

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin



Analýza genové exprese u smrku ztepilého

Bakalářská práce

Autor: Barbora Nezbedová

Vedoucí práce: Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

2018

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Barbora Nezbedová

Aplikovaná ekologie

Název práce

Analýza genové exprese u smrku ztepilého

Název anglicky

Gene expression analysis of Norway spruce

Cíle práce

Cílem bakalářské práce je vypracovat podrobnou literární rešerši se zaměřením na za 1) obecně-metodický rozbor přístupů k analýze genové exprese u lesních dřevin a za 2) na konkrétní zájmový organismus, a to smrk ztepilý *Picea abies* (L.) H. Karst. s důrazem na skupinu genů, u kterých se předpokládá spojitost s odolností smrku vůči významným abiotickým stresovým faktorům. Součástí bakalářské práce rešeršního charakteru je také nástin metodiky analýzy genové exprese vybraných genů podmiňujících odolnost vůči abiotickým faktorům prostředí, která bude uplatněna v případě zpracování návazné diplomové práce.

Metodika

Bakalantka provede důkladný rozbor vědecké literatury a vypracuje literární rešerši se zaměřením definovaném v cílech práce. Jako zdroje informací budou využity především příspěvky ze žurnálů s Impact faktorem (IF). Minimální počet zdrojů citovaných v rešerši je 50. Dále autorka vypracuje stručný návrh metodiky analýzy genové exprese vybraných genů (dehydrinů) pomocí RT qPCR.

Doporučený rozsah práce

40 stran

Klíčová slova

smrk ztepilý, genová exprese, dehydriny

Doporučené zdroje informací

- Asante DKA, Yakovlev IA, Fossdal CG, Timmerhaus G, Partanen J, Johnsen Ø (2009) Effect of bud burst forcing on transcript expression of selected genes in needles of Norway spruce during autumn. *Plant Physiol Biochem* 47:681–689.
- Campbell SA, Close TJ (1997) Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytol*:61–74.
- Close TJ (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant* 97:795–803.
- Velasco-Conde T, Yakovlev I, Majada JP, Aranda I, Johnsen Ø (2012) Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response. *Tree Genet Genomes* 8:957–973.
- White TL, Adams WT, Neale DB. 2007. *Forest genetics*. CABI Publishers, Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA.
- Yakovlev IA, Asante DKA, Fossdal CG, Partanen J, Junntila O, Johnsen Ø (2008) Dehydrins expression related to timing of bud burst in Norway spruce. *Planta* 228:459–472.

Předběžný termín obhajoby

2017/18 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Elektronicky schváleno dne 20. 4. 2016

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

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 2. 5. 2016

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 06. 11. 2017

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Analýza genové exprese u smrku ztepilého vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jiřího Koreckého, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

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

V Kralupech nad Vltavou dne

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Jiřímu Koreckému, Ph.D. za trpělivost, ochotu, vstřícný přístup a cenné rady, které mi věnoval při zpracování této práce. Dále děkuji RNDr. Jaroslavu Čeplovi, Ph.D. za pomoc v oblasti praktické molekulární biologie. Mé velké poděkování patří i mé rodině za podporu, kterou mi poskytovala po celou dobu studia.

ABSTRAKT

V bakalářské práci s názvem Analýza genové exprese u smrku ztepilého je vypracována podrobná literární rešerše obecně-metodického rozboru přístupů k analýze genové exprese se zaměřením na smrk ztepilý a specifické produkty genové exprese (dehydriny). U dehydrinů se předpokládá spojitost s odolností smrku vůči významným abiotickým stresovým faktorům, jejichž společným jmenovatelem jsou především nevyhovující hydričné poměry stanoviště. Součástí rešeršní části práce je taktéž dendrologická, ekologická a genetická charakteristika zájmového druhu a detailní rozbor vědecké literatury zabývající se dehydriny.

Ve výzkumné části práce je navržena metodika pro zpracování a analýzu genové exprese, konkrétně izolace RNA, ověření kvalitativních a kvantitativních parametrů a její zpětný přepis do cDNA. Následně byla s využitím vybraných dehydrinových primerů testována a optimalizována metoda RT-qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase).

klíčová slova: genová exprese, dehydriny, RT-qPCR, *Picea abies* [L.] Karst., smrk ztepilý, abiotický stres

ABSTRACT

This bachelor thesis, entitled “Gene expression analysis of Norway Spruce”, contains a detailed literature review of general-methodical analysis of approaches to gene expression analysis focused on Norway Spruce and specific gene expression products (dehydrins). Dehydrins are associated with the resistance of the spruce to significant abiotic stress factors, the common denominator of which are the predominantly unsuitable hydrological habitat conditions. In addition, the review part of the thesis includes the dendrological, ecological and genetic characteristics of the species of interest, and a detailed analysis of the scientific literature dealing with dehydrins.

In the research part of the thesis, methodology for processing and analysis of gene expression is proposed, namely isolation of RNA, verification of qualitative and quantitative parameters and its reverse transcription into cDNA. Subsequently, the RT-qPCR method (quantitative real-time polymerase chain reaction) was tested and optimized using selected dehydrin primers.

keywords: gene expression, dehydrins, RT-qPCR, *Picea abies* [L.] Karst., Norway Spruce, abiotic stress

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍL PRÁCE	2
3	METODIKA ZPRACOVÁNÍ PRÁCE	3
4	LITERÁRNÍ REŠERŠE	4
4.1	EXPRESSE GENETICKÉ INFORMACE	4
4.1.1	Transkripce	4
4.1.2	Translace	5
4.2	ZPŮSOBY ANALÝZY GENOVÉ EXPRESSE	7
4.2.1	Metoda přenosu RNA (Northern blot)	7
4.2.2	RNA Sekvenování (RNA-sequencing)	9
4.2.2.1	Klasické sekvenování.....	9
4.2.2.2	Sekvenování nové generace (Next generation sequencing).....	11
4.2.3	Čipová analýza (Microarrays).....	12
4.2.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	13
4.2.4.1	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-qPCR).....	14
4.2.4.1.1	Amplifikační křivka	15
4.2.4.1.2	Prahová hodnota (Threshold line) a Ct hodnota (Cycle Threshold).....	16
4.2.4.1.3	Křivka tání (Melting curve)	16
4.2.4.1.4	SybrGreen.....	17
4.2.4.1.5	TaqMan sondy	18
4.2.4.1.6	Referenční gen	19
4.2.4.1.7	Faktory ovlivňující kvalitu RT-qPCR.....	19
4.2.4.1.8	Výhody RT-qPCR	19
4.3	ROD SMRK	20
4.3.1	Smrk ztepilý (<i>Picea abies</i> (L.) H. Karst.)	20
4.3.1.1	Vědecká klasifikace	20
4.3.1.2	Rozšíření	20
4.3.1.3	Morfologie	22
4.3.1.4	Ekologie	23
4.3.1.5	Ekotypy smrku ztepilého.....	24
4.3.1.6	Genom smrku ztepilého	26
4.4	DEHYDRINY	27
4.4.1	Výskyt.....	27
4.4.2	Funkce dehydrinů.....	27
4.4.3	Struktura.....	28
4.4.4	Genová exprese dehydrinů	29
4.4.5	Expresse dehydrinů v období rašení pupenů u smrku ztepilého	30
4.4.6	Expresse dehydrinů v období nástupu dormance u smrku ztepilého	32
4.4.7	Expresse dehydrinů při vystavení suchu u smrku ztepilého	32

4.4.8	Akumulace dehydrinů u smrku při extrémně nízkých teplotách	34
5	METODIKA A VÝSLEDKY	35
5.1	IZOLACE RNA.....	35
5.1.1	Lyze buněk a tkání	35
5.1.2	Izolace RNA pomocí kitu.....	35
5.1.3	Měření koncentrace RNA	36
5.2	REVERZNÍ TRANSKRIPCE.....	37
5.3	RT-QPCR	38
6	DISKUZE.....	41
7	ZÁVĚR.....	43
8	ZDROJE.....	44

SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

TABULKY

Tab. č. 1: Klasifikace smrku ztepilého

Tab. č. 2: Komponenty Master Mix

Tab. č. 3: Program thermo cycleru

Tab. č. 4: Reagencie Master mix

OBRÁZKY

Obr. č. 1: Centrální dogma molekulární biologie

Obr. č. 2: Genetický kód

Obr. č. 3: Northern blot

Obr. č. 4: Sekvenování

Obr. č. 5: Elektroferogram

Obr. č. 6: Schéma experimentu čipové analýzy

Obr. č. 7: RT-qPCR fáze amplifikace

Obr. č. 8: RT-qPCR - Threshold line, Cycle Threshold

Obr. č. 9: RT-qPCR - křivka tání

Obr. č. 10: RT-qPCR - křivka tání

Obr. č. 11: SyberGreen

Obr. č. 12: TaqMan sondy

Obr. č. 13: Rozšíření smrku ztepilého v České republice

Obr. č. 14: Rozšíření smrku ztepilého v Evropě

Obr. č. 15: Tvary korun smrku ztepilého

Obr. č. 16: Chlumní ekotyp - tvar koruny, typ větvení

Obr. č. 17: Horský ekotyp - tvar koruny a typ větvení

Obr. č. 18: Vysokohorský ekotyp - tvar koruny a typ větvení

Obr. č. 19: Záznam 5 vzorků a jejich výtěžnosti testovaných v laboratoři

Obr. č. 20: 96-jamková destička

Obr. č. 21: Teplotní režim RT-qPCR

Obr. č. 22: Optimalizovaný teplotní režim RT-qPCR

Obr. č. 23: Amplifikační křivky

1 ÚVOD

Smrk ztepilý (*Picea abies* [L.] Karst.) je v současné době nejvýznamnější a nejrozšířenější hospodářskou dřevinou ve střední Evropě. Je upřednostňován pro rychlý růst a vysokou kvalitu dřeva (Morgenstern, 1996). Smrk je preferován pro široké využití dřeva např. ve stavebnictví, truhlářství, papírenském průmyslu a mnoha dalších oborech (Musil, 2003). Význačnou vlastností smrku ztepilého je také velká vnitrodruhová variabilita a morfologické přizpůsobení se abiotickým faktorům (Slávik, 2016). Jeho genetická struktura se adaptovala na specifické podmínky prostředí – nástup vegetační periody a adaptace na stanovištní podmínky (Morgenstern, 1996). V České republice se vyskytují tři vymezené ekotypy (dědičně podmíněné geografické variety) smrku ztepilého – chlumní, horský a vysokohorský (Cvrčková et al., 2011). V důsledku klimatických změn dochází ke změnám teplotního a hydrického režimu a ekotypy smrků se tak můžou dostávat mimo svá optima (Sogaard et al., 2008).

Termínem dehydriny je označována širší skupina proteinů, kterých genová exprese a akumulace významně souvisí se stresovými abiotickými faktory stanoviště (Galau et al., 1986). Mráz, sucho, zasolení půdy, nástup dormance na podzim a rašení pupenů na jaře vyvolávají nedostatek vody v rostlinné buňce a odolnost vůči těmto abiotickým stresům je často spojována právě s dehydriny (Close, 1997; Yakovlev et al., 2008; Asante et al., 2011; Eldhuset, 2013; Kjellsen, 2013; Campbell et al., 1997).

Téma této bakalářské práce je vysoce aktuálním a důležitým výzkumným úkolem, jelikož probíhající klimatické změny mají již velmi zřetelně viditelný dopad na stabilitu a odolnost smrkových porostů v České republice. Zvládnutí metodiky analýzy genové exprese dehydrinů jako odrazu předpokládané vnitrodruhové rozdílnosti v odolnosti smrku ztepilého a následně vytipování potenciálně odolnějších subpopulací smrku (ekotypů) může významně přispět k efektivitě aktivního managementu tohoto hospodářsky i ekologicky velmi významného druhu.

2 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce je zpracování podrobné literární rešerše metod analýzy genové exprese se zaměřením na smrk ztepilý *Picea abies* (L.) H. Karst., specifické geny a produkty jejich exprese, u kterých se předpokládá spojitost s odolností smrku vůči významným abiotickým stresovým faktorům.

Součástí bakalářské práce je návrh metodiky analýzy genové exprese vybraných genů (dehydrinů) pomocí RT-qPCR, která může být použita v případě zpracování navazující diplomové práce. Nad rámec stanovených cílů bakalářské práce byla metodika nejenom navržena, ale také otestována a byla provedena její optimalizace.

3 METODIKA ZPRACOVÁNÍ PRÁCE

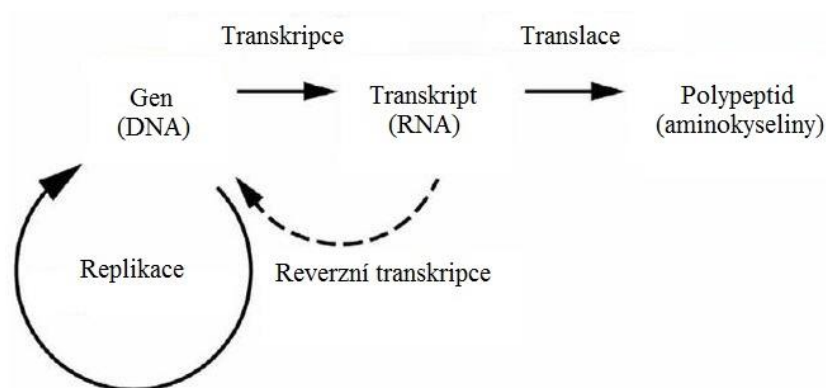
Bakalářská práce s tématem „Analýza genové exprese u smrku ztepilého“ je rešeršního typu a jako praktická část byl zvolen nástin metodiky analýzy genové exprese. Informace v literární rešerši byly čerpány především z vědeckých článků (Web of Science) a z knih zapůjčených v knihovně Akademie věd ČR, v knihovně České zemědělské univerzity a v knihovně AOPK ČR. Řada informací při vypracování metodiky byla čerpána z protokolů firem Epicentre, Top-Bio, Thermo Fisher Scientific a další informace k metodice poskytl RNDr. Jaroslav Čepl, Ph.D. Text byl zpracován v textovém editoru Microsoft Word, tabulky byly zpracovány v Microsoft excel. Obrázky pochází z odborné literatury a jsou adekvátně citovány nebo jsou vlastní.

4 LITERÁRNÍ REŠERŠE

4.1 Exprese genetické informace

Genová exprese je vyjádření genetické informace vedoucí k tvorbě proteinů. Způsob, jakým je genetická informace uložena v molekule DNA a následný přenos genetické informace do struktury proteinu, byl poprvé formulován Francisem Crickem roku 1956 v teorii, kterou pojmenoval Centrální dogma molekulární biologie (Simmons et Snustad, 2009). Molekuly DNA obsahují informaci, jež umožňuje ovládat aktivitu buněk. Tato informace je zakódována v genomu, který se skládá z kompletní sekvence DNA jedné sady chromozomů, která obsahuje geny a nekódující sekvence. Každý gen je úsekem nukleotidových párů. Slouží k řízení vývoje, chování a fungování organismů (Kočárek, 2008).

Expresí genu je dvoustupňový proces. První fáze se nazývá transkripce a druhou fází je translace.



Obr. č. 1: Centrální dogma molekulární biologie

4.1.1 Transkripce

Transkripce je přenos genetické informace z DNA do RNA. RNA představuje prostředníka mezi DNA a proteiny. Jedno vlákno DNA je použito jako templát pro vytvoření komplementárního vlákna RNA. Transkripci katalyzuje enzym zvaný RNA-polymeráza. Eukaryota obsahují tři různé RNA-polymerázy, každá z nich přepisuje určitou skupinu genů. RNA-polymeráza I se nachází v jadérku, kde se syntetizuje rRNA. RNA-polymeráza II je umístěna v jádře a jejím produktem je

jaderná pre-mRNA. RNA-polymeráza III katalyzuje syntézu tRNA a také je umístěna v jádře (Simmons et Snustad, 2009).

Nejdříve dojde k rozvolnění dvoušroubovice a k DNA templátu jsou připojovány komplementární nukleové báze (adenin s uracilem, guanin s cytozinem) a přepisem vznikne RNA. Mediátorová RNA, tedy mRNA, která slouží k přenosu genetické informace. Například DNA v podobě A-T-C-G-G se do mRNA přepíše jako U-A-G-C-C (Kočárek, 2008). K transkripci dochází pouze ve směru 5'-3'. Transkripci lze rozdělit do čtyř fází: 1) navázání RNA polymerázy na oblast DNA zvanou promotor, 2) iniciace – rozvolnění dvoušroubovice, začne se vytvářet RNA, 3) elongace – prodlužování řetězce, 4) terminace – ukončení transkripce. Zatím co transkripce probíhá v jádře, translace probíhá v cytoplasmě, takže se molekuly RNA musí přenést do cytoplasmy, aby se mohly podrobit translaci (Simmons et Snustad, 2009; Kočárek, 2008).

Většina eukaryotických genů obsahují kódující sekvence zvané exony a nekódující sekvence zvané introny. Před přesunem transkriptu RNA do cytoplasmy jsou intronové části odstraněny sestřihovými reakcemi v molekulárních strukturách zvaných spliceozomy pomocí snRNA a exony jsou pospojovány do finálního řetězce (Simmons et Snustad, 2009).

4.1.2 Translace

Translace probíhá v cytoplasmě, jedná se o přenos genetické informace z RNA do proteinu (ze sekvence mRNA do sekvence aminokyselin proteinů). Tento proces probíhá na ribozomech a účastní se jí různé typy RNA. Molekula mRNA je současně překládána více ribozomy, které vytvářejí polyzomy. mRNA je zde použita jako templát pro syntézu polypeptidu. Transferová RNA (tRNA) slouží jako adaptér mezi aminokyselinami a kodony v mRNA. Ribozomová RNA (rRNA) je strukturální složkou katalytickou složkou ribozomů. Malé jaderné RNA (snRNA) jsou složkami spliceozomů. Mikro RNA (miRNA) je krátká RNA, která blokuje expresi komplementární mRNA. Všechny čtyři typy tRNA, rRNA, snRNA a miRNA nepodléhají translaci a jsou konečnými produkty svých genů.

