

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce
roslinné

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Využití metody RT-PCR při studiu reakce rostlin řepky
na stres chladem

Autor bakalářské práce: Jan Harenčák

Vedoucí bakalářské práce: prof. Ing. Vladislav Čurn Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Irena Jelínková

České Budějovice, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:

Podpis studenta:

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce prof. Ing. Vladislavu Čurnovi Ph.D. a konzultantce Ing. Ireně Jelínkové za příkladné vedení mé práce, ochotu kdykoli zodpovídat mé otázky a bezmeznou trpělivost. Nemalé díky patří i za možnost účastnit se na katedře odborného výzkumu a tím zažít vědu doslova v praxi. Neméně důležité pro vypracování této práce byla i příležitost účastnit se mezinárodní konference v Brně, což mi pomohlo významně si rozšířit obzory v oblasti zemědělské výroby.

Mé díky patří celé mé rodině, přítelkyni Veronice Kůrkové a také Petru Štoidlovi, kteří mně po celou dobu dodávali motivaci a pomohli při závěrečné korektuře.

Abstrakt

Cílem této práce je zhodnotit míru exprese genu pro protein ze skupiny dehydrinů *ERD10* a genu transkripčního faktoru *ICE1* u řepky, které jsou potenciálně zapojené v reakci na stres chladem. Ačkoliv řepka poměrně dobře odolává chladovým podmínkám, v ČR patří právě chlad mezi důležité prvky snižující její výnosnost. Expresní analýza byla provedena metodou RT qPCR u rostlin odrůd Cadeli a Navajo, které byly vystaveny stresu chladem a vykazují odlišnou reakci na stres chladem.

Klíčová slova:

Řepka olejka, RT-PCR, qPCR stres chladem, genová exprese.

Summary

The aim of this work is to evaluate the expression of the *ERD10* gene for dehydrin protein and *ICE1* transcription factor gene in oilseed rape, which are potentially connected to the cold stress reaction in oilseed rape. Eventhough the oilseed rape is relatively cold resistant, cold stress is an significant element reducing its yield in the Czech Republic. The analysis of expression was done using RT qPCR method in cold stressed plants of Cadeli and Navajo varieties which both show a different cold stress reaction.

Key words:

Oilseed rape, RT-PCR, qPCR cold stres, gene expression.

Obsah

Motivace a cíl práce	8
Úvod.....	9
1 Teoretická část	10
1.1 Řepka olejná (<i>Brassica napus</i> L.)	10
1.1.1 Původ a historie pěstování	10
1.1.2 Šlechtění.....	11
1.1.3 Využití.....	12
1.2 Stres chladem	13
1.2.1 Přenos stresového signálu – ovlivnění genové exprese	14
1.2.2 Role genu <i>ICE1</i> při stresu chladem.....	15
1.2.3 Dehydriny.....	17
1.2.4 Role genu <i>ERD10</i> při stresu chladem	18
2 Použité metody	19
2.1 Reverzní transkripce	19
2.2 Polymerase chain reaction – PCR	20
2.2.1 Historie.....	20
2.2.2 Princip	20
2.3 Real-time PCR.....	23
2.3.1 Analýza genové exprese.....	23
2.3.2 Princip qPCR.....	23
2.3.3 Značení DNA	25
2.3.4 Vyhodnocení získaných dat	25
2.4 PCR vs qPCR	27
3 Materiál a metody	28
3.1 Podmínky pěstování rostlin	28
3.2 Odběry vzorků	29
3.3 Izolace RNA	30
3.4 Přечиštění RNA a reverzní transkripce	31
3.5 Real Time PCR.....	31
4 Výsledky	33
4.1 Analýza křivky tání	33
4.2 Zobrazení amplikonu na gelu	34
4.3 Relativní exprese genu <i>ERD10</i>	35
4.4 Relativní exprese genu <i>ICE1</i>	37

5	Diskuze	39
6	Závěr	41
7	Použitá literatura	42
8	Přílohy.....	48

Motivace a cíl práce

Hypotéza

- 1) qRT-PCR je vhodná metoda pro sledování změn v genové expresi genů *BnICE1* a *BnERD10*
- 2) Stres chladem zvyšuje relativní genovou expresi genu *ERD10*.
- 3) Chladu odolná odrůda bude mít odlišnou expresi genů *BnICE1* a *BnERD10* v porovnání s odrůdou náchylnou.

Cíl práce

Cílem mé práce bylo:

- 1) provést přesný chladový experiment
- 2) u řepky vystavené chladu provést expresní analýzu na úrovni genu pomocí qRT-PCR
- 3) vyhodnotit expresi sledovaných genů u dvou odlišně na chlad reagujících odrůd v různých fázích stresu.

Motivace

Stres chladem je druh abiotického stresu, který negativně ovlivňuje růst a vývoj rostlin. Postižena je zejména životaschopnost a reprodukceschopnost rostliny vystavené stresu. Řešit odolnost rostlin vůči stresu je potřeba zejména u zemědělských plodin. Stresované rostliny mívají často potlačenou schopnost projevit naplno svůj genetický potenciál a tím může být výrazně snížen jejich výnos. Kvůli globálním klimatickým změnám jsou rostliny podrobovány stále silnějšímu stresovému tlaku, zejména abiotickému. Jedním z nejvážnějších problémů tohoto tématu je velmi krátký a teplý podzim, během něhož nejsou rostliny schopny se včas aklimatizovat a připravit na přicházející zimu. Z tohoto důvodu je šlechtění na odolnost vůči stresu chladem stále aktuálnější šlechtitelským cílem i v našich zeměpisných šířkách. Aby bylo šlechtění na odolnost vůči stresu chladem co možná nejúčinnější, je potřeba znát rostlinný mechanismus obrany vůči němu co možná nejdůkladněji.

Úvod

V podmínkách mírného klima je brukev řepka plodinou se značným pěstitelským významem, a to zejména pro vysoký výtěžek oleje ze semene. Její ozimá a jarní forma vyhovuje pro pěstování téměř v celé Evropě. Díky své větší výnosnosti je v Evropě mnohem více pěstována ozimá forma. Jarní forma se využívá jako náhrada za vymrzlou, či jinak zlikvidovanou řepku ozimou. Dále je její pěstování důležité v Číně a jihovýchodní Asii (Baranyk, 2007). V České republice je řepka olejka, zvláště její ozimá forma nejpěstovanější olejninou (Baranyk, 2017). Její nejvýznamnější využití v ČR spočívá ve zpracování jejího oleje na bionaftu, popřípadě jeho využití v potravinářství, či technických oborech. Další možností je zpracování na extrahované šroty a různé výlisky, které se využívají v krmivářství (Baranyk, 2007). Jedna třetina celkové plochy na Zemi je považována za potenciálně užitečnou plochou pro zemědělství. Ve skutečnosti je pravidelně obděláváno zhruba 10 % z celkových 13 miliard hektarů na Zemi. Děje se tak zejména kvůli abiotického stresu, kterému jsou rostliny vystavovány a který nedokážou na většině potenciálních orebních ploch přežít. Jeden z nejkritičtějších abiotických stresorů je teplota, jež významně ovlivňuje jaké plodiny je možné v dané lokalitě pěstovat. Vyšší rostliny si pro boj s různými stresory vybudovaly metabolismus, který během života může být různě upravován podle okolního prostředí – je plastický. Výzkum této plasticity je klíčový pro tvoření nových, odolnějších odrůd (Chinnusamy, 2007). Mezi proteiny zapojené do odolnosti rostlin vůči chladu patří například dehydriny, jejichž expresi podmiňují geny *ICE1* a *ERD10*. U modelových rostlin, jako je huseníček rolní, je exprese těchto genů prozkoumána dobře. Není tomu tak u řepky olejky (Channakeshavaiah, 2014; Channakeshavaiah, 2017). Touto prací chci přispět do problematiky odolnosti řepky olejky chladu, porovnáním exprese těchto genů u dvou odrůd kontrastních v odolnosti vůči chladu – Cadeli (nižší odolnost) a Navajo (vyšší odolnost). Odolnost ke stresu byla ověřena pokusem na pracovišti VÚRV v Ruzyni (Jelínková, 2017).

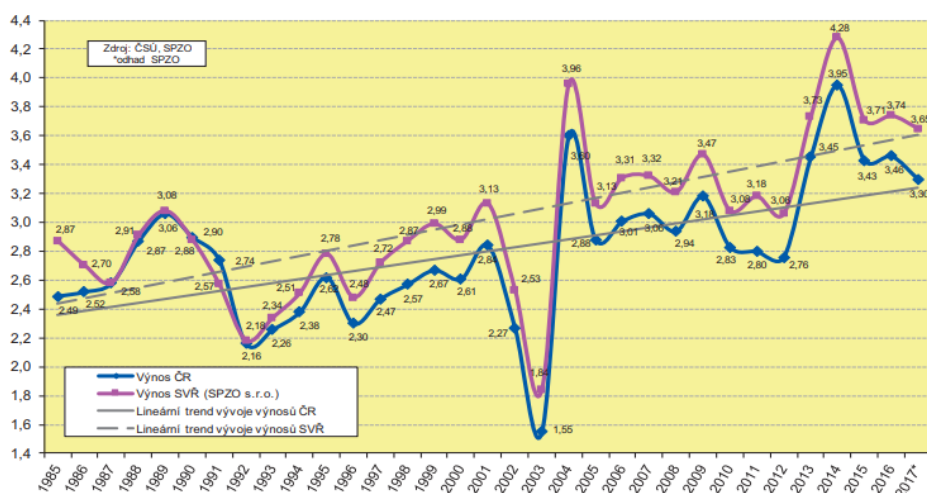
1 Teoretická část

1.1 Řepka olejná (*Brassica napus* L.)

Je žlutokvětá rostlina. Spolu s hořčicí, tuřínem, vodnicí nebo brukví zelnou patří do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Vyskytuje se v jarní i ozimé formě. Pro klíčení je semenu zapotřeba dodat 60 % hmotnostních vody, minimální teplotu 1 °C, přičemž optimální se pohybuje v rozmezí od 20 do 25 °C. Délka lodyhy leží obvykle v rozmezí 125 – 200 cm. Část nadzemní může mít dvojí fáze: listové růžice (vegetativní), nebo fázi rychlého růstu (generativní). Jedná se o fakultativně cizospašnou rostlinu. Její plod je šešule, která obsahuje v průměru 15 – 20 semen, které jsou velmi drobné (HTS = 3,75 – 6,5 g) (Baranyk, 2007). Řepka olejka je k nízkým teplotám relativně tolerantní a tím se hodí pro pěstování v chladných oblastech (Issariyakul, 2014).

1.1.1 Původ a historie pěstování

Podle genetické analýzy rodu brukev je druh *Brassica napus* L. výsledek zpětného křížení a zdvojení počtu chromozomů druhu *B. rapa* L., syn. *B. campestris* (brukev řepice) a *B. oleracea* L. (brukev zelná) (Prakash, 1980; Jahreis, 2011). Tímto vzniknul amfidiploid s 38 chromozomy - *B. napus* (Baranyk, 2007; Song, 1992). K vyšlechtění došlo poměrně nedávno, nejspíše ve Středozeří a severní Evropě (Gómez-Campo, 1999; Lin, 2013) a nejsou známé plané formy (Kole, 2007).



Obrázek 1: Výnosy řepky olejky v ČR v letech 1985–2017.

Obrázek znázorňuje výnos zrna v tunách na hektar plochy (Baranyk, 2017)

Rostliny rodu *Brassicaceae* byly dříve poměrně nezajímavý druh. Vysoká míra jejich genotypové a fenotypové mnohotvárnosti dala později za vznik tvorbě různých druhů zelenin, díky selektivnímu křížení. Mimo klasické použití – oleje pro technické zpracování, slouží tyto rostliny také pro výživu zvířat i lidí (Schmidt, 2011). Podle zmínek z 16. století byly dříve olejniný, jako například řepka, využívány, spíše než jako potravina, pro svícení a výrobu mýdla. V 17. století, během růstu velkých měst se pěstování významně rozšiřovalo. Od roku 1868 dále jsou už známé oseední plochy jejich vývoj je zprvu pozvolný a později velmi strmě rostoucí (Baranyk, 2007). Značného posunu v pěstování řepky pro olejnatá semena, bylo dosaženo vyšlechtěním tzv. „00“ linií, které mají výrazně sníženou složku 2 významných antinutričních látek v oleji – kyseliny erukové a glukosinolátů (Shahidi, 1990). Na obrázku 1 je zobrazen vývoj výnosů řepky olejky v České republice od roku 1985 do r. 2017. Začátkem 90. let vlivem restrukturalizace zemědělství došlo k mírnému propadu, později došlo k dalšímu propadu výnosů v roce 2002 a 2003. Důvodem tehdy byl vysoký výskyt houbových chorob a bejdomorky kapustové. Od té doby dochází takřka k neustále stoupavému trendu s extrémně dobrými roky – 2004 a 2014 (Baranyk, 2017).

1.1.2 Šlechtění

Řepka olejka byla lidmi objevena zhruba 2000 let před Kristem. Obsahovala vysoké procento kyseliny erukové ve svém oleji – až kolem 40 % (Lin, 2013). Proto byla zprvu pěstována spíše nepotravinářské účely (svícení, mazání) (Lin, 2013; Dupont, 1989; Kramer, 1983). V roce 1976 byla v Kanadě vyšlechtěna odrůda umožňující bezpečné použití řepkového oleje, v potravinářství (Busch, 1994; Mag, 1983). Dnešní odrůdy obsahují <2 % kyseliny erukové a <25 $\mu\text{mol} / \text{g}$ (bez tukové sušiny) glukosinolátů (Lin, 2013).

1.1.3 Využití

Řepka je pěstována pro jedlý olej (celosvětově), krmivo hospodářských zvířat, koření, výrobu bionafty a její listy jsou (obzvláště v Asii) konzumovány jako zelenina (Jahreis, 2011). Je to rostlina s druhým největším výtěžkem oleje na světě, je z ní produkováno 14 % světové produkce olejů. Mezi lety 2014 a 2015 byl světový výtěžek biomasy odhadován na 70 milionů tun. Více než 85 % řepkového oleje je vyrobeno ve 27 zemích Evropské Unie. Využití vyrobeného oleje je v potravinářství (67 %), pro výrobu biopaliv (27 %), oleochemie (3 %), ostatní (3 %). Vzhledem k neustále se zvyšující lidské populaci je třeba nepřetržitě uspokojovat poptávku po všech řepkových komoditách. Do roku 2025 by se poptávka měla zvýšit na 250 milionů tun.

Nejdůležitějším produktem zpracování řepky olejky je jedlý olej s nízkým obsahem glukosinolátů a kyseliny erukové (FU, 2016). Díky svému složení se jedná o jeden z nejzdravějších rostlinných olejů, ve smyslu jeho biologické funkce, schopnosti bránit vzniku různých chorob a udržování dobrého zdraví (Lin, 2013).

Druhý nejvyhledávanější produkt z řepky olejky je bionafta. Kvůli rychlému růstu světové ekonomiky jsou stále více používána fosilní paliva. To má za následek zhoršování životního prostředí, globální oteplování, skleníkový efekt a podobně. Proto je předmětem zkoumání, jak fosilní paliva nahradit a alespoň trochu ulehčit přírodě. Bionafta vyrobená z řepky olejky je vhodná pro nejlepší výtěžek oleje na jednotku plochy (Ge, 2017). V budoucnu se očekává zvýšení poptávky bionafty jako aditiva do klasického dieselu (Issariyakul, 2014).

