

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

**Exprese dehydrinových genů v kontrolovaných
podmínkách**

Bakalářská práce

Autor: Tereza Šandová

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

2020

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Tereza Šandová

Lesnictví
Lesnictví

Název práce

Expresce dehydrinových genů v kontrolovaných podmínkách

Název anglicky

Expression of dehydrin genes under controlled conditions

Cíle práce

V rámci práce "Expresce dehydrinových genů v kontrolovaných podmínkách" se bude autorka zabývat reakcí rostlin na sucho pomocí stanovení exprese dehydrinových genů. Dehydriny jsou skupinu proteinů přítomných v rostlinách, které jsou produkovány v reakci na mraz a sucho. Analýza exprese dehydrinových genů je v současnosti předmětem řady studií zabývajících se vlivem sucha na lesní dřeviny. Cílem práce je zmapovat využití analýzy exprese dehydrinů u lesních dřevin jako markerů přítomnosti stresu a zároveň ohodnotit roli dehydrinů při odolávání hydrickému stresu.

Metodika

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

V rámci praktické části autorka zoptimalizuje laboratorní protokol extrakce a uchování RNA z pletiv topolu osiky. Zároveň provede kvantifikaci exprese dehydrinových genů metodou qPCR. Rostlinným materiálem zde budou mladé rostliny topolu osiky (*Populus tremula*) vystavené různým hydrickým režimům.

Doporučený rozsah práce

40 stran

Klíčová slova

topol osika, genová exprese, dehydriny, odolnost vůči suchu, RNA, qPCR

Doporučené zdroje informací

Hanin, Moez, et al. "Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms."

Plant signaling & behavior 6.10 (2011): 1503-1509.

Kjellsen, Trygve Devold, et al. "Dehydrin accumulation and extreme low-temperature tolerance in

Siberian spruce (*Picea obovata*)." Tree physiology 33.12 (2013): 1354-1366.

Kosová, K., P. Vítámvás, and I. T. Prášil. "The role of dehydrins in plant response to cold." *Biologia*

plantarum 51.4 (2007): 601-617.

Stival Sena, Juliana, et al. "Expansion of the dehydrin gene family in the Pinaceae is associated with considerable structural diversity and drought-responsive expression." *Tree physiology* 38.3 (2017): 442-456.

Yakovlev, Igor A., et al. "Analysis of gene expression during bud burst initiation in Norway spruce via ESTs from subtracted cDNA libraries." *Tree Genetics & Genomes* 2.1 (2006): 39-52.

Yakovlev, Igor A., et al. "Dehydrins expression related to timing of bud burst in Norway spruce." *Planta* 228.3 (2008): 459-472.

Předběžný termín obhajoby

2019/20 LS – FLD

Vedoucí práce

RNDr. Jaroslav Čepl, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Konzultant

Jiří Korecký

Elektronicky schváleno dne 30. 1. 2020

prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 22. 2. 2020

prof. Ing. Róbert Marušák, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 09. 06. 2020

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Exprese dehydrinových genů v kontrolovaných podmínkách vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jaroslava Čepla, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

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

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

Podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

V této části bych chtěla poděkovat vedoucímu bakalářské práce RNDr. Jaroslavu Čeplovi, Ph.D. za odborné vedení práce, trpělivost, ochotný a vstřícný přístup, a za cenné rady, které mi poskytnul při zpracování této práce.

ABSTRAKT

V bakalářské práci je vypracována literární rešerše zaměřená na genovou expresi, metody analýzy genové exprese a specifické produkty genové exprese-dehydriny. Jedná se o proteiny produkované rostlinami v reakci na abiotický stres způsobený nedostatkem vody. Součástí rešerše je dendrologická a ekologická charakteristika zájmového druhu *Populus tremula*. Experimentální část bakalářské práce se zabývá genovou expresí dehydrinových genů u topolu osiky v závislosti na hydrickém stresu. Tři sazenice byly vystaveny postupnému vysychání. Během experimentu byly provedeny čtyři sběry listů, které poskytly rostlinný materiál pro analýzu genové exprese. Je zde popsána metodika použita v rámci experimentu, konkrétně izolace RNA, ověření kvality a kvantity RNA, reverzní transkripce do cDNA a optimalizovaná metoda RT-qPCR (s využitím vybraných dehydrinových primerů). Výsledky odhalily intenzivnější expresi genu DHN s rostoucím hydrickým stresem.

klíčová slova: genová exprese, dehydriny, *Populus tremula*, qPCR

ABSTRACT

This bachelor thesis contains a literature review focused on gene expression, methods of gene expression analysis and specific gene expression products – dehydrins. These are plant genes produced in response to abiotic stress caused by water deficiency. In addition, dendrological and ecological characteristics of the species of interest *Populus tremula* are included in the review part of the thesis. Experimental part of this bachelor thesis deals with gene expression of dehydrin genes in European aspen depending on hydric stress. Three plants were subjected to gradual desiccation. Leaves were collected in four stages during the experiment providing plant material for gene expression analysis. Methodology used in the experiment is described, namely RNA isolation, RNA quality and quantity verification, its reverse transcription into cDNA and optimized RT-qPCR method (using selected dehydrin primers). The results revealed more intensive expression of DHN gene with increased hydric stress.

keywords: gene expression, dehydrins, *Populus tremula*, qPCR

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	CÍLE PRÁCE	12
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE	13
3.1	Genová exprese	13
3.1.1	Transkripce	13
3.1.2	Translace	14
3.2	Dehydriny	14
3.2.1	Struktura	15
3.2.2	Funkce	16
3.2.3	Genová exprese dehydrinů	17
3.2.4	Genová exprese dehydrinů při působení chladu	17
3.2.5	Genová exprese při osmotickém stresu	19
3.2.6	Genová exprese při působení sucha	20
3.3	Metody analýzy genové exprese	21
3.3.1	Metoda PCR	21
3.3.2	Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR)	23
3.3.3	Southernův přenos (Southern blot)	25
3.3.4	Northernův přenos (Northern blot)	26
3.3.5	Čipová analýza (DNA microarray)	27
3.3.6	Sekvenování DNA	27
3.4	Rod Topol (<i>Populus</i>)	32
3.4.1	Topol osika (<i>Populus tremula</i>) – klasifikace	32
3.4.2	Rozšíření	33
3.4.3	Morfologie	34
3.4.4	Ekologie	35
4	METODIKA	37

4.1	Izolace RNA.....	37
4.1.1	Lýze buněk a tkání	37
4.1.2	Izolace RNA pomocí kitu.....	37
4.2	Měření koncentrace RNA	38
4.3	Reverzní transkripce	39
4.4	RT-qPCR.....	39
5	VÝSLEDKY	42
6	DISKUZE	44
7	ZÁVĚR	45
8	ZDROJE.....	46

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázky

Obr. č. 1: Centrální dogma molekulární biologie

Obr. č. 2: Rozšíření topolu osiky v Evropě

Obr. č. 3: Záznam parametrů vzorku testovaného v laboratoři

Obr. č. 4: 96 - jamková destička s pipetovacím schématem

Obr. č. 5: Optimalizovaný teplotní režim RT-qPCR

Obr. č. 6: Normalizovaná relativní exprese genu DHN

Obr. č. 7: Amplifikační křivky

Tabulky

Tab. č. 1: Klasifikace topolu osiky

Tab. č. 2: Komponenty pro přípravu 2X RT master mix

Tab. č. 3: Výsledné hodnoty Ct a dCt jednotlivých vzorků

1 ÚVOD

V současné době je sucho jedním z nejvíce kritických abiotických stresových faktorů, který má výrazný negativní dopad na růst a produktivitu rostlin. Epizody sucha způsobené kombinací vysokých teplot a omezeného přísunu srážek momentálně postihují lesy téměř po celém světě a působí značné škody. Do budoucna se navíc předpokládá růst frekvence výskytu sucha i doby trvání období sucha. V současné době jsou z důvodu klimatických změn po celém světě prováděny výzkumy za účelem nalezení ochranných mechanismů rostlin vůči stresu suchem. (Velasco-Conde et al., 2012; Eldhuset et al., 2013).

Dehydriny jsou skupina proteinů, jejichž množství v rostlinách roste v závislosti na přítomnosti abiotického stresového faktoru (Galau et al., 1986). Jedná se především o sucho, nízké teploty, mráz a vysokou salinitu prostředí. Tyto faktory znemožňují rostlinám přijímat dostatečné množství vody a způsobují jejich dehydraci, proto dochází v rostlinách k akumulaci dehydrinů, které hrají důležitou roli v zamezení ztráty vody a zachování funkčnosti membrán (Campbell et Close, 1997; Mahajan et Tuteja, 2005; Velasco-Conde et al., 2012; Kjellsen et al., 2013).

Topol osika (*Populus tremula*) svým rozsáhlým areálem pokrývá téměř celou Evropu a dále severní a jihovýchodní Asii, což je umožněno jeho nízkými klimatickými nároky. V České republice je rozšířen po celém území (Musil et Möllerová, 2005). Nejčastěji se vyskytuje ve světlých lesích z důvodu vysokých nároků na světlo. Při zalesňování holin je často využíván jako přípravná dřevina, další využití zahrnuje zalesňování imisních oblastí díky jeho odolnosti vůči imisím. Neméně důležitý je hospodářský význam osiky, dřevo nalézá uplatnění mimo jiné ve stavebnictví, truhlářství a papírenském průmyslu (Buriánek et Novotný, 2016).

2 CÍLE PRÁCE

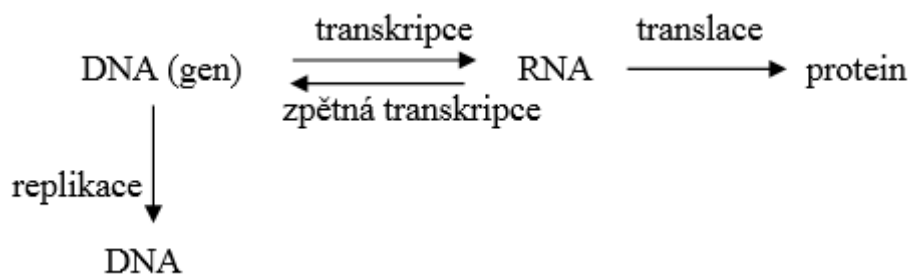
Cílem bakalářské práce je vytvoření literární rešerše zabývající se metodami analýzy genové exprese, specifickými produkty genové exprese souvisejícími s odolností rostlin vůči abiotickým stresovým faktorům (dehydriny), dále charakteristikou topolu osiky, včetně jeho rozšíření a ekologických nároků. V rámci praktické části je cílem určit reakci sazenic na sucho stanovením exprese dehydrinových genů optimalizovanou metodikou analýzy genové exprese pomocí RT-qPCR.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Genová exprese

Pojem genová exprese označuje proces, při kterém dochází k přeměně genetické informace uložené v struktuře DNA do struktury proteinu. Tato informace je obsažena v genu, což jsou určité úseky DNA na chromozomu. Pořadí nukleotidů v genu tedy udává primární strukturu polypeptidů (Kočárek, 2008).

Poprvé popsal proces proteosyntézy Francis Crick v roce 1958. Tok genetické informace označil jako centrální dogma molekulární biologie. Tímto centrálním dogmatem popisuje přenos informace z DNA do RNA a odtud do molekuly proteinu, avšak nelze zpětně přenášet informaci z proteinu do nukleové kyseliny (Kočárek, 2008).



Obr. č. 1: Centrální dogma molekulární biologie

Genová exprese sestává ze dvou fází. První fáze se označuje jako transkripce, druhá fáze je translace.

3.1.1 Transkripce

Transkripce (neboli přepis) označuje proces přenosu genetické informace z molekuly DNA do molekuly RNA. Odehrává se v jádře buňky. Templátem pro vlákno RNA je jeden z řetězců DNA, na který nasedá enzym RNA-polymeráza a tím katalyzuje syntézu. Řetězec RNA se tvoří na základě pořadí nukleotidů v genu, přičemž ribonukleotidy jsou přiřazovány k jednotlivým deoxyribonukleotidům dle principu komplementarity bazí (adenin se váže s uracilem, guanin s cytosinem). Vzniká mediátorová RNA, mRNA, která přenáší genetickou informaci. Transkripce se skládá se 3 fází: 1) iniciace - vazba RNA polymerázy na oblast promotoru DNA, rozvolnění obou vláken DNA, počátek tvorby RNA, 2) elongace - prodlužování řetězce RNA, 3) terminace - ukončení transkripce. Následně se

molekuly RNA přesunou do cytoplazmy, kde probíhá translace (Simmons et Snustad, 2017).

