

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Zuzana Horáková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Analýza exprese vybraných genů využitelných jako markery oxidativního poškození u rostlin

Bakalářská práce

Zuzana Horáková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: Mgr. Jan Humplík, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Zuzana HORÁKOVÁ
Osobní číslo: R19830
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Analýza exprese vybraných genů využitelných jako markery oxidativního poškození u rostlin
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Vypracování literární rešerše k tématu s přihlédnutím k využití vybraných genů jakožto kvantitativních markerů abiotických stresu u rostlin. Práce bude zaměřena na hospodářsky využitelné rostliny (pšenice, rajče jedlé atp.). V praktické části se studentka bude věnovat pěstování rostlin za působení abiotických stresů, odběrů vzorků rostlinných tkání a extrakci nukleových kyselin, RT-qPCR a stanovení míry exprese. Studentka provede expresní analýzu a interpretaci výsledků.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Taiz, Lincoln, et al. Plant physiology and development. No. Ed. 6. Sinauer Associates Incorporated, 2015.

Dudziak, K., Zapalska, M., Börner, A., Szczerba, H., Kowalczyk, K., & Nowak, M. (2019). Analysis of wheat gene expression related to the oxidative stress response and signal transduction under short-term osmotic stress. *Scientific reports*, 9(1), 1-14.

Waszczak, Cezary, Melanie Carmody, and Jaakko Kangasjärvi. „Reactive oxygen species in plant signaling.“ *Annual review of plant biology* 69 (2018): 209-236.

Choudhury, Feroza K., et al. „Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination.“ *The Plant Journal* 90.5 (2017): 856-867.

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Jan Humplík, Ph.D.
Centrum regionu Haná

Datum zadání bakalářské práce: 26. dubna 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

UNIVERZITA PALACKEHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
L.S. Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holič
tel.: +420 585 634 901

28-04-2021

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 27. dubna 2021

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Zuzana Horáková
Název práce:	Analýza exprese vybraných genů využitelných jako markery oxidativního poškození u rostlin
Typ práce:	bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Jan Humplík, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2022
Klíčová slova:	reaktivní formy kyslíku, ROS, oxidativní poškození, abiotický stres, analýza genové exprese, stres suchem, antioxidační obranný mechanismus
Počet stran:	44
Počet příloh:	0
Jazyk:	čeština

SOUHRN

Oxidativní poškození u rostlin úzce souvisí zejména s nepříznivými vlivy vnějšího prostředí, které významně ohrožují rostlinný organismus. Stresový faktor působící na rostlinu vyvolává kaskádu reakcí, při kterých dochází k nadprodukci toxických metabolitů, jako jsou například reaktivní formy kyslíku (ROS). Rostlinná pletiva jsou vybavena antioxidačním obranným mechanismem, který zajišťuje eliminaci toxických ROS a pokles akumulace metabolitů. Bakalářská práce se zaměřuje na abiotický stres a s ním spojenou odpověď na nepříznivý stav.

Cílem práce bylo ověření citlivosti vybraných ROS-responzivních genů jakožto markerů oxidativního poškození u rostlin a jejich reakce na indukovaný stresový faktor. Výchozím bodem práce byla studie Dudziak a kol. (2019), která se poprvé zabývala expresní analýzou ROS-responzivních genů u pšenice. Výsledná data této bakalářské práce zahrnují optimalizační test pro výběr vhodného pěstebního substrátu, ověření pracovního protokolu využívajícího komerční kit pro zjednodušení rutinní práce, ověření citlivosti studovaných genů na připravené stresové podmínky následované analýzou genové exprese.

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Zuzana Horáková
Title:	Analysis of gene expression in selected oxidative stress marker genes in plants
Type of thesis:	bachelor
Department:	Department of Cell biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor:	Mgr. Jan Humplík, Ph.D.
The year of presentation:	2022
Keywords:	reactive oxygen species, ROS, oxidative damage, abiotic stress, gene expression analysis, drought stress, antioxidant defense system
Number of pages:	44
Number of appendices:	0
Language:	Czech

SUMMARY

Plant oxidation damage is closely and mainly related to adverse impacts of outer environment that significantly endanger plant organism. Stress factor that affects a plant causes cascade of reactions which creates overproduction of toxic metabolites such as reactive forms of oxygen. Plant tissues are equipped with antioxidation defensive mechanism that ensures an elimination of the toxic oxygen forms and reduction of metabolite accumulation. This bachelor thesis is focused on abiotic stress and response to adverse environment that connects with it.

The goal of this thesis is to test the sensitivity of selected reactive oxygen forms and responsive genes as markers of plant oxidation damage and their reaction to induced stress factor. Default source of this study was a study made by Dudziak et al. (2019) which is the first one to perform express analysis of reactive oxygen responsive genes in wheat. The results of this bachelor thesis include an optimization test used for right growing substrate selection, verification of used work protocol which applies commercial kit for routine work simplification, verification of studied genes sensitivity for prepared stress conditions followed by gene expression analysis.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucího práce
Mgr. Jana Humplíka, Ph.D. a uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Zuzana Horáková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Janu Humplíkovi, Ph.D. za jeho odborný dohled a vedení, pomoc, cenné rady, ochotu, přátelský přístup a v neposlední řadě čas a trpělivost, který mi během této práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Tereze Miksteinové za poskytnuté rady a pomocnou ruku během práce v laboratoři.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	OXIDATIVNÍ POŠKOZENÍ	3
3.1.1	<i>Reaktivní formy kyslíku</i>	3
3.1.2	<i>ROS jako signální molekula</i>	5
3.2	ABIOTICKÝ STRES A REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	6
3.2.1	<i>Abiotický stres – sucho</i>	8
3.3	OBRANNÝ SYTÉM ROSTLIN PROTI STRESU	9
3.3.1	<i>Vybrané geny související s reakcí rostlin na ROS</i>	11
4	MATERIÁL A METODY	13
4.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	13
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, SOUPRAVY A ROZTOKY	13
4.3	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ	14
4.4	POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ METODY	15
4.4.1	<i>Test citlivosti primerů na vadnoucích rostlinách</i>	15
4.4.2	<i>Založení experimentu ve skleníku a optimalizace testu na stres nedostatkem půdní vláhy pro parametr výška porostu</i>	22
4.4.3	<i>Odběr vzorků vypěstované pšenice v kontrolovaných podmínkách při nedostatku půdní vláhy</i>	23
4.4.4	<i>Vyizolování RNA, syntéza cDNA a následná analýza exprese vybraných genů pomocí kvantitativní PCR ze vzorků pšenice</i>	24
5	VÝSLEDKY	26
5.1	ANALÝZA EXPRESE GENŮ ZAPOJENÝCH DO REAKCE NA OXIDATIVNÍ POŠKOZENÍ NA Odstřížených ROSTLINÁCH	26
5.2	OPTIMALIZACE <i>IN VIVO</i> TESTU NA STRES PŠENICE NEDOSTATKEM PŮDNÍ VLÁHY POMOCÍ 3D LASEROVÉHO SKENERU	28

5.3	ANALÝZA EXPRESE GENŮ ZAPOJENÝCH DO REAKCE OXIDATIVNÍHO POŠKOZENÍ ZPŮSOBENÉ NEDOSTATKEM PŮDNÍ VLÁHY V PĚSTEBNÍCH KONTEJNERECH	34
6	DISKUZE.....	38
7	ZÁVĚR.....	41
8	LITERATURA	42

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Typy reaktivních forem kyslíku v rostlinách. Upraveno dle Hasanuzzaman a kol. (2020b).	4
Obrázek 2: Role reaktivních druhů kyslíku (ROS) v aklimatizaci na abiotický stres. Upraveno dle Choudhury a kol. (2017).....	7
Obrázek 3: Mechanismus poškození rostlin suchem v závislosti na míře nedostatku vody. Upraveno dle Kúdela a kol. (2013).	8
Obrázek 4: Detoxifikační dráha vychytávání reaktivních forem kyslíku (ROS) antioxidantním obranným systémem u rostlin. Upraveno dle Kapoor a kol. (2019).....	9
Obrázek 5: Čelní pohled na 3D sken rostlin pšenice vypěstované v kontrolních podmínkách (80 % RWC) a ve stresu nedostatkem půdní vláhy (60 % RWC).	23
Obrázek 6: Pipetovací schéma na 96ti jamkové destičce při expresi genů (vždy jedna pipetovací destička pro jeden pár primerů).....	25
Obrázek 7: Exprese genu <i>APX</i> v nadzemní části rostlin pšenice z pole. Sloupce znázorňují geometrický průměr exprese ze tří technických opakování, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.	26
Obrázek 8: Exprese genu <i>CAT</i> v nadzemní části rostlin pšenice z pole. Sloupce znázorňují geometrický průměr exprese ze tří technických opakování, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.	27
Obrázek 9: Exprese genu <i>P5CR</i> v nadzemní části rostlin pšenice z pole. Sloupce znázorňují geometrický průměr exprese ze tří technických opakování, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.	27
Obrázek 10: Exprese genu <i>P5CS</i> v nadzemní části rostlin pšenice z pole. Sloupce znázorňují geometrický průměr exprese ze tří technických opakování, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.	28
Obrázek 12: Graf závislosti obsahu digitální biomasy na stresované (RWC 60) a nestresované (RWC 80) pšenici <i>Triticum aestivum</i> v souvislosti s časovou osou experimentu. Body znázorňují průměrnou hodnotu parametru ve třech biologických opakováních, chybové úsečky pak hodnotu standardní chyby. Šipka označuje DEN 1, první den odběru materiálu k hodnocení exprese ROS genů.....	30
Obrázek 11: Graf závislosti maximální výšky porostu na stresované (RWC 60) a nestresované (RWC 80) pšenici <i>Triticum aestivum</i> v souvislosti s časovou osou experimentu. Body znázorňují průměrnou hodnotu parametru ve třech biologických opakováních, chybové úsečky pak hodnotu standardní chyby. Šipka označuje DEN 1, první den odběru materiálu k hodnocení exprese ROS genů.....	30

Obrázek 13: Vizuální porovnání stresované (60A3) pšenice s viditelnými projevy vadnutí s kontrolní (80E3) rostlinou pšenice. Směs substrátu č. 3. Vlevo – Den 3, vpravo – Den 4.....	31
Obrázek 15: Vizuální porovnání stresované (60D1) pšenice s viditelnými projevy vadnutí s kontrolní (80B1) rostlinou pšenice (Den 4). Směs substrátu č. 1.	32
Obrázek 14: Vizuální porovnání stresované (60D1) pšenice bez viditelných projevů vadnutí s kontrolní (80B1) rostlinou pšenice. Směs substrátu č. 1. Vlevo – Den 1, vpravo – Den 3.	32
Obrázek 16: Vizuální porovnání stresované (60D1/A3) pšenice bez viditelných projevů vadnutí s kontrolní (80B1/E3) rostlinou pšenice. Vlevo – směs substrátu č. 1, vpravo – směs substrátu č. 3. ..	32
Obrázek 17: Expresse genu <i>APX</i> na stresované (zelená) a kontrolní (modrá) rostlině pěstované za kontrolovaných podmínek. Sloupce znázorňují relativní exprese tří technických opakování pro každé z biologických opakování (A, B, C) z jednotlivých dnů odběru, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.	34
Obrázek 18: Expresse genu <i>CAT</i> na stresované (zelená) a kontrolní (modrá) rostlině pěstované za kontrolovaných podmínek. Sloupce znázorňují relativní exprese tří technických opakování pro každé z biologických opakování (A, B, C) z jednotlivých dnů odběru, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.	35
Obrázek 19: Expresse genu <i>P5CR</i> na stresované (zelená) a kontrolní (modrá) rostlině pěstované za kontrolovaných podmínek. Sloupce znázorňují relativní exprese tří technických opakování pro každé z biologických opakování (A, B, C) z jednotlivých dnů odběru, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.	36
Obrázek 20: Expresse genu <i>P5CS</i> na stresované (zelená) a kontrolní (modrá) rostlině pěstované za kontrolovaných podmínek. Sloupce znázorňují relativní exprese tří technických opakování pro každé z biologických opakování (A, B, C) z jednotlivých dnů odběru, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.	37

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení DNase I reakční směsi (DNase I Reaction mixture) a objemy jednotlivých složek pro 1 vzorek.....	16
Tabulka 2: Složení reakční směsi pro přečištění RNA a objemy jednotlivých složek pro 1 vzorek	17
Tabulka 3: Složení reakční směsi č. 1 pro syntézu cDNA a objemy jednotlivých složek pro 1 vzorek	18
Tabulka 4: Časový a teplotní harmonogram programu spuštěného v termocycleru pro syntézu cDNA	19
Tabulka 5: Složení reakční směsi č. 2 pro syntézu cDNA a objemy jednotlivých složek pro 1 vzorek	19
Tabulka 6: Složení reakční směsi pro kvantitativní PCR a objemy jednotlivých složek pro 1 vzorek	20
Tabulka 7: Časový a teplotní harmonogram programu spuštěného v termocycleru pro optimalizaci primerů a expresi studovaných genů	20
Tabulka 8: Sekvence a účinnost primerů studovaných genů	21
Tabulka 9: Složení směsí substrátů, poměry jednotlivých složek směsí a váha směsi do květináče....	22
Tabulka 10: Souhrnná tabulka znázorňující váhu, na kterou se kontrolní vzorky pšenice (80% RWC) zalévaly vodou.....	24
Tabulka 11: Souhrnná tabulka zaznamenaných hodnot vážení květináčů s rostoucí pšenicí vždy před odběrem vzorku (vysvětlení ID – číslo 80 a 60 odpovídá míře zálivky, písmeno udává biologické opakování, číslo 1 – 3 znamená typ směsi substrátu).....	29

1 ÚVOD

Oxidativní poškození úzce souvisí s produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS), zejména v případě indukce stresu a signalizačních drah s ním spojených. ROS jsou důležité v reakci na abiotické stresy a musejí být vhodně regulovány, aby se eliminovala jejich toxicita (Castro a kol., 2021). Hlavním cílem praktické části bakalářské práce byla analýza genové exprese vybraných genů u pšenice (*Triticum aestivum*), které jsou spojeny s oxidativním poškozením u rostlin, za účelem detekce nastartování obranných mechanismů proti ROS u rostlin stresovaných nedostatkem půdní vláhy. Tato práce je dílčí součástí vyvíjeného portfolia testů pro hodnocení antistresových účinků přírodních látek a jejich derivátů syntetizovaných na katedře Chemické biologie, PřF UP v Olomouci. Jelikož je známo, že například polyfenoly mají významné antioxidační a antistresové účinky (Zálešák a kol., 2019), lze se oprávněně domnívat, že by mohly ovlivňovat i signální dráhy spouštějící expresi vybraných *ROS-scavenging* genů (ROS-responzivních genů). Pokud tomu tak je, bylo by možné navrhnout a otestovat molekulárně-biologický test hodnotící čistě indukci exprese vybraných genů pomocí testovaných látek, což by umožnilo relativně snadnou a rychlou selekci potenciálně nejúčinnějších antioxidantů pro použití v rostlinné výrobě. Předtím než bude možno tuto hypotézu potvrdit či vyvrátit, je nezbytné vyvinout metodický postup pro hodnocení exprese zvolených ROS genů u některé z hospodářsky významných rostlin. Za tímto účelem jsme využili studie Dudziak a kol. (2019), která se poprvé zabývala expresní analýzou ROS genů u pšenice. Tuto práci jsme si vzali jako podklad a pokusili se přenést a modifikovat některé z popsaných metod do našich podmínek. Bylo nezbytné otestovat popsané primery, jejich funkčnost a zejména citlivost hodnocených genů vůči stresu v krátkodobém i dlouhodobém časovém horizontu a v námi definovaných podmínkách růstu experimentálních rostlin. Výsledky tohoto testování jsou součástí předkládané práce.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce je vypracování literární rešerše na téma abiotický stres a reaktivní formy kyslíku s přihlédnutím k využití vybraných genů jakožto kvantitativních markerů oxidativního poškození u rostlin.

Cíle praktické části práce lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Příprava standardizovaného postupu pro pěstování pšenice ve stresových podmínkách.
- 2) Návrh protokolu pro měření exprese vybraných ROS-responzivních genů u pšenice.
- 3) Měření exprese vybraných ROS-responzivních genů v rostlinách pěstovaných ve standardizovaných podmínkách.
- 4) Hodnocení citlivosti jednotlivých ROS-responzivních genů na stres v standardizovaných podmínkách.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Oxidativní poškození

Oxidativní poškození u rostlin je způsobeno zejména nepříznivými vlivy vnějšího prostředí, které významně ohrožují rostlinný organismus. V závislosti na oxidativním poškození může docházet k nadprodukci toxických metabolitů a k oxidativnímu stresu. Stres u rostlin lze obecně definovat jako nepříznivý stav, který je vyvolán působením činitele, tzv. stresoru. U rostlin se setkáme se dvěma typy stresu – biotický a abiotický stres. Biotický stres je spojován s patogenními činiteli, kteří způsobují poškození rostliny. Do této skupiny spadá například stres vyvolaný mykoplazmami, viry, plísněmi či bakteriemi, stejně tak jako stres způsobený napadením hmyzími či jinými predátory. V případě abiotického (environmentálního) stresu se jedná o fyzikální nebo chemické faktory působící v bezprostředním kontaktu. Mezi základní stresory zde patří nedostatek/nadbytek světla a vody, mechanické poškození nebo stres vyvolaný nízkou či vysokou teplotou (Müllerová a kol., 2014). Protože rostliny žijí přisedlým způsobem života, nemohou se vyhnout abiotickému stresu pouhým přesunem do příznivějšího prostředí. Místo toho si rostliny vyvinuly schopnost kompenzovat stres změnou fyziologických a vývojových procesů k udržení růstu a reprodukce (Taiz a kol., 2018).