1.2 Stres chladem

Stres je vyvolaný různými vnějšími podmínkami, které narušují rovnováhu v organismu. Termín stres může mít mnoho významů, z fyziologického hlediska se jedná o odpověď organismu na různé podmínky, kterým je vystaven. Flexibilita metabolismu dovoluje rostlinám patřičně reagovat na změny prostředí, které mírně kolísají a jsou předvídatelné (během dne, nebo celých období) (Jaleel, 2009). Rostliny jsou organismy přisedlé, neschopné pohybu. Proto musejí být schopny adaptovat svůj metabolismus tak, aby je daný stres poškodil co možná nejméně (Hughes, 1990). Ne každé vybočení z normálu je však stres. O stresu hovoříme tehdy, je-li na obvyklý metabolismus vyvinut příliš velký tlak, který způsobí poškození nebo nemoc. Rostliny jsou během svého růstu ve volné přírodě vystavovány mnoha stresovým faktorům (abiotickým i biotickým). Mezi takové se řadí například: sucho, nízké teploty, vysoké koncentrace solí, záplavy, teplo, oxidativní stres a toxicita těžkými kovy (Jaleel, 2009). Rostliny na stres reagují různými biochemickými a fyziologickými změnami, za účelem získání tolerance k danému stresoru. Dlouhotrvající stres obvykle vyústí v různé potíže, například poruchám růstu a zpomalenému vývoji. Děje se tak, protože rostlina přeměruje více energie do obrany proti stresu (Zhu, 2002).

U mnoha přezimujících druhů rostlin zvyšuje vystavení teplotám těsně nad bod mrazu, odolnost vůči teplotám pod bodem mrazu (Lee, 2005). Tento proces se nazývá aklimatizace chladem a je to velmi komplexní mechanismus vyvolávající mnoho biochemických a fyziologických změn (Hughes, 1996). Je to kvantitativní znak, způsobovaný mnoha geny malého účinku (Thomashow, 1999). Dále existují přezimující (ozimé) rostliny, které po vysazení na podzim, přečkávají zimu – jarovizují. Jarovizace brání rostlinám v přechodu do generativní fáze růstu do skončení zimy. Zimu přečkávají jako sazeničky (Chinnusamy, 2007). Chlad v rostlinných buňkách způsobuje například: zvýšenou koncentraci cukrů, rozpustných proteinů, organických kyselin a také změny ve složení buněčné stěny (Hughes, 1990; Huang, 2008). Což má za následek změny struktury, vlastností a funkcí mnoha enzymů (Chinnusamy, 2007). Tyto změny jsou způsobeny rozdílnou genovou expresí v buňce po vystavení stresu (Hughes, 1990). Například žito, které neprošlo aklimatizací chladem je zničeno teplotou ~ -5 °C. Po vystavení rostlin nízkým teplotám těsně nad bodem mrazu přežívá i teploty kolem -30 °C (Thomashow, 1999).

Místo, kde rostlina utrpí nejvíce poškození chladem je cytoplazmatická membrána (Steponkus, 1984) a to dehydratací (Bray, 1993a). Jakmile teplota klesne pod 0 °C, začnou se, nejdříve v mezibuněčných prostorech tvořit ledové krystalky. V mezibuněčných prostorech je nižší koncentrace rozpuštěných látek a tím je vyšší teplota tuhnutí. Protože je chemický potenciál ledu nižší než chemický potenciál vody v tekutém stavu, dojde k pohybu vody z vnitřních prostor buňky do vnějších, mezibuněčných prostor. Tím dochází k vysušování buněk mrazem (Thomashow, 1999). Další nebezpečí pro buňku plyne z poškození membrán radikály kyslíku (McKersie, 1997), narušení buněčné stěny krystalky ledu (Olien, 1977) nebo denaturace některých proteinů chladem (Guy, 1998). Mezi vnější příznaky poškození chladem patří špatné klíčení, zakrnělé sazeničky, žloutnutí listů, vadnutí odnoží nebo snížená schopnost odnožování. V generativní fázi hlavně pylová sterilita (Suzuki, 2008).

1.2.1 Přenos stresového signálu – ovlivnění genové exprese

Chlad způsobuje vyšší viskozitu buněčného obsahu. Pravděpodobně je změna genové exprese (GE) spojena s: propustností membrán, konformací proteinů a nukleových kyselin, koncentrací metabolitů a redoxním stavem buňky (Chinnusamy, 2007). Rostliny vnímají stres chladem pravděpodobně pomocí buněčné cytoplazmatické membrány – jejím tuhnutím, což indukuje expresi s chladem asociovaných genů, které pomáhají rostlině se aklimatizovat (Orvar, 2000). Jako první reagují na chlad příslušné receptory na membráně buněk, ty spouštějí celou řadu signálních drah. Zodpovědné molekuly jsou: ionty vápníku, reaktivní formy kyslíku, kinázy, fosfatázy kyselina abscisová a lipidové signální dráhy.

Změny v koncentraci vápenatých iontů (Ca^{2+}) jsou rozpoznány proteiny vázající vápník, které nemají enzymatickou aktivitu, ale podléhají konformačním změnám po navázání Ca^{2+} . Když proběhne konformační změna, na proteiny s Ca^{2+} se vážou jiné proteiny, což spustí fosforylační kaskádu (Chinnusamy, 2007). Na konci této kaskády se spouští exprese transkripčních faktorů, jejich produkty dokážou ovlivňovat expresi jiných genů (Snustad, 2009). I přesto, že takto budou reagovat buňky, například jenom na některých listech, změny se projeví synergicky v celé rostlině. To ovlivňují rostlinné hormony – kyselina abscisová, kyselina salicylová a ethylen (Chinnusamy, 2007). Kyselina abscisová je důležitý fytohormon, který se

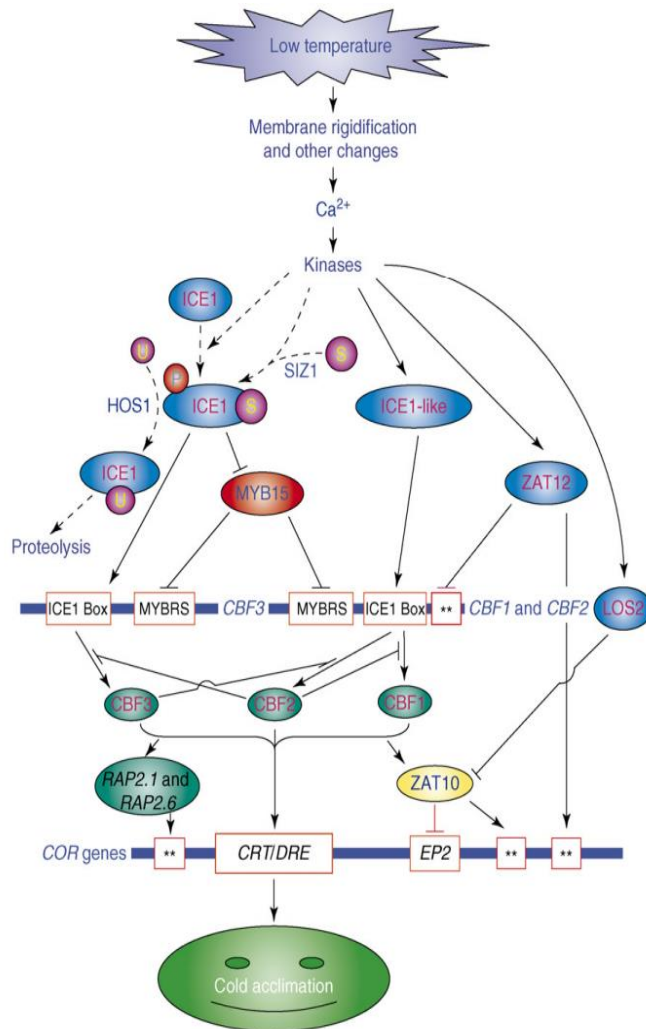
účastní mnoha důležitých pochodů v rostlině, zejména reakce na abiotický stres (Verslues, 2005).

1.2.2 Role genu *ICE1* při stresu chladem

U rostlin rodu *Arabidopsis* byla identifikována rodina genů *CBF-DREB1*, které fungují jako transkripční faktory – vážou se na specifické sekvence v promotorech genů reagujících na chlad a tím podporují jejich expresi (Rihan, 2017; obr.2).

ICE1 (angl. Inducer of CBF Expression) je transkripční faktor skupiny MYC, patřící do bHLH rodiny transkripčních faktorů a hraje zásadní roli v reakci rostliny na stres chladem (Chinnusamy, 2003). Protein *ICE1* reguluje expresi mnoha jiných transkripčních faktorů, které mohou indukovat expresi na chlad reagujících proteinů (Lee, 2005). Například je zodpovědný za regulaci *COR* (COLD Regulated) genů (Gilmour, 1998), které se účastí reakce rostliny na chlad a patří mezi dehydriny (Close, 1997).

Transkripce *CBF-DREB1* genů se pozorovatelně zvýšila již po 15 minutách od vystavení rostlin chladu, následované akumulací COR transkriptů. Takto rychlá reakce naznačuje, že rostlinný „teploměr“ – ICE1, bude nejspíše v buňkách přítomný neustále, bez ohledu na prostředí, ve kterém se rostlina právě nachází. Aktivuje se snížením teploty (Gilmour, 1998).



Obrázek 2: Schématické zobrazení reakce rostliny na stres chladem (Chinnusamy, 2007)

1.2.3 Dehydriny

Jsou vysoce hydrofilní, dobře rozpustné proteiny patřící do II. skupiny LEA (Late Embryogenesis Abundant) rodiny proteinů (Kosová, 2010; Bray, 1993b). Jsou obecně bohaté na glycin a hydrofilní aminokyseliny, nejvíce pak threonin. Naopak téměř postrádají cystein a tryptofan, což jim propůjčuje neobvyklé vlastnosti. Jsou velmi dobře rozpustné ve vodných roztocích a zůstávají rozpustné i po bodu varu. V roztoku utváří náhodné smyčky tím, že tvoří vodíkové můstky s molekulami vody (Kosová, 2010).

Celá tato rodina je asociována s rostlinnou tolerancí vůči chladu suchu a vysokému obsahu soli, ale jejich výskyt byl prokázán i ve vegetativních tkáních během normálních růstových podmínek (Jaleel, 2009). Vyskytují se v řadě organismů, například mikroorganismech, vyšších rostlinách, kvasinkách, řasách a cyanobakteriích (Rorat, 2006). Jejich přesný účinek není znám, ale je předpoklad, že jde o molekulární chaperony (Goyal, 2005). Byly nalezeny v mnoha buněčných kompartmentech – cytosolu, jádru, mitochondriích, vakuolách a v okolí cytoplasmatické membrány, ale nejvíce v cytoplasmě a jádru. Vyznačují se třemi speciálními motivy. K segment, který obsahuje 15 aminokyselin a je na lysin bohatý. Vyskytuje se při C-konci dehydrinové molekuly a je tam obsažen v 1-11 kopiích. (Kosová, 2010; Rorat, 2006) Při nedostatku vody formuje amfipatickou (hydrofilní i hydrofobní charakter zároveň) šroubovici (Close, 1997). Míru amfipaticity určuje aminokyselinový řetězec K-segmentu (Kosová, 2010). Po vytvoření šroubovice dochází k navázání na povrch částečně dehydratovaného proteinu nebo membrány a tím je dehydriny chráněny před další ztrátou vody, což by vedlo k jejich denaturaci (Jelínková, 2014; Kosová, 2010). Dalším konzervovaným úsekem je Y-segment. Nachází se na N-konci proteinového řetězce a je bohatý na aminokyselinu tyrosin. Poslední je S-segment, tvořený 4-10 serinovými rezidui (Kosová, 2010). Pomocí složení segmentů v proteinu se dehydriny dělí do několika podkupin: K_n ; SK_n ; K_nS ; Y_nK_n a Y_nSK_n (Close, 1997).

1.2.4 Role genu *ERD10* při stresu chladem

Gen *ERD10* (Early Responsive to Dehydration) je další z genů, které se vysoce exprimují při stresu chladem (Kim, 2010). *ERD10* patří do SK_n skupiny dehydrinů (Kosová, 2010). Původně byla celá *ERD* rodina genů označována za geny, které se rychle indukují chladem (Kiyosue, 1994). Ukázalo se, že tento gen je stejně tak jako *ICE1* zapotřebí pro správnou aktivaci genů *CBF/DREB1* – u jedinců bez genu *ERD10* nedošlo k aktivaci *CBF/DREB1* genů vůbec.

ERD10 (u *Arabidopsis thaliana*) je schopný chladem indukované fosforylace svého S-segmentu. Pokud dojde k fosforylaci, je protein schopný vázat Ca²⁺ ionty – což patrně nějak souvisí s tím, že vápenatý iont slouží jako druhý posel v signálních drahách reakce na stres (Kosová, 2010). *BnERD10* vykazuje velmi podobné složení ve srovnání s ostatními SK_n dehydriny (*AtERD10*, *BnCOR25*, *PgDhn1...*), pravděpodobně se svým jedním S segmentem a dvěma K segmenty patří do SK_n skupiny dehydrinů (Deng, 2009).

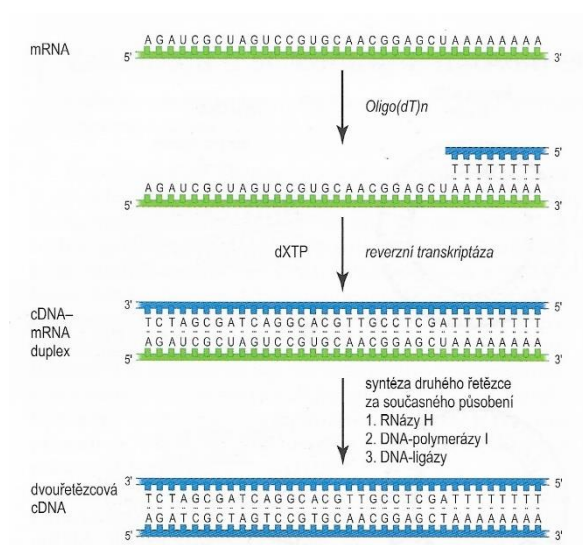
Akumulace transkriptu *ERD10* je patrně důležitá pro správný vývoj semen – stabilizuje membránové struktury. Semena postrádající tento gen měla abnormální tvar a redukované klíčení. *ERD10* pravděpodobně hraje roli v ochraně proti různým stresům a vývoji semene a klíčení. *ERD10* spolu s *ERD14* disponují chaperonovou aktivitou – jsou schopny zabránit teplem indukovanému shlukování nebo inaktivaci rozličných substrátů (lysozym, alkohol dehydrogenázy) (Kovacs, 2008).

Ještě není známý přesný mechanismus účinku genu *ERD10*, ale je pravděpodobné, že funguje jako ochrana transkriptů genů reagujících na stres chladem (chaperonová aktivita) a zároveň jako stabilizátor membránových struktur (Kim, 2010).