Ve většině eukaryotických genů se vyskytují úseky zvané introny. Tyto nekódující sekvence nukleotidů jsou odstraněny ještě před přesunem RNA do cytoplazmy procesem zvaným sestřih. Zbylé kódující úseky genu zvané exony se následně spojí do finálního řetězce a účastní se procesu translace (Simmons et Snustad, 2017).

3.1.2 Translace

Translace (neboli překlad) je proces, při kterém se genetická informace z molekuly mRNA přenáší do primární struktury proteinu. Odehrává se v cytoplazmě na ribozomech. Translace se účastní více typů RNA. Molekula mRNA slouží jako matrice pro tvorbu výsledného proteinu. Ribozomová RNA (rRNA) tvoří ribozomy. Prostřednictvím transferové RNA (tRNA) dochází k transportu aminokyselin do ribozomu.

Průběh translace lze rozdělit do tří fází: 1) iniciace - navázání mRNA na ribozom, nasednutí tRNA na startkodon AUG na mRNA, 2) elongace - pohyb ribozomu podél mRNA, syntéza polypeptidu pomocí tRNA. Pořadí aminokyselin je určeno pořadím nukleotidů v mRNA. Každá trojice nukleotidů mRNA zvaná kodon je komplementární k trojici nukleotidů v tRNA zvané antikodon. Podle pravidel genetického kódu se přiřazují aminokyseliny k určitému kodonu mRNA. 3) terminace - ukončení translace, jakmile ribozom narazí na stop kodon (UAA, UAG nebo UGA), dojde k uvolnění mRNA a odpojení polypeptidového řetězce (Simmons et Snustad, 2017).

3.2 Dehydriny

Dehydriny jsou proteiny obsažené v rostlinách, které zajišťují jejich přežití za nepříznivých podmínek, konkrétně při dehydračním stresu. Sucho, mráz nebo vysoká salinita půdy způsobují nedostatek vody v buňkách. V rostlině proto dojde v reakci na tyto abiotické stresy k indukci genové exprese specifických genů pro tvorbu dehydrinů, které zabraňují ztrátě vody a zachovávají funkčnost membrán.

První zmínka o dehydrinech pochází ze studie provedené v druhé polovině 20. století (Galau et al., 1986), ve které se v semenech bavlníku zjistila přítomnost proteinů syntetizovaných v reakci na působící dehydrizační stres. Tyto proteiny získaly označení LEA proteiny (late embryogenesis abundant - proteiny pozdní fáze embryogeneze) (Galau et al., 1986). Další studie se prováděly hlavně za účelem pochopení mechanismů zemědělských plodin, díky kterým jsou schopny přežít vodní deficit. Proteiny LEA jsou rozděleny do 7 podskupin, dehydriny patří do podskupiny LEA II neboli D-11 (Campbell et Close, 1997) neboli RAB (responsive to abscisic acid) (Hara, 2010).

3.2.1 Struktura

Dehydriny jsou hydrofilní proteiny s poměrně jednoduchou aminokyselinovou skladbou. Je pro ně typický výskyt S-, Y- nebo K-segmentu v primární struktuře. Y-segment (V/TDEYGNP) se nalézá v blízkosti oblasti N-konce. S-segment je bohatý na serin, obsahuje pět až osm těchto zbytků. K-segment se nachází ve všech dehydrinech, obecně v blízkosti oblasti C-konce. Tento segment je bohatý na lysin a skládá se z 15 aminokyselin (EKKGIMDKIKEKLPG) (Close, 1996). K-segment dokáže zaujmout sekundární strukturu amfipatického helixu při vazbě na membrány (tzn. část K-segmentu je hydrofobní a část je hydrofilní) (Koag et al., 2003). Dále jsou často součástí dehydrinů oblasti s vysokým podílem polárních aminokyselin, tzv. ϕ -segmenty, které jsou již méně konzervované, než předchozí sekvence (Close, 1996). Na základě počtu jednotlivých segmentů a jejich pořadí ve struktuře dehydrinu se dehydriny rozdělují do 5 tříd: Y_nSK_n , SK_n , Kn , Y_nK_n , K_nS (Campbell et Close, 1997). Vysoké množství glycinu, nabitých a polárních reziduí způsobuje neuspořádanou sekundární strukturu dehydrinů, která je ovšem dostatečně stabilní (pouze vysoké koncentrace silných činidel (např. trifluorethanol a SDS) dokážou způsobit tvorbu sekundární struktury helix). Díky neuspořádané struktuře se lépe váží na povrch makromolekul (Hara, 2010).

3.2.2 Funkce

Dehydriny zastávají v rostlinách několik různých funkcí. I přes uskutečnění mnoha studií se nepodařilo všechny funkce dehydrinů objasnit. Navíc ne všechny dehydriny zastávají všechny funkce. Studie provedené doposud potvrzují jejich multifunkčnost (Hara, 2010).

Hrají důležitou roli při ochraně rostlin proti vysušení, jsou produkovány v reakci na sucho, nízké teploty, vysokou salinitu půdy i při aplikaci fytohormonu ABA (kyselina abscisová) (Close, 1996). Dehydriny se ovšem nachází už i v semenech v pozdní fázi zrání, kdy jim hrozí dehydratace z důvodu vývojových událostí (Rorat, 2006).

Absence sekundární struktury dehydrinů jim umožňuje lepší navázání na cílové molekuly při ochraně enzymů a makromolekul, čímž je chrání před abiotickým stresem (Hara, 2010). Studie dokázaly, že dehydriny se vážou na fosfolipidové váčky díky přítomnosti K-segmentu (Koag et al., 2003). Y-segment je důležitý při vazbě na nukleové kyseliny (Close, 1996). Dehydriny se také účastní ochrany cytoskeletu buňky (Abu-Abied et al., 2006).

Dále se dehydriny mohou vázat na malé molekuly (vápník, dvoumocné kovové ionty, např. zinek, hořčík, nikl a měď). Vápník váže fosforylovaná forma kyselého dehydrinu, neutrální dehydriny nevážou vápník, i když jsou fosforylované. Naproti tomu kovy váže kyselá, neutrální i bazická nefosforylovaná forma dehydrinu. Předpokládá se, že dehydriny svou vazbou na kovy snižují poškození rostlinných buněk volnými kovy, které při vodním stresu unikají z organel a membrán (Svensson et al., 2000).

Dehydriny nachází uplatnění při ochraně před denaturací proteinů. Studie prokázaly, že několik dehydrinů vykazuje kryoprotektivní funkci (pravděpodobně přítomností K-segmentu), čímž zamezí nenávratné inaktivaci enzymů způsobené mrazem. Předpokládá se, že dehydriny při vodním stresu uspořádají molekuly vody okolo makromolekul a při extrémním nedostatku vody se dehydriny přímo vážou na povrch enzymů (Hara, 2010).

3.2.3 Genová exprese dehydrinů

Zvýšená intenzita syntézy dehydrinů je zapříčiněna působením abiotického stresu na rostlinu. Abiotickým stresem se v případě dehydrinů rozumí sucho, nízké teploty, zvýšená salinita půdy nebo zrání semen, kdy rostlině hrozí vodní deficit (Close, 1996). I přes stejný výsledný efekt těchto abiotických stresů, tedy nedostatek vody v rostlině, různé abiotické stresy aktivují tvorbu různých typů dehydrinů (Nylander et al., 2001).

Fytohormon ABA (kyselina abscisová), který se v rostlinných buňkách hromadí při nedostatku vody, vyvolá genovou expresi dehydrinů (odtud název RAB proteiny - responsive to abscisic acid). ABA zřejmě zastává funkci sekundárního stimulantu, má za úkol předat informaci o dehydrataci buňce a zahájit ochranné procesy a opravné mechanismy. Z toho ovšem vyplývá, že existují ještě další primární stimulanty, které se starají o rozpoznání vodního deficitu buňky (Campbell et Close, 1997).

3.2.4 Genová exprese dehydrinů při působení chladu

Stres chladem označuje stav, kdy se v okolním prostředí rostlin vyskytují nízké teploty v rozmezí 0° C - 15° C. Tyto teploty postačují k tomu, aby u subtropických a tropických rostlin způsobily rozsáhlá poškození a u mrazuvzdorných rostlin spustily biochemické a fyziologické procesy (Kosová et al., 2007). Hlavní nebezpečí pro rostliny vystavené nízkým teplotám spočívá v poškození buněčných membrán způsobeným nedostatkem vody. Nízké teploty vytváří ledové krystaly uvnitř i vně buněk. Intercelulární krystaly způsobují nevratná poškození buněčných struktur (Guy, 1990). Ledové krystaly v extracelulárním prostoru vytahují vodu z buněčných prostor díky nižšímu vodnímu potenciálu a jejich růst způsobí přetržení membrán a vede k úniku obsahu buněk (Olien et Smith, 1977). Vystavením nízkým teplotám dochází také k denaturaci proteinů a nevratné inaktivaci enzymů, což také vede k buněčnému poškození. V rostlinách proto před příchodem mrazivého období dochází k procesu zvaném aklimatizace proti chladu (cold acclimation). Aklimatizace zahrnuje fyziologické a biochemické změny a změny v genové expresi. Zajišťuje toleranci vůči chladu, jejím hlavním úkolem je stabilizace membrán před poškozením mrazem a akumulace ochranných proteinů v cytoplazmě. Zvyšuje se

podíl nenasycených mastných kyselin v membránách (podíl nenasycených mastných kyselin ovlivňuje tekutost membrány potřebnou pro laterální transport transmembránových sloučenin) (Kosová et al., 2007). Dále dochází k změně skladby proteinů a karbohydrátů, akumulaci jednoduchých cukrů a aktivaci iontových kanálů. Navíc nízké teploty aktivují genovou expresi chladem indukovaných genů, např. geny pro dehydriny, LEA proteiny, proteiny pro přenos lipidů (Mahajan et Tuteja, 2005). Dehydriny chrání proteiny (enzymy) před denaturací způsobenou mrazem, mnohé provedené výzkumy naznačují, že konkrétně K-segment hraje důležitou roli v kryoprotektivní funkci dehydrinů (Wisniewski et al., 1999; Reyes et al., 2008; Hughes et al., 2013). Ve studii publikované Hara et al. (2017) se zjistilo, že nahrazením hydrofobních reziduí na pozici 9 a 13 (v rámci 15 aminokyselin dlouhé sekvence K-segmentu) došlo k výraznému snížení kryoprotektivní funkce dehydrinu. Hydrofobní rezidua se nacházejí i na pozici 5 a 6 v sekvenci aminokyselin, avšak jejich nahrazení nemělo na kryoprotektivní aktivitu žádný vliv (Hara et al., 2017).

Studie provedená Kjellsen et al. (2013) se zaměřila na akumulaci dehydrinů u smrku sibiřského (*Picea obovata*) za extrémně nízkých teplot. Hladina dehydrinů se při podzimní aklimatizaci zvyšovala, maxima dosáhla v zimním období při největších mrazech a během deaklimatizace na jaře s rostoucí teplotou množství dehydrinů ubývalo. Tento trend byl pozorován výrazně u *Dhn1*, *Dhn2*, *Dhn3*, *Dhn6*. Stejný trend, ovšem méně výrazně byl zaznamenán u *Dhn4* a *Dhn5*. *Dhn7* vykazoval opačný trend, jeho množství s klesající teplotou klesalo a v období deaklimatizace hladina opět vzrostla. To naznačuje, že *Dhn7* vykonává u smrku jinou funkci, než je ochrana před mrazem. Zkoumané dehydriny patří do skupiny dehydrinů SK_n nebo K_n. Výsledky prozrazují, že dehydriny mají klíčovou roli pro přežití extrémně nízkých teplot (Kjellsen et al., 2013).

Kim et al. (2012) ve svém výzkumu identifikoval devět dehydrinů z křížence topolu bílého a topolu osiky (*Populus alba* x *Populus tremula* var. *glandulosa*), z nichž tři vykazovaly reakci na abiotický stres a u dvou došlo k zvýšení genové exprese při vystavení chladu (dehydriny *PoDhn2* a *PoDhn7*, oba ze skupiny K_n) (Kim et al., 2012).

Caruso et al. (2002) se podařilo izolovat jeden dehydrin z topolu kanadského (*Populus euroamericana*) patřící do skupiny SK_n, který pojmenovali *peudhn1*. Listy vystavené teplotě 10°C vykazovaly nárůst hladiny transkriptu dehydrinu (Caruso et al., 2002). Bae et al. (2009) popsal gen *Podhn* (ze skupiny SK_n) získaný z křížence topolu bílého a topolu osiky (*Populus alba x Populus tremula*) a testování ukázalo nárůst množství *Podhn* mRNA již za 2 hodiny od počátku abiotického stresu chladem (konkrétně 2°C).

