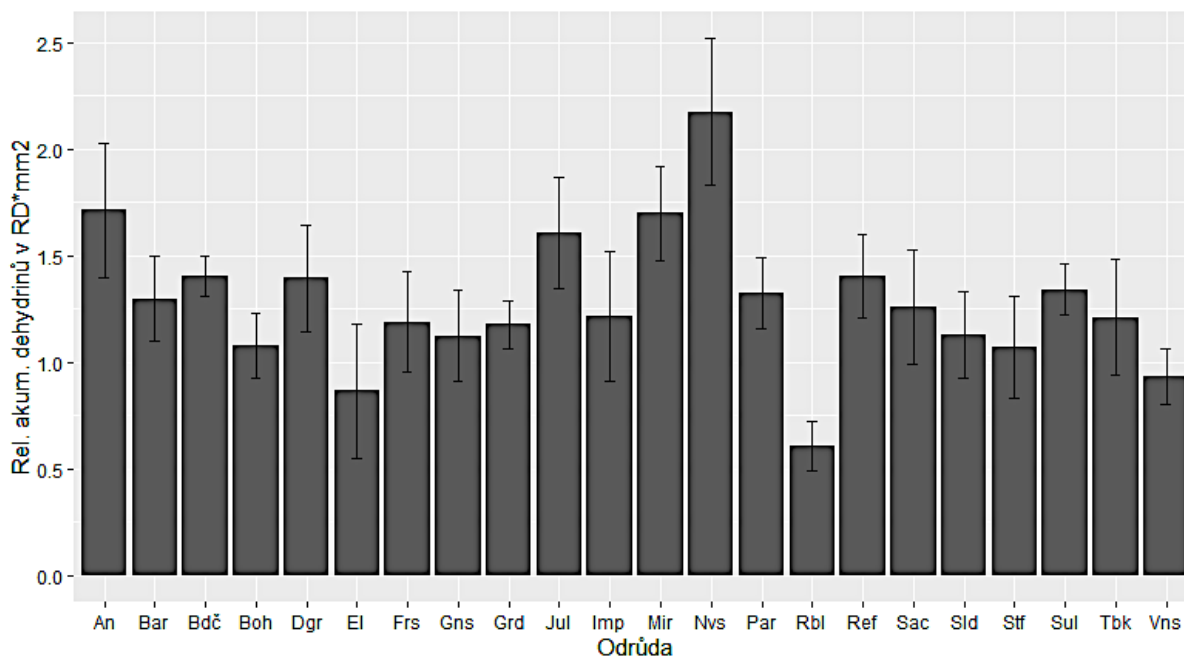
Hlavním cílem této analýzy je zjistit, zda se naměřená relativní akumulace dehydrinů v jednotkách $RD \cdot mm^2$ liší v závislosti na odrůdě, její zimovzornosti (nízká střední, vysoká) a stupně zimovzdornosti (1-9, 1 - nejnižší zimovzdornost, 9 - nevyšší zimovzdornost).



Obrázek 20: Histogram relativní akumulace dehydrinů v $RD \cdot mm^2$ pro celá data, která budou využita v další analýze (bez odlehlého pozorování)

5.1.2 Vliv odrůdy na relativní akumulaci dehydrinů

V následujícím grafu je zobrazeno (Obr. 21), jak se průměrná relativní akumulace dehydrinů liší mezi jednotlivými odrůdami. Kromě průměru je v grafu znázorněna i směrodatná odchylka měření v jednotlivých skupinách. Dá se předpokládat, že formální testy potvrdí hypotézu, že mezi některými odrůdami se relativní akumulace dehydrinů významně liší.



Obrázek 21: Průměrné relativní akumulace dehydrinů dle odrůd

K otestování hypotézy závislosti relativní akumulace dehydrinů na odrůdě bylo přistoupeno v první řadě konstrukcí lineárního modelu. Předpokladem pro použití analýzy rozptylu (Anova) je nezávislost měření, normalita dat a homogenita rozptylů. Analýzou a testováním vlastností reziduí bylo zjištěno, zda jsou splněny předpoklady, které budeme potřebovat pro další testy. (Pokud by byla například přímo testována normalita relativní akumulace dehydrinů jednotlivých odrůd, vzhledem k malému počtu pozorování u každé skupiny by normalita jistě nebyla zamítnuta). Nezamítnutí obou důležitých vlastností reziduí potvrzují i formální testy. Pro normalitu byl použit Shapiro-Wilkův test, jehož výsledkem byla p-hodnota 0,07 a pro homoskedasticitu (shodnost rozptylů) studentizovanou verzi Bresch-Paganova testu také s výslednou p-hodnotou rovnou 0,07. Na hladině spolehlivosti 0,05 tedy normalita ani homoskedasticita reziduí nebyla zamítnuta. Díky tomu jsou splněny všechny předpoklady Anova testu a může být proveden.

Analýza rozptylu (Anova)

Bylo otestováno, jestli se liší relativní akumulace dehydrinů u různých odrůd pšenice (testování rozdílu středních hodnot odrůd). Díky p-hodnotě $2,2 \cdot 10^{-16}$, která je nižší než hladina spolehlivosti 0,05 můžeme tvrdit, že nulová hypotéza o shodné relativní akumulaci dehydrinů napříč jednotlivými odrůdami je zamítnuta. Relativní akumulace dehydrinů se tedy mezi odrůdami statisticky významně liší (v souboru je aspoň jedna odrůda s jinou relativní akumulací dehydrinů).

Tabulka 2: Výsledky analýzy rozptylu

Df (počet stupňů volnosti)	F hodnota	P hodnota
21 a 109	12,253	$2,2 \cdot 10^{-16}$

Tukeyho procedura mnohonásobného porovnávání

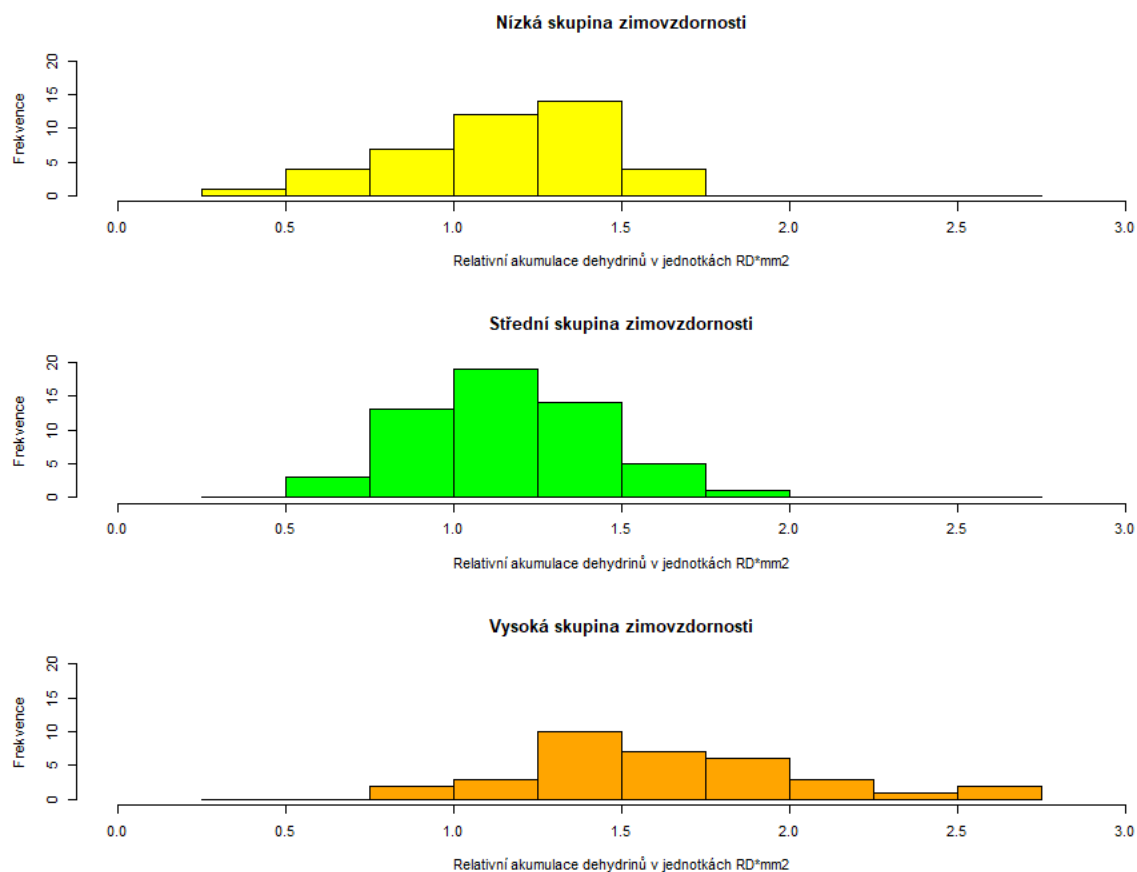
Pro testování, mezi kterými odrůdami přesně se relativní akumulace dehydrinů liší, byla použita takzvaná Tukeyho procedura mnohonásobného porovnávání. Tato metoda počítá s úpravou p-hodnot vzhledem k mnohonásobnému porovnávání a je pro použití v této situaci vhodná. Jejími předpoklady jsou normalita a homoskedasticita v rámci jednotlivých porovnávaných skupin (odrůd) a také vyvážená struktura měření (ideálně stejný počet v každé skupině). Po vyloučení 1 pozorování z analyzovaných dat zde sice dokonale vyvážená struktura není, ale je popsáno, že pokud je vyváženost blízko úplné, problémy to nezpůsobuje. Normalita a homoskedasticita v rámci skupin zamítnuta není (viz výše), a tedy je možné přejít k vlastnímu testu. Výsledkem jsou p-hodnoty testování hypotéz o stejné relativní akumulaci dehydrinů každé dvojice odrůd. Tabulku se všemi výsledky je zobrazena na následující stránce (Tab. 3). Červeně označená pole v tabulce jsou znázorněné dvojice, které se od sebe statisticky významně liší.