Ačkoliv navenek má stres u rostlin mnoho příčin, vnitřní mechanismy poškození rostlin jsou podobné u různých typů stresorů. Jednou z nejběžnějších skupin toxických meziproductů produkovaných působením stresoru jsou reaktivní formy kyslíku (ROS), což jsou vysoce reaktivní činitele ohrožující základní životní funkce organismu. Jsou schopny rychle reagovat a oxidovat širokou škálu buněčných složek, včetně proteinů, nukleových kyselin a lipidů (Taiz a kol., 2018). V rostlinách ROS však hrají dvojí roli. V první řadě jsou brány jako negativní toxické vedlejší produkty metabolismu poškozující fyziologické procesy rostlin, avšak skrze druhý úhel pohledu jsou vnímány jako signální molekuly nezbytné pro mnoho biologických procesů. Pokud hladina ROS není kontrolována obrannými mechanismy rostlin, koncentrace reaktivních činitelů naroste a může způsobit oxidativní poškození. Tento proces oxidačního stresu může vést až k oxidativní destrukci buňky a smrti celého organismu (Choudhury a kol., 2017). Tvorba musí být aktivně vyvažována procesy neutralizace ROS, tak aby nedocházelo k oxidativnímu poškození, k čemuž slouží řada obranných mechanismů – enzymů (Castro a kol., 2021).

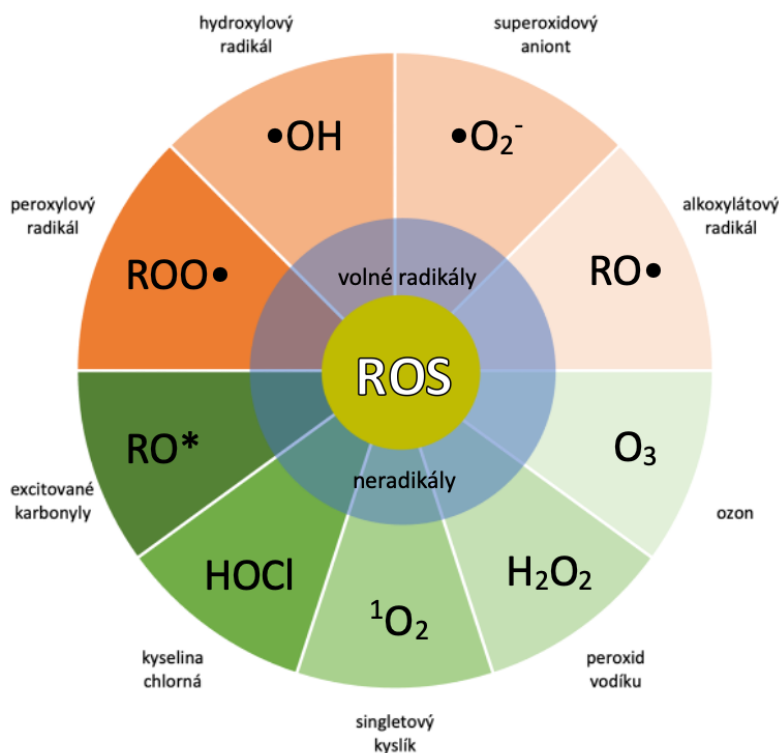
3.1.1 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS, *Reactive Oxygen Species*) jsou částečně redukované nebo excitované formy molekulového kyslíku O₂. ROS můžeme definovat jako molekuly obsahující kyslík, které vykazují vyšší chemickou reaktivitu než dvouatomární forma kyslíku O₂. Existují různé formy reaktivního kyslíku. V rostlinách se vyskytují převážně tyto formy: singletový kyslík ¹O₂, superoxidový

anion $\bullet\text{O}_2^-$, peroxid vodíku H_2O_2 a hydroxylový radikál $\bullet\text{OH}$ (Waszczak a kol., 2018). Molekuly, které obsahují tzv. volný radikál, jsou díky volnému elektronu ve valenční vrstvě elektronového obalu velice aktivní, a právě zásluhou volného radikálu vysoce reaktivní. Na rozdíl od atmosférického kyslíku jsou ROS schopny neomezené oxidace a mohou spustit autokatalytický proces membránové oxidace, který může mít za následek degradaci organel a plazmatické membrány a nakonec i buněčnou smrt. Přestože ustálenou úroveň ROS v buňce mohou rostliny používat ke sledování intracelulární úrovně stresu, musí být tato hladina reaktivních forem kyslíku přísně kontrolována, protože nadměrná akumulace ROS může vést k cytotoxickým vlastnostem sloučenin (Mittler, 2002; Taiz a kol., 2018). ROS byly dříve primárně považovány za vedlejší produkty anaerobního metabolismu, ale dnes se bere v potaz i jejich role signálních molekul (Choudhury a kol., 2017).

3.1.1.1 Typy ROS

Nejběžnější formy ROS v rostlinných buňkách představuje superoxidový aniont ($\bullet\text{O}_2^-$), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$). Mezi buněčné ROS spadají formy s volnými radikály i neradikálové sloučeniny (Obrázek 1). Do skupiny volných radikálů se řadí superoxidový aniont ($\bullet\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$), alkoxylový radikál ($\text{RO}\bullet$) či peroxylový radikál ($\text{ROO}\bullet$) a mezi neradikály náleží peroxid vodíku (H_2O_2), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) a ozón (O_3). Dalšími neradikálovými sloučeninami, které se v rostlinách nacházejí, je kyselina chlorná (HOCl) nebo excitované karbonyly (RO^*) (Hasanuzzaman a kol., 2020a).



Obrázek 1: Typy reaktivních forem kyslíku v rostlinách. Upraveno dle Hasanuzzaman a kol. (2020b).

3.1.1.2 Produkce ROS

Primárními buněčnými kompartmenty a organelami, kde jsou ROS produkovány, jsou mitochondrie, chloroplasty, peroxisomy, plazmatická membrána i mezibuněčné prostory (Hasanuzzaman a kol., 2020a). Různé buněčné kompartmenty mají svou vlastní specifickou kapacitu pro tvorbu ROS a zároveň i detoxifikační kapacitu, která je důležitá pro regulaci vychytávání ROS a udržování ROS pod prahovou úrovní. Udržení hladiny reaktivních forem kyslíku je nezbytné pro ochranu buněčných komponent nebo iniciaci signální kaskády (Hasanuzzaman a kol., 2020b). ROS vznikají v buňce jako důsledek úniku elektronů během fotosyntézy a dýchání (Kao, 2017; Nadarajah, 2020). Některá místa produkce reaktivních forem kyslíku jsou svými paralelními reakcemi zapojeny do normálního metabolismu (například fotosyntéza a dýchání). ROS jsou v tomto případě nevyhnutelnými vedlejšími produkty aerobního metabolismu (Mittler, 2002).

Chloroplastická produkce ROS

Chloroplasty jsou v rostlinách jedním z hlavních míst produkce ROS. Tvorba ROS je zde úzce spojena s fotosyntetickými reakcemi závislými na světle a interakci chlorofylu. Za produkci reaktivních forem kyslíku je zde zodpovědný zejména elektronový transportní řetězec a vznikající triplet chlorofylu. Triplet chlorofylu je škodlivý excitovaný stav, který snadno reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku vysoce reaktivního singletového kyslíku $^1\text{O}_2$ (Ballottari a kol., 2013). Fotosystém I produkuje středně reaktivní superoxidový aniont $\bullet\text{O}_2^-$, který poté superoxid dismutáza (SOD) přeměňuje na H_2O_2 (Waszczak a kol., 2018; Hasanuzzaman a kol., 2020b).

Mitochondriální produkce ROS

Ve fotosyntetické tkáni je mitochondriální část produkce ROS relativně nízká vzhledem k celkové buněčné produkci ROS. U nezelených rostlinných orgánů (hlavně v kořenech) jsou naopak mitochondrie hlavním místem generování ROS. Tvorba ROS je úzce spojena s mitochondriálním elektronovým transportním řetězcem. V mitochondriích dochází k interakci elektronů s O_2 za vzniku ROS. Při abiotických stresech se únikem elektronů z mitochondriálních komplexů hromadí nadměrné množství ROS a dochází k produkci $\bullet\text{O}_2^-$, který je později katalyzován SOD a přeměněn na H_2O_2 (Waszczak a kol., 2018; Hasanuzzaman a kol., 2020b).

3.1.2 ROS jako signální molekula

Reaktivní formy kyslíku hrají významnou roli v buněčných procesech jako signální molekuly (Choudhury a kol., 2017). Za normálních podmínek existuje rovnováha mezi produkcí a vychytáváním ROS působením složek antioxidačního obranného systému v rostlinách. Tvorba ROS na nižší úrovni během normálních růstových podmínek se podílí na klíčových signalizačních procesech pro navození

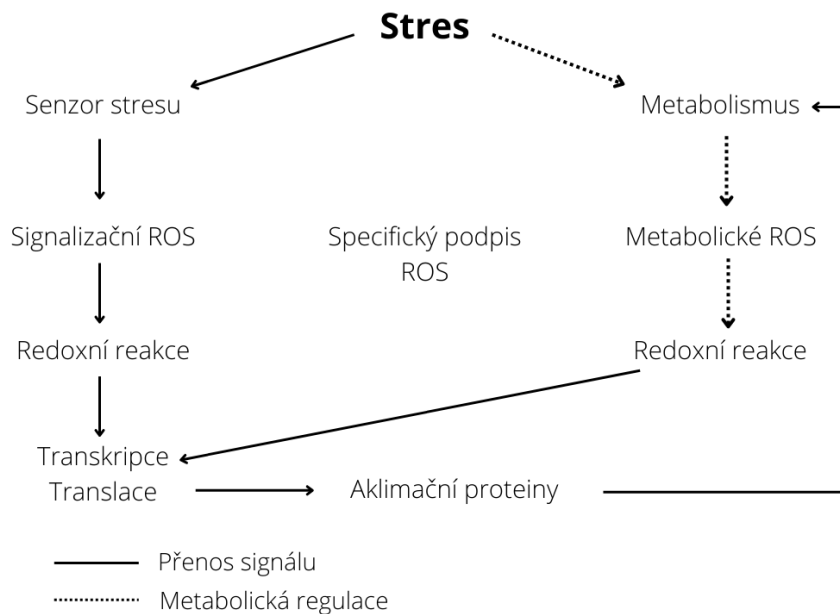
pozitivní reakce v antioxidačních obranných systémech a biologických procesech (Hasanuzzaman a kol., 2020b). Díky tomuto faktu řídí ROS mnoho aspektů vzájemného působení mezi rostlinou a prostředím, také růstem a vývojem. Informace o zvýšených koncentracích reaktivních forem kyslíku nebo pozměněné redoxní rovnováze v závislosti na aktivitě systémů, které zachycují ROS, se rychle přenáší do jádra a spouští adaptační či aklimatizační mechanismy buněk (Waszczak a kol., 2018).

3.2 Abiotický stres a reaktivní formy kyslíku

Abiotický (environmentální) stres vyvolává v rostlinných buňkách nadprodukcí reaktivních forem kyslíku, což má za důsledek nadměrnou akumulaci ROS v buněčných kompartmentech (Hasanuzzaman a kol., 2020a). Dochází ke změnám v anatomii a fyziologii a je potřeba vyššího příjmu energie. Spotřeba energie se zvyšuje v důsledku posunu v buněčném metabolismu k udržení buněčné homeostázy. Rostliny mohou na stres reagovat buď aklimatizací, tj. přizpůsobením se novým podmínkám a dosažením homeostázy, nebo adaptacemi, které zahrnují trvalé změny zavedené pro lepší odolnost vůči stresu (Pandey a kol., 2017). Ve velké míře může dojít k buněčné dysfunkci a smrti rostliny (Hasanuzzaman a kol., 2020a).

Do kategorie stresů narušujících buněčnou homeostázu působením nadměrné akumulace ROS spadá například stres ze sucha/vysychání, zasolení, ochlazení, nedostatku živin, dále stresy způsobené tepelným šokem, těžkými kovy, ultrafialovým zářením, látkami znečišťujícími ovzduší (př. ozón, oxid siřičitý), patogenem, a mechanický stres. Produkce ROS během těchto stresů je výsledkem fotorespirace, fotosyntetického aparátu nebo mitochondriálního dýchání. Kromě toho bylo prokázáno, že patogeny anebo environmentální stresy (např. sucho nebo osmotický stres) spouštějí aktivní produkci reaktivních forem kyslíku NADPH oxidázami (Mittler, 2002).

Choudhury a kol. (2017) ve své studii popisuje, že metabolické a signalizační ROS mezi sebou navzájem interagují a tvoří tzv. podpis ROS, který je specifický pro buněčné oddíly a typ abiotického stresu a řídí aklimatizační procesy rostliny na stres prostřednictvím redoxních reakcí, které jsou zapojeny do regulace transkripce a translace stresových aklimatizačních proteinů a enzymů (Obrázek 2). Metabolické ROS jsou produkovány v důsledku narušení metabolické aktivity. Signalizační ROS zahrnují reaktivní formy kyslíku produkované za účelem signalizace v rámci reakce na abiotický stres.



Obrázek 2: Role reaktivních druhů kyslíku (ROS) v aklimatizaci na abiotický stres. Upraveno dle Choudhury a kol. (2017).

Rostliny používají různé mechanismy k vnímání enviromentálního stresu. Abiotický stres narušuje nebo mění mnoho fyziologických procesů v rostlině ovlivněním stability proteinu, RNA nebo ovlivněním transportu iontů. Jakékoli z těchto primárních narušení by mohlo signalizovat rostlině, že došlo ke změně podmínek prostředí a že je čas reagovat na tyto podněty změnou dosavadních cest nebo aktivací cest, které zahrnují reakce na stres. Dle Taiz a kol. (2018) lze rozlišit alespoň pět různých typů mechanismů při vnímání stresu:

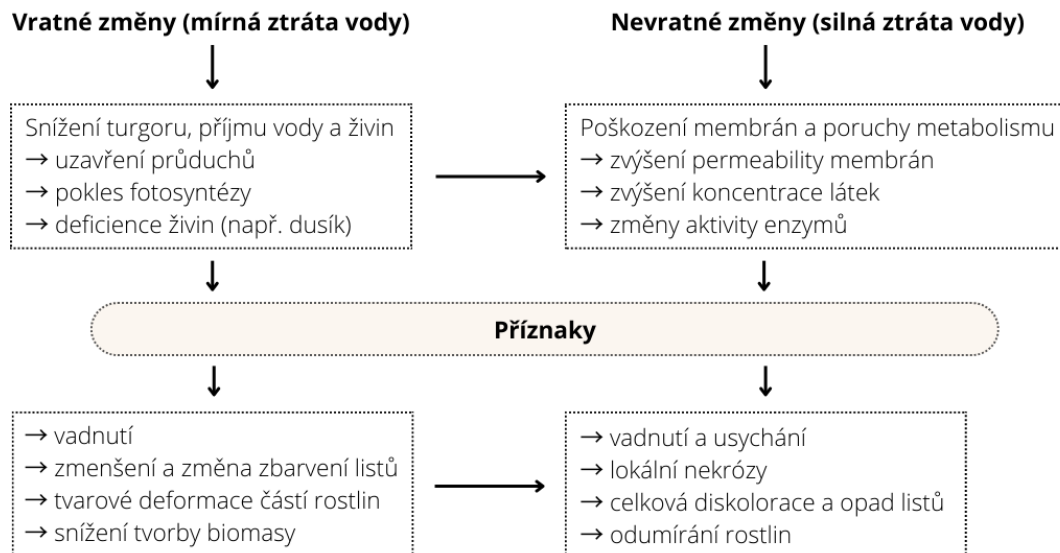
- **Fyzikální vnímání** se týká mechanických účinků stresu na rostlinu nebo buněčnou strukturu, například stažení plazmatické membrány od buněčné stěny během stresu ze sucha.
- **Biofyzikální vnímání** může zahrnovat změny ve struktuře proteinu nebo enzymatické aktivitě, jako je inhibice různých enzymů během tepelného stresu.
- **Metabolické vnímání** je obvykle výsledkem detekce vedlejších produktů, které se hromadí v buňkách v důsledku odpojení enzymatických reakcí nebo reakcí přenosu elektronů, jako je akumulace ROS během stresu zapříčiněného příliš velkým množstvím světla.
- **Biochemické vnímání** často zahrnuje přítomnost specializovaných proteinů, které se vyvinuly tak, aby snímaly určitý stres; například vápníkové kanály, které mohou snímat změny teploty a měnit homeostázu vápníku (Ca^{2+}).
- **Epigenetické vnímání** se týká modifikací struktury DNA nebo RNA, které nemění genetické sekvence, jako jsou změny v chromatinu, ke kterým dochází během teplotního stresu.

Každý z těchto mechanismů snímání stresu může působit jednotlivě nebo v kombinaci a aktivovat následné dráhy přenosu signálu a vyvolaných reakcí (Taiz a kol., 2018).