Tyto a další studie ukázaly, že především skupiny dehydrinů SK_n, K_nS a K_n se účastní procesu aklimatizace vůči chladu (Allagulova et al., 2003). Co se týče mechanismu ochrany proteinů, předpokládají se dva možné modely. První model předpokládá, že dehydriny fungují na principu molekulárního štítu - umístí se do prostoru mezi cílové proteiny a zabraňují jejich kolizi (Chakrabortee et al., 2012). Podle druhého modelu (entropy transfer model) dehydriny přímo interagují s cílovým proteinem, dojde k jeho navázání na povrch proteinu (Kovacs et al., 2008).

3.2.5 Genová exprese při osmotickém stresu

Vysoká salinita způsobuje buňkám hyperosmotický stres. K zasolování půdy přispívá například zvětrávání hornin nebo poměr evaporace a srážek (evaporace zvyšuje množství koncentrace soli). Velké množství soli v půdě způsobí pokles vodního potenciálu a tím znemožní rostlině příjem vody. Navíc nadměrná přítomnost soli snižuje pórovitost půdy a tím ubývají prostory pro vzduch a vodu v půdě. Ionty Na⁺ jsou ve větším množství pro rostliny škodlivé, naopak ion K⁺ je pro rostliny esenciální prvek. Na stejné přenašečové proteiny v membránách se váže Na⁺ i K⁺ iont, proto velká koncentrace Na⁺ v prostředí negativně ovlivňuje intracelulární tok K⁺ (Mahajan et Tuteja, 2005).

Solný stres způsobuje ztrátu intracelulární vody. Rostliny v rámci prevence ztráty vody a ochrany buněčných proteinů akumulují metabolity zvané kompatibilní soluty. Jsou to nejčastěji cukry (fruktóza, sacharóza, trehalóza) nebo cukernaté alkoholy. Tyto osmotické látky způsobí pokles vodního potenciálu uvnitř buňky a zabrání ztrátě vody (Mahajan et Tuteja, 2005; Kaur et Asthir, 2017).

Bae et al. (2009) provedl analýzu genové exprese pro topol *Populus alba* x *Populus tremula* var. *glandulosa* a dospěli k zjištění, že gen *Podhn* (ze skupiny SK₂) zvýšil transkripci při vystavení osmotickému stresu způsobeným mannitolem a NaCl. Navýšení transkripce mRNA pro dehydriny zpozorovali po 10 hodinách trvání stresu. Podobně i Caruso et al. (2002) dospěli k zjištění, že k expresi genu *peudhn1* (také ze skupiny SK₂) u topolu kanadského (*Populus euroamericana*) dochází při přidání NaCl do půdy. Výsledky ukazují, že skupina dehydrinů SK₂ zvyšuje své množství v rostlinách zasažených zvýšeným osmotickým stresem.

3.2.6 Genová exprese při působení sucha

Vystavením stresu suchem se rostlina dostává do vodního deficitu. Nedostatek vody v rostlinách spouští množství krátko- i dlouhodobých reakcí například uzavírání průduchů, odumírání kořenů a snížení biomasy jemných kořínků, omezení růstu letorostů (Eldhuset et al., 2013). Nedostatek vody způsobuje poškození membrán, dochází ke snížení aktivity buněčných proteinů nebo jejich úplné denaturaci. V rostlinách proto dochází k zvýšené expresi dehydrinů, které chrání proteiny před degradací a dále syntetizují enzymy proteinázy, které odstraňují poškozené a denaturované bílkoviny (Mahajan et Tuteja, 2005).

Reakce v rostlině na sucho se výrazně neliší od reakcí vyvolaných vysokou salinitou. V obou případech dochází k akumulaci solutů za účelem snížení osmotického potenciálu buňky (Mahajan et Tuteja, 2005).

Caruso et al. (2002) zkoumali změnu množství transkriptu genu *peudhn1* u řízků topolu kanadského (*Populus euramericana*) v závislosti na nedostatku vody. Zjistil se výrazný nárůst hladiny transkriptu genu. Zajímavé je, že po ukončení období vodního deficitu po třech dnech důkladné rehydratace se v rostlině stále akumulovala vysoká hladina transkriptu genu *peudhn1*. Předpokládá se, že i nadále zvýšené genové exprese po období vodního deficitu je zapotřebí pro obnovení růstu nebo pro ochranu buněčných struktur před opětovným zasažením vlnou sucha v brzké době (Caruso et al., 2002).

Kim et al. (2012) se podařilo detekovat zvýšený transkript genů nazvaných *PoDhn5* a *PoDhn7* při vystavení rostlin topolu *Populus alba x Populus tremula* stresu suchem. Expres *PoDhn5* se zvýšila jen při nedostatku vody. To naznačuje, že expres *PoDhn5* je specifická pro stres suchem. Zvýšený transkript *PoDhn7* se zaznamenal v podmínkách sucha i nízkých teplot. *PoDhn5* patří do skupiny dehydrinů Y_nSK_2 (Kim et al., 2012), čímž se shoduje s předchozím zjištěním, že syntéza dehydrinů Y_nSK_2 je způsobena suchem (Allagulova et al., 2003).

Velasco-Conde et al. (2012) provedli analýzu genové exprese pro každý z pěti genů pro dehydriny, které izolovali z jehlic borovice přímořské (*Pinus pinaster*). Pro testování vybrali tři provenience borovice přímořské podle klimatických charakteristik místa původu semen (středomořská, kontinentální a atlantická provenience), v rámci každé provenience použili dva různé genotypy - jeden vůči suchu tolerantní a druhý senzitivní. Popsané dehydriny náleží do skupin K_n a SK_n . Pouze dva dehydriny *PpinDhn3* a *PpinDhn4* (skupina SK_n) vykazovali nárůst transkripce s narůstajícím suchem. Transkript *PpinDhn3* se výrazně navýšil u středomořské provenience (více u senzitivního genotypu než tolerantního) a stejný nárůst byl zpozorován u tolerantního genotypu kontinentální provenience. Transkript *PpinDhn4* vykazoval s rostoucím suchem stabilní nárůst u tolerantních genotypů všech proveniencí a rovněž u senzitivního genotypu kontinentální provenience. Na základě výsledků autoři usuzují, že různé provenience využívají různé strategie pro přežití období sucha. U zbylých tří dehydrinů (*PpinDhn1*, *PpinDhn2*, *PpinDhn5*) došlo k snížení genové exprese s rostoucím suchem, nejvyšší hodnoty těchto dehydrinů se vyskytovaly v plně hydratovaných rostlinách, tyto dehydriny zřejmě souvisí s jinými stresy (například stres nízkými teplotami nebo osmotický stres) (Velasco-Conde et al., 2012).

3.3 Metody analýzy genové exprese

3.3.1 Metoda PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR, Polymerase Chain Reaction) je v současné době nejpoužívanější biochemická metoda sloužící k amplifikaci

specifických DNA úseků in vitro pro další analýzy (např. sekvenování DNA). Ke znásobení postačuje velmi malé množství DNA a v poměrně krátkém čase je produkováno několik milionů kopií. Metoda je založena na schopnosti DNA polymerázy syntetizovat nové vlákno DNA komplementárně vůči templátovému řetězci. PCR byla vyvinuta v roce 1985 a v roce 1993 za její objev obdržel její autor Kary B. Mullis Nobelovu cenu za chemii (Gupta et al., 2017).

Reakční směs pro PCR je složena z nekontaminované templátové DNA, pufru, specifických primerů (20-25 bází dlouhé úseky DNA označující vybraný kopírovaný úsek DNA, jejich sekvence je navržena na základě znalosti sekvence DNA v amplifikovaném úseku), volných nukleotidů, enzymu DNA polymerázy a dvojmocných kationtů (sloužící pro aktivaci DNA polymerázy, nejčastěji Mg^{2+} nebo Mn^{2+}). PCR probíhá v opakujících se cyklech a každý cyklus obsahuje tři kroky: denaturační fáze, anelační fáze a syntetická fáze. Počet cyklů závisí na délce amplifikovaného úseku, pro dostatečnou amplifikaci většinou postačuje 30 cyklů. Počet kopií se v každém cyklu zdvojnásobí a vzrůstá tak geometrickou řadou. Celý proces se odehrává v přístroji zvaném termocykler, který umožňuje rychlé změny teplot (Kočárek, 2008).

V rámci denaturační fáze dochází k rozvolnění dvoušroubovice DNA za vysokých teplot okolo $95^{\circ}C$ po dobu 10 - 60 sekund. Vyšší teploty nebo delší doba působení vysokých teplot způsobuje degradaci komponentů, avšak denaturaci v prvním cyklu PCR lze prodloužit na dobu 2 - 5 minut pro zaručené oddělení DNA řetězců. Při anelační fázi jsou za snížené teploty napojeny primery, fáze anelace trvá přibližně 30 - 60 sekund. Teplota závisí na sekvenci primerů, nejčastěji se pohybuje mezi $55^{\circ}C$ - $70^{\circ}C$. Vyšší teplota zajišťuje vyšší pravděpodobnost správného navázání primeru, ovšem nesmí překročit hodnotu, při níž už se primery na templát nevážou. V syntetické fázi DNA polymeráza při teplotě $72^{\circ}C$ syntetizuje zbytek DNA vlákna prodlužováním primeru navazováním nukleotidů. Doba trvání poslední fáze se liší podle délky a koncentrace templátové DNA. Syntetická fáze posledního cyklu se ovšem může prodloužit na 5 až 10 minut za účelem dokončení všech syntéz (Bartlett et Stirling, 2003; Simmons et Snustad, 2017).

Vzhledem k tomu, že celý proces probíhá za vysokých teplot, je nutné použít termostabilní DNA polymerázu. Nejčastěji se používá Taq polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v termálních pramenech Yellowstonského národního parku v teplotách okolo 75°C. V denaturační fázi při teplotách 95°C vykazuje Taq polymeráza biologický poločas 40 minut, což je dostatečná doba pro provedení více než 30 cyklů PCR. Rychlost syntézy roste s rostoucí teplotou: Taq polymeráza syntetizuje 0,25 nukleotidu při 22°C, 1,5 nukleotidu při 37°C, 24 nukleotidů při 55°C, více než 60 nukleotidů při 70°C a při teplotě vyšší než 75°C až 150 nukleotidů (uvedené počty nukleotidů jsou syntetizovány za sekundu). Taq polymeráza tedy dokáže během syntetické fáze syntetizovat více než 3500 nukleotidů za minutu (Bartlett et Stirling, 2003). Výsledný produkt PCR lze dále analyzovat, např. metodou gelové elektroforézy, hybridizace nebo sekvenace DNA.

3.3.2 Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR)

Jedním z typů PCR je metoda kvantitativní PCR, která se používá pro kvantifikaci DNA. Slouží ke zkoumání míry genové exprese, proto se v reakční směsi nevyskytuje genomová DNA, ale komplementární DNA, tzv. cDNA, získaná přepsáním RNA do DNA reverzní transkriptázou. Na rozdíl od klasické PCR je používán speciální termocykler s detektory fluorescenčního signálu, který v průběhu každého cyklu qPCR zaznamenává množství DNA. Zdrojem fluorescence jsou nejčastěji fluorescenční sondy (TaqMan sondy) nebo fluorescenční barviva (SybrGreen), které se vážou na templátovou DNA (Simmons et Snustad, 2017).

SybrGreen je fluorescenční barvivo používané pro nespecifickou detekci (váže se kdekoli na vlákno DNA). Po navázání na dvoušroubovici DNA získá fluorescenční vlastnosti, při denaturaci DNA dochází k uvolnění barviva a zastavení fluorescence (Gupta et al., 2017). Navázané barvivo na dvoušroubovici DNA po ozáření viditelným světlem absorbuje modrou složku o maximální vlnové délce 497 nm a SybrGreen potom vydává světlo zelené barvy o maximální vlnové délce 520 nm (Das et Dash, 2015). S rostoucím množstvím DNA se zvyšuje intenzita fluorescence.

TaqMan sondy jsou 18-22 bp dlouhé oligonukleotidy sloužící ke specifické detekci (jsou komplementární k cílové sekvenci). Sonda na jednom konci nese fluorescenční složku a na druhém zhášec, který v blízkosti fluorescenční složky blokuje emisi fluorescence. Sonda se během PCR váže specificky na sekvence mezi primery. Taq polymeráza během syntézy nového vlákna DNA narazí na sondu, svou exonukleázovou aktivitou ji rozloží a na její místo nasyntetizuje nový řetězec. Rozložením sondy a oddělením fluorescenční složky a zhášecce dojde k emisi fluorescence. S rostoucím počtem cyklů PCR dochází k zvyšování fluorescenčního signálu (Bookout at Mangelsdorf, 2003).