Průběh translace je možné rozdělit do tří fází – iniciace, elongace, terminace. V první fázi iniciační tRNA nasedne na startkodon AUG na mRNA. V druhé fázi se ribozom se pohybuje podél mRNA a překládá nukleotidovou sekvenci do aminokyselinové za použití tRNA a tím je syntetizován polypeptid. Příslušná

4.2 Způsoby analýzy genové exprese

4.2.1 Metoda přenosu RNA (Northern blot)

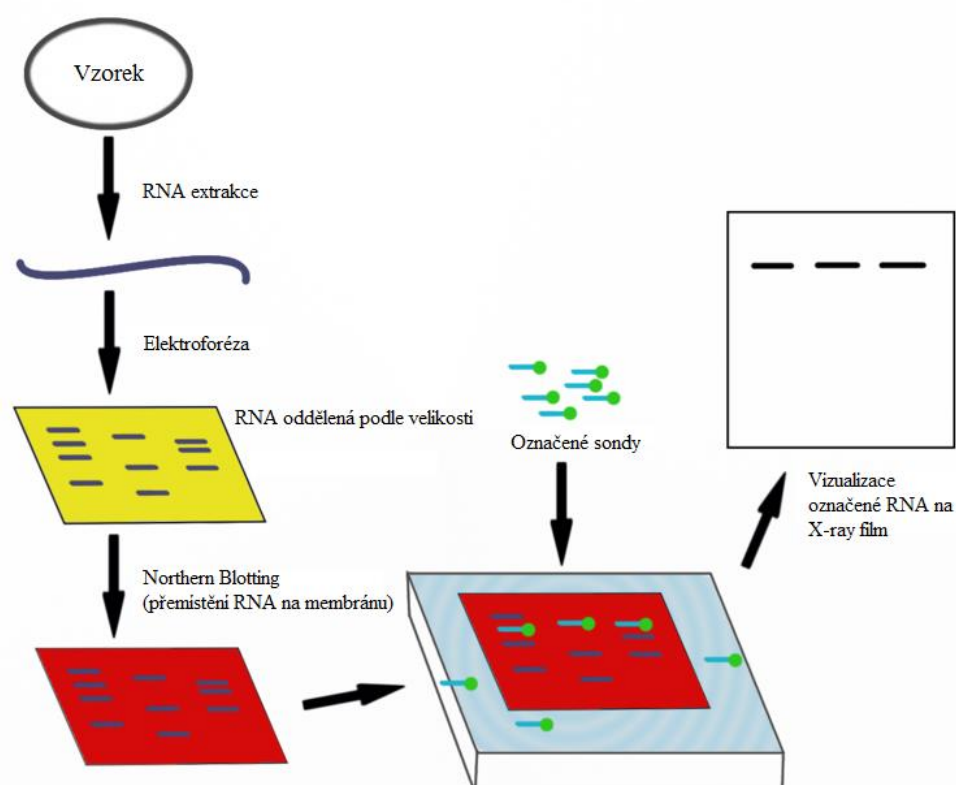
Northern blot (neboli RNA blot) je technika používaná v molekulárně biologickém výzkumu ke studiu exprese genů RNA (nebo izolované mRNA), zabývá se studiem sekvencí RNA (Walker et al., 2008). Techniku northern blot vyvinul v roce 1977 James Alwine, David Kemp a George Stark na Stanfordské univerzitě, s příspěvky od Gerharda Heinricha (Alwine et al., 1977). Northern blot má své jméno z jeho podobnosti s technikou Southern blot, pojmenované po biologovi Edwinu Southernovi. Hlavní rozdíl spočívá v tom, že u metody Northern blot je analyzována RNA na místo DNA (Bor et al., 2006).

Průběh metody

Tento proces začíná extrakcí celkové RNA z homogenizovaného vzorku tkáně nebo buněk (Walker et al., 1998). Dále následuje gelová elektroforéza. RNA je ve formě jednořetězcových molekul, které hybridizují samy se sebou a vytváří tak více či méně složité sekundární struktury. Vzhledem k tomu, že tyto struktury mohou ovlivnit elektroforetickou separaci, je třeba molekuly RNA denaturovat. Denaturace se provádí v průběhu elektroforézy, a to prostřednictvím dodaného formaldehydu (Walker et al., 1998). Vzorky denaturované RNA jsou přeneseny na membránu. Nejčastěji se používají nylonové membrány. Přenos na membránu probíhá gravitačním kapilárním způsobem nebo vakuovým způsobem. Výsledkem je membrána s navázanou nukleovou kyselinou, a to v pozicích, které věrně odrážejí jejich původní pozice na gelu po elektroforetické separaci. Nukleová kyselina je na membráně navázaná na základě iontové vazby mezi nukleovou kyselinou a membránou. Mohlo by docházet k rozrušování iontových vazeb, díky působení některých chemikálií z hybridizace, proto je třeba nukleovou kyselinu na membráně ireverzibilně imobilizovat vytvořením kovalentních vazeb pomocí UV záření či tepla (Streit et al., 2009; Zvárová et al., 2012). Dalším krokem je hybridizace (párování bází mezi dvěma úseky nukleových kyselin na základě jejich komplementarity bází a tvorba dvouvláknové struktury). Molekuly ze vzorku jsou fixovány na membráně, zatímco v roztoku vhodném pH a iontové síle jsou próby - značené sondy (komplementární k cílovému úseku nukleové kyseliny na membráně). Pokud próba

zachytí svou cílovou molekulu, naváže se na ní (hybridizuje). Díky označení próby může být výsledek vizualizován. Po ukončení hybridizace následuje promývání membrány, aby se zajistilo, že sonda je přesně vázána a aby se zabránilo vzniku signálů na pozadí. Poté, co se sonda navázala k DNA na membráně, je poloha sondy vizualizována. Signály jsou pak detekovány pomocí X-ray filmu (Streit et al., 2009).

RNA je extrémně citlivá na působení RNáz, je zapotřebí se vyvarovat jakékoliv kontaminace RNázami. Pro snížení rizika kontaminace RNázami všechny roztoky, které jsou použity pro Northernovu hybridizaci, musí být ošetřeny dietylpyrokarbonátem (DEPC), který RNázy inaktivuje (Walker et al., 1998).



Obr. č. 3: Northern blot;
https://en.wikipedia.org/wiki/Northern_blot#/media/File:Northern_blot_diagram.png [cit. 8.4.2018]

Northern blot je důležitá metoda pro studium genové exprese, protože RNA přítomná v dané buňce nebo typu tkáně reprezentuje část genomu, která je exprimována v této buňce nebo tkáni. Díky této metodě lze detekovat stavovou akumulaci (hadinu) dané sekvence RNA ve studovaném vzorku (s tím spojené fenotypové vyjádření) (Walker et al., 1998).