2 Použité metody

2.1 Reverzní transkripce

Je přepis vyizolované RNA, respektive mRNA, do komplementární DNA (cDNA). Děje se tak pomocí enzymu izolovaného z retrovirů – reverzní transkriptázy. Ta se vyznačuje RNA-dependentní DNA polymerační aktivitou a pro svou funkci nepotřebuje primer, ale pro specifitější výsledky je vhodné primer použít (Stahlberg, 2004). Existují specifické a nespecifické primery. Například „random hexamer primers“ – což je 6 za sebou jdoucích nukleotidů, které ve směsi zahrnují všechny možné způsoby jejich seřazení. Dále oligo(dT) primery – primery výhradně z thyminových nukleotidů, které se váží na polyA konec. Ten má jen mRNA. Použitím oligo(dT) primerů je vyloučen přepis jiných druhů RNA (Freeman, 1999). Průběh reakce zobrazen na obrázku 3.



Obrázek 3: Průběh reverzní transkripce (Snustad, 2009).

2.2 Polymerase chain reaction – PCR

Touto *in vitro* technikou je možné amplifikovat specifické úseky genomové DNA (gDNA), která byla předtím vyizolována z různých zdrojů. Není důležitý zdroj gDNA, ale její čistota. Amplifikací jedné molekuly DNA získáváme až miliardu stejných kopií (Ishmael, 2008).

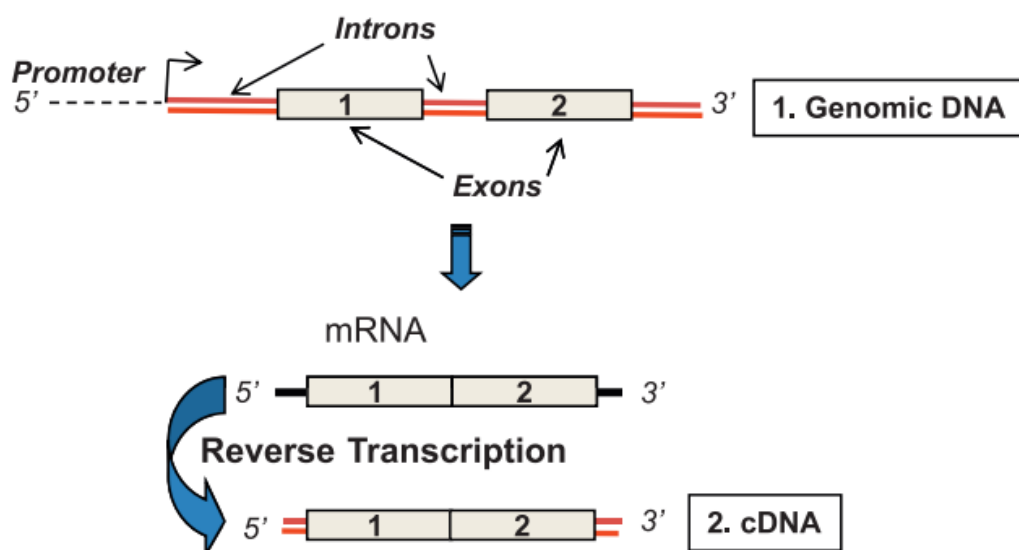
2.2.1 Historie

Historie genetiky, jako vědního oboru, se začala psát, když Johann Friedrich Miescher v roce 1869 jako první vyizoloval deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) z lososího spermatu. Dalším velkým krokem bylo, v roce 1953, popsání dvoušroubovice DNA Watsonem a Crickem (Dahm, 2005). Stejně tak velký objev jako předchozí dva je představení polymerázové řetězové reakce (PCR).

Objevil ji v roce 1983 americký chemik Kary Mullis, v roce 1993 byl za svůj objev oceněn Nobelovou cenou za chemii. Původně měla metoda sloužit jako vylepšení už tehdy známého Southern blottingu (Maheaswari, 2016).

2.2.2 Princip

Každá PCR reakce vyžaduje přítomnost templátové DNA, primerů, nukleotidů a DNA polymerázy. Templátová DNA může být gDNA vyizolovaná z tkáně, ale je možné použít i komplementární DNA (cDNA), získanou reverzní transkripcí z RNA.



Obrázek 4: gDNA obsahuje introny, které buňka při transkripci do mRNA vystřihá. Po provedení reverzní transkripce je získána cDNA, kde jsou za sebou řazeny jenom geny, bez oddělování introny. (Ishmael, 2008)

Rozdíl mezi gDNA a cDNA viz obrázek 4 – cDNA neobsahuje introny (Ishmael, 2008).

DNA polymeráza je klíčový enzym, který spojuje jednotlivé nukleotidy k sobě, aby vytvořila amplikon (Ishmael, 2008). Používá se termostabilní DNA polymeráza, vyizolovaná z bakterie žijící v horkých vřídlech – *Thermus aquaticus*, proto označení *Taq* polymeráza. Tato polymeráza vydrží nepoškozená kolísání teplot během PCR reakce (Mullis, 1990). Syntéza nového vlákna probíhá ve směru 5' → 3'.

Používají se 4 základní DNA nukleotidy – adenin, thymin, guanin a cytosin. Ty slouží jako stavební kameny pro tvorbu nového amplikonu. Primery ohraničují specifický produkt, který bude amplifikován. Jsou to krátké oligonukleotidy, které se komplementárně váží k místu na templátové DNA a slouží jako start místo pro DNA polymerázu (Mullis, 1990; Rosypal, 2002) Primery jsou 20–30 base pair (bp) dlouhé oligonukleotidy, odvozené od koncových sekvencí žádaného amplikonu (Rosypal, 2002). Jsou vyrobené umělou syntézou a komplementárně nasedají na templátovou DNA, kde specificky ohraničují vybraný úsek, ten je započat a ukončen 3' koncem primeru. Poslední složkou jsou voda a Mg^{2+} ionty, které zpevňují vazbu polymeráza-DNA.

Připravená reakční směs se podrobí amplifikaci. Ta probíhá v přístroji, zvaném thermocycler. V principu jde o pět kroků, přičemž 3 z nich se opakují v cyklech (obrázek 5). Pro každý krok je zapotřebí individuální teplota, kterou thermocycler dokáže velmi rychle a přesně měnit (Ishmael, 2008).

1. Krok – počáteční denaturace [$\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ / ~ 2 minuty]

Dojde k rozpletení celé templátové DNA, proto je časově delší. Dojde k rozpletení celé templátové DNA.

2. Krok – Denaturace [$\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ / ~ 30 sekund]

Dvoušroubovice DNA (dsDNA) je rozpletena na dvě jednovláknové molekuly DNA (ssDNA)

3. Krok – Annealing [$50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ / ~ 30 sekund]

Rozpletená ssDNA je inkubována s nadbytkem primerů v reakční směsi. Ty na ni hybridizují podle komplementarity bazí. Teplota a délka se liší v závislosti na použitých primerech – je pro každý pár primerů jedinečná.

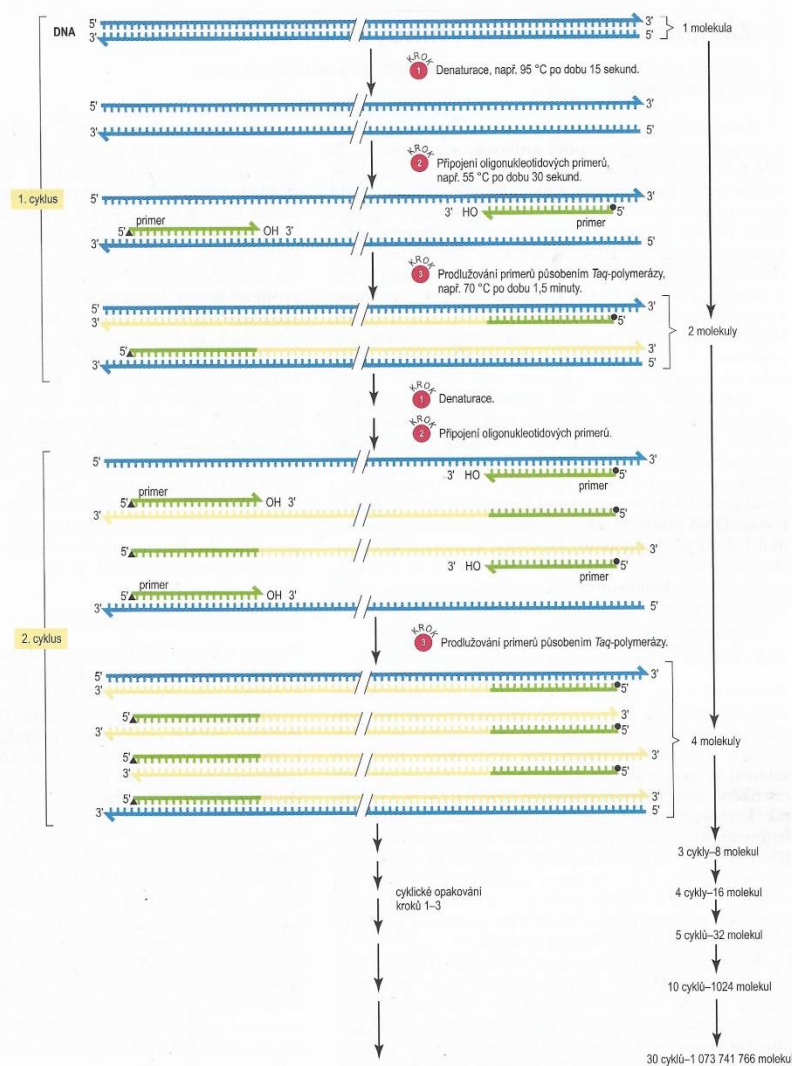
4. Krok – Elongace [70-72 °C / ~ 1,5 minuty]

V optimální pracovní teplotě použité polymerázy se zahájí prodlužovací krok. Polymeráza zahájí syntézu nového vlákna. Jako startovací bod jsou použity primery a do řetězce jsou inkorporovány nukleotidy podle komplementarity bazí. Syntéza probíhá ve směru 5' → 3'.

5. Krok – Závěrečná elongace [70-72 °C / ~ 6 minut]

Zaručuje kompletní všech ampliconů v PCR směsi.

Po proběhnutí prvního kroku jsou kroky 2, 3 a 4 opakovány za sebou v cyklech. Po každém dokončení 4. kroku je množství ampliconů ve zkumavce zdvojnásoben. Počet ampliconů lze, za ideálních podmínek, vyjádřit jako 2^n , kde n = počet cyklů. Obvykle se provádí 30–40 cyklů (Ishmael, 2008; Snustad, 2009). PCR je schopna naamplifikovat DNA jen z jedné templátové kopie nad detekovatelnou hranici. To se osvědčilo při detekci viru HIV pomocí této metody (Palmer, 2003).



Obrázek 5: Schématické zobrazení PCR reakce (Snustad, 2009).

2.3 Real-time PCR

Neboli kvantitativní PCR (qPCR) je modifikace konvenční PCR, která dokáže po každém proběhlém cyklu proměřit množství naamplifikované DNA. Tato technika se dnes, mimo jiné, využívá pro: detekci patogenů, analýzu genové exprese, jednonukleotidové polymorfizmy, analýzu chromozomových aberací. Je to vysoce citlivá a při použití specifických značení i vysoce specifická metoda (Kubista, 2006). qPCR byla objevena v roce 1992 jako modifikace PCR týmem vědců z Kalifornie (Higuchi, 1992).

2.3.1 Analýza genové exprese

Analýza probíhá porovnáváním genové exprese sledovaného vzorku s genovou expresí referenčního genu (RG). Exprese RG musí být ve všech tkáních organismu stejná a nesmí být experimentem ovlivňována. Proto je výběr RG pro stanovení relativní genové exprese pomocí qPCR naprosto klíčový. Pro experimenty sledující genovou expresi u různých odrůd, kde jsou vzorky odebírány ze stejné tkáně, je dostačující vybírat RG prověřené jinými pracemi. U komplexnějších studií porovnávajících GE v různých tkáních je vhodné mít k dispozici vypracovanou studii věnující se výběru vhodného RG (Brunner, 2004).

2.3.2 Princip qPCR

Do reakční směsi je, obdobně jako u PCR, zapotřebí přidat: templátovou DNA, pár oligonukleotidových primerů, volné nukleotidy (adenin, thymin, cytosin, guanin), termostabilní DNA-dependentní DNA polymerázu a Mg^{2+} ionty. Navíc se přidává reportér, který označí amplifikovanou DNA, obvykle fluorescenčně. Reportér vydává fluorescenční signál, který je tím vyšší, čím je vyšší obsah amplifikované DNA ve vzorku – signál se proměří po každém proběhlém cyklu. Prvních několik cyklů je signál velmi slabý, nepřekoná rušení okolí. Zvyšováním koncentrace amplikonu se exponenciálně zvyšuje i síla signálu. Konečná fluorescence, po posledním cyklu reakce, neprozradí nic o počáteční koncentraci DNA ve vzorku, pouze řekne, jestli reakce proběhla, nebo ne. Pro to se používá odečet od tzv. thresholdu. Algoritmus přístroje vypočte threshold, což je přímka kolmá na osu Y. Určuje statisticky nejvýhodnější pozici pro odečet hodnoty C_T (cycle of threshold). Hodnota C_T udává

počet cyklů, kterými vzorek musí projít, aby dosáhnul thresholdu. Amplifikační křivky jednotlivých vzorků by měly být paralelní v růstu (Kubista, 2006).

Reakce probíhá ve čtyřech hlavních fázích – viz obrázek 6.

1. Lineární fáze

Tato fáze trvá obvykle 10–15 cyklů, amplifikace pomalu startuje a není zatím možné sledovat statisticky významný růst křivky (rušení z pozadí). Na základě této fáze je určen threshold.

2. Brzká exponenciální fáze

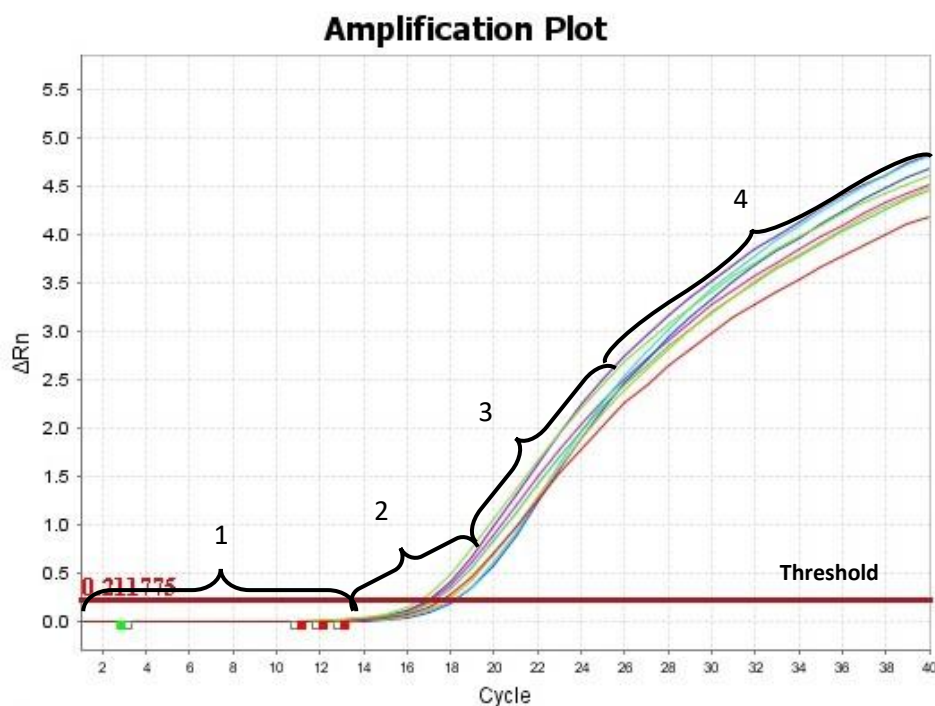
V této fázi protne křivka threshold. Fluorescence v této fázi nejnějněji vypovídá o počátečním množství templátové DNA ve vzorku. Cyklus, ve kterém vzorek protnul threshold se nazývá C_T a je to hodnota, ze které se vyvozují výsledky.