V obou případech hladina fluorescence reflektuje množství přítomné DNA. Produktu se musí vytvořit dostatečné množství, aby vznikl dostatečně silný signál pro zaznamenání a vyhodnocení přístrojem. S každým dalším cyklem fluorescence narůstá, čímž dochází ke kvantifikaci. Reakce se provádí v 96-ti jamkové destičce, v každé jamce se měří úroveň fluorescence. Hodnoty teplot při jednotlivých fázích se neliší od klasické PCR, reakce se provádí obecně po dobu 40 cyklů (Thermo Fisher Scientific handbook, 2014).

Kvantitativní PCR umožňuje sledovat průběh jednotlivých cyklů, jak probíhají v reálném čase, a díky možnosti změřit amplifikované množství DNA v každém cyklu lze kvantifikovat množství výchozího materiálu ve vzorcích. Výstupem qPCR jsou hodnoty fluorescence jednotlivých jamek a číslo cyklu, kdy byla fluorescence měřena. Analýza je provedena speciálním softwarem (Walker et Rapley, 2008).

Výsledky RT-qPCR jsou graficky znázorněny v amplifikační křivce, která vyjadřuje závislost fluorescence na počtu provedených cyklů. Amplifikační křivka má sigmoidní tvar a jsou v ní zřetelně rozeznatelné čtyři fáze: background, exponenciální, lineární a plateau fáze. V background fázi dochází k exponenciálnímu růstu fluorescence, avšak tento nárůst je velmi slabý z důvodu malého množství amplifikované sekvence a pro přístroj nedekovatelný. Jakmile se nahromadí dostatek cílového produktu, začne signál exponenciálně růst a nastává exponenciální fáze. Tato fáze slouží pro kvantifikaci templátové DNA. Zpomalením exponenciálního růstu reakce přejde do lineární fáze, amplifikační křivka se začíná odchylovat od ideální křivky a efektivita reakce postupně klesá.

V konečné fázi plateau už fluorescence nevykazuje nárůst, PCR reakce se zastavuje z důvodu spotřebování reaktantů a nahromadění koncových produktů (Ginzinger, 2002; Page et Stromberg, 2011).

Důležitá hodnota potřebná pro kvantifikaci počáteční DNA je nazývána C_t (cycle threshold). Nachází se v exponenciální fázi amplifikační křivky a jeho hodnota označuje cyklus, ve kterém amplifikační křivka překročila fluorescenční práh. Tento práh určuje software na základě statisticky významného nárůstu amplifikace. Čím je nižší hodnota C_t , tím více molekul cílové DNA bylo přítomno ve vzorku na počátku (Ginzinger, 2002; Thermo Fisher Scientific handbook, 2014).

Při použití barviva SybrGreen se pro ověření specifity amplifikace používá křivka tání (tzv. melting curve), díky které je možné sledovat vznik nespecifických produktů v průběhu reakce. Křivka tání vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na teplotě. Na základě různých teplot tání různých produktů PCR se dají rozlišit nespecifické produkty od specifických (nespecifické mají teplotu tání většinou nižší). Pokud se v grafu zobrazí pouze jeden vrchol, lze hovořit o specifické reakci. V momentě, kdy se objeví v grafu vrcholů více, jedná se o nespecifickou reakci (Thermo Fisher Scientific handbook, 2014).

3.3.3 Southernův přenos (Southern blot)

Southernova přenosu se používá ke studiu genetické informace na úrovni DNA. Slouží k detekci specifických DNA fragmentů (genů). Postup v roce 1975 popsal Edwin Southern, jehož jméno metoda nese. Samotnému přenosu předchází extrakce DNA ze vzorku tkáně a gelová elektroforéza, která způsobí uspořádání fragmentů DNA v gelu podle jejich délek. Na gelovou vrstvu s molekulami DNA se přiloží nylonová nebo nitrocelulósová membrána. Na membránu se umístí větší vrstva savého papíru. Pod gelovou vrstvou se nachází filtrační papír namočený v roztoku určeném pro přenos. Nakonec se celá sestava zatíží závažím. Kapilárním vztlínáním se roztok přesouvá přes vrstvu filtračního papíru, gelu a membrány do horní vrstvy savého papíru. Současně s tím přenáší molekuly DNA z gelu na membránu, která je pro DNA nepropustná. DNA na membráně ulpí ve stejných

polohách, v jakých se nacházely v gelu (Southern, 1975; Simmons et Snustad, 2017).

Během přenosu dochází k denaturaci DNA způsobené zásaditým složením roztoku pro přenos. Následně se membrána vysuší (působením UV záření nebo teplem), tím dojde k imobilizaci DNA molekul na membráně a molekuly se hybridizují s radioaktivní DNA-sondou komplementární k nukleotidové sekvenci DNA (nehybridizované molekuly jsou z membrány vymyty). Membrána se poté přenesse na rentgenový film, na kterém se po vyvolání ukazují tmavé proužky DNA (Simmons et Snustad, 2017).

Pro metodu se upřednostňují nylonové membrány před nitrocelulózovými díky větší odolnosti a schopnosti vázat kratší úseky DNA lépe než nitrocelulózová membrána. Navíc pro upevnění DNA na nylonovou membránu stačí krátké působení UV záření, zatímco nitrocelulózovou membránu je nutné vystavit 80° C ve vakuové peci po dobu dvou hodin (Southern, 1975; Walker et Rapley, 2008).

3.3.4 Northernův přenos (Northern blot)

Northernův přenos je technika využívaná pro studium genové exprese na úrovni RNA. Dochází k přenosu mRNA z gelu na nylonové membrány. Název dostal podle podobnosti metody se Southernovým přenosem. Princip přenosu popsali v roce 1977 James Alwine, David Kemp a George Stark (Alwine et al., 1977). Tato metoda umožňuje detekci specifických mRNA molekul a stanovit míru akumulace mRNA transkriptů ve vzorku a tím aktivitu genů (Walker et Rapley, 2008).

Po extrakci RNA ze vzorku následuje gelová elektroforéza, při níž je použit formaldehyd za účelem denaturace RNA. Formaldehyd také zamezí degradaci materiálu enzymy RNázami, na které je RNA mimořádně citlivá. V rámci Northernova přenosu jsou molekuly RNA přeneseny na nylonovou membránu na základě kapilárního vztlínání. Molekuly RNA se na membráně nacházejí v pozicích shodných s původními pozicemi na agarózovém gelu. Působením UV záření nebo vysušením se docílí imobilizace RNA na membráně. Následuje hybridizace, při které dochází k navázání označené sondy, tzv. próby, z roztoku na komplementární molekulu RNA. Membrána se poté přenesse na

rentgenový film, na kterém se po vyvolání ukazují tmavé proužky RNA (Simmons et Snustad, 2017).

3.3.5 Čipová analýza (DNA microarray)

Čipová analýza slouží k detekci a kvantifikaci nukleových kyselin. DNA čip je destička, na kterou je nanášeno do několika míst DNA o známé sekvenci, zvané sondy nebo próby (krátké úseky jednovláknové DNA), se kterými hybridizují molekuly cDNA ze vzorku. Do každého místa stačí umístit velmi malé množství DNA. Technologie genových čipů byla poprvé popsána v roce 1995 (Schena et al., 1995). Čipovou analýzou se měří relativní koncentrace nukleové kyseliny ve vzorku (Bumgarner, 2013).

Pro tvorbu DNA čipu je zapotřebí nosný materiál (např. sklo, porcelán nebo membrána), na který se strojově pomocí speciálních jehel nanáší próby. Po izolaci mRNA ze vzorků je mRNA převedena pomocí reverzní transkriptázy do komplementárních úseků cDNA, poté se amplifikuje a opatří se fluorescenční značkou. Tento vzorek je nanášen na DNA čip a cDNA se na principu komplementarity bazí spojí se sondami (hybridizace). Čip se pak omyje a osuší, tím dojde k odplavení nedostatečně přichycené cDNA (tedy odplavení úseků s rozdílnou sekvencí nukleotidů). V místech, kde došlo k navázání cDNA na sondy, se fluorescenční značka po ozáření čipu laserem rozsvítí a tento signál je detekován snímačem. Intenzita signálu je mírou hladiny exprese genu. Na jednom čipu je možné analyzovat více vzorků, pokud se použije více druhů fluorescenčních barviv (Čížková, 2005).

3.3.6 Sekvenování DNA

Metody sekvenování DNA umožňují rozklíčovat pořadí nukleotidů v dané molekule nukleové kyseliny, tedy určit primární strukturu. Metoda byla poprvé popsána v roce 1977 a podle autora nese jméno Sangerova metoda sekvenování (Sanger et al., 1977). Bylo vyvinuto několik postupů sekvenování, které se dělí na původní Sangerovu metodu a na pozdější metody sekvenování druhé a třetí generace, díky kterým je analýza genové exprese rychlejší a levnější.

3.3.6.1 Sangerova metoda sekvenování

Frederick Sanger myšlenku metody sekvenování nukleových kyselin stavěl na výsledcích své předchozí práce z roku 1955, ve které se mu podařilo jako prvnímu zjistit pořadí aminokyselin v proteinu, konkrétně v inzulinu. Tím se potvrdilo, že proteiny mají své specifické složení a že pořadí nukleotidů v DNA určuje pořadí aminokyselin v proteinech (Kolísko, 2017). Za tento objev obdržel v roce 1958 Nobelovu cenu za chemii. Následovalo několik pokusů o vytvoření metody vhodné pro čtení sekvencí (Sanger et Coulson, 1975; Maxam et Gilbert, 1977). Až sekvenovací metoda autorů Sanger, Coulson a Nicklen z roku 1977 se stala hojně využívanou. Díky tomuto objevu Frederick Sanger získal roku 1980 druhou Nobelovu cenu za chemii (Kolísko, 2017).

Metoda sekvenování DNA využívá pravidlo komplementarity bází, kdy se na templátový řetězec napojují komplementární nukleotidy (adenin se váže s thyminem, guanin s cytosinem). Sekvenování probíhá na principu postupného přidávání nukleotidů do nově syntetizovaného řetězce DNA, ovšem náhodně přiřazená pozměněná báze (dideoxynukleotid - ddNTP) způsobí terminaci syntézy z důvodu chybějící hydroxylové skupiny, na kterou by se připojil další nukleotid. Každý ddNTP obsahuje specifické fluorescenční nebo radiační značení, díky kterému se určí, o jaký nukleotid se jedná. Náhodná terminace syntézy DNA způsobuje tvorbu molekul o různých délkách a při velkém počtu opakování se získá směs molekul všech možných délek. Výsledná sekvence se zjistí při gelové elektroforéze na základě koncového ddNTP a délky molekul (nejkratší molekuly DNA se v gelu dostanou nejdál) (Gupta et al., 2017). Čtení dlouhých řetězců a vysoká přesnost čtení jsou velké výhody Sangerovy metody. Jednou sekvenční reakcí je možné zjistit pořadí až 1000 bází. Nevýhody této metody zahrnují vysokou cenu, nízkou rychlost a možnost čtení pouze jednoho úseku DNA (Kolísko, 2017).

Pokud jsou ddNTP značeny radiační značkou, sekvenování probíhá ve čtyřech vzorcích, každý vzorek je směsí cDNA, primerů, standardních nukleových bází, DNA polymerázy a jednoho ze čtyř typů modifikovaných bází ddATP/ddGTP/ddCTP/ddTTP (Sanger et al., 1977). Při použití čtyř fluorescenčních barev pro značení ddNTP lze reakci provést v jedné zkumavce.

Analýzu v tomto případě provádí moderní sekvenátor kapilární elektroforézou a výsledky převede do grafu zvaného elektroforeogram (Gupta et al., 2017).

3.3.6.2 Sekvenování nové generace

Nové metody sekvenování, označované jako metody druhé generace (Next Generation Sequencing, NGS), jsou metody čtení DNA využívané od 90. let 20. století. Jejich použití je výhodnější z důvodu nižší ceny a rychlejší analýzy většího množství vzorků oproti klasickým metodám. Sekvenování nové generace využívá paralelní proces sekvenování, při kterém dochází ke čtení až milionů vzorků najednou, čímž se ovšem vyprodukuje obrovské množství dat, pro jejichž analýzu jsou potřeba pokročilé metody zpracování (Gupta et al., 2017). Úskalí těchto metod spočívá ve větší chybovosti a kratších maximálních délkách výsledných sekvencí oproti Sangerově metodě, u metod NGS se výsledné sekvence pohybují okolo 100 až 500 bází, Sangerova metoda až 1000 bází (Kolísko, 2017).