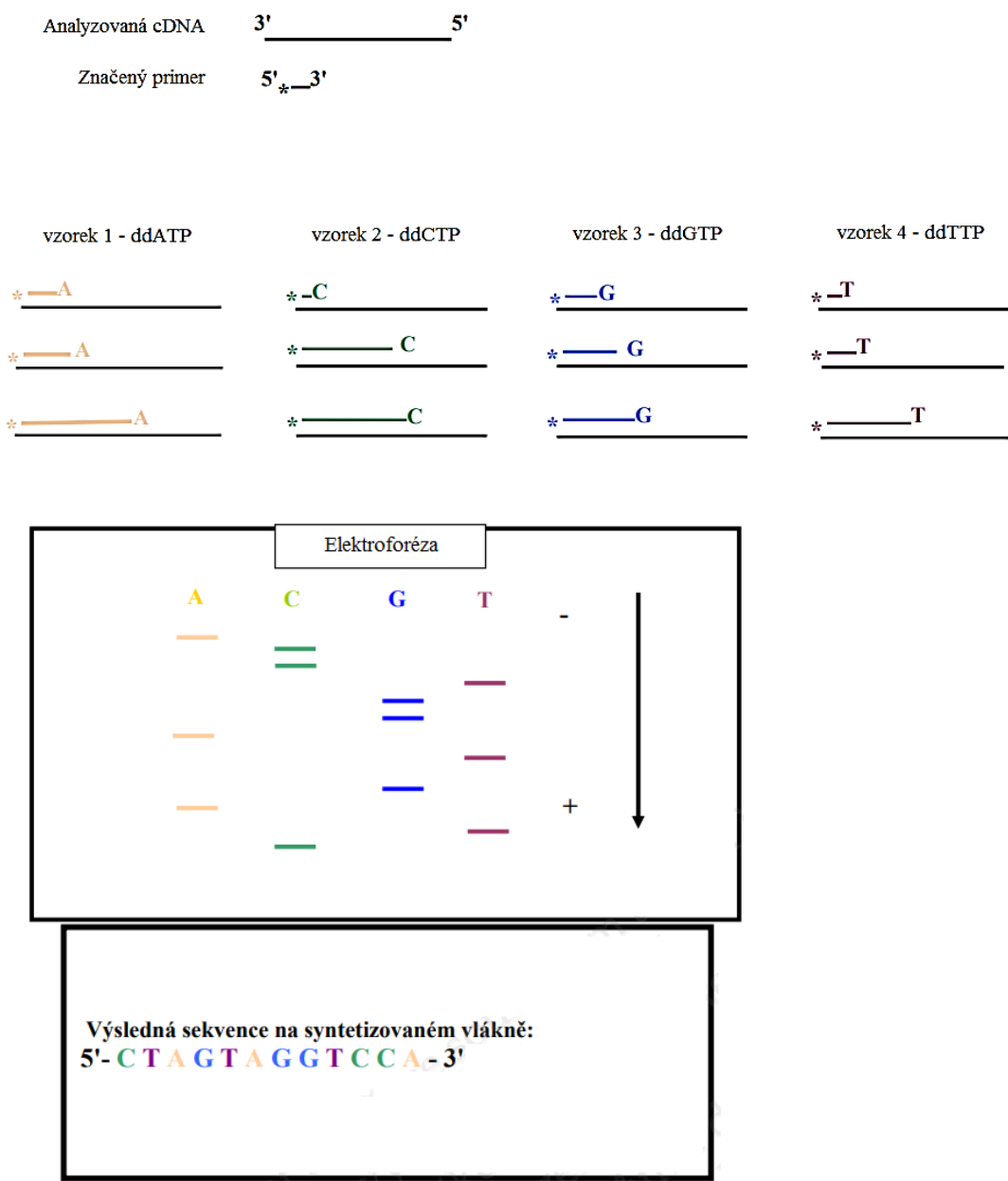
4.2.2 RNA Sekvenování (RNA-sequencing)

Jedná se o stanovení sekvence nukleotidů dané molekuly (RNA) – určení primární struktury. Tradiční metody sekvenování RNA vyžadují vytvoření molekuly cDNA, která může být následně sekvenována (Brown, 2007). cDNA (complementary DNA) je DNA syntetizovaná podle RNA v reakci katalyzované enzymem reverzní transkriptázou (Kočárek, 2008). Kanonická struktura DNA má čtyři báze: Thymin (T), adenin (A), cytosin (C) a guanin (G). Sekvenováním DNA je stanoveno fyzikálního pořadí těchto bází v molekule DNA. Existují dvě metody, první je klasické sekvenování (Sangerova metoda) a druhou je sekvenování nové generace (Brown, 2007).

4.2.2.1 Klasické sekvenování

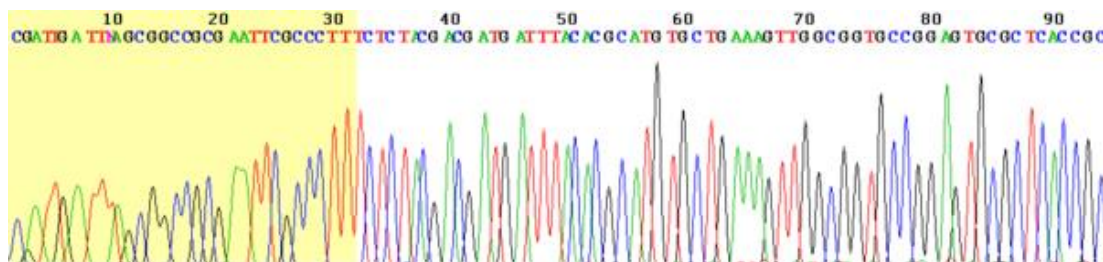
Základ pro sekvenování proteinů byl položen prací Frederika Sangera, který roku 1975 dokončil sekvenci všech aminokyselin v inzulínu. To poskytlo první přesvědčivý důkaz o tom, že proteiny jsou chemické entity se specifickým molekulárním vzorem spíše než náhodná směs materiálu suspendovaného v tekutině. Také že uspořádání nukleotidů v DNA určuje sekvenci aminokyselin v proteinech, což pomáhá určit funkci proteinů (Sanger et al., 1975).

Sangerova metoda využívá procesu replikace DNA. Sangerova metoda je založena na enzymově katalyzované terminaci syntézy DNA po zabudování dideoxyribonukleotidu (ddNTP) do nově vznikajícího komplementárního vlákna. ddNTP se začleňují do nově vznikajícího vlákna DNA na místo příslušného nukleotidu. Výsledkem je vznik různě dlouhých fragmentů DNA, které nesou na konci určitý radioaktivně nebo fluorescenčně značený, dideoxyribonukleotid – ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP. Koncový značený ddNTP a délka fragmentu informují o sekvenci nukleotidů v analyzovaném vzorku (Kolísko, 2017; Zvárová et al., 2012). Následuje gelová elektroforéza. Sekvenování je prováděno ve čtyřech vzorcích. Každý vzorek obsahuje všechna pořadí jednoho ze čtyř nukleotidů. Sekvence nukleotidů je odečtena z gelu podle délky fragmentů s příslušnými koncovými ddNTP, jedná se o radioaktivní značení. Každý vzorek obsahuje cDNA, primer, ddGTP/ddATP/ddTTP/ddCTP, DNA-polymerázu. Sekvence analyzované RNA získána na základě komplementarity bází (Kolísko, 2017).



Obr. č. 4: Sekvenování; VŠCHT – skripta Metody molekulární genetiky
 <<https://old.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/bc-skripta/kapitola10.pdf>> [cit. 8.4.2018]

Proces také může probíhat v jedné reakci, jedná se o fluorescenční značení, při použití čtyř různě barevných fluorescenčních značek. Vizualizace pak probíhá kapilárním sekvenátorem v grafu - elektroferogram (Zvárová et al., 2012).



Obr. č. 5: Elektroferogram;

<https://www.wikiskripta.eu/w/Metody_sekvenov%C3%A1n%C3%AD#/media/File:Sanger_sequencing_read_display.png> [cit. 8.4.2018]

Hlavní nevýhody této metody jsou sekvenování pouze jednoho úseku RNA, poměrně vysoká cena a nízká rychlost, Výhodou je pak nízká chybovost Sangerova sekvenování (Kolísko, 2017; Zvárová et al., 2012).

4.2.2.2 Sekvenování nové generace (Next generation sequencing)

Jedná se o řadu různých technologií, které vznikaly v posledních dvaceti letech. V porovnání s klasickým sekvenováním umožňují především rychlou a cenově příznivou produkci velkého množství sekvenovaných vzorků najednou. Sekvenování nové generace využívá principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně. Jde o zefektivnění, zjednodušení, urychlení a zpřesnění DNA sekvenování. Výsledkem je obrovská produkce výstupních dat s následnou potřebou tyto data analyzovat (Kwon, 2011). Zvárová et al. (2012) uvádí, že hlavní rozdíl mezi Sangerovým sekvenováním a NGS je ve způsobu detekce narůstajících řetězců. Sangerovo sekvenování používá elektroforetickou separaci, což je zároveň hlavní limitující faktor přes veškeré automatizační snahy. NGS využívá chemické děje při vstupu nového nukleotidu do syntetizovaného řetězce, které poskytnou signál v případě, že vložený prekurzor skutečně odpovídá požadovanému nukleotidu z hlediska komplementárního templátu. Detekce odpovědí je maximálně automatizována.

Metody sekvenování nové generace

- Genome sequencer, 454 Life Sciences (Roche) - pyrosekvenace
- Genome Analyzer a HiSeq (Illumina) – reversibilní terminátorová sekvenace
- SOLiD (Applied Biosystems) – sekvenace ligací

Všechny tři tyto metody mají jednotný scénář: fragmentace DNA, ošetření konců fragmentů a navázání sekvenačních adaptorů, amplifikace a sekvenace (Kwon, 2011).

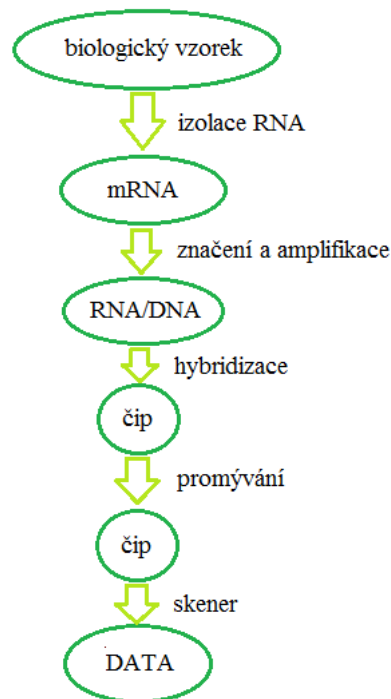
Výhodou NGS je, že jsou schopné detekovat přidávání bází jednu po druhé a zároveň sekvenovat tisíce až miliony rozdílných molekul DNA najednou. Hlavní nevýhodou oproti je krátká maximální délka výsledných sekvencí, která se dnes obvykle pohybuje zhruba od 100 až po 500 bází (Sangerova metoda nabízí až 1 000 bází). Další nevýhodou je i menší přesnost a častější chyby při čtení DNA (Kolísko, 2017).