Tabulka 3: Výsledky p-hodnot Tukeyho procedury mnohonásobného porovnávání

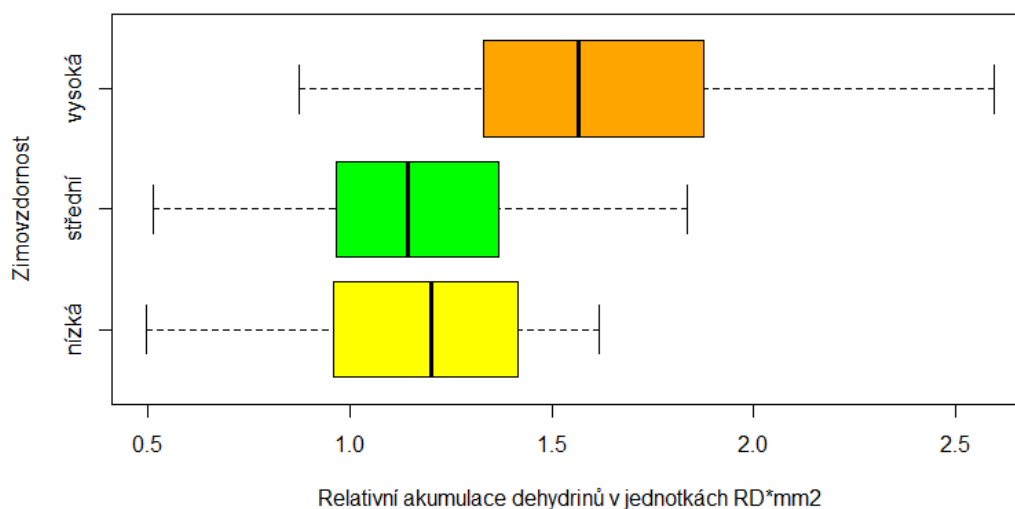
	An	Bar	Bdč	Boh	Dgr	El	Frs	Gns	Grd	Imp	Jul	Mir	Nvs	Par	Rbl	Ref	Sac	Sid	Stf	Sul	Tbk	Vns	AVG p-value
An	XXX	0.192	0.731	0.001	0.669	0.000	0.017	0.003	0.013	1.000	0.033	1.000	0.080	0.296	0.000	0.724	0.092	0.003	0.001	0.375	0.029	0.000	0.250
Bar	0.192	XXX	1.000	0.985	1.000	0.140	1.000	0.999	1.000	0.731	1.000	0.332	0.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.977	1.000	1.000	0.426	
Bdč	0.731	1.000	XXX	0.630	1.000	0.012	0.987	0.845	0.980	0.995	0.998	0.862	0.000	1.000	0.000	1.000	1.000	0.874	0.576	1.000	0.997	0.065	
Boh	0.001	0.985	0.630	XXX	0.693	0.991	1.000	1.000	1.000	0.016	1.000	0.003	0.000	0.953	0.062	0.637	0.999	1.000	1.000	0.916	1.000	1.000	
Dgr	0.669	1.000	1.000	0.693	XXX	0.016	0.993	0.887	0.989	0.990	0.999	0.818	0.000	1.000	0.000	1.000	1.000	0.910	0.641	1.000	0.998	0.083	
El	0.000	0.140	0.012	0.991	0.016	XXX	0.663	0.936	0.714	0.000	0.508	0.000	0.000	0.083	0.923	0.013	0.273	0.917	0.995	0.058	0.538	1.000	
Frs	0.017	1.000	0.987	1.000	0.993	0.663	XXX	1.000	1.000	0.177	1.000	0.044	0.000	1.000	0.004	0.988	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.943	
Gns	0.003	0.999	0.845	1.000	0.887	0.936	1.000	XXX	1.000	0.045	1.000	0.009	0.000	0.994	0.022	0.851	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	0.998	
Grd	0.013	1.000	0.980	1.000	0.989	0.714	1.000	1.000	XXX	0.149	1.000	0.036	0.000	1.000	0.005	0.981	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.960	
Imp	1.000	0.731	0.995	0.016	0.990	0.000	0.177	0.045	0.149	XXX	0.280	1.000	0.006	0.851	0.000	0.994	0.517	0.054	0.012	0.907	0.258	0.000	
Jul	0.033	1.000	0.998	1.000	0.999	0.508	1.000	1.000	1.000	0.280	XXX	0.078	0.000	1.000	0.002	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.864	
Mir	1.000	0.332	0.862	0.003	0.818	0.000	0.044	0.009	0.036	1.000	0.078	XXX	0.092	0.463	0.000	0.857	0.184	0.011	0.002	0.551	0.070	0.000	
Nvs	0.080	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.092	XXX	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
Par	0.296	1.000	1.000	0.953	1.000	0.083	1.000	0.994	1.000	0.851	1.000	0.463	0.000	XXX	0.000	1.000	1.000	0.996	0.933	1.000	0.295	0.755	
Rbl	0.000	0.000	0.000	0.062	0.000	0.923	0.004	0.022	0.005	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	XXX	0.000	0.000	0.019	0.076	0.000	0.002	0.616	
Ref	0.724	1.000	1.000	0.637	1.000	0.013	0.988	0.851	0.981	0.994	0.998	0.857	0.000	1.000	0.000	XXX	1.000	0.878	0.583	1.000	0.997	0.067	
Sac	0.092	1.000	1.000	0.999	1.000	0.273	1.000	1.000	1.000	0.517	1.000	0.184	0.000	1.000	0.000	1.000	XXX	1.000	0.997	1.000	0.642	0.741	
Sid	0.003	1.000	0.874	1.000	0.910	0.917	1.000	1.000	1.000	0.054	1.000	0.011	0.000	0.996	0.019	0.878	1.000	XXX	1.000	0.991	1.000	0.997	
Stf	0.001	0.977	0.576	1.000	0.641	0.995	1.000	1.000	1.000	0.012	1.000	0.002	0.000	0.933	0.076	0.583	0.997	1.000	XXX	0.887	1.000	0.699	
Sul	0.375	1.000	1.000	0.916	1.000	0.058	1.000	0.986	1.000	0.907	1.000	0.551	0.000	1.000	0.000	1.000	1.000	0.991	0.887	XXX	1.000	0.794	
Tbk	0.029	1.000	0.997	1.000	0.998	0.538	1.000	1.000	1.000	0.258	1.000	0.070	0.000	1.000	0.002	0.997	1.000	1.000	1.000	1.000	XXX	1.000	
Vns	0.000	0.426	0.065	1.000	0.083	1.000	0.943	0.998	0.960	0.000	0.864	0.000	0.000	0.295	0.616	0.067	0.642	0.997	1.000	1.000	1.000	XXX	

5.1.3 Vliv skupiny zimovzdornosti na relativní akumulaci dehydrinů

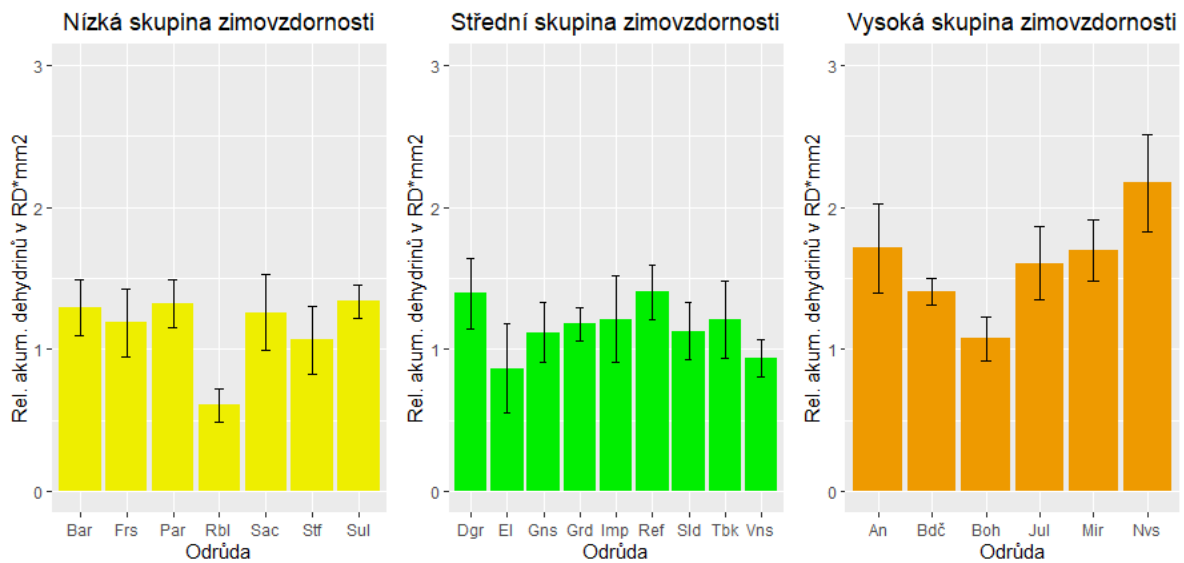
Při pohledu na histogramy a boxploty relativní akumulace dehydrinů vzhledem ke skupinám zimovzdornosti (Obr. 22; Obr. 23) je vidět, že především odrůdy, které spadají do skupiny s vysokou zimovzdorností mají vyšší relativní akumulace dehydrinů oproti odrůdám, které spadají do skupiny s nízkou a střední zimovzdorností.



Obrázek 22: Histogram nízké, střední a vysoké skupiny zimovzdornosti



Obrázek 23: Boxplot relativní akumulace dehydrinů podle skupin zimovzdornosti



Obrázek 24: Relativní akumulace dehydrinů jednotlivých odrůd podle skupin zimovzdornosti

V druhé části je testováno, zda se relativní akumulace dehydrinů liší pro odrůdy z různé skupiny zimovzdornosti. Testování proběhlo podobným způsobem jako v předchozí kapitole, tedy opět lineárním modelem. Tentokrát byla testována závislost relativní akumulace dehydrinů na skupině zimovzdornosti. Obě vlastnosti byly otestovány na reziduích formálními testy, tj. byl proveden Shapiro-Wilkův test normality a studentizovaný Breusch-Paganův test homoskedasticity. Po provedení testu bylo dosaženo p-hodnot 0,35 a 0,02, tedy normalitu na hladině významnosti 0,05 nebyla zamítnuta, homoskedasticitu však ano.