Všechny metody sekvenování druhé generace mají stejný průběh: extrakce RNA, purifikace, prepis RNA do cDNA, amplifikace cDNA, sekvenování a analýza dat. Obecný postup společný všem metodám NGS zahrnuje fragmentaci templátové cDNA na relativně krátké úseky o délce stovek bází a připojení oligonukleotidů známé sekvence tzv. adaptéry na jejich konce, kterými se zajišťuje spojení molekuly DNA s pevným povrchem. Amplifikace každého řetězce DNA se provádí za účelem posílení výsledného signálu a jeho zachycení kamerou (Kolísko, 2017). Dalším krokem je paralelní sekvenování. Nejčastěji využívané metody NGS jsou 454 sekvenování, Solexa, SOLiD a Ion Torrent.

3.3.6.3 454 sekvenování

Metoda vyvinuta Jonathanem Rothbergem v roce 2005 dokáže analyzovat přes milion molekul DNA najednou, délka každé sekvence DNA je 700 až 1000 bází. Molekuly DNA jsou amplifikovány na malých kuličkách vložených do destičky a podrobeny sekvenační reakci založené na principu pyrosekvenování. Navázáním báze do nově syntetizovaného řetězce DNA dojde k uvolnění molekuly pyrofosfátu, která je působením enzymů přeměněna na molekulu ATP spotřebovanou enzymem luciferáza oxidujícím luciferin na oxyluciferin za vzniku

světelného signálu detekovatelného citlivou kamerou. Kamera detekuje místo vyzáření signálu na destičce (tedy přidání báze do řetězce) a zároveň intenzitu záření značící kolik nukleotidů bylo přidáno najednou. V reakčních směsích je v jednom okamžiku vždy pouze jeden typ báze. Tato metoda má problém se čtením dlouhých řetězců složených z jednoho typu nukleotidu, nejčastější chybou 454 sekvenování je právě přebývajících nebo chybějících bází (Kolísko, 2017).

3.3.6.4 Solexa

Firma Illumina tuto metodu vytvořila v roce 2007. Využívá kratší sekvence kolem stovky bází, ovšem počet najednou sekvenovaných bází se přibližuje 900 miliardám. Na destičce dochází k amplifikaci molekul DNA. V rámci sekvenační reakce se připojují nukleotidy doplněné o fluorescenční barvivo (různé barvy pro každý typ nukleotidu) do nově syntetizovaného vlákna, čímž dojde k přerušení syntézy. Signál je zachycen citlivou kamerou a blokující nukleotid i fluorescenční značení jsou enzymy odstraněny, díky čemuž syntéza řetězce DNA pokračuje dál (Bleidorn, 2017). Tato metoda má velmi vysokou přesnost čtení, uvádí se až 99,9 % (Goodwin et al., 2016).

3.3.6.5 SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection)

Metoda byla popsána v roce 2008 firmou Applied Biosystems. Sekvenování využívá proces ligace, při kterém enzym ligáza k templátovému řetězci DNA připojuje celé části jednovláknových molekul DNA tzv. sondy. Do reakční směsi je umístěna cDNA, primery, ligáza a fluorescenčně značené dvoubázové sondy (sonda má 8 nukleotidů, na prvních dvou pozicích v sekvenci se nachází kombinace dvou nukleotidů, další tři pozice obsazují neurčité nukleotidy a poslední tři místa náleží nukleotidům s fluorescenční značkou, každá barva značí čtyři páry bází). Ligací sondy k templátu dojde k odštěpení nukleotidů s fluorescenční barvou a vyzáření signálu. Po osekvenování celého fragmentu se vlákno od templátu oddělí a sekvenace probíhá od začátku, jen s tím rozdílem, že primer je posunut o jeden nukleotid, tzn. každá báze je přečtena dvakrát. Analýza

dat je následně provedena programem, který podle barevných signálů a dekodující tabulky určí sekvenci fragmentu (Gupta et al., 2017).

3.3.6.6 Ion Torrent

Metoda Ion Torrent využívá při sekvenování jiného přístupu než předchozí metody. Již nedochází k detekci světelných signálů, ale jsou detekovány chemické změny v průběhu syntézy. Na počátku je řetězec DNA fragmentován na úseky o délce 200 až 400 bází a na úseky jsou připojeny adaptéry. Po přichycení úseků na kuličku probíhá amplifikace DNA. Kuličky s amplifikovanou DNA jsou následně vloženy do jamek na čipu a podrobeny sekvenování. Jednotlivé druhy nukleotidů postupně zaplavují jamky čipu a jsou činností DNA polymerázy začleňovány do nově vznikajícího řetězce, přičemž dochází k uvolnění vodíkového protonu a tím ke změně pH, kterou zaznamenává detektor v reálném čase. Výhodou metody je absence fluorescenčních detektorů, sond a kamer a nízká cena (Bleidorn, 2017). Nevýhodou stejně jako u 454 sekvenování jsou problémy se čtením řetězců složených z jediného typu nukleotidů (Kolísko, 2017).

3.3.6.7 Sekvenování třetí generace

V dnešní době už jsou hojně využívány i další metody čtení DNA označovány jako sekvenování třetí generace. Tyto metody umožňují získat informaci o pořadí nukleotidů z jediné molekuly DNA bez nutnosti předchozí amplifikace. Jejich použitím je možné získat složení delších fragmentů než u metod druhé generace. Nejpoužívanější metody jsou:

- Single Molecule Real-Time (SMRT) sequencing (PacBio)-jednomolekulové sekvenování v reálném čase od společnosti Pacific Bioscience, také využívá fluorescenčně značené nukleotidy, zaručuje vysokou citlivost (Kolísko, 2017)
- nanopórové sekvenování - sekvenování molekuly DNA v reálném čase, využitím elektroforézy je vlákno DNA transportováno skrz nanopór v elektricky nabitě membráně, vlákno při průchodu nanopórem způsobí v

membráně změnu napětí, která je charakteristická pro každou bázi (Bleidorn, 2017).

3.4 Rod Topol (*Populus*)

Topoly jsou důležitou dřevinou lesních ekosystémů tvořící hlavní složku stromového patra lužních lesů. V boreálním až subtropickém pásmu severní polokoule je popsáno na 40 druhů rozdělených do 5 sekcí:

- 1) *Populus* – bílé topoly (*Populus alba*, *Populus tremula*, *Populus x canescens*)
- 2) *Aigeiros* – černé topoly (*Populus nigra*, *Populus deltoides*, *Populus x canadensis*)
- 3) *Tacamahaca* - balzámové topoly (*Populus simonii*, *Populus balsamifera*)
- 4) *Leucoides* – velkolisté topoly
- 5) *Turanga* – subtropické druhy

V České republice jsou původní čtyři druhy: ze sekce *Populus* zastoupeni topolem bílým (*Populus alba*), topolem osikou (*Populus tremula*) a topolem šedým (*Populus x canescens*), ze sekce *Aigeiros* topolem černým (*Populus nigra*). Za účelem vyšší produktivity a rychlejšího růstu se v krajině častěji objevují kulturní topoly (kultivary). Průměrný roční výškový přírůst činí až 1 metr, u některých kultivarů až 2 metry, což z topolů činí nejrychleji rostoucí dřeviny v České republice (Musil et Möllerová, 2005).

3.4.1 Topol osika (*Populus tremula*) – klasifikace

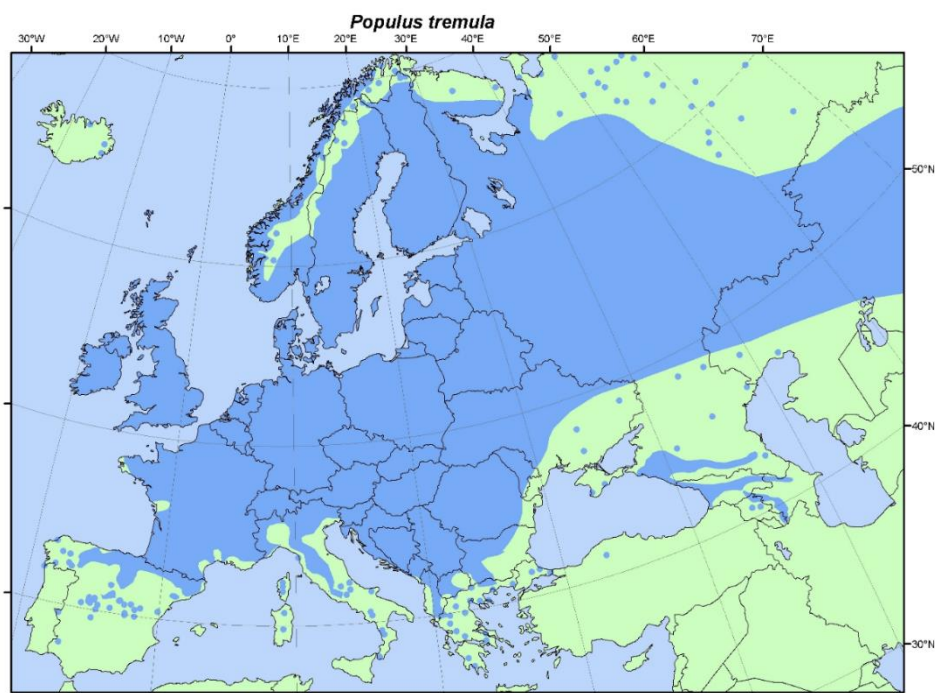
Tab. č. 1: Klasifikace topolu osiky

Říše	rostliny (<i>Plantae</i>)
Oddělení	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád	malpígiotvaré (<i>Malpighiales</i>)
Čeleď	vrbovité (<i>Salicaceae</i>)
Rod	topol (<i>Populus</i>)
Druh	topol osika (<i>Populus tremula</i>)

3.4.2 Rozšíření

Osika je na území České republiky původní dřevina, přirozeně se vyskytuje v termofytiku, mezofytiku a nižších polohách oreofytika (těžiště výskytu se nachází v 300–800 m n.m.). V Krušných horách osika vystupuje až do 900 m n. m., na Šumavě a v Krkonoších lze nalézt osiku v nadmořské výšce 1300 m n. m. (Úradníček et al., 2001). Výskyt osiky ve vyšších polohách je ojedinělý a způsobuje keřovitý vzrůst. Osika v porostech tvoří porostní příměs, uplatnění nalézá společně s břízou jako krátkověký pionýrský druh. Stejnorodé porosty vytváří činností člověka (např. zalesnění osikou a jejích hybridů imisní oblasti Krušných hor; Musil et Möllerová, 2005).

Osika má největší areál výskytu mezi topoly. Celkový areál osiky zahrnuje téměř celou Evropu a pokračuje do severní a jihovýchodní Asie. V lesích na Sibiři osika představuje jednu z nejdůležitějších dřevin. Dále se vyskytuje v severozápadní Africe (Musil et Möllerová, 2005).



Obr. č. 2: Rozšíření topolu osiky v Evropě (na mapě vyznačeno modře); <<http://www.euforgen.org/species/populus-tremula/>> [cit. 25. 5. 2020]

Tento značný rozsah je umožněn velkou ekotypickou variabilitou druhu. Jsou rozlišovány dvě skupiny klimatypů: severská nížinná osika a horská osika. Severská nížinná osika se vyskytuje především na území Ruska, horská osika se

nachází v oblasti zasahující od severozápadní Afriky přes jižní a střední Evropu a Kavkaz až do Mongolska, ojediněle až do Číny (Musil et Möllerová, 2005).

3.4.3 Morfologie

Osika je dvoudomá dřevina dorůstající výšky 20 až 25 metrů, v příhodných podmínkách i 35 metrů. V extrémních podmínkách (např. v oblastech okolo horní hranice lesa), ale i na mělkých a suchých podkladech však dosahuje pouze keřovitého vzrůstu. Kmen je štíhlý a jeho výčetní tloušťka se pohybuje v rozmezí od 75 cm až 1 m. Dožívá se přibližně 150 let. Tvar kmene v zápoji bývá nejčastěji rovný až sloupovitý, není zavětvený. Koruna je poměrně řídká, vysoce nasazená. Osika má plochý kořenový systém zasahující do vzdálenosti 20 až 30 metrů od kmene (Úradníček et al., 2001; Musil et Möllerová, 2005). Vzhled borky se s věkem stromu mění. U mladých jedinců je světle šedá až zelená a hladká, s tmavě šedými lenticelami. Postupem času borka tmavne, barva se mění na tmavě šedou a je poseta prasklinami (Buriánek et Novotný, 2016).