3.2.1 Abiotický stres – sucho

V rámci experimentální části této bakalářské práce jsem se zaměřila na rostlinný stres za sucha. Analyzovaný stresový faktor sucho (nedostatek půdní vláhy) byl vybrán na základě studie Dudziak a kol. (2019). V globálním měřítku představují vodní deficity hlavní abiotický stres, který celosvětově omezuje růst a vývoj rostlin, a tím snižuje jejich produktivitu (Dudziak a kol., 2019). Stres ze sucha je u rostlin charakterizován sníženým vodním potenciálem listů a turgorovým tlakem či zpomalením růstu a následným poškozením listů (Farooq a kol., 2009). Nedostatek vody v listech vyvolává uzavření průduchů a snižuje fixaci oxidu uhličitého CO₂. Důsledkem těchto kroků je vytvoření nerovnováhy mezi zachycením a využitím světla, které vede ke snížení fotosyntézy. Dochází k nerovnovážnému stavu mezi uvolňovanými a přijímanými elektrony, což vede k nadprodukci ROS z důvodu přebytečné světelné energie ve fotosystémech. Míra stresu neboli míra nedostatku vody může způsobovat ve vztahu k příznakům stresu vratné či nevratné změny (Obrázek 3) (Kůdela a kol., 2013).

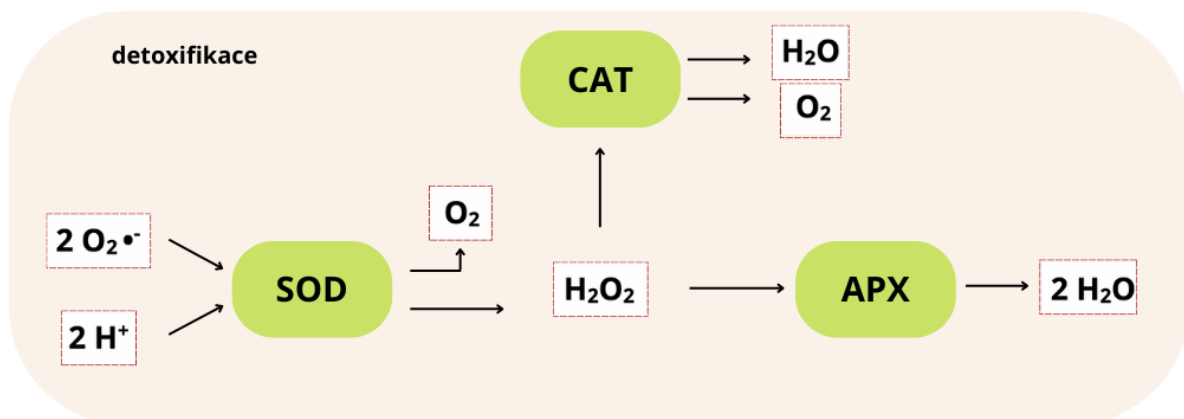
POŠKOZENÍ ROSTLIN SUCHEM



Obrázek 3: Mechanismus poškození rostlin suchem v závislosti na míře nedostatku vody. Upraveno dle Kůdela a kol. (2013).

3.3 Obranný systém rostlin proti stresu

Ke zmírnění nadprodukce ROS a oxidativního stresu rostliny využívají dobře regulovaný antioxidační mechanismus, který se skládá z enzymatických a neenzymatických složek. Jednotlivé složky obranného mechanismu mohou vyvážit syntézu ROS a zabránit tak poškození buněk. Mezi tyto enzymy patří superoxid dismutáza (SOD), kataláza (CAT) a peroxidázy (POX; askorbát peroxidáza APX, guajakol peroxidáza GPX, glutathion peroxidáza GR). Tyto enzymy se řadí mezi enzymatické antioxidační systémy, které regulují homeostázu ROS v organismech. Neenzymatické složky, například kyselina askorbová, α -tokoferol, flavanoid, glutathion, karotenoidy, lipidy či fenolové sloučeniny, účinně zmírňují oxidativní poškození snížením aktivity ROS nebo vzájemným působením v souladu s enzymatickými systémy (Nadarajah, 2020). První obrannou linií proti akumulaci ROS je superoxid dismutáza (SOD), která dismutuje radikály $\bullet\text{O}_2^-$ na H_2O_2 . Kataláza (CAT) a askorbát peroxidáza (APX) jsou dva enzymy, které vylučují H_2O_2 a zabráňují jeho akumulaci na pro rostlinu toxické úrovni (Harb a kol., 2015). Výše zmíněné detoxifikační dráhy využívající SOD, CAT a APX jsou zobrazeny na Obrázku 4. Neenzymatické a enzymatické antioxidační systémy tedy reagují přímo nebo nepřímo s ROS a přispívají k zachování integrity buněčných struktur a ke správné funkci metabolických drah. Míra aktivity antioxidačních enzymů, množství antioxidantů a akumulace ROS při stresu ze sucha závisí na genotypu rostliny, rozsahu a trvání stresu, vývoji rostliny a jejím metabolismu a poukazuje tak na rozdíly mezi rostlinnými druhy (Uzilday a kol., 2012; Harb a kol., 2015).

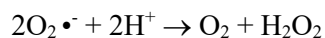


Obrázek 4: Detoxifikační dráha vylučování reaktivních forem kyslíku (ROS) antioxidačním obranným systémem u rostlin. Upraveno dle Kapoor a kol. (2019).

Příklady enzymatických mechanismů obrany

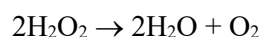
Superoxid dismutáza (SOD) je jedním z hlavních antioxidačních enzymů a má svůj význam v první linii obrany proti oxidačnímu stresu u rostlin – je zodpovědný za vylučování superoxidu $\bullet\text{O}_2^-$ za vzniku peroxidu vodíku H_2O_2 . Díky tomu se snižuje riziko tvorby vysoce toxických a reaktivních hydroxylových radikálů $\bullet\text{OH}$ ze superoxidu. Superoxidový aniont má oxidační i redukční vlastnosti,

a proto při přeměně na peroxid vodíku poskytuje jedna molekula superoxidu elektron druhé molekule a superoxid se oxiduje i redukuje zároveň. Superoxidový aniont tedy podléhá dismutaci a produkty reakce jsou kyslík a peroxid vodíku (Matoušková a kol., 2014):



SOD lze rozdělit do tří kategorií podle typu kovového kofaktoru, a to mangan-SOD (Mn-SOD), měď/zinek-SOD (Cu/Zn-SOD) a železo-SOD (Fe-SOD). Mn-SOD se nachází převážně v mitochondriích a peroxisomech, Cu/Zn-SOD se vyskytuje hlavně v cytosolu a chloroplastech, Fe-SOD je detekován z velké části v chloroplastech.

Kataláza (CAT) a peroxidázy (POX) jsou hlavními složkami zachycujícími H_2O_2 (produkt dismutace katalyzované SOD). Enzymy katalázy (CAT) jsou zpravidla lokalizovány v peroxisomech a heterolyticky štěpí peroxid vodíku za vzniku kyslíku a vody:



Askorbát peroxidáza (APX) může v rostlinách zajišťovat ochranu buď společně v součinnosti s dalšími antioxidanty, jejichž aktivita nebo množství během stresu narůstá, nebo k vzestupu aktivity APX může docházet, aniž by docházelo k podobným změnám i u dalších antioxidantů. V rostlinách bylo klasifikováno několik izoform APX – cytosolický (cAPX), mitochondriální (mitAPX), chloroplastický (chlAPX) a mikrosomální (mAPX). Všechny izoformy se liší kinetickými vlastnostmi, mezi které se řadí například molekulová hmotnost, stabilita, optimální pH, katalytická rychlost či substrátová afinita (Pandey a kol., 2017).

Příklady neenzymatických mechanismů obrany

Kyselina askorbová je silným antioxidantem, který má nepostradatelnou roli v odstraňování peroxidu vodíku z rostlin. V rostlinné buňce se vyskytuje ve stromatu chloroplastů. Kyselina askorbová působí jako transportér antioxidantů a elektronů, neutralizuje ROS pomocí sekundárních antioxidantů a je významným rostlinným metabolitem. Glutathion (GSH) je thiolová sloučenina s nízkou molekulovou hmotností, rozšířena ve většině rostlinných tkání. Antioxidační funkce glutathionu zahrnuje účast v askorbát-glutathionovém cyklu, kde GSH za pomoci dehydroaskorbát reduktázy regeneruje kyselinu askorbovou. Vysoký redukční potenciál glutathionu je způsoben přítomností nukleofilního cysteinového zbytku. Reaguje se superoxidovými radikály, hydroxylovými radikály a singletovým kyslíkem neenzymatickou cestou za vychytávání cytotoxického peroxidu vodíku (Kapoor a kol., 2019; El-Beltagi a kol., 2020).

3.3.1 Vybrané geny související s reakcí rostlin na ROS

Pro experimentální část této bakalářské práce byla podnětem studie Dudziak a kol. (2019). Tato studie se zaměřila na analýzu exprese genů souvisejících s reakcí na oxidační stres a signální transdukcí na krátkodobé sucho. Studie zahrnovala měření úrovně exprese genů zapojených do signalizace ROS (*MAPK3*, *MAPK6*), aktivity antioxidačního enzymatického systému (*CAT*, *APX*, *GPX*) a biosyntézy prolinů (*P5CR*, *P5CS*). V rámci méj práce byly vybrány geny na základě výzkumu Dudziak a kol. (2019), které byly studovány pro jejich využití jako markery oxidativního poškození u rostlin, jehož bylo navozeno nedostatkem půdní vláhy v průběhu experimentu. Výše zmíněný kolektiv autorů pracoval se substitučními liniemi (ISCSL) pšenice (*Triticum aestivum*) a stresový vjem navozoval přidáním osmotika polyethylenglykolu (PEG-6000) do MS média. PEG vyvolává osmotický stres a navozuje deficit vody v rostlinách, který je podobný stavu sucha. Stres byl ve studii vyvolán po 5ti dnech aklimatizace aplikováním 10% PEG-6000 do roztoku MS média. Klíčící sazenice pšenice byly odebrány po 1, 3 a 6 hodinách působení stresového faktoru. Dudziak a kol. použili jako kontrolu rostliny rostoucí v MS médiu bez PEG.

V této bakalářské práci byly studovány geny *APX*, *CAT*, *P5CR* a *P5CS* a pro indukci stresu byl vytvořen nedostatek půdní vláhy u rostlin pšenice pěstovaných v kontrolovaných podmínkách v substrátech ve fytotronu. V našem případě byly kontrolou rostliny, u kterých se záhlvkou udržovalo 80 % RWC (relativní obsah vody, *Leaf Relative Water Content*).

Gen APX (askorbát peroxidáza; Ascorbate Peroxidase)

APX je gen kódující enzym askorbát peroxidázu (EC 1.11.1.11). Enzym *APX* patří do rodiny peroxidáz a ve své struktuře obsahuje hemovou skupinu. Využívá askorbát jako specifický donor elektronů sloužících k redukci peroxidu vodíku na vodu. Jeho činností vzniká monodehydroaskorbát (Asada, 1992). Askorbát peroxidáza je důležitým antioxidačním enzymem podílejícím se na metabolismu kyslíku v rostlinách. Enzym katalyzuje tvorbu O_2 a H_2O z peroxidu vodíku a chrání tak rostlinu před oxidativním poškozením způsobeným nadměrnou akumulací peroxidu (Leng a kol., 2021).

Expresce genů *APX* je vyvolána různými environmentálními stresory, jako je sucho, zasolení, vysoká míra světla, vysoké a nízké teploty, útoky patogenů, H_2O_2 nebo kyselina abscisová. Transkripční exprese genů *APX* je závislá na typu pletiva a vývojovém stádiu. Solný stres indukuje produkci ROS a odpověď genů *APX* na tento stav je regulován tkání a vývojovým stádiem (Caverzan a kol., 2012). Kawakami a kol. (2002) ve své studii zkoumali vliv nízké teploty na expresi genu *APX* v hlízách brambor během skladování. Pozorovali, že přechodná akumulace cAPX po skladování při nízké teplotě je větší než po skladování při vysoké teplotě, což dle Kawakami ukazuje, že exprese *APX* byla indukována v reakci na nízkou teplotu. Zvýšení aktivity *APX* bylo pozorováno i v reakci na těžké kovy, speciálně hliník (Sharma a Dubey 2007).

Gen CAT (kataláza; Catalase)

Rodina genů *CAT* kóduje katalázu (EC 1.11.1.6), klíčový antioxidační enzym v obraně proti oxidačnímu stresu. Kataláza se vyskytuje téměř ve všech aerobních organismech a jejím úkolem je převod peroxidu vodíku na vodu, a tím dochází ke snížení hladiny ROS. Jedná se o tetramerní enzym obsahující hemovou skupinu. Aktivita *CAT* byla detekována v chloroplastech, peroxisomech, mitochondriích a cytosolu (Raza a kol., 2021). Na rozdíl od *APX*, s níž zastává *CAT* v buňce velice podobnou funkci, není *CAT* závislá na žádném substrátu.

V listech kostřavy vysoké (*Festuca arundinacea*), která byla vystavena dlouhodobému vysychání povrchové půdy, se aktivita *CAT* snížila, zatímco aktivita *SOD* se zvýšila. Aktivita *CAT* se nadále snižovala s rostoucí dobou stresu při úplném vysychání půdy (Fu a Huang, 2001). Zhao a Zhang (2006) ve své studii zkoumali koexpresi genu *GST* (glutathion S-transferáza) a *CAT* (kataláza). Na transgenní rýži aplikovali stres ze soli. Studie ukázala, že koexprese obou genů vede ke zvýšení *CAT* u transgenních vzorků po indukci stresu.

Geny P5CS (pyrrolin-5-karboxylát syntetáza; Pyrroline-5-carboxylate Synthetase) a P5CR (pyrrolin-5-karboxylát reduktáza; Pyrroline-5-carboxylate Reductase)

Geny *P5CS* a *P5CR* kódují enzymy účastníci se biosyntézy prolinu. Prolin je syntetizován ve dvoustupňovém procesu. Mnoho abiotických stresů je spojeno s akumulací právě této aminokyseliny a jedná se tak o neenzymatický antioxidační mechanismus obrany. Při osmotickém stresu prolin stabilizuje proteiny a antioxidační enzymy, přímo interaguje s ROS a vycytává je, také zajišťuje rovnováhu intracelulární homeostázy a podporuje buněčnou signalizaci (Dudziak a kol., 2019).

Yang a kol. (2021) popisují ve své studii nadměrnou expresi genu *P5CS* u *Arabidopsis thaliana* za podmínek stresu suchem. Nadměrná exprese dle studie vedla k vyššímu obsahu prolinu a menšímu poškození membrány. Při studii teplotního šoku na rostlině sójových bobů došli de Ronde a kol. (2000) k závěru, že vytvoření teplotního šoku vedlo k inaktivaci genu *P5CR*. Následkem inaktivace genu bylo snížení syntézy prolinu. Další studie ukázaly, že nadměrná exprese genu *P5CS* vede ke zvýšení akumulace prolinu a zvýšené toleranci vůči stresu u tabáku (Kavi Kishor a Sreenivasulu, 2013).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro experimenty byly použity rostliny ozimé pšenice (*Triticum aestivum*), odrůda Turandot (udržovatel odrůdy Selgen).

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- 2-mercaptoethanol (SIGMA, kat.č. M-3148)
- Gel Red (Biotium, kat.č. 41003)
- GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Scientific, kat.č. SM0321)
- 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, kat.č. R0611)
- Glycogen (Thermo Scientific, kat.č. R0561)
- RNase H (TaKaRa, kat.č. 2150A)
- 2x SensiFAST SYBR Lo-ROX Mix (Meridian, kat.č. BIO-94005)
- 5x My Taq Reaction Buffer (Bioline, kat.č. BIO-21105)
- My Taq Polymerase (Bioline, kat.č. BIO-21105)
- Agaróza UltraPure™ (Invitrogen, kat.č. 16500-500)
- Ethanol absolutní p.a. (Penta, kat.č. 71250-12500)
- Nuclease free water, sterile PCR-Inhibitor Free (BioConcept, kat.č. 3-07F04-I)
- 10x Dnase I Buffer (TaKaRa, kat.č. 2270A)
- Recombinant Dnase I (Rnase-free) 5U/μl (TaKaRa, kat.č. 2270A)
- Recombinant Ribonuclease Inhibitor 40U/μl (TaKaRa, kat.č. 2313A)

Použité soupravy

- Isolate II RNA Plant Kit (Bioline, kat.č. BIO-52077)
- Hard-Shell® PCR Plates (Bio-Rad, kat.č. HSL9601)
- PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, kat.č. 6110A)

Použité roztoky a jejich příprava

- 0,5 mol.l⁻¹ EDTA (pH 8,0): 7,306 g EDTA (kys. Ethylendiamintetraoctová), objem dH₂O (deionizovaná voda) 50 ml, filtrace filtrem MiliPore (0,22 μm), sterilizace v autoklávu

- 3 mol.l⁻¹ octan sodný (pH 5,2): 12,306 g CH₃COONa (octan sodný), objem dH₂O (deionizovaná voda) 50 ml, filtrace filtrem MiliPore (0,22 μm), sterilizace v autoklávu
- 5x TBE pufr: 54 g Tris base + 25,5 g H₃BO₃ (kys. Boritá) + 4,65 g Na₂EDTA, doplnit dH₂O (deionizovaná voda) na 1l
- 0,5x TBE pufr: 100 ml 5x TBE pufru + 900 ml dH₂O (deionizovaná voda)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Použité přístroje a zařízení

- Třepačka vortex MS 3 basic (IKA)
- Centrifuga stolní PRISMTM C2500-230V (Labnet)
- Výrobník ledu F80 C (Icematic)
- Real-Time PCR CFX98 System C-1000 Touch (Bio-Rad)
- Elektroforéza Wide Mini-Sub Cell GT, PowerPac Basic (Bio-Rad)
- Systém dokumentační InGenius 3 (SynGene)
- Váhy analytické HR 200 EC (A&D)
- Termocyklér C1000 (Bio-Rad)
- Dry Block Heating Thermostat Bio TDB-100 (BIOSAN)
- NanoDrop One/One^C UV-Vis Spektrofotometr (Thermo Scientific)
- Centrifuga Mikro 200R (Hettich)
- Centrifuga PCR Plate Spinner (VWR)
- Mikrovlnná trouba MWO 602 (Whirlpool)
- Mraznička skříňová (CANDY)
- Minicentrifuga D1008 Blue (SCI LOGEX)
- Box hlubokomrazící MDF-U3 (Panasonic)
- Pipety jednobanální Research Plus (Eppendorf)
- Pipety jednobanální Reference 2 (Eppendorf)
- PlantEye F400 Multispectral 3D Scanner (Phenospex)

Další pomůcky

- Květináče rozměru NN + podmisky, substrát Potgrond P, písek, potravinová fólie, štítky, výsevní kolík se značkou hloubky výsevu, odměrka substrátu, pravítko

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací metody

V rámci praktické části bakalářské práce byly provedeny 2 typy pokusů. Nejprve byla ověřena citlivost navržených primer oligonukleotidů na změnu vodního potenciálu u rostlin pšenice. Pro tuto část pokusu byly použity rostliny pšenice vyjmuté z polního porostu pokusných ploch PřF UP v Olomouci – Holicích. Další fáze zahrnovala založení experimentu ve skleníku, vypěstování biologického materiálu za definovaných podmínek a následný odběr materiálu pro následující hodnocení citlivosti primerů na nedostatek půdní vláhy v kontrolovaných podmínkách. Její součástí byla izolace RNA, přečištění, syntéza cDNA (komplementární DNA) a následná qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce) sloužící ke studiu exprese vybraných genů.