4.2.3 Čipová analýza (Microarrays)

Čipová analýza je metoda, která umožňuje paralelní měření genové exprese. Čipy slouží k detekci a kvantifikaci nukleových kyselin v biologickém materiálu. Tato technologie vznikla postupnou miniaturizací metody southern blot. Čipová analýza byla poprvé publikována v roce 1995 a v roce 1997 byl představen první kompletní eukariotický čip od firmy Affymetrix (Zvářová et al., 2012).

DNA/RNA Čip

Jedná se o pevnou skleněnou nebo silikonovou destičku, na kterou jsou kovalentně navázány biomakromolekuly (DNA/RNA). Nejdříve je nutné provést izolaci a amplifikaci nukleových kyselin ze vzorku. Při kontaktu destičky (čipu) s testovaným vzorkem molekuly hybridizují (váží se pomocí Watsonova-Crickova párování bází) se značenými komplementárními molekulami, které jsou na destičce. Dále se čip omyje a na destičce zůstanou jen navázané sekvence, které jsou následně analyzovány fluorescenčním skenerem. Pomocí intenzity vyzařovaného světla lze určit i množství komplementárních molekul přítomných ve vzorku (Zítka et al., 2010).



Obr. č. 6: Schéma experimentu čipové analýzy; Zvárová et al., 2012

4.2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je metoda, která slouží k amplifikaci vybraného úseku DNA. PCR poskytuje namnožený materiál pro další biotechnologické metody, jako například sekvenování DNA. Technologie polymerázové řetězové reakce byla vyvinuta na počátku 80. let v Cetus Corporation v Kalifornii. Autorem této myšlenky byl Kary Mullis, jednalo se o sloučení několika laboratorních postupů, které již existovaly. PRC dále procházela dalším vývojem, na němž se podílel Cetus Corp a Henry Erlich. V roce 1993 získal Kary Mullis na základě těchto objevů Nobelovu cenu za chemii (Bartlett et Stirling, 2003).

Jedná se o metodu rychlého zmnožení segmentu DNA v bezbuněčném systému *in vitro*, při níž se využívá termostabilní DNA polymerázy. Tato tzv. Taq polymeráza pochází z bakterie *Thermus aquaticus*, žijící v teplotách okolo 70 °C a na rozdíl od běžné polymerázy ve vysokých teplotách (až 95°C) nenedaturuje. V reakční směsi jsou dále tzv. primery - krátké oligonukleotidové sekvence (typicky okolo 20 bází), komplementární s určenou sekvencí na DNA, tak aby sekvence dvou primerů ohraničovala vybraný úsek DNA, který je potom kopírován. Dvacet nukleotidů tvoří dostatečně unikátní sekvenci na to, aby se v genomu vyskytovala

unikátně. Dalšími složkami jsou volné nukleotidy a ionty potřebné ke zdárnému průběhu polymerace (typicky Mg^{2+} a K^+) (Bartlett et Stirling, 2003).

PCR probíhá v tzv. termocykleru přístroji, který velmi rychle a precizně střídá teplotní fáze probíhající reakce.

Typicky se střídají tři fáze teplot:

1. Reakční směs je zahřívána 20-30 vteřin na $95^{\circ}C$, dochází k rozrušení vodíkových můstků a rozvláknění dvoušroubovice.
2. Teplota je krátce snížena na $40-50^{\circ}C$. Při této teplotě nasednou primery vodíkovými můstky na komplementární úseky DNA.
3. Zvýšení teploty na $70^{\circ}C$ při které probíhá syntéza úseku vymezeného primery a představuje optimální teplotu pro Taq polymerázu.

Tuto reakci je možné cyklicky opakovat, protože složky reakční směsi jsou v nadbytku (volné nukleotidy, DNA polymeráza, primery, ionty). Proces probíhá po 30 cyklech 2-3h. Počet kopií DNA se v každém cyklu ideálně zdvojnásobí a vzrůstá tak geometrickou řadou. Jedna molekula DNA se zmnoží až 2^{30} x – tedy cca milionkrát (Hruban et Majzlík, 2002).

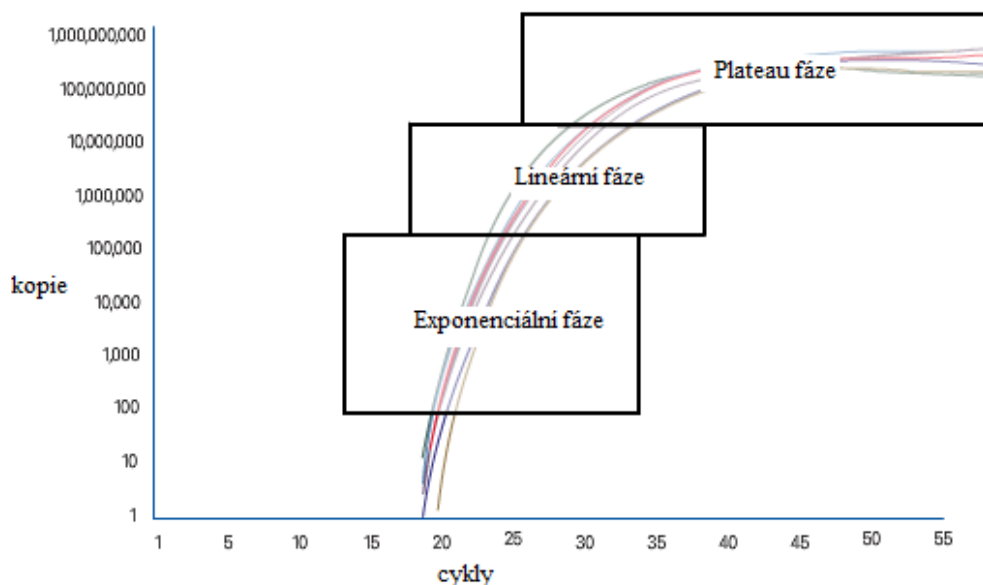
4.2.4.1 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-qPCR)

Na základě metody PCR vzniklo její rozšíření – kvantitativní PCR. Jejím základem je odečíst v každém cyklu množství DNA a určit tak kvantitu molekul DNA. Toto je užitečné zejména pro zkoumání míry genové exprese (Zvárová et al., 2012). Substrátem potom není klasická genomová DNA ale tzv. cDNA. Komplementární DNA, tedy cDNA, se získává izolací celkové buněčné RNA a celkovým přepsáním této RNA do DNA pomocí reverzní transkriptázy (Walker et al., 2008). Kvantifikace amplifikovaného produktu se provádí ve stejné reakční směsi jako klasická PCR za použití fluorescenčních sond (TaqMan sondy) nebo fluorescenčních barviv (SybrGreen), které se vážou na přítomnou DNA. Fluorescence je vyzařovaná substrátem až po jeho navázání na DNA. Hladina fluorescence odráží množství přítomné DNA, tedy i výchozího templátu. RT-qPCR typicky probíhá v 96-ti jamkových destičkách, úroveň fluorescence je zaznamenávána v jednotlivých jamkách. Teplotní fáze qPCR probíhají stejně jako v případě klasické PCR. Reakce se obecně provádějí po dobu 40ti cyklů (Walker et al., 2008).

4.2.4.1.1 Amplifikační křivka

Průběh RT-qPCR lze podle míry přírůstku fluorescence mezi cykly rozdělit do čtyř fází.