Analýza rozptylu (Anova)

Některé předpoklady klasické anovy nejsou splněny (homoskedasticita). Anova test ovšem nabízí i variantu s použitím směrodatných odchylek zohledňujících heteroskedasticitu reziduí, takzvanou Whiteovu HC3 úpravu. Po provedení testu jsme dostali výsledky v tabulce 4. Vypočtená p-hodnota $1,516 \cdot 10^{-7}$ leží hluboko pod hladinou spolehlivosti 0,05, a tedy nulová hypotéza o shodnosti relativní akumulace dehydrinů napříč skupinami zimovzdornosti byla zamítnuta.

Tabulka 4: Výsledky analýzy rozptylu

Df (počet stupňů volnosti)	F hodnota	P hodnota
2 a 128	17,796	$1,516 \cdot 10^{-7}$

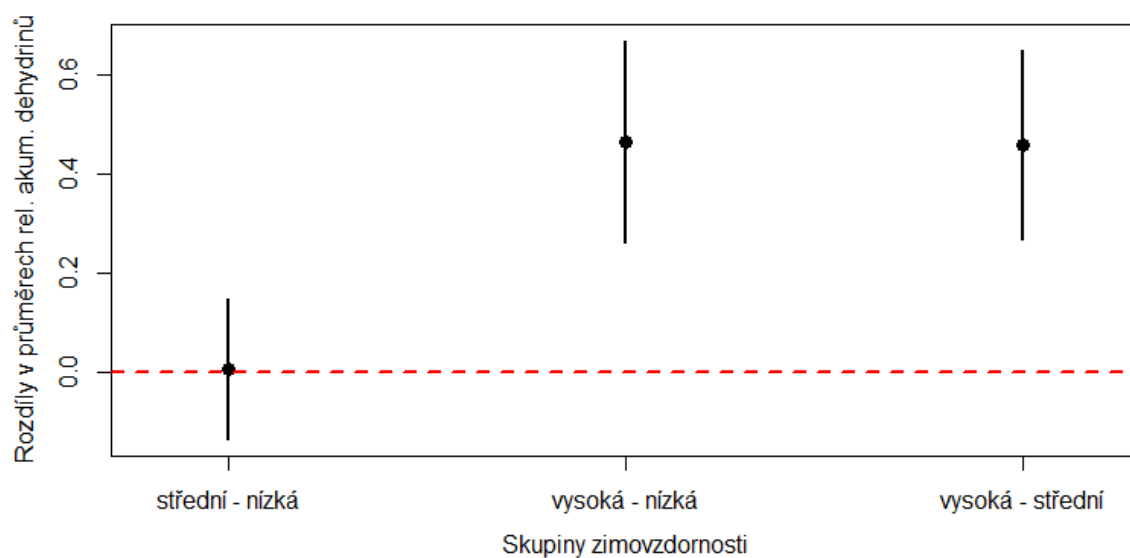
Hothorn-Bretz-Westfalova procedura

Bylo otestováno, že relativní akumulace dehydrinů se mezi skupinami zimovzdornosti liší. Dále bylo třeba zjistit, mezi kterými skupinami je tento rozdíl statisticky významný. Kdyby opět byla použita Tukeyho procedura mnohonásobného porovnávání s porušeným předpokladem homoskedasticity, mohly by být nesprávné výsledky. Použita byla tedy Hothorn-Bretz-Westfalova procedura, která se dá udělat i s použitím směrodatných odchylek robustních vůči

heteroskedasticitě. Opět byla použita Whiteova HC3 úprava. Výsledky testování jsou uvedeny v tabulce níže (Tab. 5). Pohledem na velikosti p-hodnot je zřejmé, že statisticky významný rozdíl v relativní akumulaci dehydrinů je mezi skupinou odrůd s nízkou zimovzdorností a vysokou zimovzdorností a dále mezi skupinou se střední zimovzdorností a s vysokou zimovzdorností. Mezi skupinami s nízkou a střední zimovzdorností není statisticky významný rozdíl.

Tabulka 5: Výsledky Hothorn-Bretz-Westfalovy procedury

Rozdíly skupin	Odhad	95 % interval spolehlivosti		p-hodnota
		dolní mez	horní mez	
střední - nízká	0,007	-0,135	0,149	0,992
vysoká - nízká	0,466	0,263	0,669	$<10^{-6}$
vysoká - střední	0,458	0,268	0,649	$<10^{-6}$



Obrázek 25: Odhady rozdílů a jejich 95 % intervaly

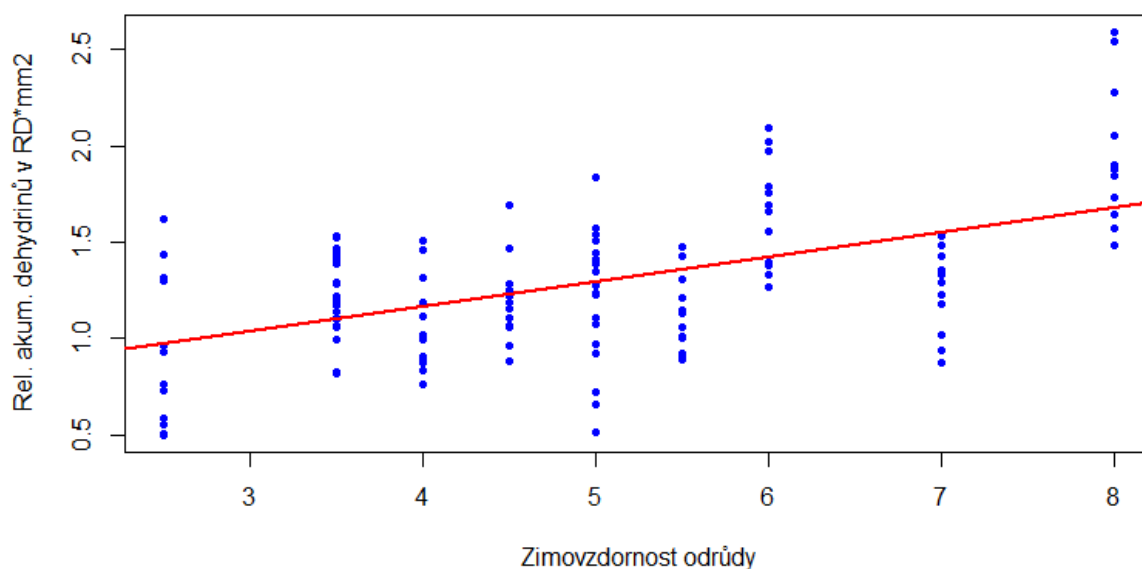
5.1.4 Vliv stupně zimovzdornosti na relativní akumulaci dehydrinů

K formálnímu otestování (lineární) závislosti relativní akumulace dehydrinů na zimovzdornosti („coby spojité proměnné“) byl použit lineární model. Regresorem v něm bude zimovzdornost, odezvou relativní akumulace dehydrinů. Po konstrukci popsaného lineárního modelu bylo přistoupeno k testu jeho předpokládů. Opět byl použit Shapiro-Wilkův test normality a studentizovaný Breusch-Paganův test homoskedasticity reziduí. Otestováním bylo dosaženo po řadě p-hodnoty 0,8642 a 0,0214. Normalita reziduí tedy nebyla nezamítnuta, homoskedaticita však ano. Pro test závislosti relativní akumulace dehydrinů na zimovzdornosti tedy byly podobně jako v předchozí kapitole použity směrodatné odchylky zohledňující heteroskedaticitu. Ty byly spočteny pomocí Whiteovy HC3 úpravy. Standardní výstup regresního modelu (s úpravou směrodatných odchylek a jejich použitím v t-testu) je zobrazen níže v tabulce 6.

Tabulka 6: Výsledky lineární regrese

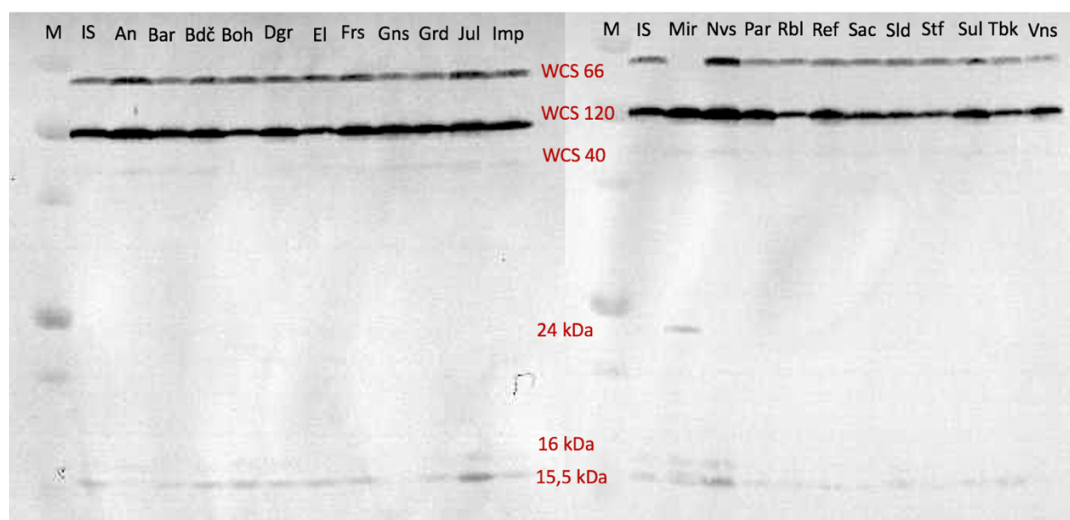
	Odhad koeficientu	Směrodatná odchylka	T hodnota	P hodnota
Absolutní člen	0,664	0,104	6,265	$2,919 \cdot 10^{-9}$
Efekt zimovzdornosti	0,126	0,022	5,778	$6,793 \cdot 10^{-8}$

V tabulce je vidět, že odhadnutá regresní přímka má tvar $y = 0,126 x + 0,664$, pro rel. akumulaci y a zimovzdornost x , korelace má hodnotu $r = 0,525$ relativní akumulace a vysvětluje zimovzdornost z 28% ($R^2 = 28$), což je statisticky významná střední závislost. Vzhledem k p-hodnotě t-testu testujícího závislost rel. akumulace dehydrinů na zimovzdornosti rovné $6,8 \cdot 10^{-8}$ může být tvrzeno, že na hladině spolehlivosti 0,05 rel. akumulace dehydrinů na stupni zimovzdornosti závisí. Regresní přímku v grafu můžeme vidět v následujícím grafu (Obr. 26).