4.4.1 Test citlivosti primerů na vadnoucích rostlinách

Pro tento typ pokusu byly použity rostliny pšenice vyjmuté z polního porostu pokusných ploch PřF UP v Olomouci – Holicích. Těmto rostlinám byla odstřižena kořenová část a rostliny byly ponechány vadnout po stanovený čas (0, 15, 30, 60, 120, 240 minut) při laboratorní teplotě (20°C, r. h. cca 55 %). Pro každý časový interval byl připraven jeden vzorek, který sloužil pro následnou izolaci RNA. Všechny vzorky obsahovaly 5 rostlin pšenice, kdy z každé rostliny byla odstřižena vrchní část, tedy čtvrtý pravý list + vzrostlý vrchol. Jednalo se tak o směsné vzorky. Po uplynutí stanoveného časového intervalu byl vzorek 5 listů zabalen do popsané alobalové lodičky a zamrazen v tekutém dusíku. Vzorky byly následně přeneseny do mrazáku a uschovány až do doby izolace RNA ze vzorků.

4.4.1.1 Izolace RNA

Odebrané vzorky byly v třecí misce rozdraceny na jemnou kaši za stálého přidávání tekutého dusíku, aby u vzorků a pomůcek byly zajišťovány nízké teploty a nedocházelo k degradaci nukleové kyseliny. Vzorky v práškové konzistenci se uchovávaly v mikrozkušavkách v mrazáku v -20 °C. Z homogenizovaných vzorků byla vyizolována RNA pomocí komerčního kitu Isolate II RNA Plant Kit. Mikrozkušavky s homogenizovanými práškovými vzorky byly přeneseny do digestoře, a ještě před rozmrznutím bylo ke každému vzorku přidáno 350 µl lyzačního pufru (Lysis Buffer, RLY) a 3,5 µl 2-mercaptoethanolu. Vzorky byly důkladně promíchány na vortexu, poté stočeny v centrifuzě nastavené na 24 °C a 13000 rpm po dobu 5 minut. Poté byl supernatant přepipetován na filtr fialových kolon se sběrnými zkušavkami a znova proběhla centrifugace po dobu 2 minut při stejném nastavení centrifugy jako v předchozím kroku. Po proběhnutí centrifugace byly fialové kolony vyhozeny do odpadu a přefiltrovaný obsah v mikrozkušavce byl bez sedimentu přepipetován do nových mikrozkušavek o objemu 1,5 ml. K přefiltrovanému objemu bylo přidáno 350 µl 70% ethanolu a celý obsah mikrozkušavky byl promíchán pomocí propipetování roztoku. Promíchaný obsah byl přepipetován na

filtr modrých kolon se sběrnými zkumavkami. Následovala další centrifugace při stejném nastavení po dobu 1,5 minuty. Přefiltrovaný obsah ve sběrné zkumavce byl vylit do odpadu, sběrná zkumavka byla zlikvidována a modrá kolona s navázanou RNA byla přenesena na nové sběrné zkumavky. Na filtr modrých kolon bylo napipetováno 350 μ l membránového odsolovacího pufru (Membrane Desalting Buffer, MEM) a následovala centrifugace při neměnném nastavení po dobu 2 minut. Po centrifugaci byl obsah ve sběrné zkumavce vylit do odpadu. Kolony s navázanou RNA a sběrnými zkumavkami byly přeneseny na led.

Pro další práci byla na ledu připravena DNaseI reakční směs (Tabulka 1). Na střed filtru modrých kolon bylo napipetováno 100 μ l reakčního mixu a mikrozkušavky se vzorky a reakčním mixem byly inkubovány po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí časového úseku bylo na modrou kolonu napipetováno 200 μ l promývacího pufru RW1 (Wash Buffer RW1) a mikrozkušavky s kolonami byly zcentrifugovány po dobu 1 minuty. Po centrifugaci byly modré kolony přeneseny na nové sběrné mikrozkušavky a bylo přidáno 600 μ l promývacího pufru RW2 (Wash Buffer RW2) na filtr modrých kolon a znova proběhla centrifugace po dobu 1 minuty. Obsah ze sběrných zkumavek byl vylit do odpadu a modré kolony byly nasazeny opět na stejné sběrné zkumavky. Poté byly membrány modrých kolon ještě dvakrát promyty přidáním 250 μ l promývacího pufru RW2 (Wash Buffer RW2), kdy po prvním přidání promývacího pufru následovala centrifuga kolon po dobu 1 minuty a po druhém přidání promývacího pufru byly modré kolony centrifugovány 2 minuty. Vždy po centrifuze byl obsah sběrné zkumavky vylit do odpadu. Po druhém přidání pufru RW2 a centrifuze byly modré kolony přeneseny na nové 1,5ml mikrozkušavky. Následoval proces eluce RNA z kolony pomocí přidání 40 μ l RNase-free vody na kolonu. Vzorky byly inkubovány po dobu 5 minut při pokojové teplotě a poté zcentrifugovány po dobu 1 minuty. Následně byly filtry kolon prolity ještě jednou stejným obsahem, který prošel během centrifugace do sběrné zkumavky, inkubovány 5 minut při pokojové teplotě a centrifugovány po dobu 1 minuty. Celkově bylo získáno 40 μ l celkové RNA z každého vzorku.

Tabulka 1: Složení DNase I reakční směsi (DNase I Reaction mixture) a objemy jednotlivých složek pro 1 vzorek

	1 vzorek
Reakční pufr pro DNase I (Reaction Buffer for DNase I, RDN)	90 μ l
RNase-free DNase I	10 μ l
Celkem reakční směsi	100 μ l

4.4.1.2 *Přečištění vyizolované RNA*

Po izolaci RNA bylo provedeno její přečištění. Práce s mikrozkuvkami se vzorky probíhala na ledu. V první fázi přečištění byla na ledu připravena reakční směs (Tabulka 2). Z reakční směsi bylo napipetováno 10 μl do každého vzorku. Vzorky byly promíchány a stočeny v minicentrifuze. Takto připravené vzorky byly vloženy do termostatu nastaveného na 37 °C na dobu 1 hodiny. Po uplynutí času byly vzorky přeneseny na led a byly ke vzorkům přidány 2 μl 0,5 mol.l⁻¹ roztoku EDTA (roztok kyseliny ethylendiamintetraoctové). Poté byly vzorky vloženy do termostatu na 2 minuty, kdy termocyklér byl v tomto kroku přehříván na 80°C. Po vyndání vzorků z termostatu byly okamžitě přeneseny na led a bylo k nim napipetováno 48 μl nuclease-free vody. Dále bylo ke všem vzorkům připipetováno 10 μl 3 mol.l⁻¹ octanu sodného, 250 μl vychlazeného 96% ethanolu a 2 μl glykogenu. Následně byly vzorky promíchány a stočeny v minicentrifuze. Další práce se vzorky probíhá následující den, kdy jsou vzorky přes noc uloženy v -80°C.

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro přečištění RNA a objemy jednotlivých složek pro 1 vzorek

	1 vzorek
10x DNase I Buffer	4 μl
Recombinant DNase I	4 μl
Recombinant Ribonuclease Inhibitor	0,5 μl
Nuclease-free water	1,5 μl
Celkem reakční směsi	10 μl

Druhá fáze přečištění RNA začala centrifugací vzorků ve vychlazené centrifuze na 4 °C a nastavené na 13000 rpm po dobu 30 minut. Před tím, než jsou vzorky dány do centrifugy, je potřeba je nechat pomalu roztát na ledu a do centrifugy je dát až mají tekutou konzistenci. Po proběhnutí centrifugací byl supernatant z mikrozkuvky vylit do odpadu a ke vzorku ulpěném na stěně mikrozkuvky bylo přidáno 500 μl vychlazeného 70% ethanolu a vzorky byly dány zpět do vychlazené centrifugy na 5 minut. Poté byl supernatant opět vylit do odpadu, ke vzorkům bylo přidáno 500 μl vychlazeného 96% ethanolu a opět byly dány do vychlazené centrifugy na 5 minut. Po vylití supernatantu do odpadu byly “prázdné mikrozkuvky“ stočeny v centrifuze po dobu 2 minut. Po centrifugaci byl zbytek supernatantu odebrán pomocí pipety tak, aby nedošlo k narušení peletu, anebo byla mikrozkuvka na malý moment převrácena dnem vzhůru, aby odtekl přebytečný supernatant.

Poté byly nechány otevřené mikrozkušavky v horizontální poloze na dobu zhruba 5 minut, aby došlo k úplnému vyschnutí ethanolu, který ulpěl na stěnách mikrozkušavky. Mikrozkušavky byly pečlivě hlídány, aby nedošlo k přeschnutí vzorků. Následně byl pelet rozpuštěn v 15 μ l RNase-free vodě, kdy tento objem byl pipetou použit na stěnách mikrozkušavky, aby se ze stěn smylo veškeré množství vzorku. Vzorky byly následně stočeny v minicentrifuze a dány ihned na led. Pomocí UV-Vis spektrofotometru NanoDrop byla změřena koncentrace vzorků vyizolované RNA.

4.4.1.3 Syntéza cDNA

Syntéza cDNA proběhla pomocí kitu PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit. Při syntéze cDNA probíhá práce na ledu. Nejprve byl vypočítán objem RNA, který je použit pro syntézu cDNA, tak, aby do jedné reakce byl dán 1 μ g RNA, a objem RNase-free vody byl dopočítán tak, aby celkový objem roztoku RNA a RNase-free vody činil 8 μ l. Napočítaný objem RNA a RNase-free vody byl napipetován do 0,2ml mikrozkušavky a dále byla připravena reakční směs č. 1 (MIX 1). Příprava reakční směsi č. 1 viz Tabulka 3. Ke každému vzorku RNA byly pak přidány 2 μ l MIXu 1. Celkový objem jedné reakce je 10 μ l. Připravené vzorky v mikrozkušavkách byly proklepány a stočeny a ihned přeneseny do předehřátého termocykléru – víčko předehřáté na 105 °C, deska předehřátá na 65 °C. Po uplynutí 5 minut byl program (Tabulka 4) pozastaven, mikrozkušavky se vzorky byly přendány z termocykléru na led. Do každého vzorku bylo přidáno 10 μ l reakční směsi č. 2 (Tabulka 5). Promíchané vzorky byly přendány zpět do termocykléru a program pokračuje dalších 75 minut. Po uplynutí této doby je program pozastaven a ke vzorkům přidáno 0,5 μ l RNasyH. Vzorky byly poté vráceny do termocykléru a program spuštěn na dalších 15 minut. Po skončení programu byla nově nasyntetizovaná cDNA přendána do mrazáku do -20 °C. Výsledkem syntézy komplementární DNA z vyizolované RNA vzorků je 20 μ l cDNA.

Tabulka 3: Složení reakční směsi č. 1 pro syntézu cDNA a objemy jednotlivých složek pro 1 vzorek

	1 vzorek
10mmol.l ⁻¹ dNTP (deoxyribonukleosid trifosfát)	1 μ l
50 μ mol.l ⁻¹ Oligo dT Primer (Oligo deoxyThimine Primer)	1 μ l
Celkem reakční směsi	2 μl

Tabulka 4: Časový a teplotní harmonogram programu spuštěného v termocycléru pro syntézu cDNA

Čas	5 min	60 min	15 min	15 min	...
Teplota desky	65 °C	42 °C	70 °C	37 °C	4 °C

Tabulka 5: Složení reakční směsi č. 2 pro syntézu cDNA a objemy jednotlivých složek pro 1 vzorek

	1 vzorek
RNase-free voda	4,5 µl
5x PrimeScript Buffer	4 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
PrimeScript Reverse Transcriptase	1 µl
Celkem reakční směsi	10 µl

4.4.1.4 Použité primery a účinnost primerů

Primery, které byly při práci použity, byly navrženy a objednány vedoucím práce. V experimentální části této bakalářské práce se pracovalo s primery genů, které souvisejí s reakcemi na oxidativní stres u rostlin. Jednalo se hlavně o geny kódující antioxidantní enzymy chránící buňky před toxickými reaktivními formami kyslíku (*CAT*, *APX*) a dále o geny kódující enzymy, které se účastní biosyntézy prolinu (*P5CS*, *P5CR*). Při práci byl používán primer pro referenční (*housekeeping*) gen *CJ705892* (v textu dále pouze *CJ*). Sekvence používaných primerů jsou uvedeny níže v tabulce 8 (tabulka je doplněna o informace ohledně účinnosti primerů – popis viz níže).

Optimalizace primerů je důležitým krokem před samotnou expresí genů. Při optimalizaci se zjišťuje efektivita a specifita primerů a volí se vhodné ředění cDNA pro další práci. Vypočítaná účinnost primerů u všech studovaných genů by se měla ideálně pohybovat v rozmezí od 95 % do až 105 %. Práce s primery i vzorky cDNA probíhá na ledu. Při optimalizaci primerů se zkouší několik typů ředění cDNA, kdy pro každý typ ředění se připraví naředěná cDNA. Dále je potřeba připravit reakční směs pro každý pár primerů zájmových genů (Tabulka 6). Před přípravou reakčních směsí a naředěním cDNA je potřeba reagenty promíchat a stočit na stolní minicentrifuze. Na 96ti jamkovou destičku bylo do jedné jamky napipetováno 16 µl reakční směsi a 4 µl naředěné cDNA dle předem připraveného schématu. Každý vzorek byl na desku napipetován v triplicátu pro zamezení chybovosti, kdy odchylka mezi jednotlivými C_t hodnotami v triplicátu by neměla být vyšší než 0,5. Pro každý typ primerů je nutné mít negativní

kontrolu, kdy do jamky místo naředěné cDNA byly napipetovány 4 μ l nuclease-free vody. Destička byla přelepena fólií a umístěna do termocycleru pro kvantitativní PCR s programem pro optimalizaci primerů a studium exprese studovaných genů (Tabulka 7).

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro kvantitativní PCR a objemy jednotlivých složek pro 1 vzorek

1 vzorek	
SYBR Green	10 μ l
Forward primer	0,8 μ l
Reverse primer	0,8 μ l
Nuclease-free voda	4,4 μ l
Celkem reakční směsi	16 μ l

Tabulka 7: Časový a teplotní harmonogram programu spuštěného v termocycleru pro optimalizaci primerů a expresi studovaných genů

Teplota	Čas	
95 °C	120 s	
95 °C	5 s	} 45 cyklů
59,2 °C	20 s	
75 °C	10 s	
95 °C	2 s	

Po dokončení programu byly výsledky vyhodnoceny a zprostředkovány softwarem Bio-Rad CFX Maestro Software. V programu Microsoft Office Excel byla vypočítána účinnost primerů. Účinnost primerů byla vypočítána z rovnice směrnice lineární ředící řady a u našich primerů se pohybovala v rozmezí zhruba 0,9 až 1,5 (Tabulka 8). Ředění templátu (cDNA) bylo 1:6, 1:12, 1:24 a 1:48.