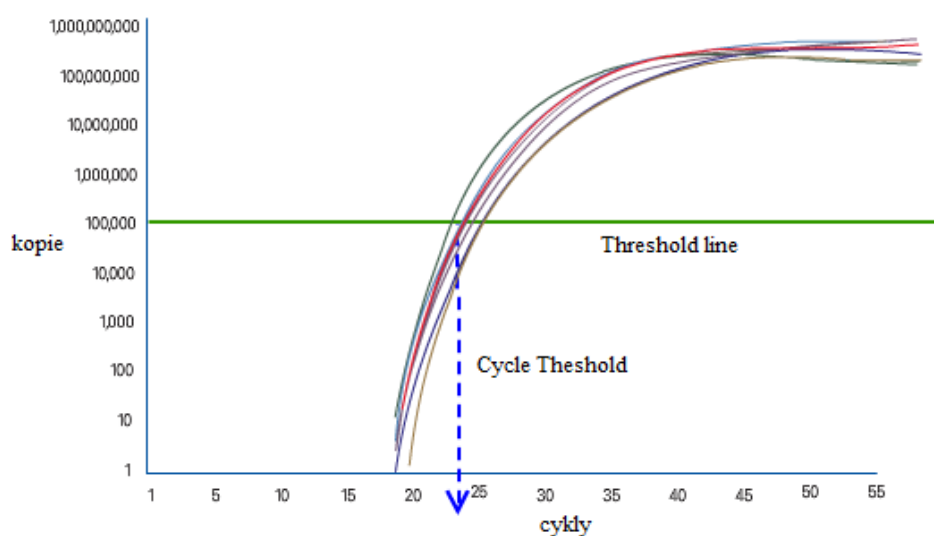
1. Množství DNA i fluorescence je nízké, nepřesahuje úroveň pozadí.
2. Exponenciální fáze - Průběh reakce je v této fázi exponenciální. Syntéza DNA je na takové úrovni, že intenzita fluorescence již přesahuje úroveň pozadí a může být zachycena. V ideálním případě nárůst množství DNA je 2^n , kde n je pořadí cyklu. Intenzita fluorescence a množství DNA odráží množství templátové DNA dodané do reakce. PCR reakce se zaměřuje na exponenciální fázi, protože poskytuje nejpřesnější a nahromaděná data pro kvantifikaci.
3. Lineární fáze - Reagencie začínají docházet a PCR reakce se zpomaluje. Množství nárůstu DNA je $2n+1$, kde n je pořadí cyklu.
4. Plateau fáze - V této fázi je přítomno velké množství DNA, ovšem reagencie jsou vyčerpané a PCR reakce se zastavuje (Zvárová et al., 2012; Thermo Fisher handbook, 2016).



Obr. č. 7: RT-qPCR fáze amplifikace; <<http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/ab/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-polymerase-chain-reaction/index.html>> [cit. 8.4.2018]

4.2.4.1.2 Prahová hodnota (Threshold line) a Ct hodnota (Cycle Threshold)

Pro kvantifikaci se odečítá cyklus, ve kterém je překročena prahová hodnota fluorescence – Ct. Pro prahovou hodnotu platí, že se vždy nachází nad úrovní fluorescence pozadí v exponenciální fázi, odráží statisticky významný nárůst amplifikace. Platí zde, že čím je Ct hodnota nižší, tím více bylo do reakce dodáno templátové DNA, a naopak. Ct hodnota určí hodnotu na ose x, tedy hodnotu cyklu, ve kterém se protíná prahová hodnota a fluorescenční křivka (Zvárová et al., 2012; Thermo Fisher handbook, 2016).

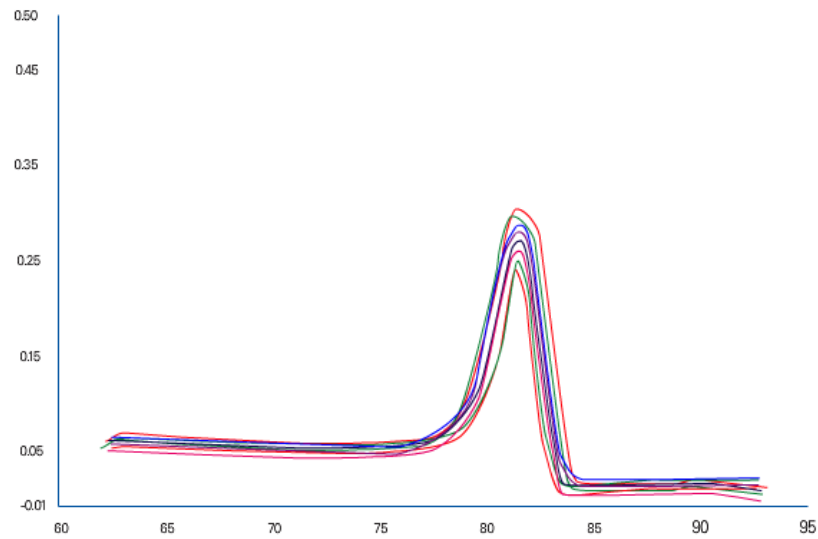


Obr. č. 8: RT-qPCR - Threshold line, Cycle Threshold;
<<http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/ab/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-polymerase-chain-reaction/index.html>> [cit. 8.4.2018]

4.2.4.1.3 Křivka tání (Melting curve)

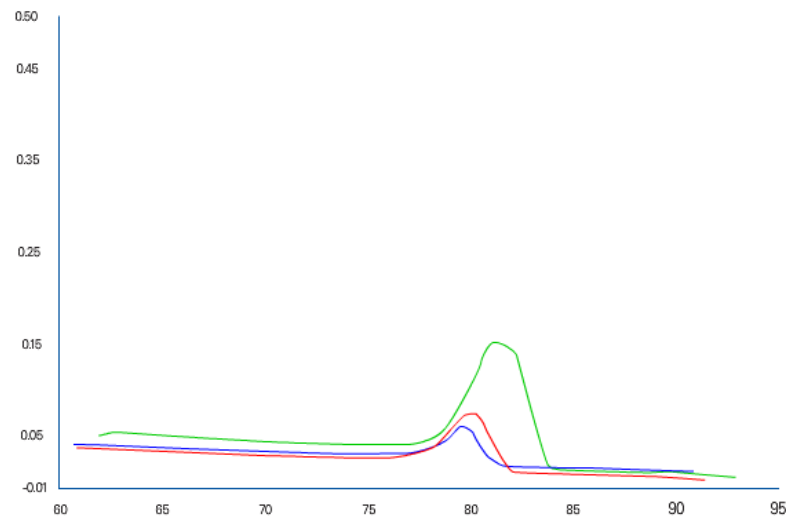
Pro kvantifikaci pomocí SybrGreen je důležitá tzv. křivka tání. Vznik nespecifických produktů je možné kontrolovat v průběhu reakce právě pomocí křivky tání. Křivka tání vykreslí změnu intenzity fluorescence při různých teplotách, kterým je vystaven výsledný produkt po skončení samotné PCR procedury. Využívá toho, že různé produkty PCR mají různou teplotu tání, nespecifické produkty mají obvykle teplotu tání nižší než specifické. Pokud je v grafu jen jeden vrchol, reakci je možné považovat za specifickou. Nespecifické amplifikace se zobrazí v grafu jako další vrcholy. (Thermo Fisher handbook, 2016).

Pozitivní amplifikace - specifický produkt



Obr. č. 9: RT-qPCR - křivka tání; <<http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/ab/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-polymerase-chain-reaction/index.html>> [cit. 8.4.2018]

Negativní amplifikace - nespecifický produkt

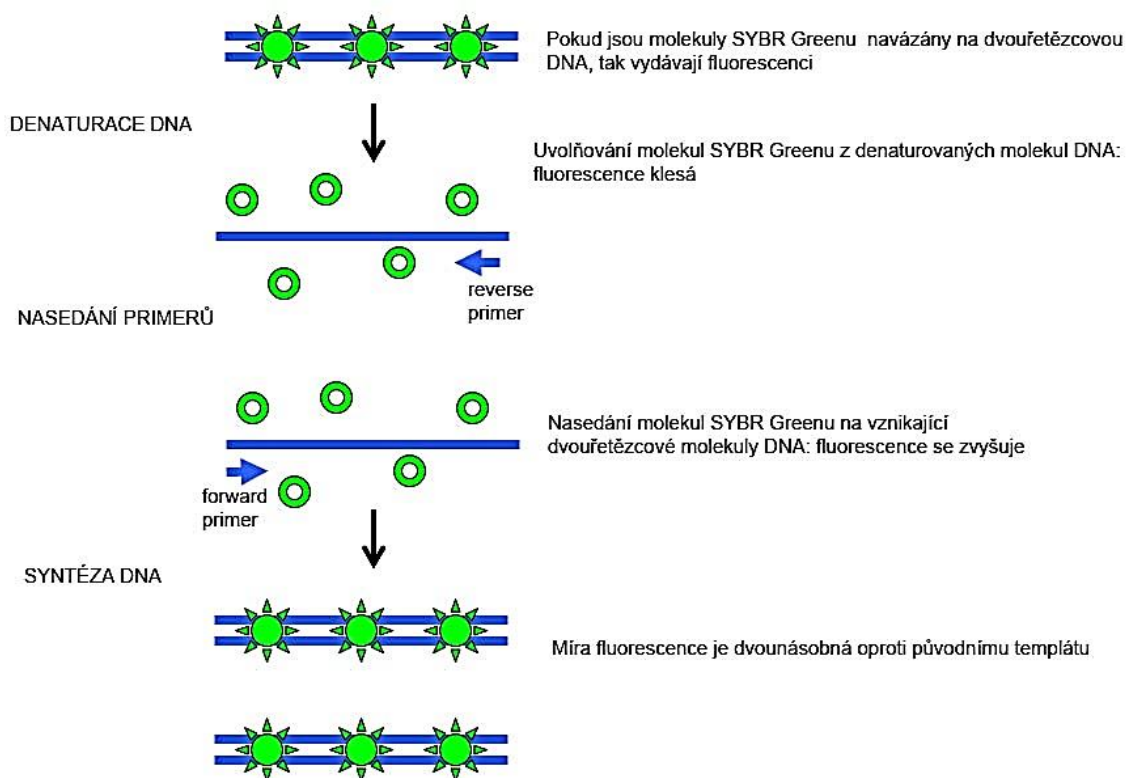


Obr. č. 10: RT-qPCR - křivka tání; <<http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/ab/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-polymerase-chain-reaction/index.html>> [cit. 8.4.2018]

4.2.4.1.4 SybrGreen

Jako fluorescenční složka pro nespecifickou detekci (bez jakékoliv specifity k sekvenci) je používáno fluorescenční barvivo SybrGreen. SybrGreen je látka, která se váže na dvouřetězcovou DNA a po navázání získává fluorescenční vlastnosti.