Obrázek 26: Závislost relativní akumulace dehydrinů na zimovzdornosti

5.2 Kvalitativní analýza dehydrinů



Obrázek 27: Reprezentativní imunoblotty testovaných odrůd. M - ALL Blue Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad), IS – interní standard (směsný vzorek)

Zvláště výrazný rozdíl byl pozorován u odrůdy Mironovská 808, kde nebyl detekován dehydrin WCS66, místo něj byl detekován dehydrin o velikosti cca 24 kDa. Tento dehydrin o délce 24 kDa byl detekován pouze u odrůdy Mironovská 808. Všechny ostatní dehydriny - WCS66, WCS120, WCS 40, 16 kDa a 15,5 kDa byly pozorovány u odrůd Annie, Dagmar, Gordian, Julie a Novosibirskaya 2 (Obr. 27).

Tabulka 7: Detekce a identifikace jednotlivých dehydrinů u každé odrůdy pšenice („x“ = dehydrin je přítomen, „-“ = není prokázána přítomnost dehydrinu)

	66 kDa (WCS 66)	50 kDa (WCS 120)	40 kDa (WCS 40)	24 kDa	16 kDa	15,5 kDa
An	x	x	x	-	x	x
Bar	x	x	x	-	-	x
Bdč	x	x	x	-	-	x
Boh	x	x	-	-	x	x
Dgr	x	x	x	-	x	x
El	x	x	x	-	-	x
Frs	x	x	x	-	-	x
Gns	x	x	x	-	-	-
Grd	x	x	x	-	x	x
Jul	x	x	x	-	x	x
Imp	x	x	x	-	-	x
Mir	-	x	x	x	x	x
Nvs	x	x	x	-	x	x
Par	x	x	x	-	-	x
Rbl	x	x	x	-	-	x
Ref	x	x	x	-	-	x
Sac	x	x	x	-	-	x
Sld	x	x	x	-	-	x
Stf	x	x	x	-	-	x
Sul	x	x	x	-	-	x
Tbk	x	x	-	-	-	x
Vns	x	x	-	-	-	x

6 Diskuse

Nízké teploty indukují aklimatizaci, přípravu rostlin na nízké teploty. To se týká i změny obsahu a složení proteinů u ozimých obilovin, což vede k získání zvýšené tolerance vůči nízkým teplotám. U ozimých obilovin je proces aklimatizace spojen se zvýšenou akumulací dehydrinových proteinů, konkrétně se jedná o rodinu dehydrinů WCS120 (Sarhan et al. 1997, Vítámvás et al. 2007, Kosová et al. 2008).

Významná korelace mezi relativní akumulací dehydrinového proteinu (celkové množství WCS120) a WS (přežití zimy) skóre u ozimých přenic byla nalezena při odběrech v listopadu. Tato data však byla získána pouze u mladých rostlin ve vegetativní fázi (stádium 3 listů) pěstovaných za kontrolovaných podmínek růstové komory, kde lze přísně regulovat všechny faktory prostředí (Vítámvás et al. 2007). Tuto korelaci však bylo potřeba ověřit v přirozených podmínkách, proto byly odrůdy pšenice v této diplomové práci pěstovány na poli bez ovlivnění vnějších faktorů. Další výsledky imunoblotových analýz ukázaly, že na rozdíl od kontrolovaných podmínek v růstové komoře, kde byla zjištěna významná korelace mezi jedním WCS120 proteinem (50 kDa) a různými tolerancemi odrůd pšenice k mrazu, je třeba získat celkové množství všech WCS120 proteinů detekovaných v imunoblotech k získání významné korelace s WS (přežití zimy) u rostlin pšenice ozimé pěstovaných na poli (Vítámvás et al. 2019). Odolnost vůči mrazu v zimě/mrazu představuje kvantitativní znak kumulativní povahy, jehož výsledná úroveň představuje výsledek aditivních účinků několika různých faktorů včetně akumulace proteinů chránících před stresem (Thomashow 1999; Ruelland et al. 2009). To byl důvod, proč byl použit pro analýzu u každé odrůdy součet densit všech dehydrinových bandů WCS120.

Studie zaměřené na indukci mrazové tolerance (LT50) nebo dehydrinových proteinů (transkriptů), akumulujících se při klesajících teplotách, naznačují, že ozimé odrůdy obilovin s vysokou odolností vůči mrazu začínají indukovat mrazovou toleranci (LT50) a akumulují dehydrinové proteiny při vyšších teplotách než rostliny s nižší tolerancí. Proto na podzim odrůdy vysoce mrazuvzdorné začínají hromadit dehydrinové proteiny dříve vzhledem k méně tolerantním (Galiba et al. 2009). Proto byly v listopadu pozorovány relativně vysoké rozdíly v hladinách dehydrinu mezi různě odolnými ozimými odrůdami. V pozdějších termínech odběru vzorků po delších obdobích nízkých teplot začnou odrůdy ozimé pšenice a ječmene, které jsou méně odolné vůči mrazu, také hromadit dehydrinové proteiny, takže rozdíly v relativní akumulaci dehydrinových proteinů mezi ozimými odrůdami s vysokou odolností vůči mrazu vůči méně tolerantním se staly relativně nižší ve srovnání s předchozími daty odběru vzorků (Fowler 2008; Vítámvás et al. 2010; Kosová et al. 2013). Také bylo zjištěno, že během vernalizace ozimých obilovin se významně snižuje jejich schopnost vyvolat zvýšenou toleranci k nízkým teplotám a syntetizovat chladem indukované proteiny. Při nepřetržitém chladu si vernalizované ozimé obiloviny zachovávají zvýšenou hladinu za studena indukovaných proteinů včetně dehydrinů v důsledku jejich předchozí akumulace před vernalizací. Zvýšené teploty však vedou k degradaci proteinů indukovaných chladem. Následné snížení teploty pak vede k významně nižší *de novo* akumulaci za chladu indukovaných proteinů ve vernalizovaných ozimých obilovinách oproti nevernalizovaným (Dhillon et al. 2010). Proto v oblastech s mírnými zimami, pro které jsou charakteristické periody mrazu a

tání, které vedou ke střídání aklimatizace a deaklimatizace, akumulace chladem indukovaných proteinů, jako jsou dehydriny, odpovídá mrazuvzdornosti rostliny pouze u nevernalizovaných rostlin. Aby bylo možné použít akumulaci dehydrinových proteinů jako ukazatele mrazové tolerance u ozimých obilovin, musí být v regionech s mírným podnebím, jako je Česká republika, doporučen odběr vzorků obilovin ozimého typu před vernalizací. Proto se zdá být druhá polovina listopadu (začátek zimy) pro odběr vzorků nejprůzračnější, v tuto chvíli už by měly být rostliny otužené a měly by syntetizovat látky, které jim zajišťují ochranu před nízkými teplotami (ideálně několik dní pod 10°C). Při pozdějších termínech odběrů (v lednu a únoru) už by mohla být větší variabilita uvnitř vzorku, jelikož pokus probíhá na poli, může docházet k různým změnám (střídání vysokých a nízkých teplot, led na poli, okus zvířaty, plíseň sněžná), což může ovlivnit množství syntetizovaných dehydrinů (Vítámvás & Prášil 2008).

Jeden gen může kódovat řádově až stovky různých proteinů (díky alternativnímu sestřihu, editaci mRNA a posttranslačním úpravám). Jejich syntéza závisí na vývojovém stádiu, daném pletivu, subcelulární lokalizaci a na podmínkách vnějšího prostředí (Heazlewood & Millar 2006). Abundanci proteinů proto nelze usuzovat pouze na základě transkriptů (Kosová et al. 2011). Při studiu stresu je často využívána komparativní proteomika, kdy dochází ke srovnání kvalitativního i kvantitativního složení proteinů u kontrolních versus stresovaných rostlinných materiálů nebo různých genotypů. Proteom rostliny je velice heterogenní a dynamický, jedná se o soubor proteinů a všech jejich modifikací nacházejících se v pletivu rostliny v daném okamžiku. Proteiny se přímo podílejí na utváření přizpůsobení se změnám vnějšího prostředí včetně stresu, proto mají proteomické studie důležitou funkci ve výzkumu odezvy zemědělských plodin na abiotické i biotické stresové faktory (Hnilička & Sředa 2016).

V této diplomové práci bylo studováno 22 odrůd ozimé pšenice, jednalo se o odrůdy Annie, Baracuda, Bodyček, Bohemia, Dagmar, Elly, Frisky, Genius, Gordian, Julie, LG Imposanto, Mironovská 808, Novosibirskaya 2, Partner, Rebell, RGT Reform, RGT Sacramento, Seladon, Steffi, Sultan, Tobak, Vanessa. Analýzou imunoblotů byly zjištěny kvantitativní i kvalitativní rozdíly v akumulaci dehydrinů. Zvláště výrazný rozdíl v syntéze jednotlivých dehydrinů byl u odrůdy Mironovská 808, kde nebyl detekován dehydrin WCS66, místo něj byl detekován dehydrin o velikosti cca 24 kDa (obr. 27). Tento kvalitativní rozdíl dosud nebyl pozorován u předchozích experimentů (Vítámvás et al. 2007, Vítámvás & Prášil 2008). Genotyp se tedy liší od genotypu stejné odrůdy získané z genobanky VÚRV, v.v.i. v minulých dekáдах. Je možné, že došlo k posunu v genomu Mironovské 808 během množení testovaných odrůd z jednoho klasu. To ale pravděpodobně nemělo vliv na celkové množství dehydrinů akumulovaných v odrůdě Mironovská 808 a tak ani na kvantitativní analýzu.

Nejvyšší relativní akumulaci dehydrinů měly odrůdy Mironovská 808 a Novosibirskaya, které obě mají zároveň i nevyšší stupeň zimovzdornosti (8) z analyzovaného souboru odrůd. Nejnížší relativní akumulaci dehydrinů měla odrůda Rebell, jejíž stupeň zimovzdornost patří k nejnižším v našem sledovaném souboru (Tab. 1). U většiny odrůd, pohybujících se ve na začátku a ve středu škály stupňů zimovzdornosti 1-9 (resp. v tomto výběrovém souboru 2,5-8), není zřetelný významný rozdíl v relativní akumulaci dehydrinů. Oproti tomu u odrůd s vyšším stupněm zimovzdornosti (Mironovská 808, Novosibirskaya 2) je rozdíl významný, zde by mohl mít vliv

původ odrůd a jejich dlouhodobá adaptace na místní podmínky. Odrůda Mironovská má původ na Ukrajině a Novosibirskaya 2 pochází z Ruska (porovnání odlišnosti jednotlivých odrůd viz tab. 3, obr. 21). U odrůdy Bohemia byla naměřena nižší relativní akumulace dehydrinů, než by mohlo být očekáváno vzhledem k jejímu vysokému stupni zimovzdornosti 7.