Tabulka 8: Sekvence a účinnost primerů studovaných genů

Primer	Sekvence 5' – 3'	Účinnost
<i>CJ705892</i>	F: AACCACCGCATTGCTGAAG	1,40
	R: GACAGGGTGCCACCAACTAT	
<i>CAT</i>	F: CACCTGGTGGAGAAGATCGC	0,92
	R: TCACCTCGAAGAAGCCCTTG	
<i>APX</i>	F: CAAGGCTCTGACCACCTCAG	1,27
	R: CATCTTCCCAGGGTGTGACC	
<i>P5CS</i>	F: GATTCTCCGATGGTGCTCGT	1,35
	R: TTCAACACCCACAGGTCCAC	
<i>P5CR</i>	F: TAAATGCCGTTGTTGCTGCC	1,44
	R: AGCAAAACTAACAATGGCTACCAG	

4.4.1.5 *Expres genů pomocí kvantitativní PCR*

Kvantitativní PCR metoda (real-time qPCR) byla použita pro následnou práci se vzorky cDNA a byly při ní využity páry primerů genů *CJ*, *CAT*, *APX*, *P5CS* a *P5CR*. Všechna práce se vzorky a primery probíhala na ledu. Po procesu optimalizace primerů bylo zvoleno jedno ředění, které se ukázalo jako neoptimálnější pro všechny studované geny. Kvantitativní PCR probíhala obdobně jako při optimalizaci primerů, pouze s tím rozdílem, že vzorky cDNA byly naředěny všechny stejně podle optimálního ředění (1:10). Do 96ti jamkové destičky bylo napipetováno do jedné jamky 16 µl reakční směsi (Tabulka 6) a 4 µl naředěné cDNA nebo nuclease-free vody jako negativní kontrola. Každý vzorek byl na destičku napipetován v triplikátu podle předem připraveného schématu. Připravená destička byla vložena do termocycleru, kde byl nastaven stejný program jako u optimalizace primerů (Tabulka 7). Po ukončení programu byly pomocí softwaru Bio-Rad CFX Maestro Software vyhodnoceny výsledky. Vyhodnocení a analýza dat proběhla na základě amplifikační křivky. Pro výsledné hodnocení byla využita relativní kvantifikace. Relativní exprese daného genu byla vypočítána jako geometrický průměr ze tří technických replikátů vztažených ke kontrolnímu vzorku (nestresovaná kontrola = vzorky 80A-E3), jehož exprese byla ad hoc definována jako 1,0.

4.4.2 Založení experimentu ve skleníku a optimalizace testu na stres nedostatkem půdní vláhy pro parametr výška porostu

Nejprve byly připraveny tři různé směsi substrátů pro optimalizaci testu na stres z nedostatku půdní vláhy. Typy směsí substrátů se od sebe lišily poměrem rašelinového substrátu (Klassman Potgrond P) a písku, kdy směs č. 1 obsahovala substrát a písek v poměru 1:1, směs č. 2 v poměru 2:1 a směs č. 3 v poměru 3:1 (Tabulka 9). Květináče byly dle typu směsi plněny danou směsí substrátu a písku podle váhy. Jednotlivé hmotnosti směsí substrátů, které se vážily do květináčů na výsev, jsou zaznamenány níže v tabulce 9. Pro každý typ směsi substrátu bylo připraveno 10 květináčů s příslušným označením.

Tabulka 9: Složení směsí substrátů, poměry jednotlivých složek směsí a váha směsi do květináče

Směs č.	Poměr substrát : písek	Hmotnost směsi do 1 květináče
1	1:1	1120 g
2	2:1	900 g
3	3:1	760 g

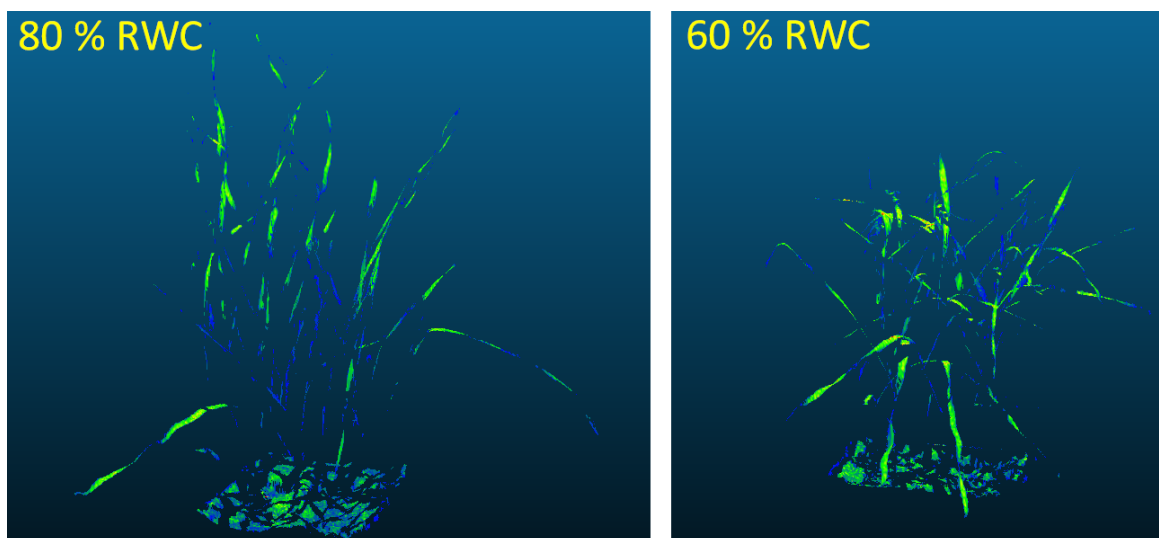
Do každého květináče, bez ohledu na typ směsi, bylo vyseto 25 semen. K výsevu byl použit vysévací kolík se značkou hloubky výsevu a pinzeta, díky které byla semena pšenice zasunuta až na dno jamky od vysévacího kolíku. Nakonec byly jamky se semínky lehce zasypány směsí. Takto připravené květináče byly zality do plné půdní kapacity. Květináče stály 90 minut na tácu s vodou a poté byly přeneseny do fytotronu.

Smyslem testu se třemi různými směsmi substrátů byl požadavek na dosažení optimálního nastavení délky experimentu tak, aby stresu bylo dosaženo po vývoji prvního pravého listu a optimálně ne déle než za 14-21 dní po výsevu pšenice. Stres na rostlině byl způsobený nedostatkem půdní vláhy. Výsev byl proveden do 100 % RWC (relativní obsah vody). Poté se vždy pět replikátů od každého typu směsi zalévalo na 80 % RWC (optimální zalévání pro nestresovaný vývoj rostliny) a zbylých pět replikátů se zalévalo na 60 % RWC (vyvolání stresu nízkou mírou zálivky).

4.4.2.1 Skenování nadzemních částí rostlin pomocí skeneru PlantEye F400 výšky porostu

Pro měření výšky porostu – vyrostlých rostlin v květináčích jsme využili 3D laserový skener PlantEye F400 od společnosti Phenospex. Phenospex PlantEye je první laserový skener, který byl speciálně navržen a vyroben pro aplikace screeningu rostlin. Skener má standardní sadu 4 vlnových délek v RGB a v NIR oblasti (blízká infračervená oblast). RGB snímek je složený z oblastí, které spadají

do rozsahu těchto vlnových délek: red (červená) 624 – 634 nm, green (zelená) 530 – 555 nm, blue (modrá) 465 – 485 nm. Oblast NIR využívá spektrum 720 – 750 nm a více. Vlnové délky RGB a NIR jsou kombinovány do spektrálních indexů. Jedním z nejdůležitějších indexů je tzv. normalizovaný digitální vegetační index (Normalized Digital Vegetation Index, NDVI). Model NDVI se vypočítá jako poměr NIR a Red oblasti z PlantEye skeneru (Obrázek 5). Pomocí PlantEye skeneru je možné automaticky vypočítat širokou škálu morfologických parametrů, jako jsou: výška rostliny, 3D plocha listu, projektovaná plocha listu, digitální biomasa, sklon listu, index listové plochy, hloubka pronikání světla. Při hodnocení míry stresu pomocí PlantEye skeneru v rámci naší bakalářské práce jsme využili dva morfologické parametry, které PlantEye skener nabízí a počítá. Jedná se o parametr maximální výšky rostliny/porostu a parametr digitální biomasy. Parametr maximální výšky (Height Max) je vyvinut pro detekci absolutně nejvyššího bodu rostliny a její jednotkou je milimetr [mm]. Parametr hodnotící digitální biomasu (Digital Biomass) využívá jednotku milimetr čtvereční [mm²] a vypočítá se jako součin výšky a 3D plochy listů rostliny.



Obrázek 5: Čelní pohled na 3D sken rostlin pšenice vypěstované v kontrolních podmínkách (80 % RWC) a ve stresu nedostatkem půdní vláhy (60 % RWC).

4.4.3 Odběr vzorků vypěstované pšenice v kontrolovaných podmínkách při nedostatku půdní vláhy

Po deseti dnech od výsevu se květináče s pšenicí, u kterých jsme navozovali stresový stav, jsme přestali zalévat, zatímco kontrolní květináče byly udržovány na hladině zálivky 80 % RWC. Před samotným odběrem vzorku se vždy květináč s vyrůstající pšenicí naskenoval pomocí PlantEye skeneru, následovalo odebrání jedné celé rostlinky pšenice z květináče s původně 25 rostlinami, poté se květináč zvážil a květináče s 80% zálivkou jsme zalili vodou na definovanou váhu (Tabulka 10).

Tabulka 10: Souhrnná tabulka znázorňující váhu, na kterou se kontrolní vzorky pšenice (80% RWC) zalévaly vodou

Směs č.	Poměr substrát : písek	Zalévání na váhu
1	1:1	1496,8 g
2	2:1	1219,2 g
3	3:1	865,8 g

Při odběru vzorků práce probíhala v rukavicích, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku. Odběr vzorků začal 11. den od výsevu a probíhal každých 24 hodin po dobu následujících čtyř dnů. Zalévání kontrolních květináčů začalo už 10. den od výsevu a probíhalo po dobu pěti dnů. Při odběru vzorků se vždy po naskenování květináčů s vyrůstající pšenicí PlantEye skenerem z každého květináče odřízla jedna celá rostlinka (vzorek). Řez byl veden cca 1 cm nad substrátem. Vzorek byl zabalen do popsané allobalové lodičky příslušným označením a ihned ponořen do tekutého dusíku. Vzorky z jednoho dne po skončení odběru byly přeneseny do mrazáku a tam byly uschovány až do izolace RNA ze vzorků.

Po čtvrtém dnu odběru byly u stresované pšenice patrné známky stresu (kroucení a stočení listů, pokles výšky porostu = vadnutí pšenice), a proto u těchto rostlinek proběhl tzv. rewatering, tedy znovu zalití stresovaných rostlin s cílem hodnotit rychlost regenerace. Po dobu následujících deseti dnů byly všechny květináče zalévány na 100 % RWC. Tuto fázi následoval poslední odběr vzorků ze všech květináčů a poslední skenování pšenice.

4.4.4 Vyizolování RNA, syntéza cDNA a následná analýza exprese vybraných genů pomocí kvantitativní PCR ze vzorků pšenice

Následující postup práce se vzorky je shodný jako postup práce při testu na uvadající pšenici, který byl popsán v kapitolách 4.4.1.1 – 4.4.1.5. Při práci byly využity primery, u kterých proběhl test na citlivost primerů a u kterých byla stanovena jejich účinnost v rámci testu na uvadajícím obilí (*CJ*, *CAT*, *APX*, *P5CS*, *P5CR*). Při expresi genů pomocí kvantitativní PCR byl každý vzorek na 96ti jamkovou destičku napipetován v triplicátech podle předem připraveného schématu (Obrázek 6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	9	9	9	17	17	17	25	25	25
B	2	2	2	10	10	10	18	18	18	26	26	26
C	3	3	3	11	11	11	19	19	19	27	27	27
D	4	4	4	12	12	12	20	20	20	28	28	28
E	5	5	5	13	13	13	21	21	21	29	29	29
F	6	6	6	14	14	14	22	22	22	30	30	30
G	7	7	7	15	15	15	23	23	23	K ⁻		
H	8	8	8	16	16	16	24	24	24			

Obrázek 6: Pipetovací schéma na 96ti jamkové destičce při expresi genů (vždy jedna pipetovací destička pro jeden pár primerů)

Pozn. Každý vzorek je napipetován v triplicátu. K⁻ znázorňuje jamku pro napipetování negativní kontroly (nuclease-free voda místo naředěné cDNA).

5 VÝSLEDKY

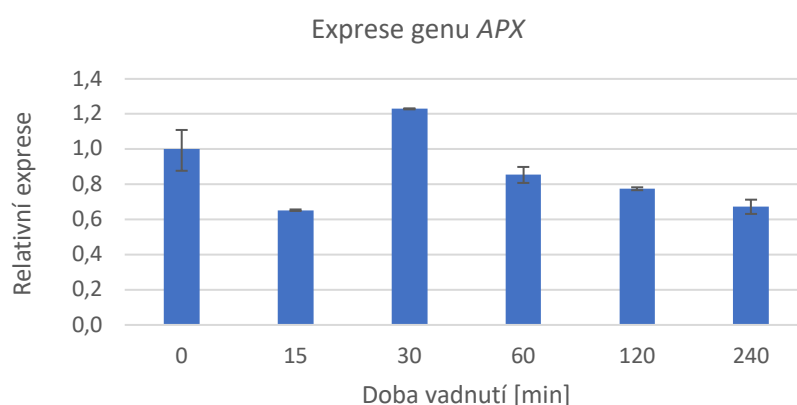
Cílem této bakalářské práce byla analýza exprese genů, které jsou součástí buněčné odpovědi na oxidativní stres způsobený reaktivními formami kyslíku, a zároveň by mohly sloužit jako markery míry oxidativního poškození u obilnin, konkrétně u pšenice (*Triticum aestivum*, odrůda Turandot). U rostlin pěstovaných v kontrolovaných podmínkách byl studován vliv nedostatku půdní vláhy na vnější a vnitřní projevy stresu.

5.1 Analýza exprese genů zapojených do reakce na oxidativní poškození na odštěpených rostlinách

Cílem experimentu bylo otestovat citlivost studovaných genů na silnou indukci stresových podmínek u rostlin pšenice. Nadzemní část rostlin byla odštěpena od kořenové části a ponechána vadnout při laboratorní teplotě po definovaný čas (viz Materiál a Metody 4.4.1). Byla hodnocena exprese vybraných genů dle studie Dudziak a kol. (2019) na směsných vzorcích. Každý vzorek obsahoval nadzemní části pěti rostlin odebraných z pole přibližně ve fenologické fázi odnožování (BBCH 25-29).

Exprese genu Ascorbate peroxidase (APX)

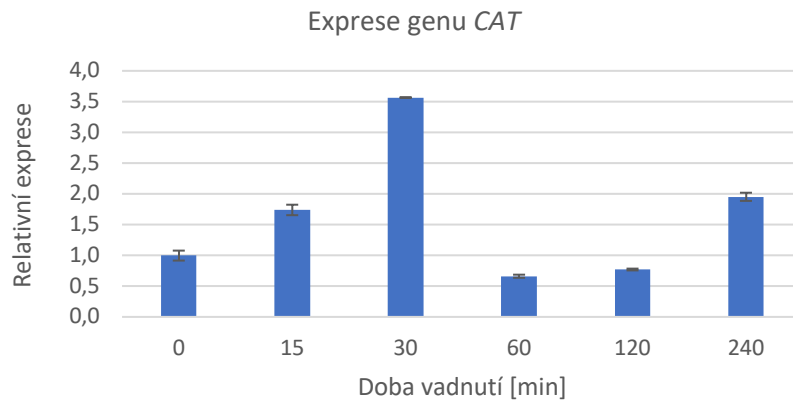
Gen pro *APX* vykazoval nejvyšší expresi ve vzorku, který absolvoval 30 minut vadnutí. Vzhledem ke kontrolnímu vzorku (0 min) byla po 15 minutách vadnutí exprese nižší zhruba o jednu třetinu. V následujícím časovém bodě (30 min) byla exprese až dvojnásobná a tedy nejvyšší. Po 60 min vadnutí až do konce testu (120 min, 240 min) docházelo ke snižování exprese genu *APX* vzhledem ke kontrolnímu vzorku (čas 0 min; viz Obrázek 7).



Obrázek 7: Exprese genu *APX* v nadzemní části rostlin pšenice z pole. Sloupce znázorňují geometrický průměr exprese ze tří technických opakování, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.

Expresce genu *Catalase (CAT)*

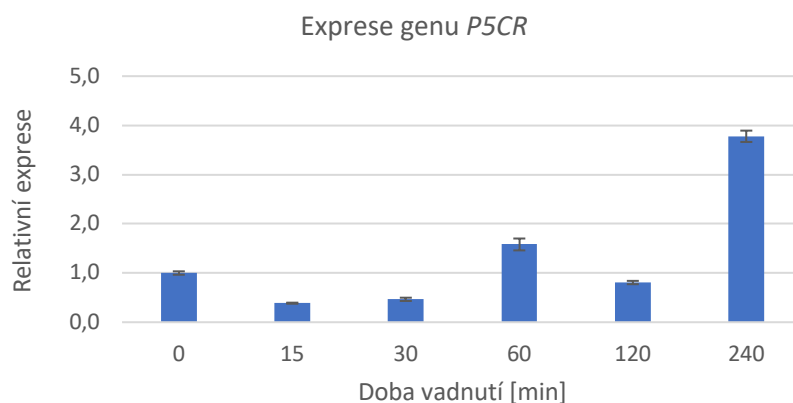
U genu *CAT* došlo oproti kontrole (0 min) k výraznému nárůstu exprese genu už po 15 minutách vadnutí rostlin a exprese dále více než trojnásobně stoupla v případě vzorků, které vadnuly po dobu 30 minut. Expresce genu byla nejnižší po 60 minutách vadnutí. Poté míra exprese lehce stoupla, vzhledem ke kontrolnímu vzorku však byla stále nižší. Ve vzorku po 240 minutách vadnutí byl opět pozorován téměř dvojnásobný nárůst oproti kontrolnímu vzorku (viz Obrázek 8).