3. Exponenciální fáze

Zdvojnásobení množství produktu každým cyklem.

4. Plató fáze

Průběh reakce limitují vyčerpané komponenty. Reakce není tak účinná, probíhá pomaleji, nebo vůbec (Wong, 2005). Hodnoty z této fáze jsou pro výzkum nevhodné (Bustin, 2000).



Obrázek 6: Fáze qPCR reakce.

1 = Lineární fáze

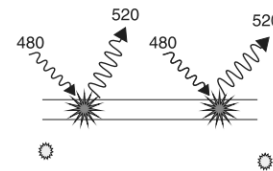
2 = Brzká exponenciální fáze

3 = Exponenciální fáze

4 = Plató fáze

2.3.3 Značení DNA

Pro značení amplifikované DNA je možné používat specifické a nespecifické metody (Kubista, 2006). Higuchi (1992) ve své práci, která jako první popisovala použití qPCR, použil barvivo ethidium bromid, který po nespecifickém navázání na dsDNA a ozáření UV světlem fluoreskuje. Díky jednoduššímu použití a bezpečnosti se od ethidia ustoupilo a dnes se jako nespecifické interkalační barvivo používá spíše SYBR Green I (SG) (Zipper, 2004). Volně v roztoku není vydávána téměř žádná fluorescence. Po navázání na jakoukoliv dsDNA ve vzorku vydává SG fluorescenční záření 1000x silnější, než volný SG. Přijímá záření o vlnové délce 480 nm a zároveň vydává záření o délce 520 nm (Valasek, 2005, obrázek 7).



Obrázek 7: SYBR green I

SG se váže nespecificky na všechny dsDNA, tedy i na kontaminující dsDNA a primer-dimery. Pro zjištění čistoty vzorku se používá analýza křivky tání (melt curve analysis). Ta se proměřuje po proběhnutí všech cyklů reakce. Dochází k postupnému zahřívání vzorků a kontinuálně s tím je proměřována jejich fluorescence. Po dosažení teploty tání dsDNA, dojde k poklesu signálu a v grafu se vytvoří pík (Kubista, 2006).

2.3.4 Vyhodnocení získaných dat

Existují dva přístupy, jak data vyhodnotit – absolutní a relativní kvantifikace genové exprese. Absolutní kvantifikace poskytuje informace o přesném množství původní templátové DNA, dosazením získaných dat do předem připravené a proměřené kalibrační křivky (Livak, 2001). Používá se v případech, kdy je potřeba zjistit přesné množství RNA / DNA na buňku (Schmittgen, 2008). Například při kvantifikaci virové zátěže (Niesters, 2001). Nevýhody této metody: mnohem více práce při přípravě výzkumu a fakt, že pro většinu prací stačí pouze relativní porovnání – gen A se exprimuje 5x více, než gen B (Schmittgen, 2008; Livak, 2001).

Základní metoda výpočtu relativní genové exprese je komparativní $\Delta\Delta C_T$ kvantifikace. Ta mezi sebou porovnává hodnoty genové exprese sledovaného a referenčního (Bustin, 2009) (také housekeeping) genu. Kalibrační vzorek může být neošetřená kontrolní rostlina nebo odběr v čase 0 (Livak, 2001). Výhoda spočívá v relativně jednoduchém provedení a schopnosti data uvést jako násobek genové

expresí proti jinému (kalibračnímu) vzorku. Nevýhodou je, že do výpočtu nezahrnuje účinnost reakce. (Schmittgen, 2008).

Pro výpočet stačí surová data, exportovaná z qPCR programu do tabulkového editoru – Microsoft Excel. Pro výpočet je vhodné seřadit vzorky – například podle času odběru. Postupuje se podle vzorce:

$$2^{-\Delta\Delta CT}, \text{ kde}$$

$$\Delta\Delta CT = (C_{T,vzorku} - C_{T,ref.genu})_{v\ čase\ X} - (C_{T,vzorku} - C_{T,ref.genu})_{v\ čase\ 0}$$

Respektive lze rovnici rozepsat do čtyř logických kroků, pro lepší přehlednost v tabulkovém editoru (viz tabulka 1).

$$\Delta CT_{v\ čase\ X} = (C_{T,vzorku} - C_{T,ref.genu})_{v\ čase\ X}$$

$$\Delta CT_{v\ čase\ 0} = (C_{T,vzorku} - C_{T,ref.genu})_{v\ čase\ 0}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{v\ čase\ X} - \Delta CT_{v\ čase\ 0}$$

$$2^{-(\Delta\Delta CT)} = \text{násobek exprese proti vzorku v čase 0}$$

Tabulka 1: Výpočet relativní exprese z naměřených hodnot CT

Jako kalibrační byl použit vzorek 1, správností provedení měření je potom jeho průměr $2^{-(\Delta\Delta CT)}$, který se musí rovnat co nejlíže 1. Každý vzorek byl proměřen v třech opakováních.

Čas odběru [h]	Číslo vzorku	CT					2 ^{-(ΔΔ CT)}	Průměr 2 ^{-(ΔΔ CT)}
		Cílový gen	∅ CT v čase 0 - Cílový gen	∅ CT v čase 0 - referenční gen	Referenční gen	2 ^{-(ΔΔ CT)}		
0	Vzorek 1	16,505	16,407	17,841	17,971	1,022	1,00504904	
0	Vzorek 1	16,744	16,407	17,841	17,986	0,875		
0	Vzorek 1	15,972	16,407	17,841	17,566	1,117		
0,5	Vzorek 2	15,991	16,407	17,841	13,247	0,055	0,065755229	
0,5	Vzorek 2	15,950	16,407	17,841	13,405	0,063		
0,5	Vzorek 2	15,931	16,407	17,841	13,695	0,079		
1	Vzorek 3	22,304	16,407	17,841	18,439	0,025	0,025006758	
1	Vzorek 3	22,033	16,407	17,841	18,445	0,031		
1	Vzorek 3	22,518	16,407	17,841	18,222	0,019		

Důkazem správně provedené qPCR reakce je hodnota $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ u vzorku odebraného v čase 0. Ta by se měla v průměru všech u něj naměřených hodnot pohybovat velmi blízko 1 (Livak, 2001). Tabulka 1 v překladu říká, že exprese vzorku 1 je jednonásobná proti expresi vzorku 1. Vzorek 2 má ve expresi 0,065krát nižší než vzorek 1 a exprese vzorku 3 je nižší 0,025krát.

2.4 PCR vs qPCR

Real-time PCR (qPCR) je modifikace konvenční PCR (cPCR). Například pro výzkum již zmiňované virové zátěže se qPCR ukázala jako mnohem citlivější metoda. Dokázala jednoznačně identifikovat rhinoviry v desetkrát nižší koncentraci oproti cPCR (Dagher, 2004).

Co se genové exprese týče, qPCR je také považována za vhodnější metodu. Oproti cPCR je opakovatelnost experimentů mnohem lepší (téměř se překrývající křivky), a také mnohem přesnější (velmi nízké směrodatné odchylky v replikátech). qPCR je však zhruba 3,6x dražší, ale není tak pracná a je méně časově náročná. Pro stanovení genové exprese je zapotřebí pro obě metody zajistit správný referenční gen (Huber, 2003).

Existuje mnoho metod, pro určení počátečního obsahu templátové DNA ve vzorku – North a South blotting, HPLC, scintillation proximity assay, PCR-ELISA, PCR end-point systémy a různé gelové elektroforézy. Všechny však mají velké nevýhody, ztěžující jejich používání – náročnost, velké riziko kontaminace, práce s radioaktivními látkami a podobně. qPCR se vyznačuje vysokou citlivostí (<5 kopií templátové DNA, za určitých podmínek stačí 1), vysokou přesností (<2 % směrodatná odchylka) (Valasek, 2005) a rychlostí provedení. Po proběhnutí qPCR reakce není obvykle třeba provádět žádné další kroky (gelová elektroforéza apod.), tím se vylučuje další kontaminace (Klein, 2002; Valasek, 2005). qPCR umožňuje, na základně průběhu amplifikační křivky, odhadnout původní počet templátových kopií ve vzorku, navíc lze po proběhnutí reakce, pomocí analýzy křivky tání identifikovat kontaminace, tvorbu primer-dimerů, či jiných nespecifických struktur. Podle analýzy křivky tání lze vyhodnocovat přítomnost SNP's nebo například rezistenci mikroorganismů k antibiotikům (Valasek, 2005).

3 Materiál a metody

Pokusnou rostlinou byla zvolena brukev řepka olejka (*Brassica napus* L.), konkrétně odrůdy Cadeli a Navajo. Na základě předchozích pokusů byly tyto dvě odrůdy vybrány jako kontrastní v odolnosti vůči chladu – Cadeli jako k chladu náchylná, Navajo jako odolná (Jelínková, 2017).

3.1 Podmínky pěstování rostlin

Rostliny byly vysety do sadbovačů s univerzálním zahradnickým substrátem, který byl předtím promíchán s perlitem v poměru 5:1. Následně bylo ještě přidáno hnojivo Kristalon (AGRO CS a.s.), a to podle doporučení výrobce. Semínko bylo položeno na mírně utužený substrát a zasypáno tenkou vrstvou substrátu. Pro usnadnění klíčení byla vrchní vrstva substrátu navlhčena, dále byla záливka prováděna podmokem. Rostliny byly pěstovány ve fytotronu při následujících podmínkách:

- fotoperioda 14 / 10 hodin (světlo/tma), intenzita 400 $\mu\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$
- 21 ± 2 °C přes den
- 19 ± 2 °C v noci
- Relativní vlhkost = 85 %

Stresovaná skupina rostlin byla od kontrolních oddělena po pěti týdnech (3–4 pravé listy). Byly dále pěstovány při 2 °C. Po dosažení této teploty ve fytotronu byl započat odběr vzorků.

3.2 Odběry vzorků

Kontrolní rostliny (K) byly odebírány 1. (ihned po dosažení 2 °C u skupiny stresovaných rostlin), 6. a 9. den → K1, K10 a K13.

Stresované rostliny (S) byly odebrány 1., 2., 3., 4., 7., 8., 10., 11., a 14. den → S 1-14.

Viz tabulka 2.

Tabulka 2: Odběry vzorků

Stejným systémem byly odebírány vzorky u odrůdy Cadeli i Navajo.

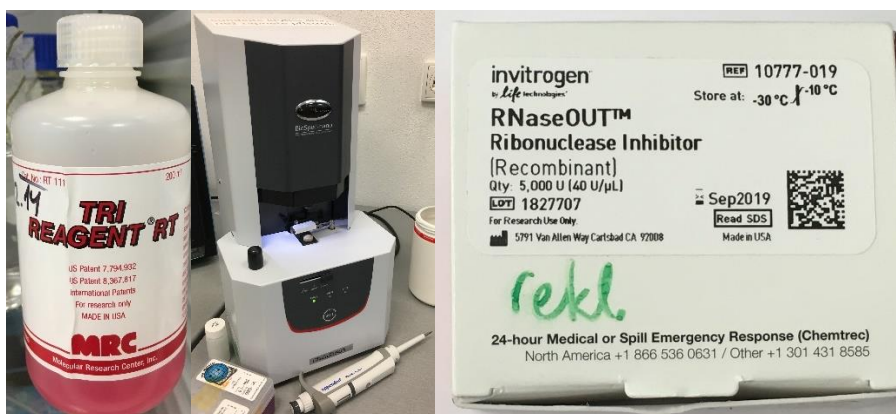
Kontrolní rostliny (20 °C)	
Číslo vzorku	Délka (hod)
1	0
10	144
13	216
Stresované rostliny (2 °C)	
Číslo vzorku	Délka stresu (hod)
1	0
2	1,5
3	3
4	4,5
5	6
6	7,5
7	24
8	48
9	72
10	144
11	168
12	216
13	240
14	312

Odebráno bylo vždy z nejmladšího plně vyvinutého listu na rostlině do předem popsané mikrozkuřavky. Bezprostředně po odběru byl vzorek zmražen vložením do tekutého dusíku a dále uchováván v mrazícím boxu při teplotě -80 °C.

3.3 Izolace RNA

Izolace celkové RNA (totalRNA) byla provedena ze 100 mg pletiva. Vzorek byl homogenizován v tekutém dusíku přímo v mikrozkuvkách. Po homogenizaci byl ke vzorku přidán 1 ml předechlého roztoku TRI REAGENT®RT (Molecular Research Center, INC; obr 8). Izolace byla provedena podle protokolu (příloha 1). Pro zpomalení degradace RNA byl přidán inhibitor RNáz: RNaseOUT™ (Invitrogen; obr. 8) Čistota izolace a množství vyizolované RNA bylo změřeno na přístroji BioSpec-nano (obr. 8; příloha 5). Po izolaci byla RNA uchovávána v mrazícím boxu, při teplotě -80 °C. Před provedením dalšího kroku je potřeba vyizolovanou RNA naředit na koncentraci 50 ng*μl⁻¹. K tomu byly použity hodnoty koncentrací jednotlivých vyizolovaných vzorků. RNA byla ředěna DEPC vodou.

Čistota RNA je určena poměrem absorbcí při vlnových délkách 260/280 a 260/230 nm. Pro RNA je obecně platné, že hodnota 260/280 by měla být přibližně 2,0 – potom lze RNA považovat za čistou. Hodnota nižší indikuje obsah proteinů nebo fenolů, vyšší hodnota není chybou. Poměr 260/230 je sekundární ukazatel čistoty RNA. Jeho hodnota by se měla optimálně pohybovat kolem 2,0 – 2,2. Nižší hodnoty indikují obsah například sacharidů, zbytků fenolických látek, rezidua guanidinu nebo glykogenu. Vyšší hodnoty potom znamenají špatně změřený blank, popřípadě špatný roztok použitý pro kalibraci blanku (pH, voda namísto TE pufru apod.) (Matlock, 2015).



Obrázek 8: Vlevo TRI REAGENT®RT, uprostřed BioSpec-nano, vpravo inhibitor RNáz.

3.4 Přečištění RNA a reverzní transkripce

RNA byla přečištěna od kontaminující DNA pomocí kitu DNA-free™ DNA Removal Kit (Invitrogen™; obr. 9). Po přečištění byl proveden přepis mRNA do cDNA pomocí kitu ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega; obr. 9) podle doporučení výrobce (protokol v příloze 2).



Obrázek 9: Vlevo kit pro čištění RNA, vpravo kit pro reverzní transkripci.