U analyzovaného souboru odrůd byla také prokázána statisticky významná korelace relativní akumulace dehydrinů a stupně zimovzdornosti, což je v souladu s předchozími publikacemi (Vítámvás et al. 2010, Kosová et al. 2013, Vítámvás et al. 2019). Vítámvás et al. 2010 uvádí, že v kontrolovaných podmínkách růstové komory předpovídá relativní akumulace dehydrinů až ze 70 % zimovzdornost u korelace lineárního modelu. V této diplomové práci u pšenic pěstovaných na poli bylo vyhodnoceno, že relativní akumulace dehydrinů vysvětluje z 28 % zimovzdornost, což naznačuje, že k odolnosti odrůd vůči nízkým teplotám přispívají i další sloučeniny a procesy. Můžeme tedy u obou studií pozorovat stejný trend větší akumulace dehydrinů u odolnějších odrůd, ovšem v polním pokusu je tento trend pozorován v menší míře, to může způsobovat mnoho abiotických faktorů, které na poli na rostliny působí (dostupnost vody, teplota, světelné záření). Bylo by dále potřeba vyhodnotit více sezón po sobě, abychom mohli do výsledků zahrnout vliv ročníku (tento výzkum nadále pokračuje ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i., v Praze). Dále bylo prokázáno, že při rozdělení souboru odrůd na odrůdy s nízkou, střední a vysokou zimovzdorností se statisticky významně liší pouze odrůdy s vysokou zimovzdorností od odrůd se střední i nízkou zimovzdorností, což by mohlo sloužit k odlišení odolných odrůd. Celkové množství WCS120 dehydrinů odebraných u rostlin s dosud neukončeným vernalizačním požadavkem by mohlo sloužit jako ukazatel (marker) odolnosti plodin pěstovaných laboratorních i v polních podmínkách, což už naznačovaly i studie Vítámvás et al. 2010 a Vítámvás et al. 2019. Výsledky této diplomové práce tedy podporují hypotézu o vhodnosti analýzy akumulace dehydrinů pro odhad odolnosti odrůd vůči abiotickým stresům. Snáze by tak mohlo docházet k výběru odolných genotypů pšenice pro další šlechtění rostlin.

7 Závěr

V této diplomové práci byla studována akumulace speciálních proteinů, dehydrinů, pomocí SDS-PAGE elektroforézy a imunoblotu. Vyhodnocení proběhlo na základě density dehydrinových bandů a jejím porovnáním odrůd mezi sebou. Otestování jednotlivých opakování prokázalo, že mezi opakováními není statisticky významný rozdíl, tudíž je tato metoda opakovatelná.

První hypotéza, že odrůdy pšenice s vyšší odolností vůči chladu akumulují ve vegetativním stádiu více dehydrinů ve stresovaných pletivech, byla potvrzena. Pro tuto analýzu byly využity tři skupiny zimovzdornosti - nízká, střední a vysoká, v závislosti na celkové densitě všech dehydrinových bandů u každé odrůdy. Z naměřených dat bylo statistickou analýzou prokázáno, že odrůdy, které spadají do skupiny odrůd s vysokou zimovzdorností, se statisticky významně liší od odrůd, které spadají do skupiny se střední a nízkou zimovzdorností. Ovšem odrůdy s nízkou a střední zimovzdorností se od sebe statisticky významně neliší. Významně vyšší akumulace dehydrinových proteinů mohla být pozorována pouze u odrůd s vysokou zimovzdorností.

Druhá hypotéza, že pokud je akumulace dehydrinů geneticky podmíněná, lze předpokládat závislost odolnosti vůči nízkým teplotám na obsahu dehydrinů u odrůd pěstovaných v polních podmínkách, byla také potvrzena. Statistickou analýzou byla prokázána závislost relativní akumulace dehydrinů (vlastní proteomická analýza) na zimovzdornosti (hodnocení odrůd pomocí stupnice 1-9, kdy 1 - nejnižší zimovzdornost, 9 - nevyšší zimovzdornost).

Z těchto výsledků lze tedy vyvodit, že velmi odolné odrůdy ozimé pšenice k chladu a mrazu mají více akumulovaných dehydrinů v období aklimatizace než ostatní odrůdy. Následně také lze konstatovat, že lze pozorovat závislost mezi odolností odrůdy k nízkým teplotám a celkovému množství akumulovaných dehydrinů. Dehydriny by tak bylo možné využít jako ukazatele (markery) odolnosti pšenic pěstovaných i v polních podmínkách. Ovšem je potřeba otestovat více genotypů v polních podmínkách i v dalších sezónách pro ověření spolehlivosti dehydrinových analýz jako markeru odolnosti vůči daným abiotickým stresům.

Výsledky diplomové práce byly publikovány v časopisu Úroda v článku Vítámvás et al. 2019 (příloha č.2). Tento výzkum nadále pokračuje i v dalších sezónách ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i., v Praze, na Odboru genetiky a šlechtění rostlin pod vedením Mgr. Pavla Vítámváse, Ph.D. Je nutné ověřit rozdíly mezi ročníky, kdy mohou rozdílně působit podmínky prostředí a s nimi spojené odlišné abiotické stresy působící na rostliny.

8 Literatura

- Ahuja I, Ric CH, De Vos RC, Bones AM, Hall RD. 2010. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science* **15**(12):664-74.
- Allagulova CR, Gimalov FR, Shakirova FM, Vakhitov VA. 2003. The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry* **68**:945-951.
- Battaglia M, Olvera-Carrilla Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias A. 2008. The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins, Departamento de Biología Molecular de Plantas (M.B., Y.O.-C., F.C., A.A.C.) and Departamento de Microbiología Molecular (A.G.), Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca. Morelos 62250. Mexico.
- Bittner V. 2009. Škodlivé organismy pšenice: Abiotická poškození, choroby a škůdci. Kurent. České Budějovice.
- Boddington KF, Graether SP. 2014. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Frontiers in Plant Science* **5**:576.
- Campbell SA, Close TJ. 1997. Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New phytologist* **137**:61-74.
- Close TJ. 1996. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* **97**:795-803.
- Close TJ. 1997. Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* **100**: 291-296.
- Close TJ, Fenton RD, Moonan F. 1993. A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant molecular Biology* **23**: 279-286.
- ČSÚ, 2019. Osevní plochy ozimých plodin pro sklizeň v roce 2019. Available from <https://www.czso.cz/csu/czso/osevni-plochy-ozimych-plodin-pro-sklizen-v-roce-2019-> (accessed April 2020)
- ČSÚ, 2019. Sklizeň pšenice ozimé v roce 2019 podle krajů. Available from <https://www.czso.cz/documents/10180/122461974/2701412011.pdf/0677a403-6b40-4554-bb30-5695a9bfba2a?version=1.0> (accessed April 2020)
- Danyluk J, Houde M, Rassart E, Sarhan F. 1994. Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant gramineae species. - *FEBS Letters* **344**:20-24.

- Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F. 1998. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* **10**:623-638.
- Dhillon T, Pearce SP, Stockinger EJ, Distelfeld A, Li CX, Knox AK .2010. Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: the VRN-1 connection. *Plant Physiology* **153**:1846–1858.
- Dubcovský J, Dvořák J. 2016. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* **316(5833)**: 1862–1866.
- Dure L, Chlan C. 1981. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. XII. Purification and properties of principal storage proteins. *Plant Physiology* **68**:180–186.
- Enz M, Dachler CH. 1997. Compendium of Growth Stage Identification Keys for Mono- and Dicotyledonous Plants, Extended BBCH scale. společné vydání BBA, BSA, IGZ, IVA, AgrEvo, BASF, Bayer, Novartis.
- Fowler DB. 2008. Cold acclimation threshold induction temperatures in cereals. *Crop Science* **48**:1147–1154.
- Fowler DB, Breton G, Limin AE, Mahfoozi S, Sarhan F. 2001. Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. *Plant Physiology* **127**:1676-1681.
- Fowler DB, Limin AE, Shi-Ying Wang, Ward RW. 1996. Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. *Canadian Journal of Plant Science* **76(1)**: 37-42.
- Galiba G, Vagujfalvi A, Li C, Soltész A, Dubcovsky J. 2009. Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. *Plant Science* **176**:12—19.
- Ganeshan S, Vítamvas P, Fowler DB, Chibbar RN. 2008. Quantitative expression analysis of selected COR genes reveals their differential expression in leaf and crown tissues of wheat (*Triticum aestivum* L.) during an extended low temperature acclimation regimen. *Journal of Experimental Botany* **59(9)**:2393–2402.
- Hara M. 2010. The multifunctionality of dehydrins: An overview. *Plant Signaling & Behavior* **5**:503-508.
- Hazlewood JL, Millar AH. 2006. Plant proteomics: Challenges and resources. *Plant Proteomics*, 1-31
- Hnilička F, Středa T. 2016. Rostliny v podmínkách stresu - Abiotické stresory. Česká zemědělská univerzita. Praha.

- Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Laliberté S, Sarhan F. 1995. Immunolocalization of freezing-tolerance associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant Journal* **8**:583-593.
- Horáková V, Dvořáčková O. 2019. Seznam doporučených odrůd 2019, Pšenice ozimá, pšenice jarní, ječmen jarní, ječmen ozimý, tritikale ozimé, oves setý. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Národní odrůdový úřad. Brno.
- Horčíčka P, Bízová I, Veškrna O, Bláha T, Holubová H, Chrpová J, Hanzalová J, Dašková L, Čapek J, Ježek S. 2017. Rádce pěstitele ozimé pšenice. Kurent. České Budějovice.
- Houde M, Danyluk J, Laliberte JF, Rassart E, Dhindsa RS, Sarhan F. 1992. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding a 50 kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. *Plant Physiology* **99**:1381-1387.
- Chouard P. 1960. Vernalization and its relations to dormancy. *Annual Review. Plant Physiology. Plant Molecular Biology* **11**:191–238.
- Ingram J, Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Biology* **47**:377–403.
- International Wheat Genome Sequencing Consortium. 2018. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* DOI: 10.1126/science.aar7191.
- Jorin JV, Maldonado AM, Castillejo MA. 2007. Plant proteome analysis: A 2006 update. *Proteomics* **7(16)**:2947-2962.
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT. 2007. The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum* **51(4)**:601-617.
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT. 2011. Expression of dehydrins in wheat and barley under different temperatures. *Plant Science* **180(1)**:46-52.
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT, Renault J. 2011. Plant Proteome changes under abiotic stress- contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics* **74**:1301-1322.
- Kosová K, Vítámvás P, Prášilová P, Prášil IT. 2013. Accumulation of WCS120 and DHN5 proteins in differently frost-tolerant wheat and barley cultivars grown under a broad temperature scale. *Biologia Plantarum* DOI:10.1007/s10535-012-0237-5.
- Levitt J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stress: Chilling, Freezing and High Temperature Stress. Academic Press. New York.

- Limin AE, Fowler DB. 1985. Cold-hardiness response of sequential winter wheat segments to differing temperature regimes. *Crop Science* **25**:838-843.
- Prášil IT, Musilová J, Prášilová P, Kosová K, Vítámvás P. 2018. Odolnost pšenice vůči zimním stresům. *Úroda* **8**:15-17.
- Prášilová P, Prášil IT. 2007. Hodnocení zimovzdornosti obilnin provokační nádobovou metodou. *Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. Praha*
- Procházka S, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J. 1998. *Fyziologie rostlin. Academia, Praha.*
- Richards RA, Condon AG, Rebetzke GJ. 2011. Traits to Improve Yield in Dry Environments. *Journal of Experimental Botany* **65(8)**: 1981–1995.
- Riley AC, Ashlock DA, Graether SP. 2019. Evolution of the modular, disordered stress proteins known as dehydrins. *PLoS ONE* (e0211813) DOI:10.1371/journal.pone.0211813.
- Rorat T. 2006. Plant dehydrins – Tissue location, structure and function. *Cellular and Molecular Biology Letters* **11**:536-556.
- Ruelland E, Vaultier MN, Zachowski A, Hurry V. 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research* **49**:35–150.
- Sarhan F, Ouellet F, Vazquez-Tello A. 1997. The wheat wcs120 gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. *Physiologia Plantarum* **101**:439-445.
- Shavrukov Y, Kurishbayev A, Jatayev S, Shvidchenko V, Zotova L, Koekemoer F, de Groot S, Soole K, Langridge P. 2017. Early flowering as a drought escape mechanism in plants: How can it aid wheat production?. *Frontiers in Plant Science* DOI: 10.3389/fpls.2017.01950
- Stevensson J, Palva ET, Welin B. 2000. Purification of recombinant *Arabidopsis thaliana* dehydrins by metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification* **20**:169-78.
- Sung SB, Amasino RM. 2004. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Plant Biology*. **7**:4–10.
- Thomashow MF. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *The Annual Review of Plant* **50**:571–599.
- Vítámvás P, Kosová K, Musilová J, Holková L, Mařík P, Smutná P, Klíma M, Prášil IT. 2019. Relationship Between Dehydrin Accumulation and Winter Survival in Winter Wheat and Barley Grown in the Field. *Frontiers in plant science* DOI:10.3389/fpls.2019.00007.
- Vítámvás P, Kosová K, Musilová J, Nezbedová B, Čit Z, Klíma M, Prášil IT. 2019. Vztah akumulace dehydrinů a tolerance plodin k abiotickým stresům (Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění, ochraně rostlin a zpracování produktů), *Vědecká příloha časopisu Úroda* 12/2019

- Vítámvás P, Kosová K, Prášilová P, Prášil IT. 2010. Accumulation of WCS120 protein in wheat cultivars grown at 9 °C or 17 °C in relation to their winter survival. *Plant Breeding* **129**:611-616.
- Vítámvás P, Prášil IT. 2008. WCS120 protein family and frost tolerance during cold acclimation, deacclimation and reacclimation of winter wheat. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**:970–976.
- Vítámvás P, Saalbach G, Prášil IT, Čapková V, Opatrná J, Ahmed J. 2007. WCS120 protein family and proteins soluble upon boiling in cold-acclimated winter wheat. *Journal of Plant Physiology* **164**:1197–1207.
- Yadav SK. 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **30**:515-527.
- Yan J, Aznar A, Chalvin C, Birdseye DS, Baidoo EEK, Eudes A, Shih PM, Loque D, Zhang A, Scheller HV. 2018. Increased drought tolerance in plants engineered for low lignin and low xylan content. *Biotechnology for Biofuels* DOI:10.1186/s13068-018-1196-7.
- Yan L, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Bennetzen JL, Echenique V, Dubcovsky J. 2004: The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* **303(5664)**:1940–1644.
- Zimolka J. 2005. Pšenice: pěstování, hodnocení a užití zrna. Profi Press. Praha.

9 Seznam tabulek a obrázků

Tabulky:

Tabulka 1: Přehled zimovzdornosti odrůd pšenice ozimé, pozn. 1 - nejnižší zimovzdornost, 9 - nevyšší zimovzdornost, * není dostatečně otestováno, bude upřesněno v roce 2020 (VÚRV)	15
Tabulka 2: Výsledky analýzy rozptylu	32
Tabulka 3: Výsledky p-hodnot Tukeyho procedury mnohonásobného porovnávání	33
Tabulka 4: Výsledky analýzy rozptylu	35
Tabulka 5: Výsledky Hothorn-Bretz-Westfalovy procedury	36
Tabulka 6: Výsledky lineární regrese	37
Tabulka 7: Detekce a identifikace jednotlivých dehydrinů u každé odrůdy pšenice („x“ = dehydrin je přítomen, „-“ = není prokázána přítomnost dehydrinu)	38

Obrázky:

Obrázek 1: Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i>)	3
Obrázek 2: Strukturní diagram genomu pšenice	4
Obrázek 3: Rozdělení stresových faktorů	5
Obrázek 4: Působení stresorů na rostliny	6
Obrázek 5: Schéma stresové reakce a odpovědi organismu	6
Obrázek 6: Sekvence aminokyselin K-segmentu s variacemi, aminokyseliny jsou označené jednopísmennými zkratkami a indexy představují množství nalezených výskytů	10
Obrázek 7: Typické složení rostlinného dehydrinu	10
Obrázek 8: Parcelky různých odrůd ozimé pšenice	13
Obrázek 9: Ozimá pšenice při odběru vzorků	14
Obrázek 10: Jedna rostlina ozimé pšenice při odběru	14
Obrázek 11: Odebrané odnožovací uzly	14
Obrázek 12: Průměrné denní teploty vzduchu ve 2 metrech, rok 2018	16
Obrázek 13: Zobrazení denních srážek, rok 2018	16
Obrázek 14: Schéma experimentu	17
Obrázek 15: Ukázka označení bandu (U1) a jeho pozadí (B1, B2)	26
Obrázek 16: Zobrazení směsi deseti modře zbarvených rekombinantních proteinů 10–250 kD (Bio-Rad)	27
Obrázek 17: Reprezentativní imunoblotty 22 testovaných odrůd, M - ALL Blue Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad), IS – interní standard (směsný vzorek) nutný pro normalizaci kvantit mezi gely	28
Obrázek 18: Histogram podílu hodnot relativní akumulace dehydrinů pozorování a průměru dané odrůdy	29
Obrázek 19: Histogram studentizovaných reziduí pro určení odlehlých pozorování	30
Obrázek 20: Histogram relativní akumulace dehydrinů v RD*mm ² pro celá data, která budou využita v další analýze (bez odlehlého pozorování)	30
Obrázek 21: Průměrné relativní akumulace dehydrinů dle odrůd	31
Obrázek 22: Histogram nízké, střední a vysoké skupiny zimovzdornosti	34
Obrázek 23: Boxplot relativní akumulace dehydrinů podle skupin zimovzdornosti	34
Obrázek 24: Relativní akumulace dehydrinů jednotlivých odrůd podle skupin zimovzdornosti	35
Obrázek 25: Odhady rozdílů a jejich 95 % intervaly	36
Obrázek 26: Závislost relativní akumulace dehydrinů na zimovzdornosti	37
Obrázek 27: Reprezentativní imunoblotty testovaných odrůd. M - ALL Blue Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad), IS – interní standard (směsný vzorek)	38

10. Seznam použitých zkratek a symbolů

ABA - abscisic acid, kyselina abscisová

ASP - anaerobic stress protein, proteiny indukované sníženou koncentrací kyslíku

APS - persulfát amonný

BBCH - Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry, fenologická stupnice

FAPPZ ČZU - Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze

HSP, HS protein - heat shock protein, protein teplotního šoku

Kn - dehydrin obsahující n počet K-segmentů

KnS - dehydrin obsahující n počet K-segmentů a S-segment

LEA proteiny - late embryogenesis abundant protein, proteiny pozdní fáze embryogeneze

Mb - megabase-pair, páry bází

RD - relative density

SDS-PAGE - Sodium dodecylsulfát - Protein Acrylamide Gel Electrophoresis, elektroforéza v polyakrilamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného

SZ - stupeň zimovzdornosti

SKn - dehydrin obsahující S-segment a n počet K-segmentů

TBS - tris-pufrovaný fyziologický roztok

TEMED - N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin

TGS - Tris-Glycin-SDS

TTBS - roztok složený z TBS a Tween 20

WCOR - wheat cold-regulated

WCS - wheat cold-specific

WS - winter survival, přežití zimy

YnKn - dehydrin obsahující n počet Y-segmentů a K-segmentů

YnSKn - dehydrin obsahující n počet Y-segmentů, S-segment a n počet K-segmentů

Samostatné přílohy

Příloha č. 1: Naměřené hodnoty relativní akumulace dehydrinů u 22 odrůd pšenice, pro každou odrůdu proběhla 3 biologická a 2 technická opakování