Obrázek 8: Expresce genu *CAT* v nadzemní části rostlin pšenice z pole. Sloupce znázorňují geometrický průměr exprese ze tří technických opakování, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.

Expresce genu *Pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR)*

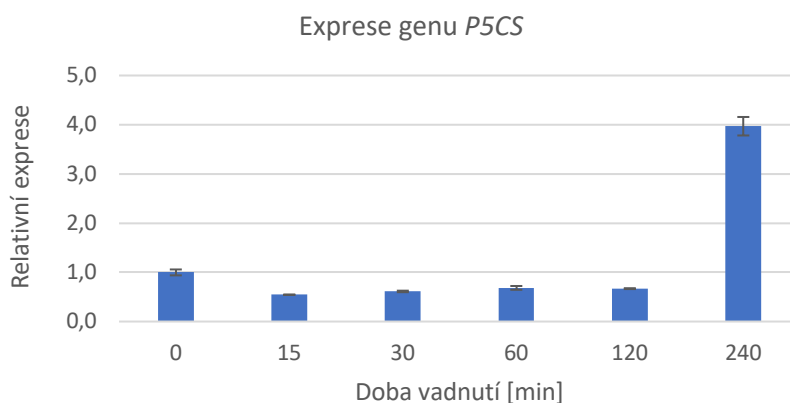
Expresce genu *P5CR* po prvních 15 minutách byla až o polovinu nižší v porovnání s kontrolou (0 min). Nad úroveň exprese kontroly se exprese genu zvedla po 60 minutách. Po 120 minutách exprese *P5CR* klesla znova pod hladinu genové exprese kontroly. V posledním sledovaném časovém bodě (240 min) stoupla exprese více než třikrát vzhledem ke kontrole (viz Obrázek 9).



Obrázek 9: Expresce genu *P5CR* v nadzemní části rostlin pšenice z pole. Sloupce znázorňují geometrický průměr exprese ze tří technických opakování, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.

Expresce genu *Pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS)*

V případě genu *P5CS* klesla expresce genu u vzorků s časem vadnutí 15, 30, 60 a 120 minut vzhledem ke kontrole (0 min). Tyto expresce byly až o polovinu nižší než v případě kontroly. Naopak v čase vadnutí 240 minut výrazně stoupla expresce genu, a to až na čtyřnásobek expresce kontrolního vzorku (viz Obrázek 10).



Obrázek 10: Expresce genu *P5CS* v nadzemní části rostlin pšenice z pole. Sloupce znázorňují geometrický průměr expresce ze tří technických opakování, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.

5.2 Optimalizace *in vivo* testu na stres pšenice nedostatkem půdní vláhy pomocí 3D laserového skeneru

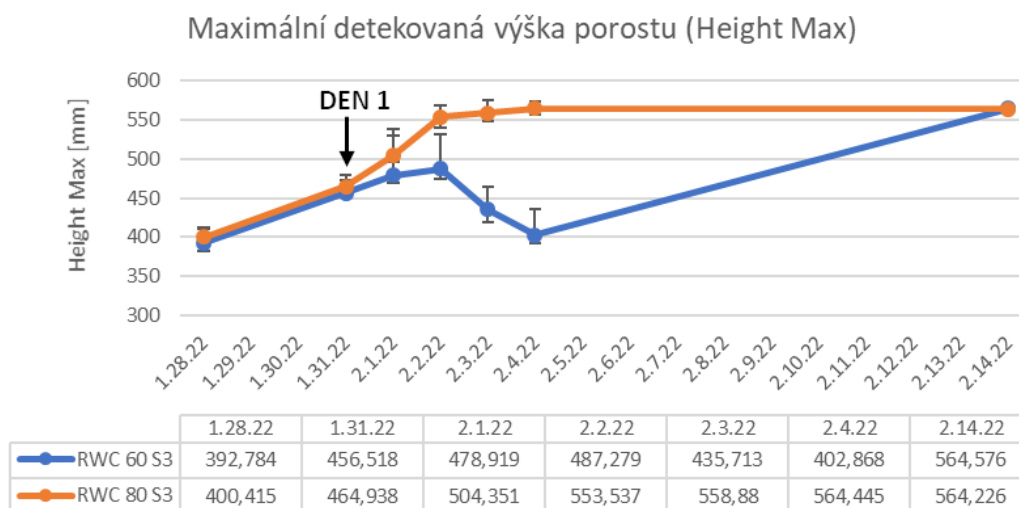
Vzhledem k typu stresu v umělých podmínkách (nádobový pokus v růstové komoře), nebylo před začátkem jasné, jaký je vhodný poměr substrátu a písku v nádobách, tak aby v daných podmínkách stres nastupoval dostatečně rychle, zároveň však aby neovlivnil rostliny před vývoje prvního pravého listu. Experiment byl založen se třemi typy směsi substrátů (1 – 3), se dvěma typy závlivky (80 % RWC, 60 % RWC) a vždy v pěti opakováních (A – E). Míra stresu byla hodnocena měřením morfologických parametrů nadzemních částí rostlin, hodnocených pomocí 3D laserového skenování (PlantEye F400 skener). Stanovení relativního obsahu vody v půdě (RWC) bylo provedeno pomocí vážení květináčů při známé hmotnosti sušiny i plně nasyceného vzorku každé směsi. Měření (skenování a vážení květináčů s rostlinkami) začalo desátý den od výsevu při plném rozvoji děložního listu. Před samotným odběrem vzorků byly květináče s vypěstovanou pšenicí zváženy a vývoj hmotnosti květináčů v průběhu experimentu je zaznamenán v tabulce 11 níže. Po vývoji prvního pravého listu bylo zastaveno zalévání rostlin pěstovaných při 60 % RWC. U těchto vzorků s můžeme vidět snižování hmotnosti substrátu v průběhu měřících dnů v důsledku nezalévání daných rostlin. U vzorků, kde docházelo k zalévání dle váhy (vzorky s 80 % RWC), se hmotnosti květináčů nijak výrazně nemění v průběhu měření.

Tabulka 11: Souhrnná tabulka zaznamenaných hodnot vážení květináčů s rostoucí pšenící vždy před odběrem vzorku (vysvětlení ID – číslo 80 a 60 odpovídá míře zálivky, písmeno udává biologické opakování, číslo 1 – 3 znamená typ směsi substrátu)

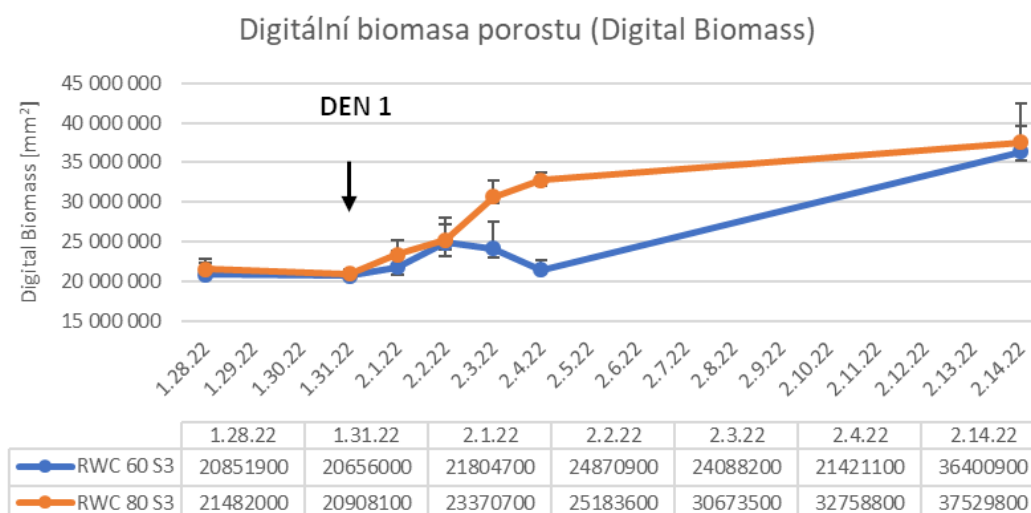
ID	Hmotnost květináče [g]					ID	Hmotnost květináče [g]				
	31.01.	01.02.	02.02.	03.02.	04.02.		31.01.	01.02.	02.02.	03.02.	04.02.
80A1	1 165,0	1 320,0	1 248,0	1 277,5	1 215,0	60A1	1 091,5	1 221,5	1 112,5	1 029,5	995,0
80B1	1 213,5	1 303,5	1 256,5	1 274,0	1 264,0	60B1	1 073,0	1 168,0	1 047,0	1 002,0	979,0
80C1	1 233,5	1 301,0	1 281,5	1 255,0	1 265,5	60C1	1 073,0	1 191,5	1 075,0	1 014,5	987,5
80D1	1 221,0	1 284,0	1 262,0	1 280,5	1 231,0	60D1	1 072,5	1 197,0	1 088,5	1 022,0	994,0
80E1	1 253,0	1 312,0	1 276,5	1 272,0	1 245,5	60E1	1 190,0	1 216,0	1 115,0	1 034,0	998,0
80A2	977,0	1 122,0	1 081,5	1 064,0	1 056,5	60A2	860,0	964,5	868,5	787,5	751,0
80B2	1 003,0	1 137,0	1 101,5	1 085,5	1 058,5	60B2	849,0	960,0	857,0	784,5	746,5
80C2	1 026,5	1 121,5	1 052,0	1 073,0	1 004,5	60C2	856,5	965,0	856,5	779,0	746,0
80D2	959,0	1 121,0	1 057,5	1 062,0	1 037,0	60D2	884,0	936,0	816,0	764,5	737,5
80E2	972,0	1 127,0	1 087,5	1 082,0	1 043,0	60E2	901,5	943,5	817,0	768,0	740,0
80A3	710,5	767,5	753,5	748,0	720,5	60A3	714,5	637,0	593,0	572,0	555,5
80B3	731,0	760,5	749,5	746,0	697,0	60B3	696,5	648,5	601,0	574,0	558,5
80C3	682,0	849,5	735,5	737,5	726,0	60C3	699,0	680,0	615,0	586,0	567,0
80D3	726,5	775,0	741,5	757,5	735,5	60D3	722,0	670,5	612,0	583,5	564,0
80E3	767,0	788,0	744,5	748,5	722,5	60E3	675,0	653,0	603,5	577,0	561,0

Při hodnocení míry stresu pomocí PlantEye skeneru od společnosti Phenospex jsem v rámci méj bakalářské práce využila dva morfologické parametry, které PlantEye skener nabízí a počítá. Jedná se o parametr maximální výšky rostliny/porostu a parametr digitální biomasy. Obrázky 11 a 12 znázorňují závislost parametru maximální výšky a digitální biomasy na jednotlivých dnech měření. V grafech lze vidět stoupající či klesající tendenci parametrů v souvislosti s mírou zálivky a délkou experimentu. Pro oba grafy byly vypočítány mediány hodnot, které byly získány od vzorků zasetých do směsi č. 3 (tři díly substrátu : jeden díl písku). V grafech je znázorněna časová osa měření parametrů

skrže PlantEye skener. Samotný odběr vzorků, vážení a definované zalévání kontrolních (nestresovaných) rostlin pšenice začalo až od 31.1.2022.

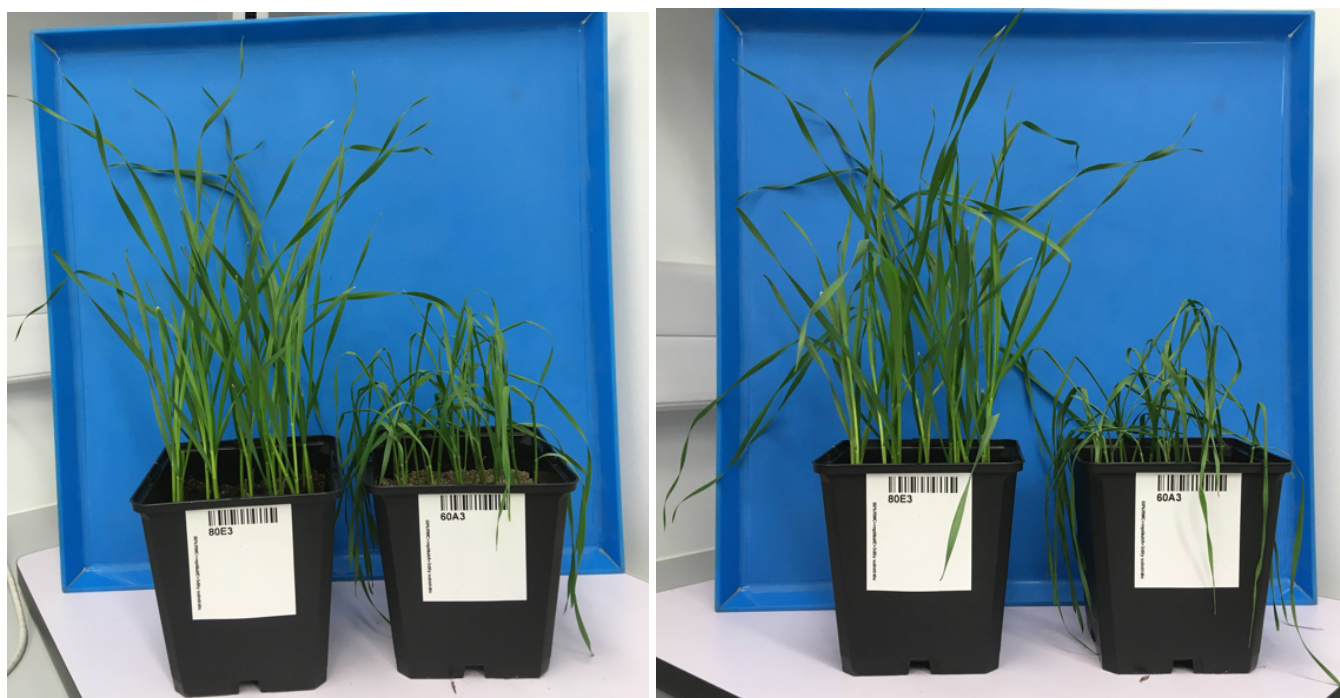


Obrázek 11: Graf závislosti maximální výšky porostu na stresované (RWC 60) a nestresované (RWC 80) pšenici *Triticum aestivum* v souvislosti s časovou osou experimentu. Body znázorňují průměrnou hodnotu parametru ve třech biologických opakováních, chybové úsečky pak hodnotu standardní chyby. Šipka označuje DEN 1, první den odběru materiálu k hodnocení exprese ROS genů.



Obrázek 12: Graf závislosti obsahu digitální biomasy na stresované (RWC 60) a nestresované (RWC 80) pšenici *Triticum aestivum* v souvislosti s časovou osou experimentu. Body znázorňují průměrnou hodnotu parametru ve třech biologických opakováních, chybové úsečky pak hodnotu standardní chyby. Šipka označuje DEN 1, první den odběru materiálu k hodnocení exprese ROS genů.

Průběh změny fenotypu rostlin je možné rovněž pozorovat pouhým okem, byť tyto změny není možné snadno kvantifikovat. Ilustrační obrázky (Obrázek 13 – 16) ukazují viditelný stav rostlin, hlavně jejich listů, v průběhu experimentu. Hlavními viditelnými znaky působení sucha je vadnutí rostliny. Vadnutí se v případě našeho experimentu projevovalo hlavně stočením listů a následným poklesem až zvadnutím celé rostliny. Měření výšky pomocí 3D skeneru ukázalo nejprve zastavení růstu, jakožto nejranější projev vážného stresu a následně pokles výšky způsobený ztrátou turgorového tlaku v listech. Tento je pak viditelný pouhým okem. U květináčů s vysazenou pšenicí do směsi č. 3 se výrazné projevy vadnutí objevují už po třech dnech stresování suchem (Obrázek 13), tedy nezaléváním květináče a způsobením tak nedostatku půdní vláhy. U stresovaných vzorků ve směsích č. 1 a 2 ve stejném čase nejsou projevy nedostatku půdní vláhy skoro vůbec viditelné, lze porovnat pouze jejich nižší výšku porostu oproti nestresovaným, kontrolním vzorkům pšenice (Obrázek 14). Stočení a pokles listů je u nich viditelný až o přibližně dva dny později (Obrázek 15). Proto pro následnou izolaci RNA byly použity vzorky pšenice ze směsi č. 3. V případě nestresované, kontrolní, zalévané pšenice na 80 % RWC pozorujeme pouze růst stonků a prodlužování listů. Po čtvrtém dnu vyvíjení stresu nedostatečnou mírou zálivky, a tedy nedostatkem půdní vláhy podstoupily vzorky se stresovanou pšenicí tzv. rewatering a po dobu následujících 10ti dnů byla zálivka v květináčích udržována v optimálních podmínkách a pšenice byla zalévána na 100 % RWC. Poté proběhl poslední odběr biologického materiálu. Všechny vzorky, ať už stresované nebo nestresované, vypadaly na první pohled velice podobně. Projevy vadnutí nebyly vizuálně patrné, pouze se listy některých rostlinek pšenice ohýbaly z důvodu jejich vyššího vzrůstu a nízkého stropu ve fytotronu (Obrázek 16).