Listy osiky jsou charakteristické výraznou heterofylií. Listy na stromech mají čepel okrouhlou, 3 - 8 cm dlouhou a stejně tak i širokou, na okrajích je hrubě zubatá až vroubkovaná. Listy na výmladcích jsou větší (až 13 cm dlouhé a 10 cm široké) a čepel má srdčitý tvar (Buriánek et Novotný, 2016). Podle místa výskytu dřeviny se liší povrch listu. Osiky v nížinách a v oceanické části areálu mají listy pokryté drobnými chlupy (varianta villosa). Naopak jedinci v horách a v kontinentální části areálu mají listy lysé (varianta glabra). Řapík listů je 4 - 7 cm dlouhý, tenký a zploštělý (Musil et Möllerová, 2005).

Topoly jsou anemogamní dřeviny. Kvetení probíhá od března do dubna. Květenství jsou převislé jehnědy, které jsou 6 - 10 cm dlouhé. Plodem jsou tobolky s velkým množstvím drobných ochmýřených lehkých semen, která se šíří větrem (Hejný et Slavík, 1990). Semena jsou produkována soliterně stojícími stromy již ve věku 10 - 15 let (Myking et al., 2011). Nízká hmotnost jim umožňuje překonávat velké vzdálenosti. Klíčivost semen je krátkodobá, trvá jen několik dnů, a pro úspěšné uchycení a klíčení semena vyžadují holou plochu s dostatkem vlhkosti a světla (Úradníček et al., 2001). Z těchto důvodů se osika reprodukuje ve větší míře kořenovými výmladky.

Kořenový systém je zpočátku křivý, dosahuje hloubky přibližně jednoho metru, později dochází k intenzivnímu růstu bočních kořenů. Osika se vyznačuje silnou kořenovou výmladností, která jí umožňuje snadné šíření do blízkého okolí. Díky schopnosti kořenové výmladnosti osika tvoří na pasekách a spáleništích husté porosty, při nadměrné intenzitě z lesnického hlediska nežádoucí (Musil et Möllerová, 2005).

Dřevo z osiky je nejkvalitnější ze všech domácích druhů topolů. Je měkké, bez jádra, poměrně pevné a pružné a dobře opracovatelné. Uplatnění nalézá ve výrobě dýh, překližek a papíru. Výjimkou není použití osikového dříví pro stavební účely. Dřevo je také žádané pro výrobu sirek (Úradníček et al., 2001; Musil et Möllerová, 2005).

3.4.4 Ekologie

Osika je silně světlomilná dřevina, světlo přicházející z boku způsobuje odklon kmene. Snáší i mírné zastínění, ale ve starších zapojených porostech ustupuje (Musil et Möllerová, 2005). Nejčastěji se vyskytuje ve světlých lesích, tvoří stálou příměs zejména doubrav, dále se nachází na pasekách, opuštěných pastvinách a v lesních lemech (Buriánek et Novotný, 2016).

Na množství dostupné vody v půdě kladou osiky menší nároky na rozdíl od ostatních topolů. Nejčastěji roste na živinami bohatých, vlhkých půdách s vyšší hladinou podzemní vody. Stagnující vodu toleruje za předpokladu dostatku živin, avšak záplavy jí nevyhovují (vznik hnilob). Najdeme ji i na mělkých a vysýchavých kamenitých půdách, kde roste spíše keřovitě (Buriánek et Novotný, 2016). Nejlepší podmínky pro růst osik se nacházejí na aluviálních náplavech lužních oblastí na hlubokých hlinitých, humózních půdách bohatých na minerály a vodu. Na půdu je osika nenáročná, nalezneme ji na nejrůznějších podkladech. Snáší i určitou míru zasolení půdy (Úradníček et al., 2001). Opad osik zlepšuje půdu, listy obsahují ve vysoké míře vápník a zmírňují tím kyselost lesních půd (Nikula et al., 2010).

Rozsáhlý areál osiky je způsoben velmi nízkými klimatickými nároky. Roste v klimatu oceánickém i kontinentálním. Osika toleruje nízké i vysoké teploty, dobře snáší i mrazy (Musil et Möllerová, 2005). Výsledky studie

Sivadasan et al. (2018) ukazují, že zvýšená teplota podporuje růst osiky. Mimo výšky (u samčích rostlin došlo k přírůstu výšky o 41 %, u samičích rostlin o 33 %) došlo i k nárůstu biomasy listů (samčí rostliny vykazovaly nárůst listové biomasy o 65 %, u samičích rostlin byl zaznamenán nárůst listové biomasy o 29 %) a pupenů.

Nevadí jí znečištěné ovzduší měst a průmyslových oblastí (Úradníček et al., 2001). Odolává imisní zátěži, proto se využívala k zalesňování imisních oblastí jako přípravná dřevina, zejména v Krušných horách (Buriánek et Novotný, 2016). Přípravné dřeviny jsou schopné upravit porostní mikroklima, půdní podmínky nebo koloběh vody, čímž dochází ke zlepšení podmínek pro obnovu cílových dřevin (Souček et al., 2019). Osika jako pionýrská dřevina rychle obsazuje kalamitní holiny, nejlépe se zmlazuje na místech po požárech. Na holinách přispívá k obnově dlouhověkých dřevin, osiky zde spolu s břízou vytváří porostní úroveň a fungují jako kryt pro výsadby cílových dřevin, které ji však později vytlačí. V příznivých podmínkách vykazuje velmi rychlý růst, který se ovšem okolo 20. roku zpomaluje z důvodu zvýšeného kompetičního tlaku okolních dřevin (Musil et Möllerová, 2005).

Osika bývá z lesnicko-hospodářského hlediska označována jako plevelný druh. Většinou netvoří čisté porosty a není cílovou dřevinou (cílovou dřevinou je jen na extrémních lokalitách), z toho důvodu je odstraňována z hospodářských porostů v rámci prořezávek a probírek (Musil et Möllerová, 2005; Martiník et al., 2017).

Nejčastější původce poškození osik je zvěř a dobytek. Je vyhledávanou okusovou dřevinou, mlaziny bývají okusem silně poškozovány a ranami proniká hniloba do stromu (Úradníček et al., 2001). Osika je často využívána v honitbách pro zvýšení úživnosti (Buriánek et Novotný, 2016). Silná poškození jsou také způsobována sněhem a námrazou (Musil et Möllerová, 2005).

4 METODIKA

V experimentu bylo použito 6 sazenic topolu osika rostoucí v laboratorních podmínkách v sadbovačích. Před zahájením experimentu byli všichni jedinci stejně zaléváni. Od momentu prvního odběru listů se tři jedinci přestali zalévat, zbylí tři se zalévali dál. Sběr listů probíhal po týdnu, celkem byly provedeny čtyři sběry. Sběr spočíval v odebrání jednoho listu z každé sazenice a materiál se okamžitě umístil do hlubokomrazícího boxu (- 80°C) do doby provedení analýz.

4.1 Izolace RNA

4.1.1 Lýze buněk a tkání

Do každé z mikrozkušavek o objemu 2 ml (Eppendorf) se vloží 2 kovové drtící kuličky a sebraný list. Mikrozkušavky se zamrazí v tekutém dusíku a následně se vloží do oscilačního mlýnu (doba drcení 1 minuta). Po vyjmutí z oscilačního mlýnu je třeba zkontrolovat, zda je vzorek zcela nadrcen.

4.1.2 Izolace RNA pomocí kitu

Pro izolaci RNA byla použita laboratorní souprava Thermo Scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, product information, 2014).

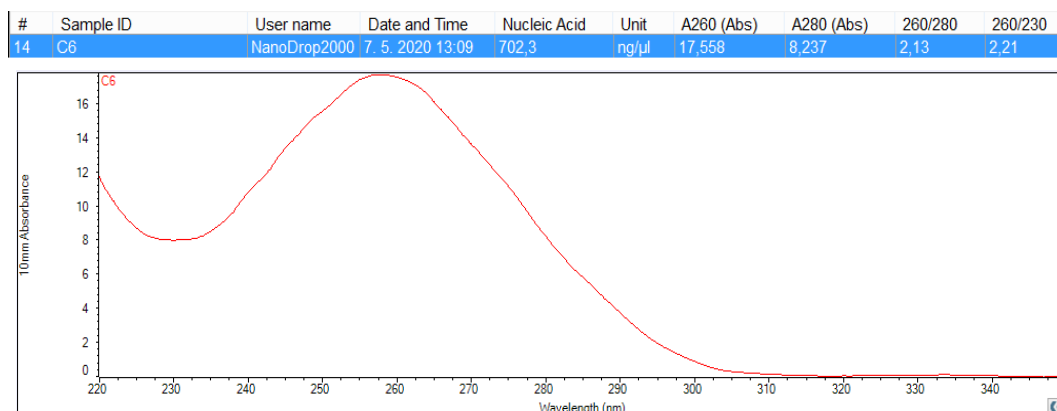
Před RNA purifikací se připraví roztok pro extrakci rostlinné RNA doplněný o dithiothreitol (DTT). Do každých 500 µl Plant RNA Lysis Solution potřebných pro extrakci se přidá 10 µl 2M DTT. Po vyjmutí z oscilačního mlýnu se do každého vzorku přidá 500 µl Plant RNA Lysis solution doplněný o DTT. Vortexujeme 20 sekund, poté se vzorky inkubují v termomixeru po dobu 3 minut při teplotě 56°C. Následná centrifugace po dobu 5 minut při 20 000 g slouží k oddělení fází. Roztok se přelije do nových mikrozkušavek, přidá se do nich 250 µl 96 % ethanolu a promíchá se pipetováním. Takto připravený roztok se přelije do mikrocentrifugačních filtrů umístěných ve sběrných zkušavkách. Následuje centrifugace po dobu 1 minuty při 12 000 g. Roztok, který při centrifugaci přešel

přes membránu filtru do sběrné zkumavky se vylije a zkumavka se opět složí. Do každého mikrocentrifugačního filtru se přidá 700 µl promývacího pufru Wash Buffer WB 1, zkumavky se vloží do centrifugy na 1 minutu při 12 000 g. Roztok se vylije a každý filtr se přemístí do čisté sběrné zkumavky. Filtry se následně dvakrát promyjí 500 µl Wash Buffer 2 (centrifugace na 1 minutu při 12 000 g). Pro odstranění zbytkové tekutiny se filtry centrifugují ještě na 1 minutu při 20 000 g. Roztok a sběrná zkumavka se odstraní, filtr se vloží do 1,5 ml sběrné zkumavky. Pro uvolnění RNA se do filtru přidá 50 µl ultračisté vody a zkumavky se centrifugují po dobu 1 minuty při 12 000 g. Mikrocentrifugační filtr se odstraní, purifikovaná RNA se okamžitě uloží na led.

4.2 Měření koncentrace RNA

Koncentrace a čistota izolované RNA se stanoví absorpční spektrofotometrií (spektrometr NanoDrop). Měří se absorbance při vlnové délce 260 nm (zjišťuje koncentraci nukleové kyseliny) a 280 nm (podává údaj o čistotě nukleové kyseliny).

Před samotným měřením koncentrace RNA se provede vynulování spektrometru oproti slepému vzorku (tzv. blank), kterým je nejčastěji voda. Pro měření koncentrace RNA se na spektrometr nanese 1 µl vzorku. Po změření absorbancí RNA při vlnových délkách 260 nm a 280 nm se vypočte jejich poměr A260/280. Tento poměr absorbancí by pro RNA měl dosahovat hodnot 2 a výše (výrazně nižší hodnoty značí znečištění vzorku; Desjardins et Conklin, 2010).



Obr. č. 3: Záznam parametrů vzorku testovaného v laboratoři

4.3 Reverzní transkripce

Izolovanou RNA je nutné před použitím RT-qPCR metody převést do molekuly DNA, což umožňuje enzym reverzní transkriptáza. Reverzní transkripcí vznikne jednořetězcová komplementární DNA, tzv. cDNA.

Pro reverzní transkripci byla použita laboratorní souprava High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific, product information, 2016).

Před přípravou 2X RT master mixu se komponenty nechají roztát na ledu. Objem jednotlivých komponentů se vypočítá podle požadovaného počtu reakcí. Příprava 2X RT master mixu se provádí na ledu, po smíchání všech komponentů se master mix promíchá a uloží na led.

Tab. č. 2: Komponenty pro přípravu 2X RT master mix (Thermo Fisher)

Komponenty	Objem (μl)
pufr	2
dNTP mix	0,8
náhodné primery	2
reverzní transkriptáza	1
RNase inhibitor	1
voda bez nukleáz	3,2
celkem na reakci	10

Do každé jamky na 96-jamkové destičce se napipetuje 10 μl 2X RT master mix spolu s 10 μl izolované RNA, směs se promíchá pipetováním. Jamky se uzavřou folií a celá destička se krátce centrifuguje. Následně se destička umístí do termálního cycleru. Nastavení termálního cycleru: 10 minut při 25°C, poté 120 minut při 37°C, 5 minut při 85°C pro inaktivaci reverzní transkriptázy, na závěr ∞ minut při 4°C. Vzniklá cDNA se využije okamžitě pro RT-qPCR nebo ji lze dlouhodobě uchovat při teplotě -25°C až -15°C do doby provedení RT-qPCR.