3.5 Real Time PCR

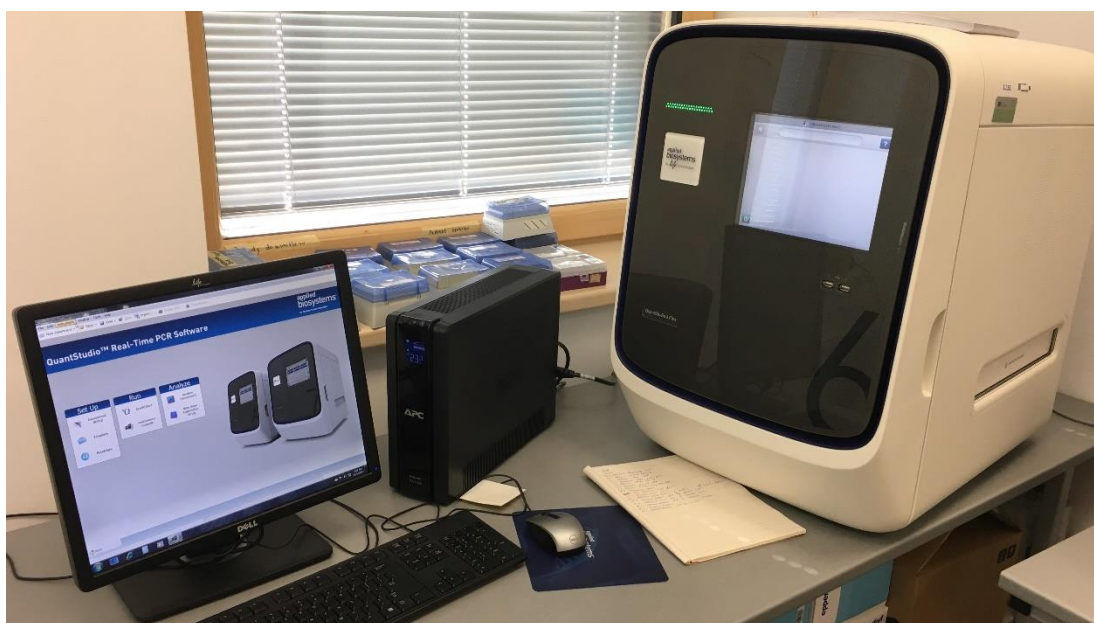
Real Time qPCR analýza genové exprese byla provedena na přístroji QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems – Life Technologies; obr. 10). Data byla analyzována pomocí programu QuantStudio Real-Time PCR Systém v1.3 (Applied Biosystems – Life Technologies) a zpracována pomocí tabulkového editoru Microsoft Excel (Microsoft).

Reakce byla provedena ve 40 cyklech a změnou teplot $1,6\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$. Při následujících podmínkách, doporučených výrobcem:

1. $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 2 minuty
2. $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 10 minut
↓ 40 cyklů ↓
3. $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 15 sekund
4. $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 1 minuta
↑ 40 cyklů ↑
5. zvyšování teploty z $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $0,05\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ – proměření křivky tání

Jako referenční (housekeeping) gen byl použit *BnAct*, což je velmi konzervovaný gen pro protein který se v buňce účastní velké řady různých pochodů. *BnAct* je laboratoří zavedený referenční gen pro řepku olejků. Zkoumána byla exprese genů *BnERD10* a *BnICE1* (sekvence primerů: příloha 3). Primery pro studovaný gen *BnERD10* a *BnICE1* byly navrženy v programu Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). Relativní exprese byla vypočtena metodou komparativní $\Delta\Delta C_T$ kvantifikace (Livak, 2001).

Cadeli Stres 1, byl použit jako kalibrační vzorek u obou zkoumaných genů. Složení qPCR reakce: viz příloha 4. Pro ověření správnosti amplifikace, odhalení případné nespecifické amplifikace, byly některé vzorky separovány elektroforeticky – 2 % agarózový gel + ethidium bromid, TBE pufr, 120 V, ~ 30 minut.



Obrázek 10: Příklad pro Real-Time qPCR analýzu – QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems – Life Technologies).

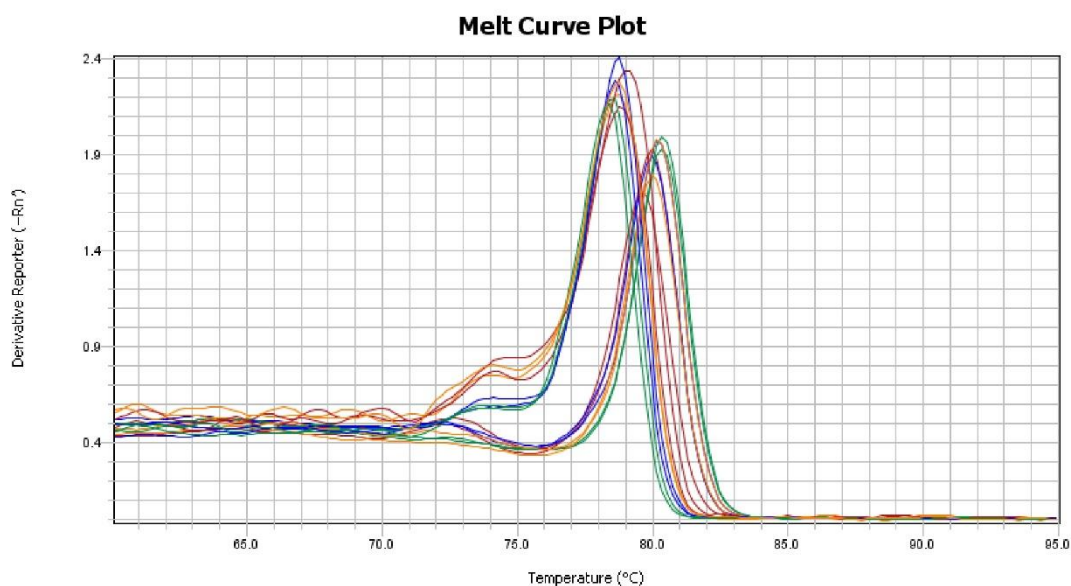
4 Výsledky

Pro zjednodušení interpretace výsledků jsou použity tyto zkratky:

K	=	Kontrolní rostliny (20 °C)
S	=	Stresované rostliny (2 °C)
Cad	=	Odrůda Cadeli
Nav	=	Odrůda Navajo

4.1 Analýza křivky tání

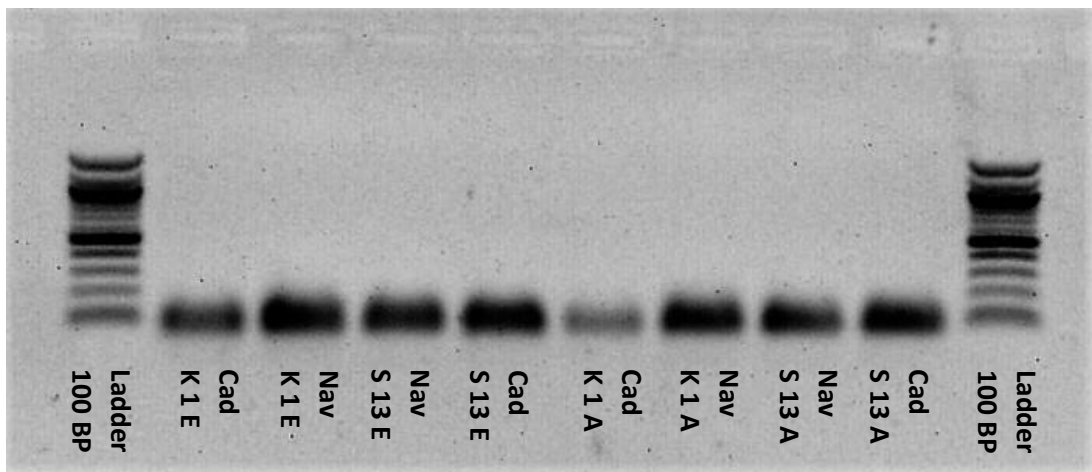
Analýzou křivky tání je získán obsah ampliconů v konečném produktu po proběhnutí qPCR reakce. Niže (obrázek 11) je zobrazena křivka tání u jednoho souboru měřených vzorků. Amplicon genu *BnAct* má nižší očekávanou teplotu tání oproti genu *ERD10*. Primery pro *BnAct* pravděpodobně tvořily nespecifické produkty – primerdimery. Ty se na křivce tání projevují velmi slabým píkem v rozmezí teplot cca 74–75 °C. Tyto struktury jsou však v mém měření zanedbatelné, vzhledem k tomu, že nebyly pozorovatelné na elektroforetickém gelu – viz níže.



Obrázek 11: Analýza křivky tání pro geny *BnAct* (78-79 °C) a *ERD10* (80-81 °C), vzorky: Cad S 13; Nav S 13; Nav K 1; Cad K 1

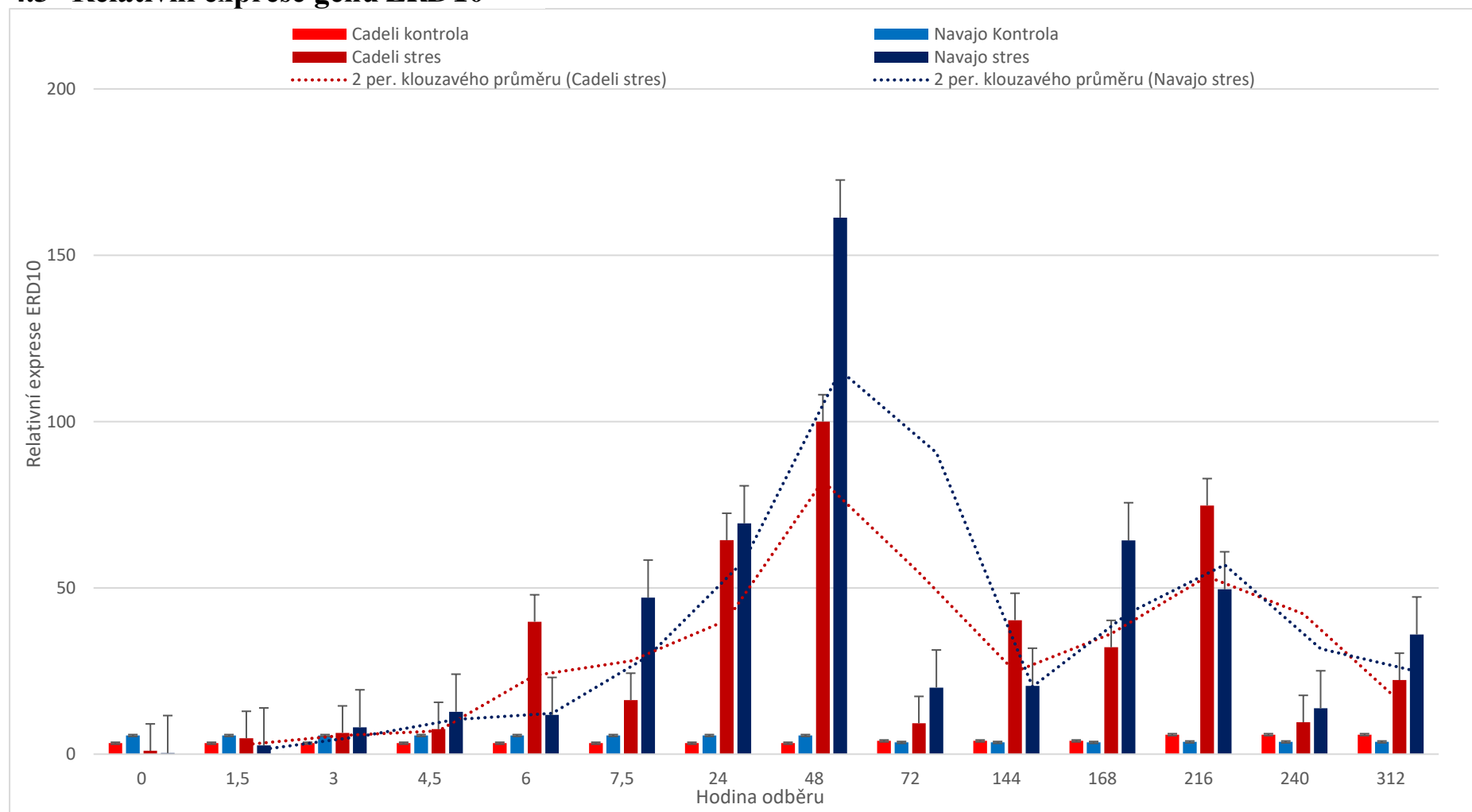
4.2 Zobrazení amplikonu na gelu

Na gel bylo vyneseno pouze první měření pro ověření správnosti amplifikace použitých primerů. Jako marker byl použit 100 bp ladder. Velikost fragmentů odpovídá očekávané velikosti kolem 100 bp a je bez nesespecifických amplikonů (obr 13).



Obrázek 13: Elektroforetická separace amplikonu po proběhnutí qPCR reakce. E = *ERD10*, A = *BnAct*

4.3 Relativní exprese genu *ERD10*



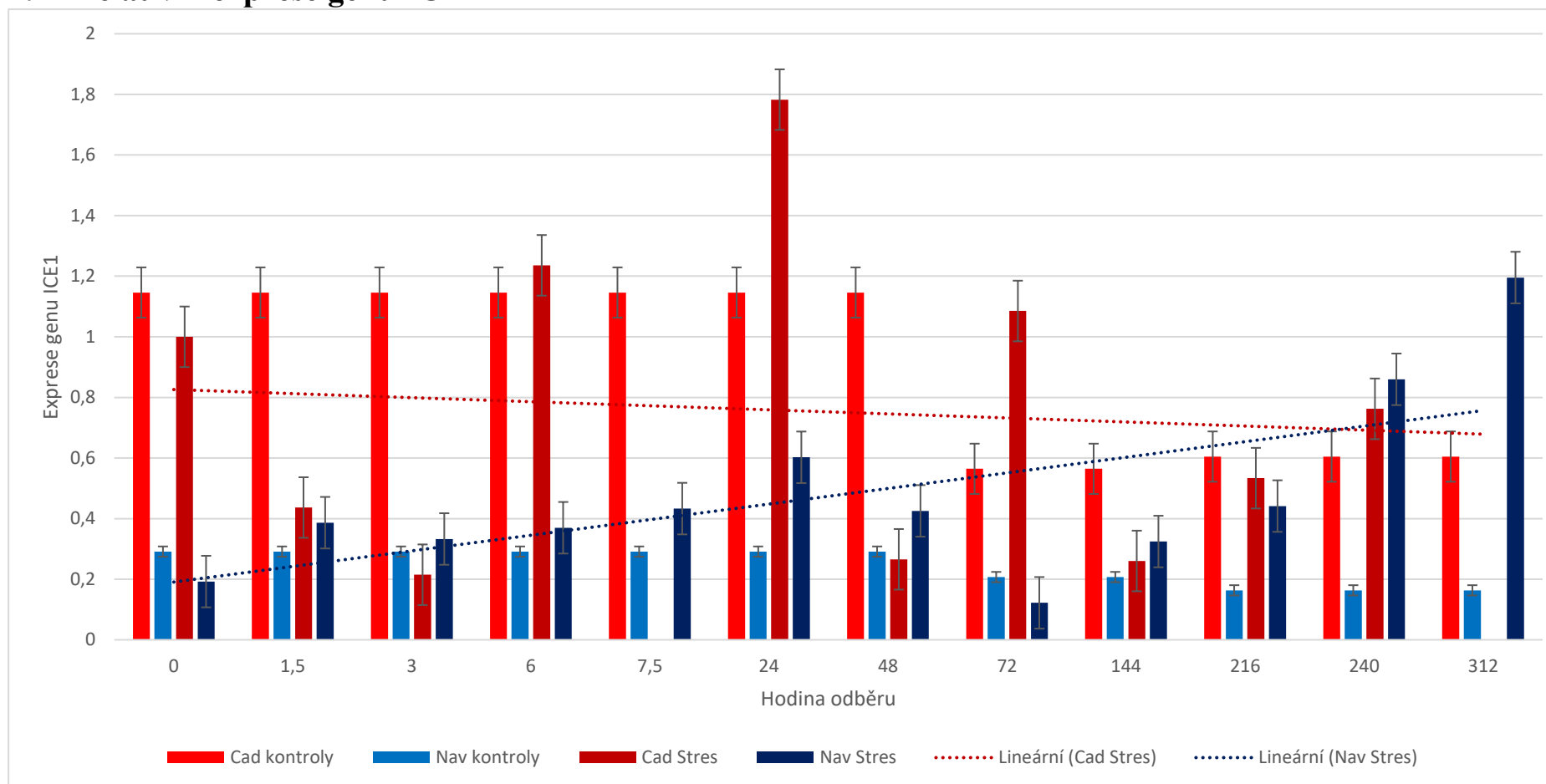
Graf 1: Relativní exprese genu *ERD10* u chladem stresovaných (■) a kontrolních (■) rostlin chladu odolné odrůdy Navajo a náchylné odrůdy Cadeli stresovaných (■) a kontrolních (■). Sloupce vyjadřují průměrné hodnoty ze 3 nezávislých měření a úsečky představují standardní chybu měření. Do grafu jsou vneseny hodnoty klouzavého průměru, které znázorňují změnu exprese v čase.