Obrázek 13: Vizuální porovnání stresované (60A3) pšenice s viditelnými projevy vadnutí s kontrolní (80E3) rostlinou pšenice. Směs substrátu č. 3. Vlevo – Den 3, vpravo – Den 4.



Obrázek 14: Vizuální porovnání stresované (60D1) pšenice bez viditelných projevů vadnutí s kontrolní (80B1) rostlinou pšenice. Směs substrátu č. 1. Vlevo – Den 1, vpravo – Den 3.



Obrázek 15: Vizuální porovnání stresované (60D1) pšenice s viditelnými projevy vadnutí s kontrolní (80B1) rostlinou pšenice (Den 4). Směs substrátu č. 1.



Obrázek 16: Vizuální porovnání stresované (60D1/A3) pšenice bez viditelných projevů vadnutí s kontrolní (80B1/E3) rostlinou pšenice. Vlevo – směs substrátu č. 1, vpravo – směs substrátu č. 3.

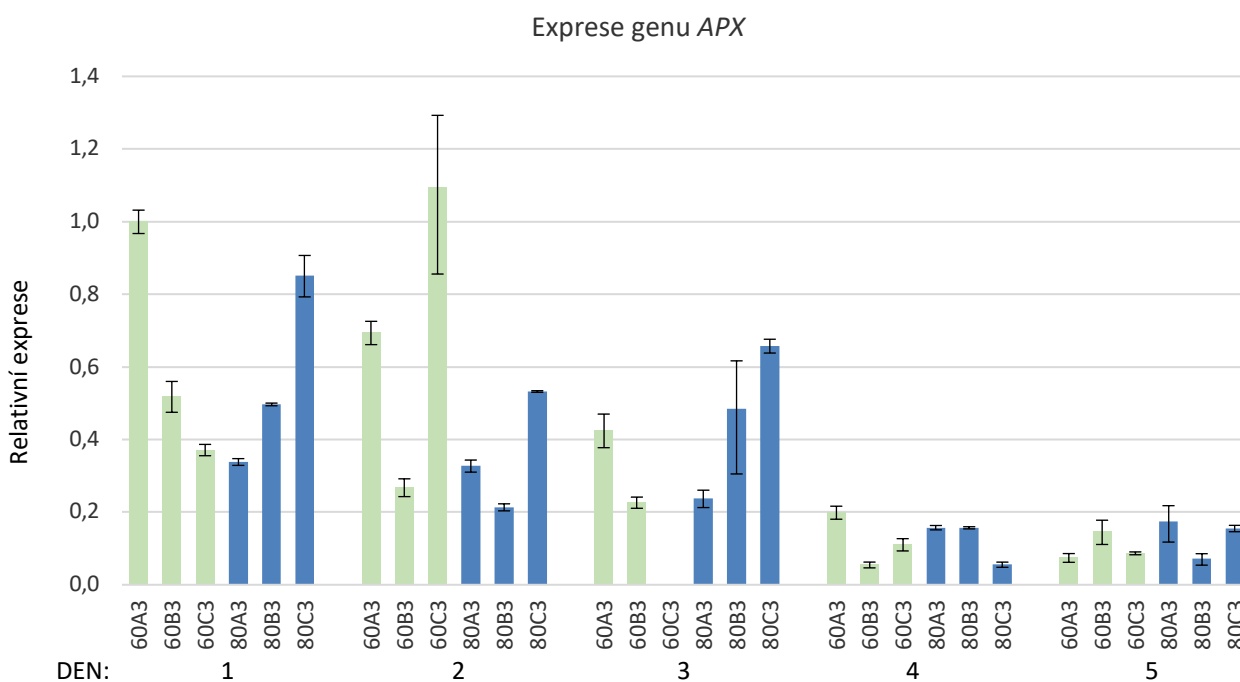
Odebrané vzorky pšenice ze stresovaných a nestresovaných podmínek byly využity pro vyizolování RNA. Pro izolaci byly použity triplikáty vzorků pěstovaných ve směsi č. 3. Izolace RNA byla provedena pomocí Isolate II RNA Plant Kitu a následovaly dvě kola přečištění získané RNA. Čistota a koncentrace vyizolované a přečištěné RNA byla po každém kroku změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop (NanoDrop One/One^C UV-Vis Spektrofotometr) a integrita získané RNA byla hodnocena pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu.

5.3 Analýza exprese genů zapojených do reakce oxidativního poškození způsobené nedostatkem půdní vláhy v pěstebních kontejnerech

Analýza genové exprese proběhla pomocí reverzní transkripce vyizolované RNA do cDNA a následnou kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Jako referenční gen byl použit interní standard *CJ*. Byla porovnána exprese genů u vzorků pšenice, které byly stresované nedostatkem půdní vláhy (zelené vzorky v grafech níže) vzhledem ke kontrolním nestresovaným vzorkům (modré vzorky). Vzhledem k vysoké heterogenitě získaných výsledků nebyly hodnoty obdrženy v jednotlivých biologických opakováních sumarizovány a prezentovány formou střední hodnoty (průměr, medián), ze stejného důvodu nebylo provedeno statistické hodnocení a v grafech jsou prezentovány pouze geometrické průměry z technických opakování a jejich standardní chyby.

Expresse genu Ascorbate peroxidase (APX)

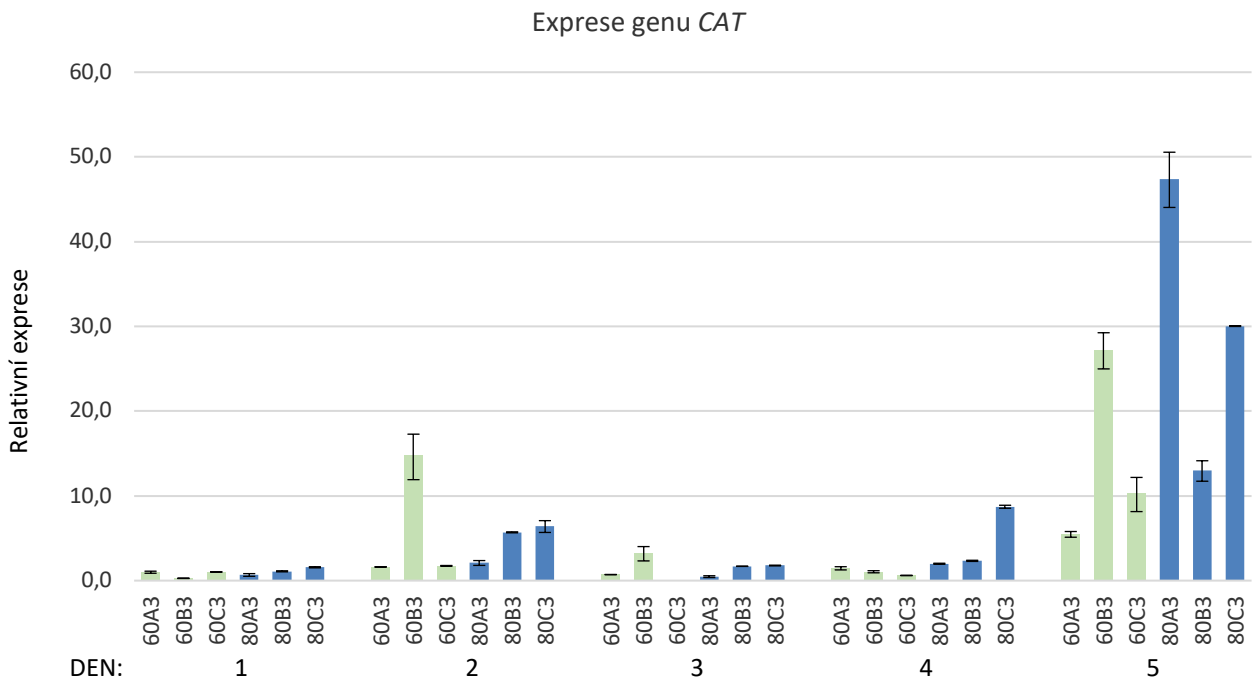
Expresse genu *APX* dosáhla největšího vzestupu u stresovaných vzorků odebraných v den 2 vzhledem k jejich kontrole z téhož dne. Expresse genu první den odběru byla u stresované pšenice byla vyšší, ale vzhledem ke kontrole vzestup exprese nebyl tak markantní. V pozdějších stádiích vadnutí pšenice exprese genu *APX* klesla jak u stresovaných, tak i u kontrolních vzorků. V případě období po rewateringu (Den 5) jsou exprese kontrolních i stresovaných rostlin velmi podobné (viz Obrázek 17).



Obrázek 17: Expresse genu *APX* na stresované (zelená) a kontrolní (modrá) rostlině pěstované za kontrolovaných podmínek. Sloupce znázorňují relativní exprese tří technických opakování pro každé z biologických opakování (A, B, C) z jednotlivých dnů odběru, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.

Expresa genu *Catalase* (*CAT*)

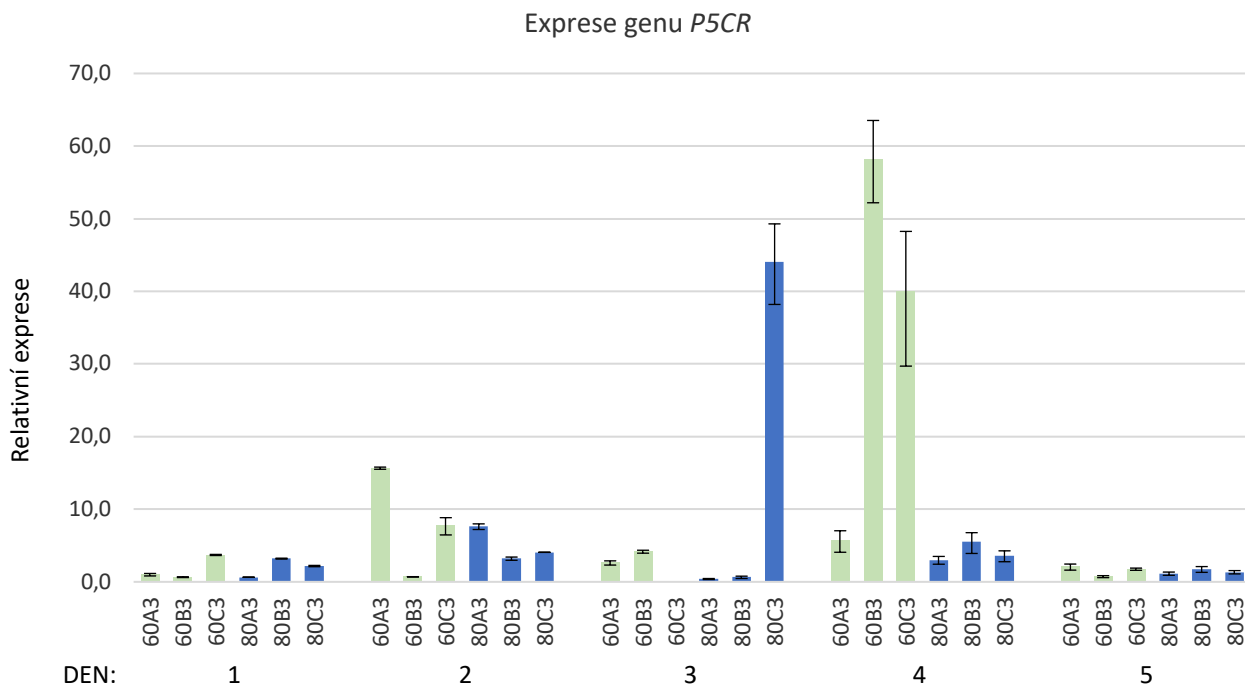
Změna exprese genu *CAT* v průběhu prvních odběrových dnů není výrazná. Expresa genu se pohybuje v nižších hodnotách s lehkými vzestupy a sestupy a v porovnání stresovaných a kontrolních vzorků mají kontroly vyšší expresi genu *CAT*. Výkyv exprese nastal u jednoho technického triplicátu stresované rostliny ze dne 2. Výrazný vzestup exprese se uskutečnil v pátý den, kdy expresi kontroly se navýšila až o čtyřnásobek hodnoty exprese z předchozích dnů. V tento den je vidět vzestup exprese i u stresovaných rostlin po rewateringu. Vzhledem ke kontrole z téhož dne je expresi *CAT* u stresovaných rostlin zhruba poloviční (viz Obrázek 18).



Obrázek 18: Expresa genu *CAT* na stresované (zelená) a kontrolní (modrá) rostlině pěstované za kontrolovaných podmínek. Sloupce znázorňují relativní expresi tří technických opakování pro každé z biologických opakování (A, B, C) z jednotlivých dnů odběru, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.

Expresa genu *Pyrroline-5-carboxylate reductase* (*P5CR*)

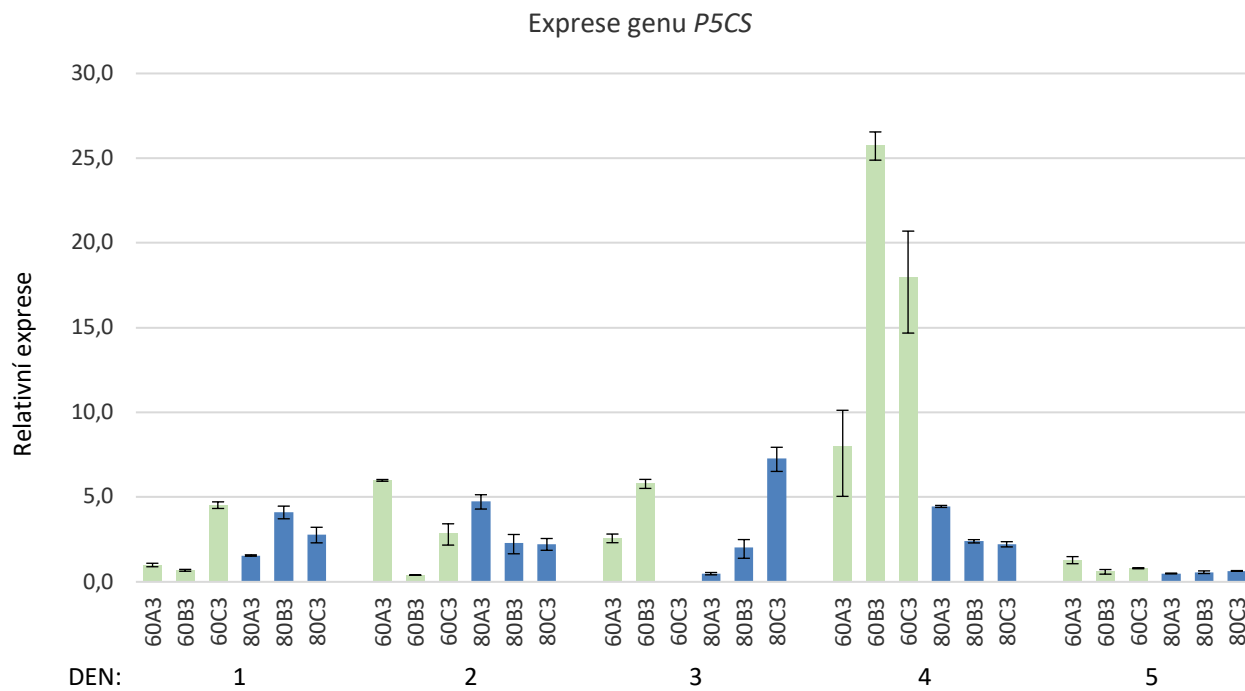
U genu *P5CR* největší nárůst exprese genu u stresovaných rostlin byl zaznamenán čtvrtý den odběru (Den 4), vzhledem ke kontrole z téhož dne je expresi u stresovaných vzorků až čtyřikrát vyšší. První dny vadnutí je míra exprese genu velmi nízká a podobná expresi genu u kontroly. Menší vzestup exprese v porovnání s kontrolou je u vzorků ze dne 2. Po rewateringu a následném odběru v den 5 jsou míry exprese genu *P5CR* u kontrolních a stresovaných vzorků velice podobné a oproti předchozímu odběru velmi nízké (viz Obrázek 19).



Obrázek 19: Expresse genu *P5CR* na stresované (zelená) a kontrolní (modrá) rostlině pěstované za kontrolovaných podmínek. Sloupce znázorňují relativní exprese tří technických opakování pro každé z biologických opakování (A, B, C) z jednotlivých dnů odběru, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.

Expresse genu Pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS)

V případě genu *P5CS* je expresse genu stresovaných rostlin v první den odběru nižší než u kontrolních rostlin z téhož dne. V následujících dvou dnech míra expresse genu lehce narostla, vzhledem ke kontrole se jeví jako nižší nebo podobná. Největší a strmý nárůst expresse genu je zaznamenán u stresovaných vzorků ze dne 4, genová expresse je oproti kontrole více jak dvakrát větší. V poslední den odběru (Den 5) po rewateringu jsou expresse genu u stresovaných a kontrolních rostlin velice podobné, s mírným nárůstem expresse v případě stresovaných vzorků (viz Obrázek 20).



Obrázek 20: Expresse genu *P5CS* na stresované (zelená) a kontrolní (modrá) rostlině pěstované za kontrolovaných podmínek. Sloupce znázorňují relativní exprese tří technických opakování pro každé z biologických opakování (A, B, C) z jednotlivých dnů odběru, chybové úsečky znázorňují standardní chybu.