4.4 RT-qPCR

Vzorky pro amplifikaci cDNA se připraví s využitím qPCR 2x SYBR Master Mixu. Specifické primerové páry pro aktin (ACT; referenční gen) a

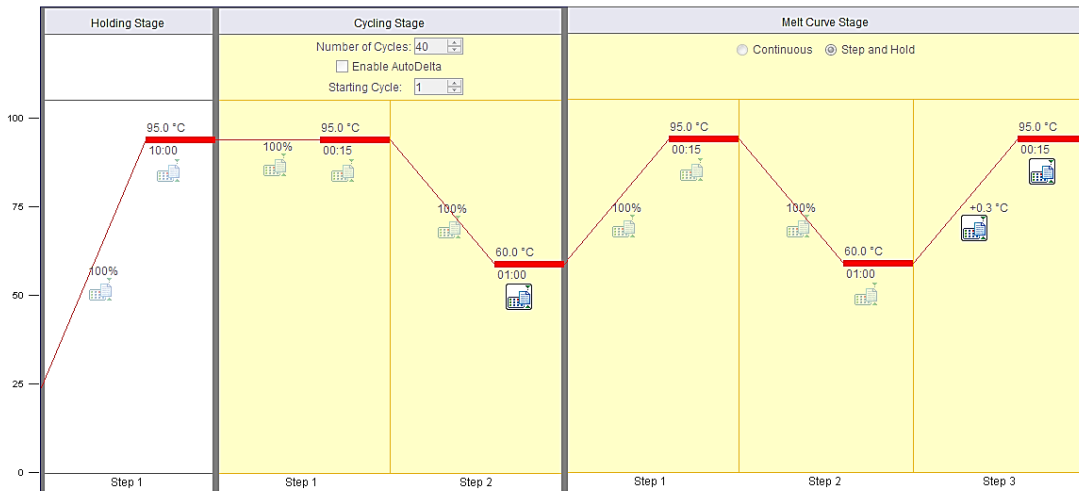
dehydrin (DHN; Ku et Kim, 2008) se doplní o určené množství vody, tento roztok se následně naředí vodou na výslednou koncentraci 5 pmol/μl. Každá mikrozkušavka na destičce obsahuje 6 μl qPCR 2x SYBR Master Mixu, 1,2 μl 5' primerů, 1,2 μl 3' primerů, 1 μl cDNA, 2,1 μl vody a 0,5 μl ROX. Do dvou zkušavek (pro primer ACT a DHN) se namíchá směs všech komponentů potřebných pro reakci, zatím bez templátové DNA. Reakce pro každý vzorek se připravuje v triplicáttech. Objem komponentů se přepočítá v závislosti na počtu jamek a přiměřeném objemu navíc jako rezerva. Do jamek v 96-jamkové destičce se podle schématu napipetuje 11 μl tohoto roztoku a přidá se 1 μl templátové DNA.



Obr. č. 4: 96-jamková destička s pipetovacím schématem: řádek A – D s primery aktinu, řádek E – H s primery dehydrinu, jamky Z1 – Z4 značí vzorky cDNA ze zalévaných rostlin z týdne 1 až 4, jamky N1 – N4 značí vzorky cDNA z nezalévaných rostlin z týdnů 1 až 4

Destička se zalepí folií a krátce centrifuguje. Následná RT-qPCR probíhá za optimalizovaných podmínek. Nastavení termálního cycleru: 10 minut při 95°C,

15 sekund při 95°C a 1 minuta při 60°C (tuto sekvenci dvou kroků opakovat 40 krát). Následuje 15 sekund při 95°C, 1 minutu při 60°C. Kontinuální zvyšování teploty z 60°C na 95°C umožní zaznamenat fluorescenci SYBR Green I.



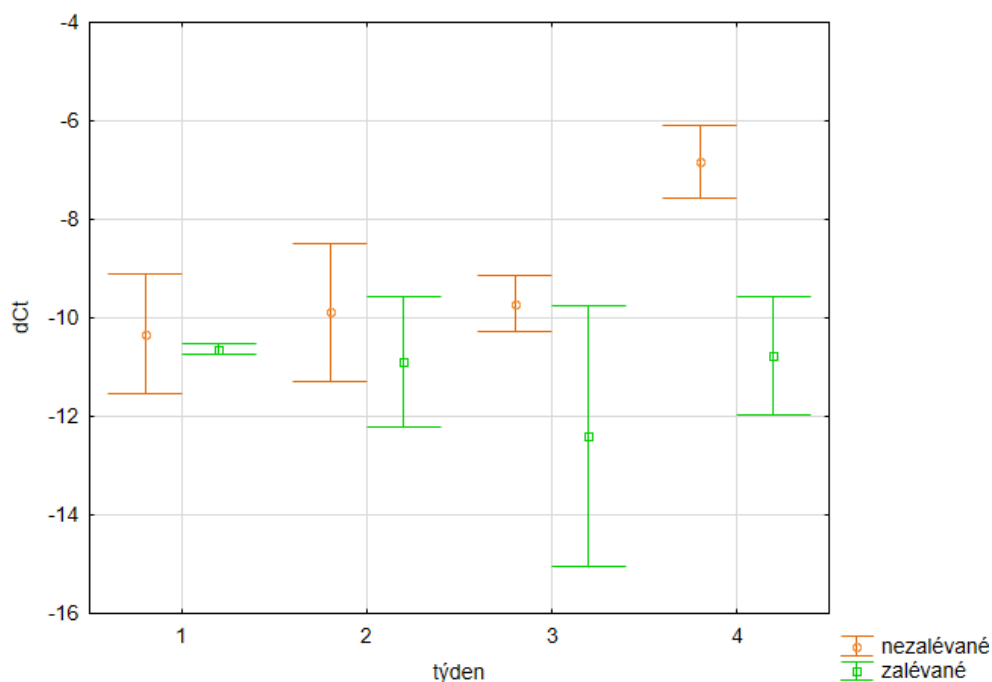
Obr. č. 5: Optimalizovaný teplotní režim RT-qPCR

5 VÝSLEDKY

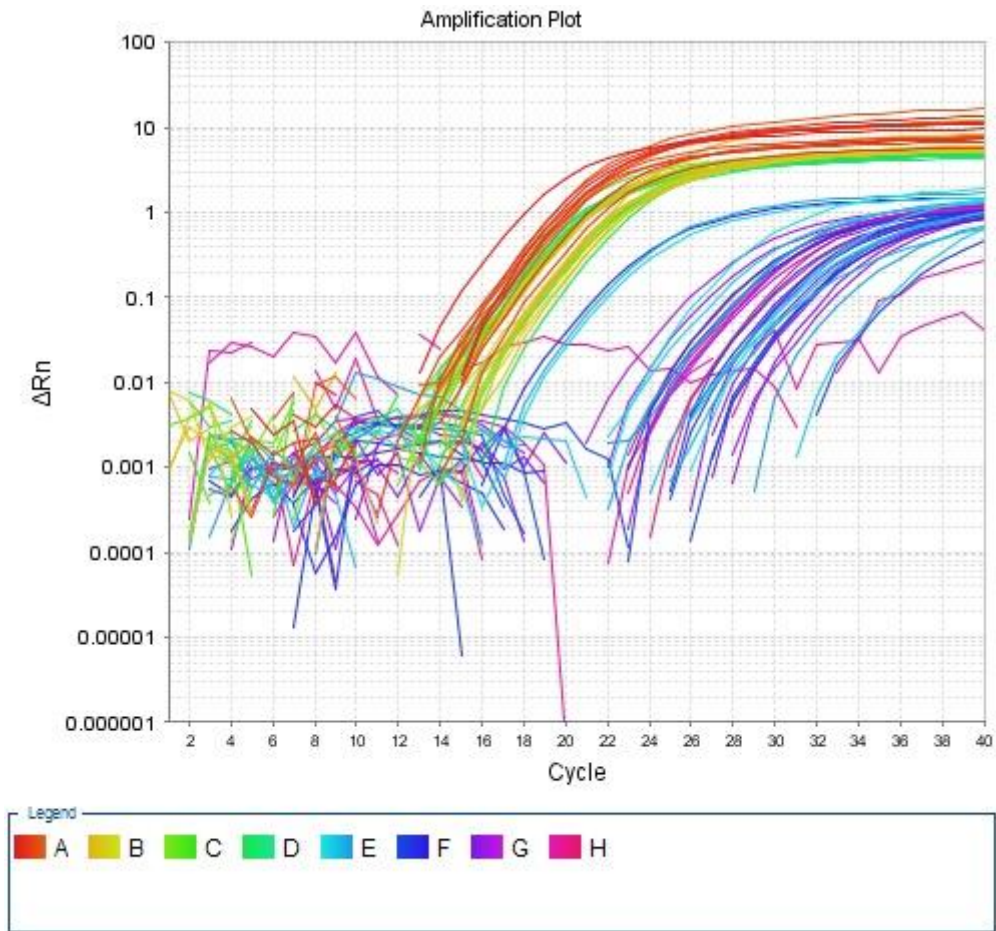
Hodnoty referenčního genu ACT jsou ve všech vzorcích téměř totožné. Co se týče výsledných hodnot Ct pro dehydrinový gen je patrné, že u zalévaných sazenic (Z1 – Z4) se hodnota Ct podstatně nemění celou dobu experimentu, drobná odchylka u vzorku Z3 je způsobena nedostupnými daty jednoho ze tří technických opakování. U nezalévaných rostlin (N1 – N4) hodnota Ct postupem času klesá. Platí, že čím je nižší hodnota Ct, tím více se ve vzorku nacházelo templátové DNA. Počáteční hodnota Ct DHN genu u nezalévaných rostlin je shodná s hodnotami zalévaných rostlin (viz tab. č. 3).

Tab. č. 3: Výsledné hodnoty Ct a dCt jednotlivých vzorků

vzorek	Ct (ACT)	Ct (DHN)	dCt	standardní chyba
N1	20,143	30,464	-10,321	1,202
N2	19,810	29,695	-9,885	1,402
N3	19,828	29,534	-9,706	0,558
N4	20,852	27,667	-6,815	0,737
Z1	21,339	31,978	-10,639	0,109
Z2	20,429	31,319	-10,890	1,330
Z3	20,925	33,331	-12,406	2,641
Z4	20,203	30,965	-10,762	1,195



Obr. č. 6: Normalizovaná relativní exprese genu DHN (chybové úsečky značí standardní chybu)



Obr. č. 7: Amplifikační křivky (křivky A – D pro aktin, křivky E – H pro dehydrin)

Z grafů (obr. č. 6 a 7) lze vyčíst stoupající hladinu dehydrinů s postupujícím hydrickým stresem u nezalévaných rostlin. Naopak u zalévaných rostlin se exprese dehydrinových genů udržuje v poměrně konstantní míře.

6 DISKUZE

V rostlinách zasažených abiotickým stresem probíhá velké množství fyziologických a morfologických změn za účelem přizpůsobení se novým nepříznivým podmínkám. Jedním z těchto mechanismů je indukce genové exprese dehydrinových genů, které pomáhají rostlině přečkat období nedostatku vody (Close, 1996). Cílem experimentu bylo analyzovat genovou expresi dehydrinových genů u topolu osiky (*Populus tremula*) v reakci na stres suchem. RT-qPCR analýza odhalila, že exprese dehydrinového genu DHN probíhala již v zalévaných rostlinách. To značí souvislost s jinými procesy v rostlině (např. ochrana před solným stresem; Mahajan et Tuteja, 2005). Hladina transkriptu genu DHN byla na počátku experimentu stejná u všech sazenic, s dále trvajícím nedostatkem vody se hladina dehydrinů zvyšovala, což potvrzuje zapojení genu DHN do procesu odolnosti vůči suchu. Významný nárůst genové exprese byl zaznamenán mezi třetím a čtvrtým týdnem. Výsledek experimentu poskytuje informaci o mechanismu, jakým rostliny fyziologicky reagují na hydrický stres.

Na výsledky by se dalo navázat v diplomové práci. Mohlo by se jednat o rozšíření zkoumaných dehydrinových genů a sledování míry jejich exprese v delším časovém horizontu, popřípadě srovnání míry genové exprese dehydrinových genů v různých rostlinných orgánech.