Odrůda	Relativní akumulace dehydrinů
An	1,689
An	1,757
An	1,330
An	2,022
An	2,093
An	1,383
Bar	1,098
Bar	1,418
Bar	1,219
Bar	1,528
Bar	1,459
Bar	1,064
Bdč	1,330
Bdč	1,487
Bdč	1,425
Bdč	1,532
Bdč	1,291
Bdč	1,359
Boh	0,940
Boh	1,016
Boh	1,175
Boh	0,874
Boh	1,229
Boh	1,230
Dgr	1,384
Dgr	1,235
Dgr	1,837
Dgr	1,109
Dgr	1,441
Dgr	1,351
El	0,921
El	0,514
El	<u>1,411</u>
El	0,655
El	0,725
El	0,968

Odrůda	Relativní akumulace dehydrinů
Mir	1,640
Mir	2,057
Mir	<u>0,430</u>
Mir	1,485
Mir	1,574
Mir	1,730
Nvs	2,540
Nvs	1,877
Nvs	2,593
Nvs	1,849
Nvs	1,897
Nvs	2,276
Par	1,467
Par	1,197
Par	1,177
Par	1,141
Par	1,525
Par	1,435
Rbl	0,764
Rbl	0,496
Rbl	0,555
Rbl	0,727
Rbl	0,589
Rbl	0,503
Ref	1,441
Ref	1,538
Ref	1,278
Ref	1,575
Ref	1,073
Ref	1,511
Sac	0,960
Sac	0,929
Sac	1,618
Sac	1,313
Sac	1,435
Sac	1,302

Frs	1,536
Frs	1,294
Frs	0,829
Frs	1,055
Frs	1,195
Frs	1,211
Gns	1,308
Gns	1,055
Gns	0,915
Gns	0,890
Gns	1,426
Gns	1,129
Grd	1,223
Grd	1,283
Grd	0,966
Grd	1,253
Grd	1,151
Grd	1,187
Jul	1,556
Jul	1,658
Jul	1,975
Jul	1,788
Jul	1,266
Jul	1,393
Imp	1,110
Imp	1,061
Imp	1,465
Imp	1,069
Imp	0,885
Imp	1,693

Sld	1,009
Sld	1,006
Sld	1,477
Sld	1,144
Sld	1,209
Sld	0,923
Stf	0,814
Stf	0,814
Stf	1,389
Stf	0,997
Stf	1,107
Stf	1,287
Sul	1,387
Sul	1,209
Sul	1,428
Sul	1,438
Sul	1,173
Sul	1,406
Tbk	0,877
Tbk	1,459
Tbk	1,512
Tbk	1,184
Tbk	1,312
Tbk	0,908
Vns	0,996
Vns	1,115
Vns	1,018
Vns	0,879
Vns	0,838
Vns	0,763

Příloha č. 2: Vítámvás P, Kosová K, Musilová J, Nezbedová B, Cit Z, Klíma M, Prášil IT. 2019. Vztah akumulace dehydrinů a tolerance plodin k abiotickým stresům (Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění, ochraně rostlin a zpracování produktů), Vědecká příloha časopisu Úroda 12/2019

OBSAH

Úroda 12/2019, vědecká příloha časopisu

VZTAH AKUMULACE DEHYDRINŮ A TOLERANCE PLODIN K ABIOTICKÝM STRESŮM

The relationship of dehydrin accumulation and crop tolerance to abiotic stresses

Vítámvás P.¹, Kosová K.¹, Musilová J.¹, Nezbedová B.^{1,2}, Cit Z.¹, Klíma M.¹, Prášil I. T.¹

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6 – Ruzyně

²Česká zemědělská univerzita v Praze

Abstrakt

Výskytem abiotických stresů (např. sucho, nízká či vysoká teplota) během vegetačního období může být výrazně snížen výnos plodin. V posledních letech se na výnosu plodin pěstovaných v České republice projevuje deficit srážek. Navíc mírné zimy s minimem srážek mohou zapříčinit vymrznutí ozimých plodin při náhlém výkyvu počasí (holomrazy, např. v zimě 2011/12). Výběrem odrůd schopných adaptace k danému abiotickému stresu a akceptovatelným výnosem lze omezit možné snížení výnosu. Proto je výzkum rostlinných obranných a adaptačních mechanismů vůči stresům důležitý. V tomto příspěvku jsme se zaměřili na vztah mezi odolností obilnin vůči abiotickým stresům a schopností akumulovat dehydriny v pletivech.

Klíčová slova: dehydrin, odolnost rostlin, obilniny, abiotický stres

Abstract

The occurrence of abiotic stresses (e.g., drought, low or high temperature) during the growing season could significantly reduce crop yield. In recent years, the yield of crops grown in the Czech Republic has been reduced by rainfall deficit. Moreover, mild winter with lower precipitation could cause winter crops to freeze during sudden weather fluctuations (frost without snow; e.g. winter 2011/2012). The selection of cultivars capable of adapting to a given abiotic stress and an acceptable yield, a possible yield reduction could be lowered. Therefore, research of plant defense and adaptation mechanisms to stress is important. In this paper, we focused on the relationship between cereal resistance to abiotic stresses and ability to accumulate dehydrins in plant tissues.

Key words: dehydrin, plant tolerance, cereals, abiotic stress

Úvod

Odpověď rostlin na stres je dynamický proces, který směřuje k přizpůsobení buněčných struktur, metabolismu a k ustanovení nové rovnováhy (Levitt 1980; Kosová et al. 2011; Lawlor 2013). Důležitým prvkem odpovědi rostlin na stres je akumulace stresem indukovaných ochranných proteinů. V naší laboratoři jsme se zaměřili na výzkum dehydrinů. Dehydriny jsou proteiny z rodiny LEA-II, které se vyznačují přítomností alespoň jedné kopie K-segmentu (konzervativní 15-aminokyselinová sekvence bohatá na lysin) a které se akumulují v pozdních stádiích vývoje embrya (tzv. desikace a maturace embrya), ale rovněž v odezvě na různé environmentální stresy spojené s buněčnou desikací, včetně nízkých teplot (Kosová et al. 2007). Dehydriny jsme detekovali jak u jednoděložných (pšenice, ječmen), tak dvouděložných (řepka, hrách) plodin, vystavených abiotickému stresu. Ovšem u dvouděložných plodin detekujeme v obdobných podmínkách zhruba o dva řády nižší akumulace dehydrinů (Klíma et al. 2012, Urban et al. 2013), než u jednoděložných (Kosová et al. 2013, Vítámvás et al. 2019).

Signifikantní rozdíly v akumulaci dehydrinů byly zjištěny mezi různě odolnými genotypy plodin vystavených chladu (Vítámvás et al. 2010, Klíma et al. 2012), zasolení (Kosová et al. 2015) či suchu (Vítámvás et al. 2018). Rostliny odebrané z polních podmínek nevykazují tak vysoké korelace akumulace dehydrinů s jejich odolností vůči stresu jako rostliny pěstované v regulovaných podmínkách kvůli kombinacím různých stresů, ale přesto jsme byli schopni signifikantně odlišit různě zimovzdorné ozimé ječmeny a pšenice odebrané počátkem zimy (tj. nejarovizované rostliny; Vítámvás et al. 2019). Proto se nám jeví akumulace dehydrinů jako dobrý ukazatel odolnosti plodin vůči abiotickým stresům. Pro ověření markerovací schopnosti akumulace dehydrinů v plodinách jsme provedli analýzu 22 odrůd chladem otužených pšenic odebraných z polních podmínek (viz níže).

Materiál a Metody

Ozimé pšenice byly pěstovány na poli firmy Selgen, a.s. (50.0520492N, 14.6459456E) a odběr odnožovacích uzlů byl proveden dopoledne 30. 11. 2018. Byly odebrány tyto odrůdy pšenice: Annie, Baracuda, Bodyček, Bohemia, Dagmar, Elly, Frisky, Genius, Gordian, Julie, LG Imposanto, Mironovská 808, Novosibirskaya 2, Partner, Rebell, RGT Reform, RGT Sacramento, Seladon, Steffi, Sultan, Tobak, Vanessa. Odnožovací uzly z 10 rostlin byly z pole odebrány natříkrát a tyto vzorky byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a následně uchovány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dalšího zpracování.

Zimovzdornost ozimých pšenic byla hodnocena provokačním bedýnkovým testem ve VÚRV, v.v.i. (Prášil a Rogalewicz, 1989). Relativní akumulace dehydrinových proteinů byla stanovena pomocí 1D SDS-PAGE a imunoblotu s antidehydrinovou primární protilátkou (Vítámvás et al. 2010). Relativní densita dehydrinových bandů byla vyhodnocena softwarem Quantity One, verze 4.6.2 (Bio-Rad). Korelační analýzy pro stanovení Pearsonova korelačního koeficientu r na hladině významnosti 0,01 byly provedeny pomocí softwaru Unistat, verze 5.1 (Unistat Ltd, Londýn, Velká Británie).

Výsledky a diskuze

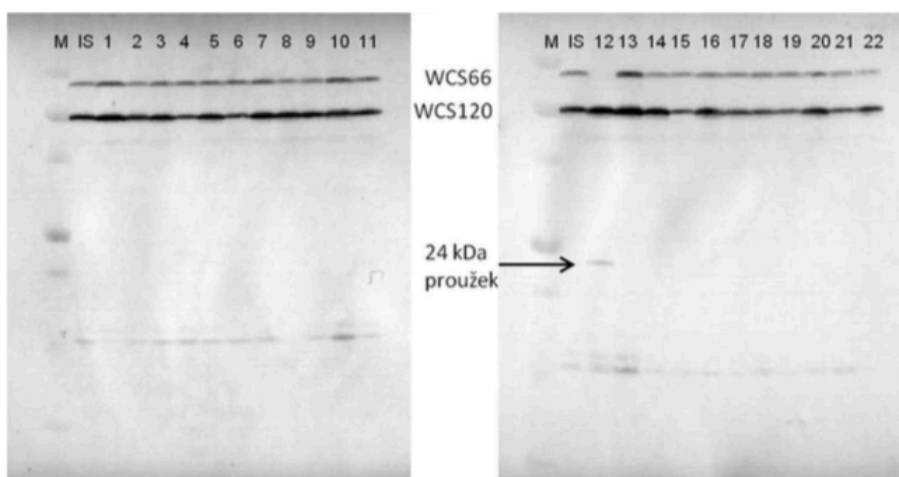
Hodnocení zimovzdornosti ozimých pšenic pomocí bedýnkového testu ve VÚRV, v.v.i. ukázalo u ozimých pšenic škálu přežití od stupně zimovzdornosti 2,5 (Rebell, RGT Sacramento) až po stupeň zimovzdornosti 8 (Mironovská 808, Novosibirskaya 2) na devítistupňovém hodnocení (9 – nevyšší mrazuvzdornost; Tabulka 1.). Dosažené stupně zimovzdornosti odpovídají také dlouhodobým výsledkům testování přezimování a mrazuvzdornosti těchto odrůd.