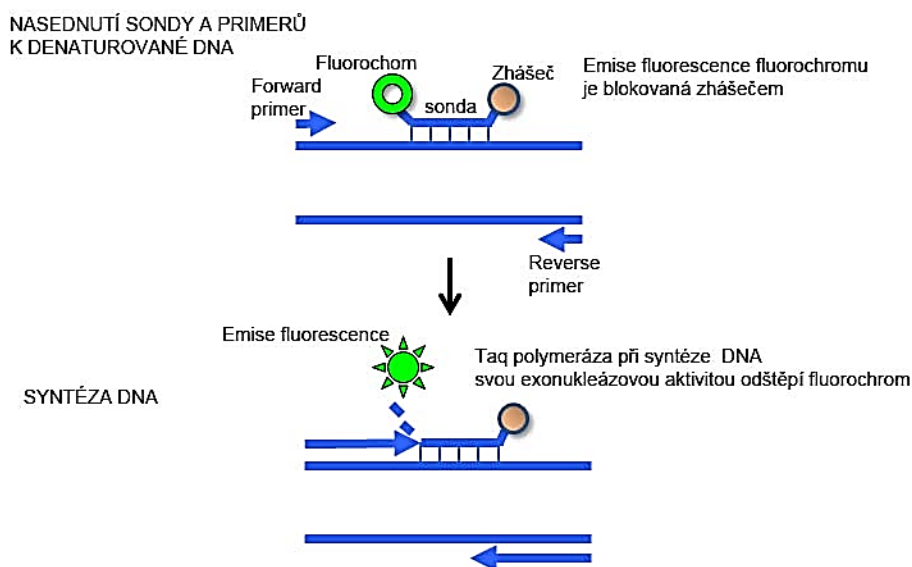
Excitována je modrou složkou viditelného světla (maximum při 497 nm), emituje potom světlo zelené barvy (maximum při 520 nm). Pokud je dvouřetězcová DNA denaturovaná na jednořetězcovou, dochází také k uvolnění Sybergreenu z DNA a nedochází k fluorescenci. Se vzrůstajícím množstvím DNA se zvyšuje i intenzita fluorescence. Díky tomu je možné vyčíst dynamiku i množství DNA (Thermo Fisher handbook, 2016).



Obr. č. 11: SyberGreen; <<http://labguide.cz/sybergreen/>> [cit. 8.4.2018]

4.2.4.1.5 TaqMan sondy

Tyto sondy jsou fluorescenční složkou pro specifickou detekci. Obsahují fluorescenční složku a tzv. zhášec, který brání fluorescenci, dokud je s fluorescenční složkou ve vazbě. TaqMan sondy využívají 5' exonukleázové aktivity Taq polymerázy při syntéze DNA. Během PCR se sonda váže mezi forward a reverse primery. Taq polymeráza, která během extenze podle templátového řetězce syntetizuje DNA, narazí na přisedlou TaqMan sondu a svou exonukleázovou aktivitou ji rozloží. Tím se separuje molekula fluorochromu od zhášecí a dochází k fluorescenci. V průběhu PCR, při opakování jednotlivých cyklů, dochází k postupnému zvyšování fluorescenčního signálu (Thermo Fisher handbook, 2016).



Obr. č. 12: TaqMan sondy; <<http://labguide.cz/taqman-sondy/>> [cit. 8.4.2018]

4.2.4.1.6 Referenční gen

Zvolení referenčního genu slouží jako vnitřní kontrola. Jsou zde využívány geny, jejichž počet kopií v testované DNA by měly být stejné u všech testovaných vzorků. Jako referenční gen je možné použít například aktin (Zvárová et al., 2012).

4.2.4.1.7 Faktory ovlivňující kvalitu RT-qPCR

qPCR je poměrně citlivá na různé chyby při přípravě vzorků (nepřesné pipetování, špatné promíchání či přítomností kontaminace). Pro zajištění co největší přesnosti se vzorky dělají v několika opakováních (nejčastěji triplikátech). Nízká efektivita reakce může být způsobena špatně zvolenými sekvencemi primerů (Thermo Fisher handbook, 2016).

4.2.4.1.8 Výhody RT-qPCR

- Schopnost sledovat průběh jednotlivých reakcí PCR, jak se vyskytují v reálném čase.
- Schopnost přesně měřit množství amplifikované DNA v každém cyklu, což umožňuje vysoce přesnou kvantifikaci množství výchozího materiálu ve vzorcích.
- Amplifikace a detekce se dějí v jedné zkumavce, což eliminuje post-PCR manipulace.

4.3 Rod Smrk (*Picea*)

Jedná se o dřevařsky významný rod boreálních lesů studeného a mírného klimatu. Rozlišujeme 40 druhů smrků na severní polokouli mezi 23° a 72° s.š. ve výškovém rozmezí 0-4800 m n. mm. V Evropě jsou původní pouze 3 druhy (*P. abies*, *P. omorika*, *P. obovata*) a v České republice pouze jeden (*P. abies*) (Musil, 2003).

4.3.1 Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) H. Karst.)

Smrk ztepilý patří k nejrozšířenějším a nejvíce hospodářsky významným dřevinám v Evropě. Jedná se o poměrně rychle rostoucí dřevinu s vysokou kvalitou dřeva (Morgenstern, 1996). Jeho dřevo bývá využíváno ve stavebnictví, truhlářství a nástrojařství. Dřevo vhodných horských stromů se používá jako tzv. dřevo rezonanční. Vlákna se používá v papírenském průmyslu. Klest se využívá v zahradnictví. V sadovnictví se používají kultivary smrku a také může být využit jako podnož při roubování (Musil, 2003).

4.3.1.1 Vědecká klasifikace

Říše	rostliny (<i>Plantae</i>)
Skupina	nahosemenné (<i>Gymnospermae</i>)
Oddělení	jehličnany (<i>Pinophyta</i>)
Třída	jehličnaté (<i>Pinopsida</i>)
Řád	borovicotvaré (<i>Pinales</i>)
Čeleď	borovicovité (<i>Piancea</i>)
Rod	smrk (<i>Picea</i>)
Druh	smrk ztepilý (<i>Picea abies</i>)

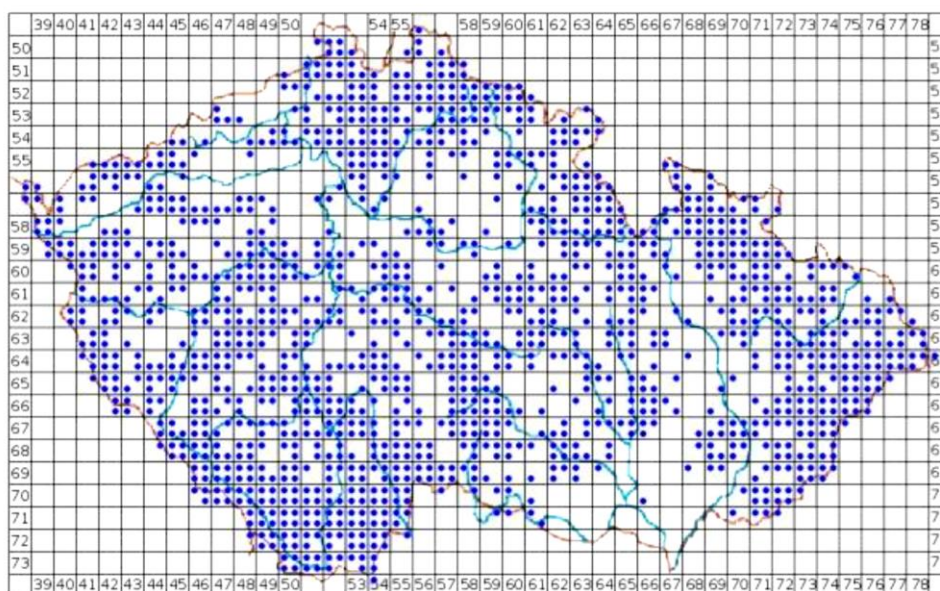
Tab. č. 1: Klasifikace smrku ztepilého

4.3.1.2 Rozšíření

Smrk se v České republice přirozeně vyskytuje v mezofytiku a oreofytiku a jen výjimečně v termofytiku. V mezofytiku se smrk vyskytuje jako příměs ve stinných údolích, kotlinách a v luzích. Dominantní může být na okrajích rašelinišť, v podmáčených jedlových smrčínách a na prameništích. Jedná se o převládající dřevinu kulturních lesů. V oreofytiku se smrk nachází s klimaxových smrčínách,