7 ZÁVĚR

Bakalářská práce se v rešeršní části zabývá problematikou proteinů zvaných dehydriny, kterým je přisuzována klíčová role při odolnosti rostlin vůči abiotickým stresovým faktorům (např. sucho, mráz, vysoká salinita). Další část literární rešerše pojednává o genové expresi, metodách analýzy genové exprese (PCR, Southernův přenos, Northernův přenos, čipová analýza, sekvenování DNA) se zaměřením na metodu kvantitativní polymerázové řetězové reakce RT-qPCR. Tyto metody jsou neustále zdokonalovány nebo dochází k vývoji metod nových. Zlepšení spočívá v automatizaci procesů a jednodušší analýze dat díky zapojení výpočetní techniky do procesu analýzy. Literární rešerši uzavírá kapitola osahující podrobnou charakteristiku zájmového druhu topolu osiky (*Populus tremula*).

Praktická část je zaměřena na expresi dehydrinových genů u sazenic topolu osiky v kontrolovaných podmínkách. Listy rostlin vystavených stresu suchem spolu s listy rostlin dostatečně zásobených vodou se podrobily analýze genové exprese dehydrinů. Tato analýza proběhla podle navržené a optimalizované metodiky zahrnující izolaci RNA, její reverzní transkripci do cDNA a RT-qPCR. Výsledky potvrdily přítomnost dehydrinových genů a dále postupný nárůst jejich genové exprese v závislosti na přetrvávajícím období sucha.

8 ZDROJE

ABU-ABIED, M.; GOLOMB, L.; BELAUSOV, E.; HUANG, S.; GEIGER, B.; KAM, Z.; STAIGER, C. J.; SADOT, E. Identification of plant cytoskeleton-interacting proteins by screening for actin stress fiber association in mammalian fibroblasts. *The Plant Journal*. 2006, vol. 48, no. 3, s. 367-379

ALLAGULOVA, Ch. R.; GIMALOV, F. R.; SHAKIROVA, F. M.; VAKHITOV, V. A. The Plant Dehydrins: Structure and Putative Functions. *Biochemistry (Moscow)*. 2003, vol. 68, no. 9, s. 945-951

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977, vol. 74, no. 12, s. 5350-5354

BAE, E.K.; LEE, H.; LEE, J. S.; NOH, E. W. Differential expression of a poplar SK₂-type dehydrin gene in response to various stresses. *Biochemistry and Molecular Biology reports*. 2009, vol. 42, no. 7, s. 439-443

BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. PCR Protocols. *Methods in Molecular Biology*. 2003, vol. 226, 556 s.

BLEIDORN, C. *Phylogenomics: An Introduction*. Springer International Publishing. 2017, 222 s.

BOOKOUT, A. L.; MANGELSDORF, D. J. Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nuclear Receptor Signaling*. 2003, vol. 1, no. 1, 7 s.

BUMGARNER, R. DNA microarrays: Types, Applications, and their future. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2013, vol. 101, no. 1, s. 21.1.1-21.1.11

BURIÁNEK, V.; NOVOTNÝ, P. Metodická příručka k určování domácích druhů topolů. *Lesnický průvodce*. 2016, no. 11, 35 s.

- CAMPBELL, S. A.; CLOSE, T. J.** Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *The New Phytologist*. 1997, vol. 137, no. 1, s. 61-74
- CARUSO, A.; MORABITO, D.; DELMOTTE, F.; KAHLEM, G.; CARPIN, S.** Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002, vol. 40, no. 12, s. 1033-1042
- CLOSE, T. J.** Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*. 1996, vol. 97, no. 4, s. 795-803
- ČÍŽKOVÁ, A.** Genové čipy - perspektivní nástroj molekulární biologie i moderní medicíny. *Živa*. 2005, no. 3, s. 98-99
- DAS, S.; DASH, H. R.** *Microbial Biotechnology - A Laboratory Manual for Bacterial Systems*. Springer India. 2015, 239 s.
- DESJARDINS, P.; CONCLIN, D.** NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*. 2010, vol. 45, s. 2565
- ELDHUSET, T. D.; NAGY, N. E.; VOLAŘÍK, D.; BØRJA, I.; GEBAUER, R.; YAKOVLEV, I. A.; KROKENE, P.** Drought affects tracheid structure, dehydrin expression, and above- and belowground growth in 5-year-old Norway spruce. *Plant and Soil*. 2013, vol. 366, no. 1/2, s. 305-320
- GALAU, G. A.; HUGHES, D.W.; DURE, L.** Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology: An International Journal on Molecular Biology, Molecular Genetics and Biochemistry*. 1986, vol. 7, no. 3, s. 155-170
- GINZINGER, D. G.** Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*. 2002, vol. 30, no. 6, s. 503-512
- GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D., MCCOMBIE, W. R.** Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. 2016, vol. 17, no. 6, s. 333-351
- GUPTA, V.; SENGUPTA, M.; PRAKASH, J.; TRIPATHY, B. C.** *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*. Springer Singapore. 2017, 527 s.

- GUY, C.L.** Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 1990, vol. 41, s. 187-223
- HARA, M.** The multifunctionality of dehydrins: An overview. *Plant Signaling & Behavior*. 2010, vol. 5, no. 5, s. 503-508
- HARA, M.; ENDO, T.; KAMIYA, K.; KAMEYAMA, A.** The role of hydrophobic amino acids of K-segments in the cryoprotection of lactate dehydrogenase by dehydrins. *Journal of Plant Physiology*. 2017, vol. 210, s. 18-23
- HEJNÝ, S.; SLAVÍK, B.** *Květena České republiky 2*. Praha: Academia, 1990, 544 s.
- HUGHES, S. L.; SCHAT, V.; MALCOLMSON, J.; HOGARTH, K. A.; MARTYNOWICZ, D. M.; PATEL, S. N.; GRAETHER, S. P.; TRALMAN-BAKER, E.** The Importance of Size and Disorder in the Cryoprotective Effects of Dehydrins. *Plant Physiology*. 2013, vol. 163, no. 3, s. 1376-1386
- CHAKRABORTEE, S.; TRIPATHI, R.; WATSON, M.; SCHIERLE, G. S.; KURNIAWAN, D. P.; KAMINSKI, C. F.; WISE M. J.; TUNNACLIFFE, A.** Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Molecular Biosystems*. 2012, vol. 8, no. 1, s. 210-219
- KAUR, G.; ASTHIR, B.** Molecular responses to drought stress in plants. *Biologia Plantarum*. 2017, vol. 61, no. 2, s. 201-209
- KIM, E. Ch.; LEE, H. S.; CHOI, D. W.** Sequence variability and expression pattern of the dehydrin gene family in *Populus alba* x *P. tremula* var. *glandulosa*. *Plant Omics*. 2012, vol. 5, no. 2, s. 122-127
- KJELLEN, T. D.; YAKOVLEV, I. A.; FOSSDAL, C. G.; STRIMBECK, G. R.** Dehydrin accumulation and extreme low-temperature tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*). *Tree Physiology*. 2013, vol. 33, no. 12, s. 1354-1366
- KOAG, M.; FENTON, R. D.; CLOSE, T. J.; WILKENS, S.** The binding of Maize DHN1 to Lipid Vesicles. Gain of Structure and Lipid Specificity. *Plant Physiology*. 2003, vol. 131, no. 1, s. 309-316

- KOČÁREK, E.** *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Praha: Scientia, 2008. 211 s.
- KOLÍSKO, M.** Moderní metody sekvenování DNA. *Živa*. 2017, no. 3, s. LXXIII-LXXVI
- KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I. T.** The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum*. 2007, vol. 51, no. 4, s. 601-617
- KOVACS, D.; KALMAR, E.; TOROK, Z.; TOMPA, P.** Chaperone Activity of ERD10 and ERD14, Two Disordered Stress-Related Plant Proteins. *Plant Physiology*. 2008, vol. 147, no. 1, s. 381-390
- KU, J. J.; KIM, Y. Y.** Comparative Expression of Stress Related Genes in Response to Salt-stressed Aspen by Real-time RT-PCR. *Korean Journal of Plant Resources*. 2008, vol. 21, no. 3, s. 210-215
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N.** Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005, vol. 444, no. 2, s. 139-158
- MARTINÍK, A.; ADAMEC, Z.; HOUŠKA, J.** Production and soil restoration effect of pioneer tree species in a region of allochthonous Norway spruce dieback. *Journal of Forest Science*. 2017, vol. 63, no. 1, s. 34-44
- MAXAM, A. M.; GILBERT, W.** A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977, vol. 74, no. 2, s. 560-564
- MUSIL, I.; MÖLLEROVÁ, J.** *Listnaté dřeviny: Přehled dřevin v rámci systému rostlin krytosemenných (Lesnická dendrologie 2)*. Praha: ČZU FLD, 2005, 216 s.
- MYKING, T.; BÖHLER, F.; AUSTRHEIM, G.; SOLBERG, E. J.** Life history strategies of aspen (*Populus tremula L.*) and browsing effects: a literature review. *Forestry*. 2011, vol. 84, no. 1, s. 61-71
- NIKULA, S.; VAPAAVUORI, E.; MANNINEN, S.** Urbanization-related changes in European aspen (*Populus tremula L.*): Leaf traits and litter decomposition. *Environmental pollution*. 2010, vol. 158, no. 6, s. 2132-2142

- NYLANDER, M.; SVENSSON, J.; PALVA, E. T.; WELIN, B. V.** Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology: An International Journal on Molecular Biology, Molecular Genetics and Biochemistry*. 2001, vol. 45, no. 3, s. 263-279
- OLIEN, C. R.; SMITH, M. N.** Ice Adhesions in Relation to Freeze Stress. *Plant Physiology*. 1977, vol. 60, no. 4, s. 499-503
- PAGE, R. B.; STROMBERG, A. J.** Linear Methods for Analysis and Quality Control of Relative Expression Ratios from Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Experiments. *The Scientific World Journal*. 2011, vol. 11, s. 1383-1393
- REYES, J. L.; CAMPOS, F.; COVARRUBIAS, A. A.; WEI, H; ARORA, R.; YANG, Y.; KARLSON, D. T.** Functional dissection of Hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant, Cell and Environment*. 2008, vol. 31, no. 12, s. 1781-1790
- RORAT, T.** Plant dehydrins - Tissue location, structure and function. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2006, vol. 11, no. 4, s. 536-556
- SANGER, F.; COULSON, A. R.** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 1975, vol. 94, no. 3, s. 441-448
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977, vol. 74, no. 12, s. 5463-5467
- SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O.** Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*. 1995, vol. 270, no. 5235, s. 467-470
- SIVADASAN, U.; CHENHAO, C.; NISSINEN, K.; RANDRIAMANANA, T.; NYBAKKEN, L.; JULKUNEN-TIITTO, R.** Growth and defence of aspen (*Populus tremula*) after three seasons under elevated temperature and ultraviolet-B radiation. *Canadian Journal Of Forest Research*. 2018, vol. 48, no. 6, s. 629-641

- SIMMONS, M.; SNUSTAD, D. J.; RELICHOVÁ, J.** *Genetika*. 2. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2017. 844 s.
- SOUČEK, J.; ŠPULÁK, O.; LEUGNER, J.** Vývoj porostu s dominancí břízy a osiky na kalamitní holině. *Zprávy lesnického výzkumu*. 2019, vol. 64, no. 4, s. 191-197
- SOUTHERN, E. M.** Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. 1975, vol. 98, no. 3, s. 503-517
- SVENSSON, J.; PALVA, E. T.; WELIN, B.** Purification of Recombinant Arabidopsis Thaliana Dehydrins by Metal Ion Affinity Chromatography. *Protein Expression and Purification*. 2000, vol. 20, no. 2, s. 169-178
- THERMO FISHER Scientific**, Real-time PCR handbook, 2014
- THERMO FISHER Scientific**, The Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, product information, 2016
- THERMO FISHER Scientific**, Thermo Scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit, product information, 2014
- ÚRADNÍČEK, L.; MADĚRA, P. et al.** *Dřeviny České republiky*. Písek: Matice lesnická, 2001, 333 s.
- VELASCO-CONDE, T.; YAKOVLEV, I.; MAJADA, J. P.; ARANDA, I.; JOHNSEN, Ø.** Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response. *Tree Genetics & Genomes*. 2012, vol. 8, no. 5, s. 957-973
- WALKER, J. M.; RAPLEY, R.** *Molecular Biomethods Handbook*. 2008, 1124 s.
- WISNIEWSKI, M.; WEBB, R.; BALSAMO, R.; CLOSE, T. J.; YU, X.-M.; GRIFFITH, M.** Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum*. 1999, vol. 105, no. 4, s. 600-608