Expresí genu *BnERD10* (graf 1, jako referenční vzorek byl použit odběr v čase 0 – vz. S1) se u obou stresovaných odrůd časem zvyšuje, až do 48. hodiny, kde maximum dosahuje 161násobku u Nav S a 100násobku u Cad S. Dále dochází k výraznému poklesu v 72. hodině, aby se exprese opět pomalu zvedala do 216 hodiny. Následuje další propad a pozvolné zvyšování exprese stresovaných rostlin.

Chladu odolnější odrůda (Navajo) vykazuje téměř v celé řadě expresi genu *BnERD10* vyšší. K chladu náchylná odrůda (Cadelí) má vyšší expresi tohoto genu oproti odrůdě Navajo 6, 144 a 216 hodin po vystavení stresu chladem.

Kontrolní rostliny byly odebírány 3x (0., 144. a 216. hodina), jejich exprese je tedy pro ilustraci a snazší orientaci v grafu nakopírována od 0. do 48. hodiny u nultého odběru, od 72. do 168. hodiny u 144. hod. odběru a od 216. do 312. hodiny u 216. odběru. Jejich exprese se výrazně v čase nemění.

4.4 Relativní exprese genu ICE1



Graf 2 Relativní exprese genu *ICE1* u chladem stresovaných (■) a kontrolních (■) rostlin chladu odolné odrůdy Navajo a stresovaných (■) a kontrolních (■) rostlin náchylné odrůdy Cadeli. Sloupce vyjadřují průměrné hodnoty z 3 provedených měření, úsečky střední chybu měření. Z pokusu byly vyloučeny hodnoty pro Cad S v hodinách 7,5 a 312, jelikož se nepodařilo provést statisticky přesné měření. Graf je proložený dvěma spojnicemi trendu, které znázorňují expresi v čase – stoupavou u Nav S a klesavou u Cad S.

Expresse genu *BnICE1* (graf 2, jako referenční vzorek byl použit odběr v čase 0 – vz. S1) je celkově vyšší u k chladu náchylnější odrůdy – Cadeli, a to ve skupině kontrol i stresovaných rostlin. Celkově se exprese tohoto genu u Cadeli stresovaných rostlin pohybuje kolem průměru 0,8násobku exprese Cad S 1. Expresse genu *BnICE1* u rostlin odrůdy Navajo se v průměru pohybuje kolem 0,48násobku v porovnání s Cad S 1.

K chladu náchylnější odrůda (Navajo) exprimuje gen *BnICE1* ze začátku méně, ovšem se stoupavou tendencí. K chladu náchylnější odrůda (Cadel) exprimuje tento gen, hlavně zpočátku, mnohem více, ale v čase se jeho exprese snižuje. Obě odrůdy vykazují v expresi genu *BnICE1* velké výkyvy. Kontrolní rostliny byly odebírány 3x (0., 144. a 216. hodina), jejich exprese je tedy nakopírována od 0. do 48. hodiny u nultého odběru, od 72. do 144. hodiny u 144. odběru a od 216. do 312. hodiny u 216. odběru.

5 Diskuze

V posledních letech se vědecké práce v oblasti šlechtění rostlin stále více zabývají zlepšením tolerance rostlin k různým stresorům (Kosová, 2010). To s sebou nese různé překážky, zejména momentální malá znalost mechanismu účinku stresu na rostliny. Poměrně dobře je prozkoumána rostlina huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*), která je zároveň i modelovým organismem v genetickém výzkumu (Meinke, 1998). Naopak řepka olejka je v tomto směru prozkoumána o mnoho méně.

Výsledky expresní analýzy genů *BnERD10* a *BnICE1*, které jsou společně zapojeny do reakce rostliny na stres, naznačují rozdílnou reakci zkoumaných odrůd – Navajo a Cadeli, na stres chladem. Podle Denga (2009) je gen *ERD10* exprimován v celé rostlině, nejvíce zejména v listech, proto jsem k izolaci RNA a následným analýzám odebíral právě listy.

Z výsledků mnou prováděných analýz vyplývá, že u stresovaných rostlin, v porovnání s rostlinami kontrolními, je zvýšená exprese genu *ERD10*. Navajo dosahuje až 32x vyšší exprese (48 hodin od začátku stresu) oproti kontrolním rostlinám. Exprese odrůdy Cadeli se 48 hodin od začátku stresu zvýšila oproti kontrolním rostlinám až 30násobně. U většiny odběrů byla exprese genu *ERD10* vyšší u odrůdy Navajo, ta byla na základě dřívějších polních pokusů vybrána jako chladu odolná odrůda (Jelínková, 2017, příloha 7). V průběhu stresu se u obou testovaných odrůd exprese tohoto genu spíše zvyšovala.

Na podobné téma se zaměřovalo už několik skupin vědců, kteří mají podobné výsledky. Podle Kosové (2010), zvýšení exprese chladem indukovaných genů často (ale ne vždy) koreluje se zvýšenou odolností ke stresu a zvýšení akumulace transkriptu nebo jeho proteinu přímo pozitivně ovlivňuje odolnost rostliny ke stresu. Toto tvrzení se však částečně vylučuje s tvrzením Bustina (2009), který uvádí, že detekce přítomnosti mRNA neposkytuje žádné informace o tom, zda bude mRNA podrobena translaci a zda bude utvořen funkční protein. Odolnost vůči chladu lze však předpovědět kvantifikací dehydrinových proteinů v listech (Klíma, 2012).

V tomto ohledu jsou zajímavé i naše předchozí pozorování nárůstu akumulace proteinu ERD10 u odrůdy Cadeli po 42 dnech, u odrůdy Navajo již po 11 dnech, a to desetinásobně oproti kontrolním rostlinám (Jelínková, 2017, příloha 7). Můj soubor vzorků bohužel nezahrnuje 11. den, avšak zahrnuje den 9. (216. hodina) a 10. (240. hodina). V těchto dnech dochází k výraznému poklesu transkriptu v listech, což může

být způsobeno právě akumulací proteinu, díky které rostlina nepotřebuje exprimovat a translatovat další. Tomu odpovídá i zjištění Havlíčkové (2013), že rostliny řepky po 80denní jarovizaci při 4 °C nevykazovaly zvýšenou expresi genu *ERD10*.

Deng (2009) uvádí, že transkripce genu *ERD10* byla signifikantně vyšší již po 8 hodinách stresu. Exprese po 48 hodinách se dále mírně zvyšovala (příloha č. 6). Stejných výsledků jsem dosáhl i v mé práci. Stresované rostliny měly oproti kontrolním v 7,5 hodině stresu (v 8. hodině jsem neodebíral vzorek) pětinasobnou (Cadelì) a osminásobnou (Navajo) expresi. Rozdíl stresovaných rostlin mezi 48. a 8. hodinou je více než 5násobný (Cadelì) a 3násobný (Navajo).

Šlechtění na zvýšení exprese genu *ERD10* by mohlo být patrně zajímavým šlechtitelským cílem. Zkoumáním *erd10 mutantů* bylo dokázáno, že rostliny postrádající tento gen nejsou schopny dlouhodobě odolávat nízkým teplotám. Rostliny řepky olejky byly vystaveny po dobu 24 hodin teplotě 4 °C – *erd10 mutant* měl 70 % celkové listové plochy poškozenou, zatímco kontrolní rostliny pouhých 40 %. Z toho plyne, že tento gen se pravděpodobně výrazně zapojuje do obranné reakce na chlad (Kim, 2010).

Další mnou studovaný protein ICE1 se vyskytuje ve všech tkáních rostliny (Budhagatapalli, 2016; Chinnusamy, 2003) a to neustále, bez ohledu na prostředí, ve kterém se rostlina právě nachází (Gilmour, 1998). Exprese genu *ICE1* je ovlivňována chladem jen velmi mírně (Chinnusamy, 2003), čemuž odpovídají i moje výsledky. V čase se exprese razantně neměnila. Exprese u odrůdy Cadelì sice dosahovala silných výkyvů v rámci jednotlivých měření, ale v průměru byla stále stejná. Odrůda Navajo měla výkyvy v expresi *ICE1* mnohem slabší, vyrovnanější a zejména ke konci experimentu s expresí mírně stoupavou. Odrůda Navajo dosáhla u kontrolních i stresovaných rostlin výrazně nižší exprese oproti odrůdě Cadelì, což by mohlo paradoxně podtrhávat fakt, že se jedná chladu odolnější rostlinu. Z výsledků expresní analýzy genu *ERD10* jsem došel k závěru, že při snižování exprese bylo v tkáních obsaženo větší množství dehydrinů ERD10 (Jelínková, 2017). Pokud bude stejný princip fungovat i zde, může nižší exprese genu *ICE1* patrně znamenat vyšší obsah ICE1 proteinů (transkripčních faktorů) v tkáni rostliny, čímž by mohla být způsobena i její chladuvzdornost, resp. její lepší připravenost na příchod chladného období.

6 Závěr

Cílem této práce bylo provedení přesného chladového experimentu a expresní analýza genů *BnICE1* a *BnERD10* u řepky vystavené chladu v různých fázích stresu. Na základě výsledků mnou provedených analýz jsem zjistil, že pomocí qRT-PCR je možné vyhodnotit relativní genovou expresi genů *BnERD10* a *BnICE1* u řepky olejky. Oproti kontrolním rostlinám byla relativní genová exprese stresovaných rostlin značně zvýšená, čímž se potvrdila hypotéza této práce. Podle další hypotézy, na jejímž základě vznikla tato bakalářská práce, by měla odolná odrůda řepky mít odlišnou expresi genů *BnICE1* a *BnERD10* v porovnání s odrůdou náchylnou. Výsledky mnou provedených analýz tuto hypotézu také potvrdily.

7 Použitá literatura

BARANYK, Petr a ANDREJ FÁBRY A KOLEKTIV, 2007. *Řepka: pěstování, využití, ekonomika*. 1. vyd. Praha: Profi Press. ISBN 9788086726267.

BARANYK, Petr, 2017. *Stanovisko k odrůdové skladbě řepky pro rok 2017/2018: doporučení SPZO*. 14. Praha: Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin. ISBN 978-80-87065-72-3.

BRAY, E., 1993b. Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiology* [online]. **103**(4), 1035-1040 [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1104/pp.103.4.1035. ISSN 0032-0889.

BRAY, Elizabeth, Timothy CLOSE, ed., 1993a. *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress: proceedings, 16th Annual Riverside Symposium in Plant Physiology, January 28-30, 1993 : Department of Botany and Plant Sciences, University of California, Riverside*. Rockville, Md: American Society of Plant Physiologists. ISBN 0943088267.

BRUNNER, Amy, Igor YAKOVLEV a Steven STRAUSS, 2004. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology* [online]. **4**(14), 14 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1186/1471-2229-4-14. ISSN 14712229.

BUDHAGATAPALLI, Nagaveni, Rama NARASIMHAN, Jeyaraman RAJARAMAN, Chinnusamy VISWANATHAN a Karaba N. NATARAJA, 2016. Ectopic expression of AtICE1 and OsICE1 transcription factor delays stress-induced senescence and improves tolerance to abiotic stresses in tobacco. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* [online]. **25**(3), 285-293 [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1007/s13562-015-0340-8. ISSN 0971-7811.

BUSCH, Lawrence, Valerie GUNTER, Theodore MENTELE, Masashi TACHIKAWA a Keiko TANAKA, 1994. Socializing Nature: Technoscience and the Transformation of Rapeseed into Canola. *Crop Science* [online]. **34**(3), 607-614 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.2135/cropsci1994.0011183X003400030001x. ISSN 0011-183X.

BUSTIN, S., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* [online]. **25**(2), 169-193 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1677/jme.0.0250169. ISSN 0952-5041.

BUSTIN, S., V. BENES, J. GARSON a J. HELLEMANS, 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* [online]. **55**(4), 611-622 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797. ISSN 0009-9147.

CLOSE, Timothy, 1997. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* [online]. **100**(2), 291-296 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb04785.x. ISSN 0031-9317.

DAGHER, Hayat, Howard DONNINGER, Paul HUTCHINSON a Reena GHILDYAL, 2004. Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *Journal of Virological Methods* [online]. **117**(2), 113-121 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.01.003. ISSN 01660934.

DAHM, Ralf, 2005. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology* [online]. **278**(2), 274-288 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.11.028. ISSN 00121606.

- DENG, Zhongxiang, Yongzhen PANG, Weiwen KONG a Zhonghai CHEN, 2009. A novel ABA-dependent dehydrin ERD10 gene from *Brassica napus*. *DNA Sequence* [online]. **16**(1), 28-35 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1080/10425170500040180. ISSN 1042-5179.
- DUPONT, J, P WHITE, K JOHNSTON, H HEGGTVEIT, B MCDONALD, S GRUNDY a A BONANOME, 1989. Food safety and health effects of canola oil. *Journal of the American College of Nutrition* [online]. **8**(5), 360-375 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1080/07315724.1989.10720311. ISSN 0731-5724.
- FREEMAN, Willard, Stephen WALKER a Kent VRANA, 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. *BioTechniques* [online]. **26**(1), 112-125 [cit. 2018-03-22].
- FU, Dong-hui, Ling-yan JIANG, Annaliese MASON et al., 2016. Research progress and strategies for multifunctional rapeseed: A case study of China. *Journal of Integrative Agriculture* [online]. **15**(8), 1673-1684 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1016/S2095-3119(16)61384-9. ISSN 20953119.
- GE, Jun, Sam YOON a Nag CHOI, 2017. Using Canola Oil Biodiesel as an Alternative Fuel in Diesel Engines: A Review. *Applied Sciences* [online]. **7**(9), 1-19 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.3390/app7090881. ISSN 2076-3417.
- GILMOUR, Sarah, Daniel ZARKA, Eric STOCKINGER a Maite SALAZAR, 1998. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Journal* [online]. **16**(4), 433-442 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1046/j.1365-3113x.1998.00310.x. ISSN 0960-7412.
- GÓMEZ-CAMPO, C., 1999. *Biology of Brassica coenospecies*. 1st ed. New York: Elsevier. ISBN 0444502785.
- GOYAL, Kshamata, Laura J. WALTON a Alan TUNNACLIFFE, 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* [online]. **388**(1), 151-157 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1042/BJ20041931. ISSN 0264-6021.
- GUY, Charles, Dale HASKELL a Qin-Bao LI, 1998. Association of Proteins with the Stress 70 Molecular Chaperones at Low Temperature: Evidence for the Existence of Cold Labile Proteins in Spinach. *Cryobiology* [online]. **36**(4), 301-314 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1006/cryo.1998.2089. ISSN 00112240.
- HAVLÍČKOVÁ, Lenka, Irena JELÍNKOVÁ, Channakeshavaiah CHIKKAPUTTAIAH, Ilja PRÁŠIL a Milan URBAN, 2013. Studium exprese genů spojených s abiotickým stresem u řepky. *Úroda: vědecká příloha* [online]. **61**(12), 142-145 [cit. 2018-04-07].
- HIGUCHI, Russell, Gavin DOLLINGER, P. WALSH a Robert GRIFFITH, 1992. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology* [online]. **10**(4), 413-417 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1038/nbt0492-413. ISSN 0733-222X.
- HUANG, Daiqing, Weiren WU, Suzanne ABRAMS a Adrian CUTLER, 2008. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany* [online]. **59**(11), 2991-3007 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1093/jxb/ern155. ISSN 1460-2431.
- HUBER, René, Elke KUNISCH, Brigitte GLÜCK a Renate EGERER, 2003. Comparison of conventional and real-time RT-PCR for the quantitation of jun protooncogene mRNA and analysis of jun B mRNA expression in synovial membranes and isolated synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients. *Zeitschrift für Rheumatologie* [online]. **62**(4), 378-389 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1007/s00393-003-0472-4. ISSN 0340-1855.