Tab. 1: Stupně zimovzdornosti odrůd testovaných v zimě 2018/19 provokačním bedýnkovým testem.

Kód odrůdy	Odrůda	Stupeň zimovzdornosti
1	Annie	6
2	Baracuda	3,5
3	Bodyček	7
4	Bohemia	7
5	Dagmar	5,5
6	Elly	5
7	Frisky	4
8	Genius	5
9	Gordian	4,5
10	Julie	6
11	LG Imposanto	4,5
12	Mironovská 808	8

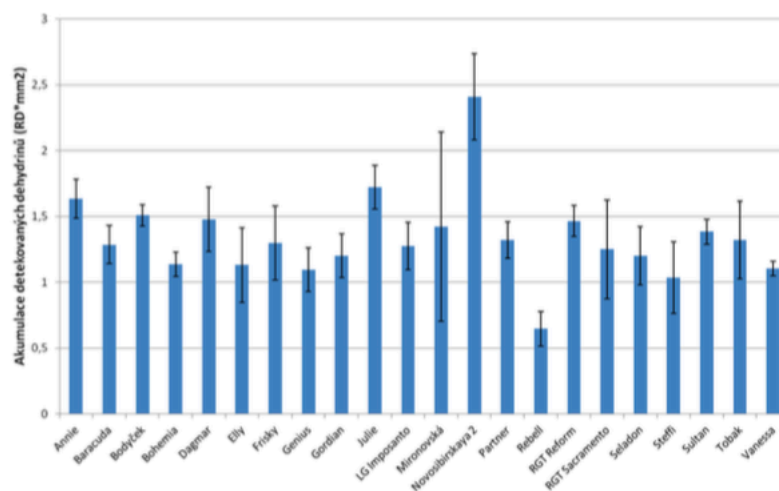
13	Novosibirskaya 2	8
14	Partner	3,5
15	Rebell	2,5
16	RGT Reform	5
17	RGT Sacramento	2,5
18	Seladon	5,5
19	Steffi	3
20	Sultan	4
21	Tobak	4,5
22	Vanessa	4

Analýzou imunoblotů byly zjištěny kvantitativní i kvalitativní rozdíly v akumulaci dehydrinů (Obr. 1). Zvláště výrazný rozdíl byl u odrůdy Mironovská 808, kde nebyl detekován dehydrin WCS66 a místo něj byl detekován dehydrin o velikosti cca 24 kDa (vzorek 12, Obr. 1). Tento kvalitativní rozdíl dosud nebyl pozorován u předchozích experimentů (např. Vítámvás et al. 2007, Vítámvás a Prášil 2008). Genotyp se tedy liší od genotypu stejné odrůdy získané z genobanky VÚRV, v.v.i. v minulých dekádech. Je možné, že došlo k posunu v genomu Mironovské 808 během našeho množení testovaných odrůd z jednoho klasu pro potřeby asociačního mapování v rámci projektu QK1710302.

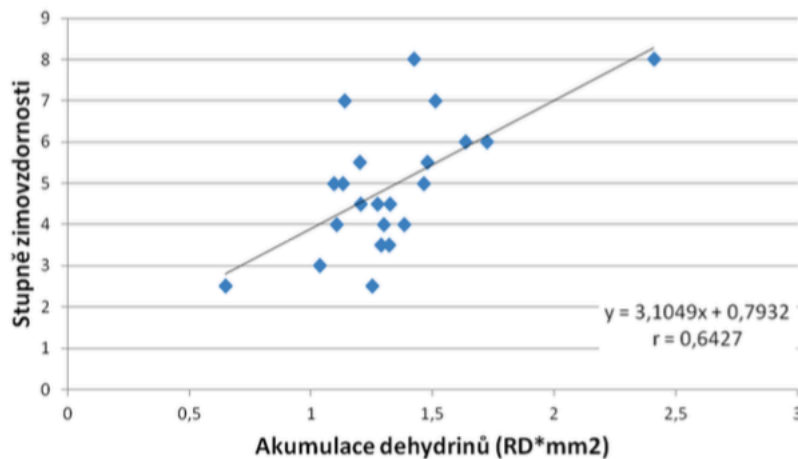


Obr. 1. Reprezentativní imunoblotty 22 testovaných odrůd. M - ALL Blue Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad), IS – interní standard (směsný vzorek) nutný pro normalizaci kvantit mezi gely, čísla odpovídají kódu odrůdy v Tab. 1.

Výsledky analýz dehydrinových proteinů WCS120 u ozimých pšenic (Obr. 2) vztažené ke stupni přezimování rostlin stanovenému na základě provokačního bedýnkového testu pak ukázaly statisticky významnou korelaci (Obr. 2; $r = 0,6427$; $P \leq 0,01$) mezi mírou relativní akumulace dehydrinových proteinů a mírou přezimování rostlin. Korelační analýza bez odrůdy Mironovská 808 dopadla dokonce lépe ($r = 0,6843$; $P \leq 0,01$).



Obr. 2. Výsledek analýz relativní akumulace dehydrinů v odnožovacích uzlech 22 ozimých pšenic.



Obr. 3. Korelace dosažených stupňů odolnosti a akumulace dehydrinů v odnožovacích uzlech 22 ozimých pšenic.

Je to tedy jen předběžný výsledek testování více odrůd z polních podmínek založený jen na jednom odběru z jedné zimy, ale významné korelace jsme dříve dosáhli při testování 11 pšenic a 9 ječmenů (Vítámvás et al. 2019). Tyto výsledky tedy podporují hypotézu o vhodnosti analýzy akumulace dehydrinů pro odhad odolnosti odrůd vůči abiotickým stresům.

Závěr

Na základě výsledků získaných z popsaného polního pokusu v lokalitě Selgen a.s., Stupice v sezóně 2018/19 a dříve publikovaných pokusů můžeme shrnout, že míra relativní akumulace dehydrinů statisticky významně koreluje s odolností plodin, a to zvláště u rostlin s dosud neukončeným vernalizačním požadavkem. Dehydriny lze tak využít jako ukazatele (markery) odolnosti plodin pěstovaných i v polních podmínkách. Ovšem je nutné otestovat větší sortiment genotypů v polních podmínkách v dalších sezónách pro ověření spolehlivosti dehydrinových analýz jako markeru odolnosti vůči daným abiotickým stresům.

Dedikace

Práce byla podpořena institucionálním záměrem Ministerstva zemědělství ČR MZe RO0418 a projekty Ministerstva zemědělství ČR QK1710302, QK1910197, a QK1910269. Také tímto děkujeme Ing. O. Veškrnovi za umožnění odběru odrůd z pokusů v lokalitě firmy Selgen a.s., Stupice.

Použitá literatura

- Klíma M., Vítámvás P., Zelenková S., Vyvadilová M., Prášil I. T. (2012): Dehydrin and proline content in *Brassica napus* and *B. carinata* under cold stress at two irradiances. *Biol. Plantarum* 56 (1): 157-161.
- Kosová K., Vítámvás P., Prášil I. T. (2007): The role of dehydrins in plant response to cold. *Biol. Plantarum* 51 (4): 601 - 617.
- Kosová K., Vítámvás P., Prášil I. T., Renaut J. (2011): Plant proteome changes under abiotic stress – contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J. Proteomics* 74: 1301-1322.
- Kosová K., Vítámvás P., Prášilová P., Prášil I. T. (2013): Accumulation of WCS120 and DHN5 proteins in differently frost-tolerant wheat and barley cultivars grown under a broad temperature scale. *Biol. Plantarum* 57 (1): 105-112.
- Kosová K., Vítámvás P., Urban M. O., Klíma M., Ray A., Prášil I. T. (2015): Biological Networks Underlying Abiotic Stress Tolerance in Temperate Crops-A Proteomic Perspective. *International J. Mol. Sci.* 16 (9): 20913-20942.
- Lawlor DW. (2013): Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *J. Exp. Bot.* 64:83–108.
- Levitt J. (1980): Responses of plants to environmental stress. Chilling, freezing and high temperature stresses. 2nd edition. New York, USA: Academic Press.
- Prášil, I. T., Rogalewicz, V. (1989): Accuracy of wheat winterhardiness evaluation by a provocation method in natural conditions. *Genetika a Šlechtění* 25:223-230.
- Urban M. O., Klíma M., Vítámvás P., Vašek J., Hilgert-Delgado A. A., Kučera V. (2013): Significant relationships among frost tolerance and net photosynthetic rate, water use efficiency and dehydrin accumulation in cold-treated winter oilseed rapes. *J. Plant Physiol.* 170 (18): 1600-1608.
- Vítámvás P., Kosová K., Dandová J., Cit Z., Klíma M., Prášil I. T. (2018): Kvantitativní změny proteomu obilnin vystavených suchu. *Úroda 12, vědecká příloha*, s. 179-182.
- Vítámvás P., Kosová K., Musilová J., Holková L., Mařík P., Smutná P., Klíma M., Prášil I. T. (2019): Relationship between dehydrin accumulation and winter survival in winter wheat and barley grown in the field. *Front. Plant Sci.* 10: 7.

- Vítámvás P., Kosová K., Prášilová P., Prášil I. T. (2010): Accumulation of WCS120 protein in wheat cultivars grown at 9 °C or 17 °C in relation to their winter survival. *Plant Breed.* 129:611-616.
- Vítámvás, P., Prášil, I. T. (2008): WCS120 protein family and frost tolerance during cold acclimation, deacclimation and reacclimation of winter wheat. *Plant Physiol Biochem* 46: 970-976.
- Vítámvás, P., Saalbach G., Prašil I. T., Čapkova V., Opatrna J., Jahoor A. (2007): WCS120 protein family and proteins soluble upon boiling in cold-acclimated winter wheat. *J. Plant Physiol.*, 164 (9), 1197 – 1207.

Kontaktní adresa:

Mgr. Pavel Vítámvás, Ph.D.,
VÚRV, v.v.i.,
Dmlovská 507/73, 161 06 Praha 6,
e-mail: vitamvas@vurv.cz