6 DISKUZE

Oxidativní poškození úzce souvisí s produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS), zejména v případě indukce stresu a signalizačních drah s ním spojených. ROS jsou důležité v reakci na abiotické stresy a musejí být vhodně regulovány, aby se eliminovala jejich toxicita (Castro a kol., 2021). Hlavním cílem praktické části bakalářské práce byla analýza genové exprese vybraných genů u pšenice (*Triticum aestivum*), které jsou spojeny s oxidativním poškozením u rostlin, za účelem detekce nastartování obranných mechanismů proti ROS u rostlin stresovaných nedostatkem půdní vláhy. Za tímto účelem jsme využili recentní práce Dudziak a kol. (2019), která se poprvé zabývala expresní analýzou ROS genů u pšenice. Tuto práci jsme si vzali jako podklad a pokusili se přenést a modifikovat některé z popsaných metod do našich podmínek. Bylo nezbytné otestovat metodu extrakce RNA, popsané primery, navržené původně pro využití ve spojení s TaqMan sondami, a především citlivost zvolených genů k nedostatku půdní vláhy, jelikož původní práce hodnotila jejich expresi pouze po ošetření osmotikem PEG-6000.

Jedním z důležitých zjištění bylo, že je možné k izolaci RNA z našich vzorků pšenice využít i standardní izolační kit, zatímco ve studii Dudziak a kol. (2019), byla RNA získávána pomocí izolace Trizol reagentem. Jako zásadní se však ukázala nutnost optimalizace samotných primerů, jelikož měřené účinnosti dosahovaly hodnot, které jsou mimo doporučený rozsah (viz Tabulka 8 – účinnost primerů). Vzhledem k časovým a finančním možnostem byly i tyto ne-zcela optimální primery použity pro test citlivosti ke stresu, získané výsledky je tedy třeba považovat za předběžné. Geny, které jsou propojovány s ROS a rostlinným stresem, byly vybrané na základě výsledků studie Dudziak a kol. (2019), tuto práci jsme také použili jako hlavní vztažný bod diskuze. Vybrané geny (*APX*, *CAT*, *P5CR*, *P5CS*) byly studovány pro jejich využití jako markery oxidativního poškození u rostlin, které bylo způsobeno nedostatkem půdní vláhy v průběhu experimentu.

V rámci mojí práce byly studovány 4 geny ve dvou různých testech – podmínkách. První test se prováděl na základě studie Dudziak a kol. (2019) a proběhl na uvádějícím obilí, kdy odštíhnuté rostliny pšenice byly nechány vadnout po stanovený čas. Zatímco v citované práci byla exprese ROS genů indukována osmotickým stresem, naším předpokladem bylo zvýšení exprese genů v reakci na stres způsobený vadnutím. Tato hypotéza byla potvrzena u všech čtyř genů. Geny *APX* a *CAT* měly největší expresi po 30 minutách vadnutí, zatímco geny *P5CR* a *P5CS* se nejvíce exprimovaly až po 2 hodinách vadnutí. Ve výsledcích studie Dudziak a kol. (2019) se objevil stejný trend exprese pro geny *P5CR* a *P5CS*. Exprese genů, které se podílejí na biosyntéze prolinu (*P5CR*, *P5CS*), měla velice podobný charakter v rámci časového rozpětí studie i našich výsledků. Výsledky studie ukázaly významné zvýšení exprese obou genů v řádu prvních pár hodin stresu jako velmi rychlou reakci na vystavení se stresu. Toto okamžité zvýšení úrovně exprese genů potvrzuje hypotézu Dudziak a kol. (2019), že hlavním mechanismem biosyntézy prolinů v reakci na sucho je regulace na úrovni transkripce. V případě

antioxidačních enzymů CAT a APX Dudziak a kol. dospěli k závěru, že u většiny testovaných substitučních linií (ISCSL) pšenice (*Triticum aestivum*) bylo pozorováno významné zvýšení exprese CAT už po 1 hodině stresu. Toto zvýšení exprese u většiny použitých linií zůstalo stabilní až po dobu 6 hodin. V našem případě výrazný vzestup exprese byl zaznamenán po 30 minutách vadnutí a poté tendence exprese CAT byly klesající s výjimkou posledního časového bodu, kdy byla exprese opět vyšší než u kontrolního vzorku. Pro gen APX studie charakterizovala model pro expresi genu APX jako počáteční zvýšení exprese následované snížením. K tomuto vzoru jsme dospěli i my v rámci experimentální části, ovšem ve velmi malém měřítku. Zvýšení exprese APX bylo pouze v řádu několika procent a je spíše nepravděpodobné, že by se tento trend podařilo potvrdit na větším statistickém souboru. Dudziak a kol. (2019) ale dále v článku zmiňuje, že jí pozorovaný vzor exprese byl pozorován pouze u některých linií, a nelze tento trend definovat jako konstitutivní vzor exprese.

Druhý test analýzy exprese genů se prováděl za kontrolovaných podmínek na pšenici rostoucí v nádobách s definovaným půdním vodním potenciálem (RWC). Stresovým faktorem zde byl nedostatek půdní vláhy. Výsledná exprese genu APX byla u stresovaných rostlin nejvyšší v průběhu prvních dvou dnů stresu, a tedy ještě před nástupem vizuálních známek vadnutí rostlin. Studie Xu a kol. (2011) byla zaměřená na reakce antioxidačních enzymů na stres ze sucha na druhu trávy lipnice luční (*Poa pratensis*). Výsledky studie Xu a kol. naznačují, že na úrovni vyššího genového transkriptu by APX mohlo hrát hlavní roli při ochraně rostlin před oxidačním stresem vyvolaným suchem. V práci Jiang a kol. (2010) došlo z důvodu 7denního stresu ze sucha ke zvýšení hladiny APX ve sledovaných genotypech smělka štíhlého (*Koeleria macrantha*). Míra exprese APX (jejich různých izoform) je rozdílně regulovaná v reakci na environmentální stresy i v závislosti na jejich subcelulární lokalizaci. Této skutečnosti se věnoval Pandey a kol. (2017) a ve své práci vymezuje roli izoform APX s ohledem na různé typy abiotických stresů.

V případě genu CAT se celkově exprese u stresovaných rostlin výrazně nezvýšila ani v jeden den odběru při působení stresu. K náhlému nárůstu exprese došlo u stresovaných i kontrolních rostlin po rewateringu a deseti dnech zalévání rostlin na 100 % RWC. Dvojice genů P5CR a P5CS měla, jako v případě studie Dudziak a kol. a v případě testu na uvadající pšenici, velice podobný model exprese. K nejvyššímu nárůstu exprese obou genů došlo v čase, kdy už rostlina vykazovala znatelné znaky stresu (kroucení listů, pokles výšky porostu, vadnutí rostlin). Geny CAT exprimují antioxidační enzym katalázu, a právě tuto rodinu genů komplexně zanalyzoval Raza a kol. (2021) ve své studii na řepce (*Brassica napus*). Studie identifikovala 14 *BnCAT* genů v genomu řepky. Analýza genové exprese ukázala, že některé *BnCAT* geny byly významně zvýšeny působením chladu, slanosti nebo kyseliny abscisové, ale ne suchem. Upregulace (zvýšení odpovědi na podnět) genu CAT byla také pozorována u ječmene (*Hordeum vulgare*) po 2 dnech sucha (Harb a kol., 2015). Vysoké hladiny exprese genu CAT byly pozorovány i u *Cleome gynandra* a *C. spinosa* během dlouhodobé expozice suchu (10 dní) ve studii Uzilday a kol. (2012). V případě genu P5CS došlo ke zvýšení hladin jeho transkriptu u rýže (*Oryza*

sativa) po 2 a 5 hodinách stresu suchem (Choudhary a kol., 2005). Upregulace genu *P5CS* byla také pozorována za podmínek osmotického stresu vyvolaného chloridem sodným NaCl (stres ze slanosti) v pšenici (Tavakoli a kol., 2016). Zvýšení exprese genů *P5CS* a *P5CR* byla také nalezena u *K. macrantha* za podmínek stresu ve studii Jiang a kol. (2010).

7 ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byla provedena řada experimentů zkoumající vliv stresu na expresi čtyř genů spojovaných s reakcí rostlin na oxidativní stres. Smyslem celé práce bylo ověřit možnosti kvantitativního hodnocení exprese těchto genů za účelem měření míry stresu a testování antistresových účinků přírodních látek a jejich derivátů, které se syntetizují na Katedře chemické biologie. Tyto antistresové účinky jsou důležité zejména u kulturních plodin. Jako hlavní zemědělskou plodinu jsme zvolili pšenici, nejpěstovanější plodinu vůbec. Geny a primery pro ně byly vybrány na základě studie Dudziak a kol. (2019), která se jako první detailně věnovala expresním profilům ROS-responzivních genů u pšenice. Naším cílem tedy bylo ověřit přenositelnost popsané metody do námi definovaných podmínek: práci s rostlinami podstupující reálný stres nedostatkem vláhy, pěstovanými v substrátu nikoliv pouze v in vitro podmínkách. Za tímto účelem byl navržen a otestován postup pro pěstování rostlin s indukcí vláhového stresu pomocí různých směsí pěstební substrátu a míra stresu byla hodnocena fenotypově pomocí měření výšky porostu 3D skenerem. Byl zvolen nejvhodnější substrát a rostliny z něj byly použity pro expresní analýzu. Následně byl navržen a otestován protokol pro extrakci RNA, její přečištění a přepis do cDNA a pro qPCR analýzu exprese. V mé práci se podařilo ověřit, že je možné izolovat RNA v dostatečném množství a čistotě z rostlin pšenice pomocí komerčního kitu, což značně zjednoduší budoucí rutinní použití protokolu. RNA se takto podařilo získat jak z rostlin odebraných z pole, tak z rostlin pěstovaných v nádobách. V obou případech se rovněž podařilo detekovat reakci rostlin na stres, a to jak na vnější – fenotypové, tak i na vnitřní, expresní rovině. Podařilo se prokázat citlivost studovaných genů na námi indukované stresové podmínky, a to v různých časových horizontech. Nicméně jako nejcitlivější v krátkodobém testu (minuty až hodiny) se ukázal gen *CAT* kódující katalázu. Naopak v delším časovém horizontu se jako nejcitlivější ukázal gen kódující *APX* (*Ascorbate peroxidase*). Oba tyto geny by se po ověření výsledků mohly stát hlavními markery ROS stresu. Jejich exprese by pak mohla být významným selekčním parametrem pro iniciální výběr látek s antioxidačním potenciálem. Před samotným návrhem molekulárně-biologického testu, však bude nezbytné ověřit výsledky dosažené v této práci. Zejména bude nezbytná optimalizace primerů, tak aby bylo dosaženo maximální účinnosti, rovněž by bylo vhodné provést studii na stabilitu exprese *housekeeping* genu v různých fázích stresu. Obojí bude náplní další práce v tomto tématu.

8 LITERATURA

- Ballottari M., Mozzo M., Girardon J., Hienerwadel R., Bassi R. (2013): Chlorophyll Triplet Quenching and Photoprotection in the Higher Plant Monomeric Antenna Protein Lhcb5. *The Journal of Physical Chemistry B* 117(38): 11337–11348.
- Castro B., Citterico M., Kimura S., Stevens D.M., Wrzaczek M., Coaker G. (2021): Stress-induced ROS compartmentalization, perception and signalling. *Nat Plants* 7(4): 403-412.
- Caverzan A., Passaia G., Rosa S. B., Ribeiro C. W., Lazzarotto F., Margis-Pinheiro M. (2012): Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* 35(4): 1011–1019.
- de Ronde J. A., Spreeth M.H., Cress W.A. (2000): Effect of antisense L- δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress. *Plant Growth Regulation* 32: 13-26.
- Dudziak K., Zapalska M., Börner A., Szczerba H., Kowalczyk K., Nowak M. (2019): Analysis of wheat gene expression related to the oxidative stress response and signal transduction under short-term osmotic stress. *Scientific reports* 9(1): 1-14.
- El-Beltagi H. S., Mohamed H. I., Sofy M. R. (2020): Role of Ascorbic acid, Glutathione and Proline Applied as Singly or in Sequence Combination in Improving Chickpea Plant through Physiological Change and Antioxidant Defense under Different Levels of Irrigation Intervals. *Molecules* 25(7): 1702.
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Basra S. M. A. (2009): Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29: 185–212.
- Fu J., Huang B. (2001): Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 45(2): 105–114.
- Harb A., Awad D., Samarah, N. (2015): Gene expression and activity of antioxidant enzymes in barley (*Hordeum vulgare* L.) under controlled severe drought. *Journal of Plant Interactions* 10(1): 109–116.
- Hasanuzzaman M., Bhuyan M. H. M. B., Parvin K., Bhuiyan T. F., Anee T. I., Nahar K., Hossen Md. S., Zulfiqar F., Alam Md. M., Fujita M. (2020b): Regulation of ROS Metabolism in Plants under Environmental Stress: A Review of Recent Experimental Evidence. *International Journal of Molecular Sciences* 21(22): 8695.
- Hasanuzzaman M., Bhuyan M. H. M. B., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S. M., Al Mahmud J., Fujita M., Fotopoulos V. (2020a): Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants* 9(8): 681.
- Choudhary N.L., Sairam R.K., Tyagi A. (2005): Expression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian J Biochem Biophys* 42(6): 366-370.
- Choudhury F. K., Rivero R. M., Blumwald E., Mittler R. (2017): Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* 90: 856-867.

- Jiang Y., Watkins E., Liu S., Yu X., Luo N. (2010): Antioxidative Responses and Candidate Gene Expression in Prairie Junegrass under Drought Stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135(4): 303-309.
- Kao C. H. (2017): Mechanisms of salt tolerance in rice plants: Reactive oxygen species scavenging-systems. *J. Taiwan Agric. Res.* 66(1): 1–8.
- Kapoor D., Singh S., Kumar V., Romero R., Prasad R., Singh J. (2019): Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene* 19: 100182.
- Kavi Kishor P. B., Sreenivasulu N. (2013): Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant, Cell and Environment* 37(2): 300–311.
- Kawakami S., Matsumoto Y., Matsunaga A., Mayama S., Mizuno M. (2002): Molecular cloning of ascorbate peroxidase in potato tubers and its response during storage at low temperature. *Plant Science* 163(4): 829–836.
- Kůdela V., Ackermann P., Prášil I. T., Rod J., Veverka K. (2013): Abiotikózy rostlin: poruchy, poškození a poranění. Academia, Praha. ISBN 978-80-200-2262-2.
- Leng X., Wang H., Zhang S., Qu C., Yang C., Xu Z., Liu G. (2021): Identification and Characterization of the APX Gene Family and Its Expression Pattern under Phytohormone Treatment and Abiotic Stress in *Populus trichocarpa*. *Genes* 12(3): 334.
- Matoušková M., Ruttkay-Nedecký B., Kizeka R. (2014): Antioxidační enzymy - biochemické markery oxidačního stresu, *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 1(3): 53-56.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants a and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410.
- Müllerová V., Nábělek T., Kuchař V. (2014): Rok zahradníka: praktický pomocník při pěstování plodin či hubení škůdců ve vaší zahradě. AgroBio Opava, Oldřichov. ISBN 978-80-260-5664-5.
- Nadarajah K. K. (2020): ROS Homeostasis in Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 21(15): 5208.
- Pandey S., Fartyal D., Agarwal A., Shukla T., James D., Kaul T., Negi Y. K., Arora S., Reddy, M. K. (2017): Abiotic Stress Tolerance in Plants: Myriad Roles of Ascorbate Peroxidase. *Frontiers in Plant Science* 8: 581.
- Raza A., Su W., Gao A., Mehmood S. S., Hussain M. A., Nie W., Lv Y., Zou X., Zhang X. (2021): Catalase (CAT) Gene Family in Rapeseed (*Brassica napus* L.): Genome-Wide Analysis, Identification, and Expression Pattern in Response to Multiple Hormones and Abiotic Stress Conditions. *International Journal of Molecular Sciences* 22(8): 4281.
- Sharma P., Dubey R. S. (2007): Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports* 26(11): 2027–2038.
- Taiz L., Zeiger E., Møller I. M., Murphy A. (2018): *Plant physiology and development*. International sixth edition. Sinauer Associates, New York, Oxford University Press, Oxford. ISBN 978-1-60535-745-4.

- Tavakoli M., Poustini K., Alizadeh H. (2016): Proline Accumulation and Related Genes in Wheat Leaves under Salinity Stress. *JAST* 18(3): 707-716.
- Uzilday B., Turkan I., Sekmen A. H., Ozgur R., Karakaya H. C. (2012): Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. *Plant Science* 182: 59–70.
- Waszczak C., Carmody M., Kangasjärvi J. (2018): Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology* 69(1): 209-236.
- Xu L., Han L., Huang B. (2011): Antioxidant Enzyme Activities and Gene Expression Patterns in Leaves of Kentucky Bluegrass in Response to Drought and Post-drought Recovery. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 136(4): 247-255.
- Yang D., Ni R., Yang S, Pu Y., Qian M., Yang Y., Yang Y. (2021): Functional Characterization of the *Stipa purpurea* P5CS Gene under Drought Stress Conditions. *International journal of molecular sciences* 22(17): 9599.
- Zálešák F., Bon D.J.D., Pospíšil J. (2019): Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. *Pharmacol Res.* 146: 104284.
- Zhao F., Zhang H. (2006): Salt and paraquat stress tolerance results from co-expression of the *Suaeda salsa* glutathione S-transferase and catalase in transgenic rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 349-358.