- HUGHES, Monica a M. DUNN, 1990. The Effect of Temperature on Plant Growth and Development. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* [online]. **8**(1), 161-188 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1080/02648725.1990.10647868. ISSN 0264-8725.
- HUGHES, Monica a M. DUNN, 1996. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *Journal of Experimental Botany* [online]. **47**(3), 291-305 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1093/jxb/47.3.291. ISSN 0022-0957.
- CHANNAKESHAIAH, Chikkaputtaiah, L. HAVLÍČKOVÁ a I. JELÍNKOVÁ, 2014. Differential expression analysis of genes involved in abiotic stress in oilseed rape. *Úroda* [online]. **63**(12), 167-170 [cit. 2018-03-30].
- CHINNUSAMY, Viswanathan, 2003. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes & Development* [online]. **17**(8), 1043-1054 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1101/gad.1077503. ISSN 08909369.
- CHINNUSAMY, Viswanathan, Jianhua ZHU a Jian-Kang ZHU, 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* [online]. **12**(10), 444-451 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1016/j.tplants.2007.07.002. ISSN 13601385.
- ISHMAEL, Faoud a Cristiana STELLATO, 2008. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* [online]. **101**(4), 437-443 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)60323-7. ISSN 10811206.
- ISSARIYAKUL, Titipong a Ajay DALAI, 2014. Biodiesel from vegetable oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. **31**, 446-471 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1016/j.rser.2013.11.001. ISSN 13640321.
- JAHREIS, Gerhard a Ulrich SCHÄFER, 2011. Rapeseed (*Brassica napus*) Oil and its Benefits for Human Health. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* [online]. Jena: Elsevier, s. 967-974 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1016/B978-0-12-375688-6.10114-8. ISBN 9780123756886.
- JALEEL, Cheruth, 2009. Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *International journal of agriculture & biology* [online]. **11**(1), 100-105 [cit. 2018-03-19]. ISSN 1814-9596.
- JELÍNKOVÁ, I., M. VRÁBLOVÁ, J. HARENČÁK, P. ŠTOIDL a V. ČURN, 2017. Využití metody rezonance povrchového plazmonu k selekci chladu odolných genotypů řepky ozimé (*Brassica napus* subsp. *napus*). *Úroda: vědecká příloha* [online]. **65**(12), 215-217 [cit. 2018-03-30]. ISSN 0139-6013.
- JELÍNKOVÁ, Irena, Ch. CHANNAKESHAIAH, L. HAVLÍČKOVÁ, P. VÍTÁMVÁS a M. URBAN, 2014. Genů/proteinů indukovaných v podmínkách stresu suchem u řepky olejky: comparative analysis of protein/gene expression profiling in terms of time and duration of exposure to drought in winter oilseed rape. *Úroda* [online]. **63**(12), 187-190 [cit. 2018-03-30].
- KIM, Sun a Kyoung NAM, 2010. Physiological roles of ERD10 in abiotic stresses and seed germination of Arabidopsis. *Plant Cell Reports* [online]. **29**(2), 203-209 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1007/s00299-009-0813-0. ISSN 0721-7714.

KIYOSUE, Tomohiro, Kazuko YAMAGUCHI-SHINOZAKI a Kazuo SHINOZAKI, 1994. Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L: identification of three ERDs as HSP cognate genes. *Plant Molecular Biology* [online]. **25**(5), 791-798 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1007/BF00028874. ISSN 0167-4412.

KLEIN, Dieter, 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* [online]. **8**(6), 257-260 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/S1471-4914(02)02355-9. ISSN 14714914.

KLÍMA, Miroslav, Pavel VÍTÁMVÁS, S. ZELENKOVÁ, M. VYVADILOVÁ a Ilja PRÁŠIL, 2012. Dehydrin and proline content in *Brassica napus* and *B. carinata* under cold stress at two irradiances. *Biologia Plantarum* [online]. **56**(1), 157-161 [cit. 2018-04-07]. ISSN 0006-3134.

KOLE, Chittaranjan., 2007. *Oilseeds*. New York: Springer. ISBN 3-540-34387-3.

KOSOVÁ, Klára, Ilja PRÁŠIL a Pavel VÍTÁMVÁS, 2010. Role of Dehydrins in Plant Stress Response. PESSARAKLI, Mohammad, ed., Mohammad PESSARAKLI. *Handbook of Plant and Crop Stress, Third Edition* [online]. CRC Press, s. 239-285 [cit. 2018-04-01]. Books in Soils, Plants, and the Environment. DOI: 10.1201/b10329-13. ISBN 978-1-4398-1396-6.

KOVACS, D., E. KALMAR, Z. TOROK a P. TOMPA, 2008. Chaperone Activity of ERD10 and ERD14, Two Disordered Stress-Related Plant Proteins. *PLANT PHYSIOLOGY* [online]. **147**(1), 381-390 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1104/pp.108.118208. ISSN 0032-0889.

KRAMER, John, Frank SAUER a Wallace PIGDEN, 1983. *High and low erucic acid rapeseed oils: production, usage, chemistry, and toxicological evaluation*. New York: Academic Press. ISBN 0124250807.

KUBISTA, Mikael, José ANDRADE, Martin BENGTSSON et al., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. **27**(2-3), 95-125 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007. ISSN 00982997.

LEE, B.-h., 2005. The Arabidopsis Cold-Responsive Transcriptome and Its Regulation by ICE1. *THE PLANT CELL ONLINE* [online]. **17**(11), 3155-3175 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1105/tpc.105.035568. ISSN 1040-4651.

LIN, Lin, 2013. Evidence of health benefits of canola oil. *Nutrition Reviews* [online]. **71**(6), 370-385 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1111/nure.12033. ISSN 00296643.

LIVAK, Kenneth a Thomas SCHMITTGEN, 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* [online]. **25**(4), 402-408 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1006/meth.2001.1262. ISSN 10462023.

MAG, T., 1983. Canola oil processing in Canada. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. **60**(2), 380-384 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1007/BF02543522. ISSN 0003021X.

MAHEASWARI, Rajendran, JaishreeTukaram KSHIRSAGAR a Nallasivam LAVANYA, 2016. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology* [online]. 128-135 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.4103/0972-124X.176391. ISSN 0972-124X.

- MATLOCK, Brian, 2015. Assessment of Nucleic Acid Purity: Technical Note 52646. *Thermo Fisher Scientific* [online]. Wilmington, MA, USA: Thermo Fisher Scientific [cit. 2018-04-07].
- MCKERSIE, Bryan a Stephen BOWLEY, 1997. Active Oxygen and Freezing Tolerance in Transgenic Plants. LI, Paul H., ed. a Tony H. H. CHEN, ed., Paul LI, Tony CHEN. *Plant Cold Hardiness* [online]. Boston, MA: Springer US, s. 203-214 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1007/978-1-4899-0277-1_18. ISBN 978-1-4899-0279-5.
- MEINKE, D., 1998. Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* [online]. **282**(5389), 662-682 [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.1126/science.282.5389.662.
- MULLIS, Kary, 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* [online]. **262**(4), 56-65 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1038/scientificamerican0490-56. ISSN 0036-8733.
- NIESTERS, Hubert, 2001. Quantitation of Viral Load Using Real-Time Amplification Techniques. *Methods* [online]. **25**(4), 419-429 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1006/meth.2001.1264. ISSN 10462023.
- OLIEN, C. a M. SMITH, 1977. Ice Adhesions in Relation to Freeze Stress. *Plant Physiology* [online]. **60**(4), 499-503 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1104/pp.60.4.499. ISSN 0032-0889.
- ORVAR, Bjorn, Veena SANGWAN, Franz OMANN a Rajinder DHINDSA, 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal* [online]. **23**(6), 785-794 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00845.x. ISSN 0960-7412.
- PALMER, S., A. WIEGAND, F. MALDARELLI et al., 2003. New Real-Time Reverse Transcriptase-Initiated PCR Assay with Single-Copy Sensitivity for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **41**(10), 4531-4536 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1128/JCM.41.10.4531-4536.2003. ISSN 0095-1137.
- PRAKASH, Shyam., 1980. *Taxonomy, cytogenetics, and origin of crop Brassicas: a review*. Stockholm, Sweden: [Distributor] Swedish Natural Science Research Council. Opera botanica, v. 55. ISBN 9154602831.
- RIHAN, Hail, Mohammed AL-ISSAWI a Michael FULLER, 2017. Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance. *Journal of Plant Interactions* [online]. **12**(1), 143-157 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1080/17429145.2017.1308568. ISSN 1742-9145.
- RORAT, Tadeusz, 2006. Plant dehydrins — Tissue location, structure and function. *Cellular and Molecular Biology Letters* [online]. **11**(4), - [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.2478/s11658-006-0044-0. ISSN 1689-1392.
- ROSPAL, Stanislav, 2002. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*. 3., inovované vyd. Brno: Stanislav Rosypal. ISBN 80-902562-4-4.
- SHAHIDI, Fereidoon, 1990. Rapeseed and Canola: Global Production and Distribution. SHAHIDI, Fereidoon, ed., Fereidoon SHAHIDI. *Canola and Rapeseed* [online]. Boston, MA: Springer US, s. 3-13 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1007/978-1-4615-3912-4_1. ISBN 978-1-4613-6744-4.
- SCHMIDT, Renate. a Ian. BANCROFT, 2011. *Genetics and genomics of the Brassicaceae*. New York: Springer. Plant genetics and genomics: Crops and models, v. 9. ISBN 1441971173.

- SCHMITTGEN, Thomas a Kenneth LIVAK, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* [online]. **3**(6), 1101-1108 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1038/nprot.2008.73. ISSN 1754-2189.
- SNUSTAD, D. a Michael SIMMONS, 2009. *Genetika*. 1. vyd. Přeložil Jiřina RELICHOVÁ. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2.
- SONG, Keming a Thomas OSBORN, 1992. Polyphyletic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses. *Genome* [online]. **35**(6), 992-1001 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1139/g92-152. ISSN 0831-2796.
- STAHLBERG, A., 2004. Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clinical Chemistry* [online]. **50**(3), 509-515 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1373/clinchem.2003.026161. ISSN 0009-9147.
- STEPONKUS, P, 1984. Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation. *Annual Review of Plant Physiology* [online]. **35**(1), 543-584 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1146/annurev.pp.35.060184.002551. ISSN 0066-4294.
- SUZUKI, K., K. NAGASUGA a M. OKADA, 2008. The Chilling Injury Induced by High Root Temperature in the Leaves of Rice Seedlings. *Plant and Cell Physiology* [online]. **49**(3), 433-442 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1093/pcp/pcn020. ISSN 0032-0781.
- THOMASHOW, Michael, 1999. PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* [online]. **50**(1), 571-599 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1146/annurev.arplant.50.1.571. ISSN 1040-2519.
- VALASEK, Mark a Joyce REPA, 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* [online]. **29**(3), 151-159 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1152/advan.00019.2005. ISSN 1043-4046.
- VERSLUES, P.E. a J.-K. ZHU, 2005. Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochemical Society Transactions* [online]. **33**(2), 375-379 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1042/BST0330375. ISSN 0300-5127.
- VIJAYAN, Vikram, Rick ZUZOW a Erin K. O'SHEA, 2009. Oscillations in supercoiling drive circadian gene expression in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **106**(52), 22564-22568 [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1073/pnas.0912673106. ISSN 0027-8424.
- WONG, Marisa a Juan MEDRANO, 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* [online]. **39**(1), 75-85 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.2144/05391RV01. ISSN 0736-6205.
- ZHU, Jian-Kang, 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* [online]. **53**(1), 247-273 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329. ISSN 1543-5008.
- ZIPPER, H., 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* [online]. **32**(12), 103 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1093/nar/gnh101. ISSN 1362-4962.

8 Přílohy

RNA extraction

Sample preparation

- Homogenize tissue samples in preheated 60 °C TRI Reagent (1 ml per 50-100 mg of tissue) in appropriate homogenizer
- Allow samples to stand for 5 minutes at room temperature

Phase separation

- Centrifuge at 3 000 rpm at 4 °C for 20 minutes. Transfer supernatant to a new tube

Chloroform

- Add 0.2 ml of chloroform per ml of TRI Reagent used and vortex for 15 seconds and allow to stand for 2-15 minutes at room temperature. Centrifuge the resulting mixture at 12 000 x g at 4 °C for 15 °C
- Repeat once.

Precipitation

- Transfer the aqueous phase to a fresh tube and add 0.5 volumes of 2-propanol and 0.5 volume of 1.2 M NaCl. Mix and leave at room temperature for 5-10 min. Centrifuge at 12 000 x g for 10 minutes at 4 °C.

Wash

- Remove the supernatant and wash the RNA pellet by adding a minimum of 1 ml of 75 % ethanol per 1 ml of TRI Reagent. Vortex the samples and then centrifuge at 7 500 x g at 4 °C for 5 minutes.
- Briefly dry the RNA pellet for 5-10 minutes by air drying. Do not let the RNA pellet dry completely, as this will greatly decrease its solubility.
- Repeat once.

Resuspension

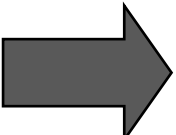
- Add an appropriate volume of DEPC-MQ water (20 µl) to the RNA pellet and add RNase inhibitor (1 µl). To facilitate dissolution, mix by repeated pipetting with a micropipette and incubate at 37 °C for 10-15 minutes.

Přečištění RNA

- 1/10 objemu 10x DNase I buffer + 1 μ l rDNase do mikrokumavky s vyizolovanou RNA
- 20 minut / 37 °C
- 1/10 objemu DNase inactivation reagent
- 2 minuty při pokojové teplotě
- Centrifugace 10 000 rpm / 1,5 minuty
- Supernatant = čistá RNA

Reverzní transkripce

Navázání oligo(dt)15 primeru

- | | | | |
|----------------------------------|-----------|--|--------------------------|
| - Nuclease free H ₂ O | 1 μ l |  | objem reakce = 5 μ l |
| - Oligo(dt)15 primer | 1 μ l | | |
| - Přečištěná RNA | 3 μ l | | |

ZAHŘÁT 5 MINUT / 70 °C

Elongace

- | | |
|----------------------------------|-------------|
| - Nuclease free H ₂ O | 6,6 μ l |
| - dNTP | 1 μ l |
| - 5x RxN Buffer | 4 μ l |
| - MgCl ₂ | 2,4 μ l |
| - RT enzym | 1 μ l |
| - Vzorek RNA | 5 μ l |

ZAHŘÁT 5 MINUT / 25 °C



ZAHŘÁT 1 HODINU / 42 °C

Vše provádět na ledu, enzym přidat nakonec (degraduje na teple).

Příloha 2: Protokol pro přečištění vyizolované RNA a její přepis do cDNA.

<u>BnACT</u>										
5'	CAA	CGG	AAT	CTC	TCA	GCT	CC	3'	F	
5'	TGG	CAT	CAC	ACT	TTC	TAC	AA	3'	R	
<u>BnERD10</u>										
5'	CAG	GTC	ACA	GCG	AGA	AAC	CA	3'	F	
5'	CGC	CGT	TTT	CTC	CGT	CAC	T	3'	R	
<u>BnICE1</u>										
5'	ATC	AGC	AAC	TAT	GGA	GGC	GT	3'	F	
5'	GTT	TCC	GTC	GAG	AAC	CAT	CG	3'	R	

Příloha 3: Sekvence použitých primerů.

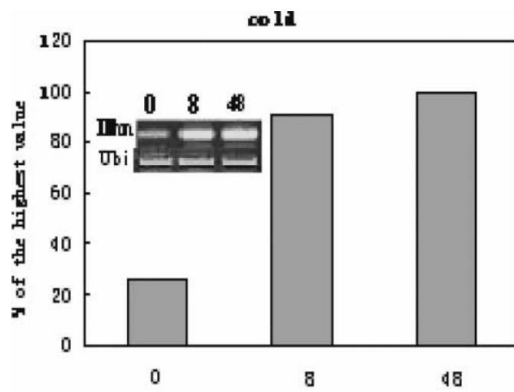
<u>Real Time qPCR reakční směs</u>		
-	cDNA	3 µl
-	Master mix	12,5 µl
-	H ₂ O	4,5 µl
-	Primer F	1 µl
-	Primer R	1 µl

Příloha 4: qPCR reakční směs.

Příloha 5, tabulka 3: Koncentrace a čistota vyizolované RNA

Extrakce totalRNA ze vzorků – proměření na přístroji NanoDrop		Poměr absorpance [nm/nm]	
Vzorek	Koncentrace nukleové kyseliny [ng / μ L]	OD 260/280	OD 260/230
Cadeli – Kontrolní rostliny			
1	76,21	1,91	2,08
1	1402,36	2,06	2,29
10	26,44	1,21	0,15
10	100,62	2,11	0,63
13	315,29	2,05	1,52
13	415,19	1,81	0,79
13	86,84	2,1	0,85
13	152,64	1,77	0,15
Cadeli – Stresované rostliny			
16	28,56	1,42	0,55
1	91,02	1,95	0,2
1	74,88	1,91	0,34
2	265,91	1,94	1,14
2	282,82	2,09	1,07
3	97,3	2,07	0,84
3	873,17	2,04	2,24
4	235,01	2,04	1,85
4	506,01	2,12	2,35
5	190,32	2,02	1,38
5	262,25	2,04	0,82
6	1432,25	1,81	2,01
6	184,42	1,81	0,17
7	232,05	2,03	0,91
7	287,13	2,08	1,78
8	356,82	2,13	0,8
8	285,66	2,2	1,96
9	520,09	1,82	1,09
9	257,17	2,17	2,38
10	286,03	2,14	1,22
10	406,49	2,1	2,05
11	228,98	2,07	1,1
11	310,5	2,11	2,29
12	392,59	2,18	2,15
12	725,76	2,03	2,45
13	422,35	2,06	1,57
13	113,22	2,04	2,01
13	256,73	2,14	1,26
13	209,03	2,08	0,33
14	250,58	2,1	2,12

Navajo – Kontrolní rostliny			
1	112,95	1,89	0,21
1	889,76	2,09	1,19
10	356,28	1,73	0,17
10	80,8	2,19	1,48
13	89,79	1,75	0,24
13	49,16	2,07	0,38
13	242,65	2,13	1,89
13	297,5	2,05	1,53
16	81,36	1,86	0,45
Navajo – Stresované rostliny			
1	150,69	1,43	0,43
1	228,78	2,11	0,67
2	111,53	1,77	0,95
2	1048,97	2,1	2,22
3	453,38	2,13	2,31
3	239,16	2,06	1,96
4	176,28	2,17	1,34
4	871,62	2,13	2,03
5	212,6	1,97	0,55
5	151,5	2,14	2,25
6	386,81	2,1	2,34
6	24,68	2,25	2,02
7	175,24	1,9	0,79
7	84,83	1,98	0,79
8	381,3	2,18	2,38
8	279,72	2,13	2,32
9	160	2,12	2,18
9	45,31	2,04	0,03
10	401,72	2,09	2
10	167,99	2,15	2,17
11	442,12	2,16	1,75
11	330,29	2,16	2,12
12	324,18	2,1	1,61
12	291,61	2,17	1,13
13	444,12	2,13	1,75
13	442,97	2,06	1,74
13	470,71	2,16	2,46
13	265,5	2,18	2,04
14	9,84	3,92	1,75



Příloha 6: Expresse genu *ERD10* u řepky olejky po vystavení stresu chladem.

Zobrazeno jako % z nejvyšší naměřené Měřeno v 0., 8. a 24. hodině(Deng, 2009).

Využití metody rezonance povrchového plazmonu k selekci chladu odolných genotypů řepky ozimé (*Brassica napus* subsp. *napus*)

Use of surface plasmon resonance method for cold stress tolerant genotype esselection

Jelínková I.¹, Vráblová M.², Harenčák J.¹, Štoidl P.¹, Čurn V.¹

¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, ZF

²Vysoká škola Báňská – Technická univerzita Ostrava

Abstrakt

Rezonance povrchového plazmonu (SPR) je moderní optická metoda, která umožňuje studovat velmi nízké koncentrace nativních proteinů i v přítomnosti jiných látek, umožňuje kvantifikaci konkrétních proteinů vazbou na specifické protilátky a u řepky či jiných významných plodin nebyla doposud použita. V této studii byla metoda SPR použita ke sledování odlišné reakce dvou kontrastních odrůd řepky olejky na stres chladem a dosažené výsledky ukazují na vhodnost použití této metody.

Klíčová slova: *Brassica napus*, dehydriny, odolnost k chladu, řepka olejka

Abstract

Surface plasmon resonance method (SPR) is a novel optical method for study very low native protein concentration even in the presence of other substances. It allows specific protein quantification by specific antibody binding. This method has not been used in oilseed rape or other major crop before. In this study, we used SPR for different cold stress reaction of two contrast genotypes of oilseed rape.

Key words: *Brassica napus*, dehydrins, cold stress tolerance

Úvod

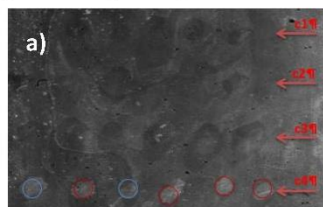
Stres chladem zásadně ovlivňuje růst a vývoj rostlin a tím snižuje životaschopnost a reprodukceschopnost rostlin (Chinnusamy et al., 2007). V důsledku globálních klimatických změn je umocňováno působení abiotického stresu na zemědělské plodiny, proto se šlechtění na odolnost k těmto nepříznivým faktorům prostředí stává aktuálním i v našich zeměpisných šířkách. Pro úspěšné šlechtění nových, odolných odrůd je důležitá zejména znalost obranných mechanismů. Jedním z těchto obranných mechanismů je aklimatizace. Jedná se o proces, při kterém rostlina nabývá odolnosti k mrazu vlivem působení nízkých teplot po dobu několika dní či týdnů (Örvar et al., 2000). V průběhu aklimatizace dochází k řadě fyziologických a biochemických změn, které jsou spojeny s akumulací stresových proteinů indukovaných chladem, např. dehydrinů (Ingram and Bartels, 1996). Pro řepku olejku byly dehydriny představeny jako vhodné indikátory úrovně stresu chladem (Klíma et al., 2012; Urban et al., 2013). Účast dehydrinových proteinů v reakci na stres chladem byla ověřena v experimentu u desítek odrůd řepky olejky (Urban et al., 2013). Autoři prokázali zvýšenou intenzitu akumulace dehydrinů o velikosti 50 kDa v listech jednotlivých odrůd řepky po několikátýdenním exponování chladu a suchu. Zvýšená exprese dehydrinů na úrovni genu byla také prokázána (Xu et al., 2007; Jelínková et al., 2016), a to již několik hodin po začátku stresu rostliny (Xu et al., 2007). Analýza exprese většího spektra genů u genotypů potenciálně využitelných ve šlechtění je však velmi technicky a časově náročná a navíc tyto analýzy nejsou přesné, neboť expresní profil na úrovni genů může být značně odlišný od expresního profilu na úrovni proteinů, resp. od fenotypového projevu. Metodu rezonance povrchového plazmonu jsme tedy zvolili pro její relativní časovou, finanční a technickou nenáročnost jako metodu potenciálně využitelnou pro sledování dynamiky reakce jednotlivých genotypů na stres chladem.

Materiál a metody

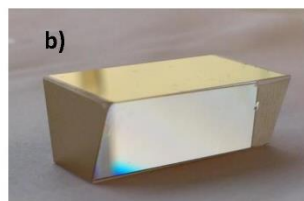
V experimentu byly použity dvě odrůdy řepky olejky Navajo (odolná) a Cadeli (náchýlná k chladu), které byly na základě předchozích experimentů identifikovány jako kontrastní v reakci na stres chladem. Sadbovače s rostlinami byly umístěny do dvou fytotronů (14/10 hod. fotoperioda, 21°C ve dne, 19°C v noci, vlhkost 85 %) a rostliny byly pěstovány po dobu 5 týdnů (3 – 4 pravé listy). Ve fytotronu určeném k simulaci stresu chladem byla po této době přenastavena teplota na 2°C a po dosažení této teploty byly započaty odběry vzorků v pravidelných časových intervalech. Vzorky kontrolních rostlin (teplota stejná po celou dobu experimentu) byly odebírány v časových intervalech odpovídajících DD (degree*days) stresovaných rostlin.

Na základě předchozích experimentů a provedené literární rešerše byl jako vhodný kandidát pro studium mechanismu reakce na stres chladem zvolen gen *ERD10* (NM_001315610.1). Na základě jeho sekvence mRNA v databázi NCBI byla objednána protilátka od firmy Agrisera (Švédsko).

Z každé varianty a odrůdy byly vždy odebírány plně vyvinuté listy 4 rostlin a následně byla extrahována směs dehydrinů (Ashraf, Mehmood, 1990). Pro vlastní měření akumulace proteinu ERD10 byl použit komerčně dodávaný biočip CS-LD (Horiba, Francie) s ukotvenou protilátkou (Obr. 1a).



Obr. 1: a)
Ukázka povrchu biočipu po ukotvení protilátky nebo negativní kontroly.

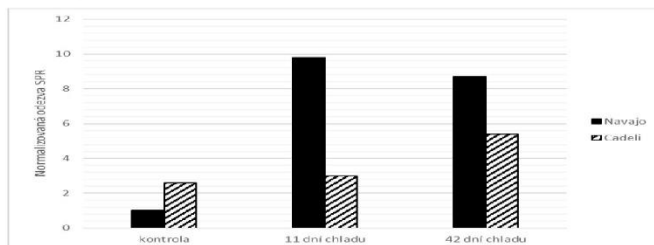


Jednotlivé protilátky (červené body) a pre-séra (modré body) jsou na čip umístěny v řadách. Měření pak probíhá na vybraných bodech. **b)** CS-LD biočip od výrobce Horiba (Francie).

Výsledky a diskuze

Byly připraveny extrakty dehydrinů z listů rostlin dvou odrůd řepky vystavených stresu chladem. Odezva biočipu byla sledována vždy současně na bodech obsahujících protilátku a na negativní kontrole, neboť k odezvě dochází i díky změně indexu lomu prostředí, případně interferencemi látek obsažených ve vzorku. Výsledky pro obě odrůdy řepky ukazují rostoucí SPR signál u stresovaných rostlin (graf 1). U odrůdy Cadeli je tento nárůst signálu znamenající zvýšenou akumulaci dehydrinu ERD10 pozorovatelný až po 42 dnech stresu. Po 11 dnech stresu chladem je akumulace tohoto dehydrinu u stresované rostliny srovnatelná s jeho akumulací u rostliny kontrolní. Naproti tomu u odrůdy Navajo, která byla v předchozích experimentech vytíkována jako odrůda odolná k chladu, je výrazný (téměř desetinasobný) nárůst akumulace dehydrinu ERD10 v porovnání s kontrolními rostlinami pozorovatelný již po 11 dnech stresu chladem. Klíma et al. (2012) uvádí, že schopnost jednotlivých genotypů řepky odolávat mrazu se dá odhadnout na základě úrovně akumulace dehydrinů u chladem stresovaných jedinců. V případě, že hledáme genotypy, které by měly vynikat svou schopností přezimovat v měnících se klimatických podmínkách ČR, musíme sledovat také dynamiku aklimatizace, zejména schopnost aklimatizovat se i během krátkého, teplého podzimu. K těmto studiím by tedy mohla velmi dobře posloužit právě metoda SPR.

Graf 1: Normalizované odezvy SPR měření pro odrůdy Navajo a Cadeli vystavené působení stresu po různou dobu



Závěr

Pro sestavení ideální metodiky pro selekci genotypů podle schopnosti aklimatizace a následného přezimování na základě metody SPR jsou na našich pracovištích prováděny další experimenty s větším počtem odolných i neodolných odrůd. Tato metoda by na základě našich výsledků mohla vhodně doplnit metody selekce genotypů v praktickém šlechtění řepky v době, kdy se díky klimatickým změnám stává problém nedostatečného otužení rostlin před zimou a následné vymrzání porostů aktuálním.

Použitá literatura

- Jelínková I., Channa Keshavaiah, Čurn V., Urban M. O., Klíma M., 2016: Analýza exprese genů indukovaných stresem chladem u řepky. *Úroda* 12, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 149-152.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, J.-K., 2007: Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12, 444-451.
- Örvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F., and Dhindsa, R.S., 2000: Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23, 785-794.
- Ingram, J., and Bartels, D., 1996: The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 377-403.
- Klíma, M., Vitámvás, 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. Plant.* 56, 157-161.
- Urban, M.O., Klíma, M., Vitámvás, P., Vasek, J., Hilgert-Delgado, A.A., Kucera, 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, 1600-1608.
- Xu, J., Zhang, Y., Guan, Z., Wei, W., Han, L., Chai, T., 2007: Expression and function of two dehydrins under environmental stresses in *Brassica juncea* L. *Mol. Breed.* 21, 431-438.
- Ashraf, M., and Mehmood, S., 1990: Response of four *Brassica* species to drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 30, 93-100.

Poděkování

Tato studie byla vytvořena díky podpoře grantů GAJU 120/2016/Z a NAZV QJ1510172.

Kontaktní adresa:

Ing. Irena Jelínková
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta
Na Sádkách 1780, 37005 České Budějovice, e-mail: jelini00@zf.jcu.cz