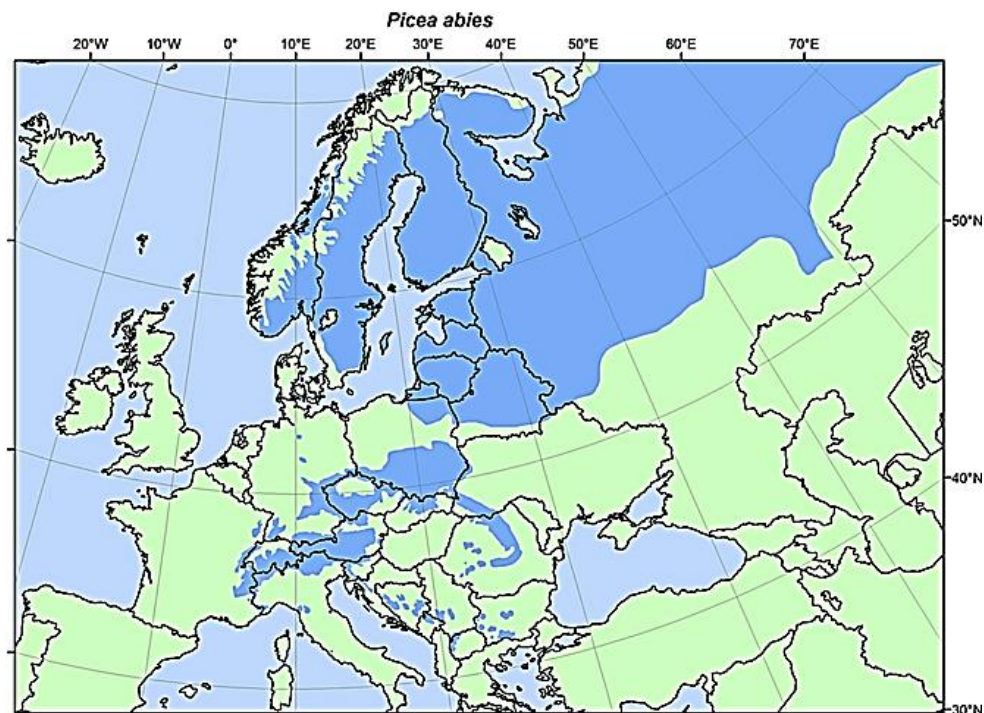
smrky vystupují i nad horní hranici lesa a vytváření horní hranici stromovou (Musil, 2003). Přirozeně se v České republice smrk vyskytuje ve všech vyšších i nižších pohořích. Těžištěm rozšíření v pohraničí jsou Novohradské hory, Šumava, Český les, Krušné hory, Jizerské hory, Krkonoše, Orlické hory a Jeseníky. Ve vnitrozemí se smrk vyskytuje na území Českomoravské vrchoviny, v Brdech, Slavkovském lese, Dražanské vrchovině a Oderských vrších. V České republice smrk nejčastěji osidluje místa s nadmořskou výškou 550-1000 m (Slávik et al., 2016)

Zastoupení smrku v českých lesích: přirozené 11,2%, současné 50,6%, doporučené 36,5% (Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2015). Současné zastoupení je druhotné. Zastoupení smrku je oproti původnímu asi pětinasobné, na úkor lesů jedlobukových, bukových a dubových, především díky rychlosti růstu a vlastnostem dřeva (Musil, 2003).



Obr. č. 13: Rozšíření smrku ztepilého v České republice; <<http://quick.florabase.cz/>> [cit. 8.4.2018]

Smrk ztepilý se nachází v severní, střední a jihovýchodní Evropě. Evropský areál výskytu lze rozdělit do dvou oblastí: Středoevropsko-balkánská a Severoevropská. Středoevropsko-balkánská oblast je převážně ostrůvkovitá (netvoří souvislý areál) ve vysokých horách střední a jihovýchodní Evropy. Vylisují se zde 4 oblasti: Hercynsko-karpatská oblast, Alpská oblast, Dinárská oblast a Rodopská oblast. Severská (Skandinávsko-ruská) oblast smrku ztepilého je souvislá, s nižší průměrnou nadmořskou výškou, převažují zde pahorkatiny a nížinné roviny (Musil 2003, Slávik 2016).

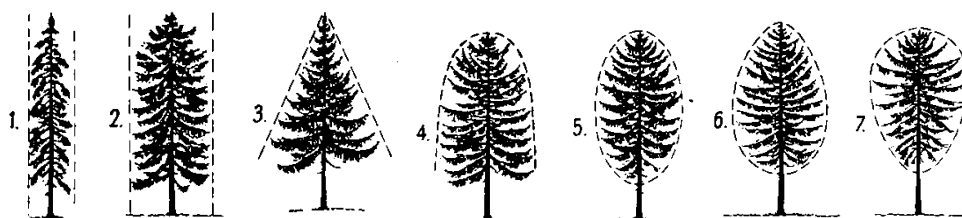


Obr. č. 14: Rozšíření smrku ztepilého v Evropě; < <http://www.euforgen.org/species/picea-abies/>> [cit. 8.4.2018]

4.3.1.3 Morfologie

Dosahuje výšky 50m a stáří až 650 let. Koruna je pyramidální a do vysokého věku špičatá (Musil, 2003). Má průběžný, přímý, štíhlý válcovitý kmen s pravidelným přeslenitým větvením (Koblížek et al., 2009). Šupinovitá borka zpočátku světle hnědá později šedá, ve spodní části u starších jedinců může být rozpraskaná. Obecně se borka považuje za méně odolnou, proto je náchylná k poškození biotickými faktory jako je hmyz a zvěř (Slávik, 2016). Dřevo je měkké, pevné, pružné, lehké a snadno opracovatelné (Musil, 2003). Snadno dochází k vývratům, jelikož kořenový systém je rozvinut do plochy a není dostatečně ukotven v půdě (Koblížek et al., 2009). Při půdním povrchu má smrk silné talířovitě rozložené kořeny, z nichž vyrůstají tenké kořenové výběžky rostoucí svisle dolů. Na tvorbu kořenového systému může mít vliv obsah kyslíku v půdě, obsah živin v půdě a vodní poměry (Musil, 2003). Plodnost začíná u jedinců v zápoji od 60 let, u soliterně rostoucích jedinců mezi 30-40 lety (Slávik, 2016). Kvetení probíhá v dubnu až v červnu. Šišťice mají elipsoidní tvar. Samičí se nacházejí v horní části koruny, jsou až 6 cm dlouhé vzpřímené, přisedlé, zelené nebo červené. Samčí mají velikost 2-2,5 cm, stopkaté, žlutavě červené ve střední části koruny. Před dozráním jsou šišky

nazelenalé (červenofialové). Zralé jsou hnědé, válcovité na podzim 1. roku (Musil, 2003). Růst je zprvu pozvolný, nejrychlejšího růstu dosahuje kolem 40. roku a zastavuje se obvykle ve 100 letech (Musil, 2003). Smrk ztepilý se vyznačuje širokou vnitrodruhovou variabilitou, je nejpolymorfnějším taxonem svého druhu. Morfologická variabilita je pozorovatelná především na tvaru koruny, typu borky, jehlicích, barvy samičích šištic a zralých šištic (Slávik, 2016).



Obr. č. 15: Tvary korun smrku ztepilého; Samek, 1964

4.3.1.4 Ekologie

Smrk ztepilý je dřevina polostinná se středními nároky na světlo. V mladém věku lépe toleruje zástin, ale s věkem se mění jeho schopnost tolerovat zastínění (Musil, 2003). Díky povrchové kořenové soustavě je náročný na vzdušnou i půdní vlhkost, tudíž je pro něj dostatek vody limitujícím faktorem (Cvrčková et Máchová, 2013). Dobře snáší nadbytečnou vlhkost i stagnující vodu (Koblížek et al., 2009). Smrk není náročný na půdu a geologické podloží, ale nese špatně nedostatečné provzdušnění půdy (Smith et Hinckley, 1995). Optimální průměrná roční teplota se udává přes 6°C, srážky ve vegetační době 490-580 mm (Musil, 2003). Je citlivý na vysoké teploty (spojené s nedostatkem vody) a znečištění ovzduší (Koblížek et al., 2009).

V posledních letech bylo zaznamenáno chřadnutí smrkových porostů na území Moravy způsobené především nedostatkem vody v půdě. Za prvotní faktor způsobující poškození smrkových porostů je obecně považován nedostatek srážek, způsobující stres suchem. Dalším faktorem je pak nepůvodnost smrkových porostů na stanovištích v nižších lesních vegetačních stupních (Holuša et Liška, 2002). Na vývoj poškození mají vliv především biotičtí škodliví činitelé, jako je václavka a kůrovec, kteří vedou k urychlení rozpadu porostů (Šrámek et al., 2008).

4.3.1.5 Ekotypy smrku ztepilého

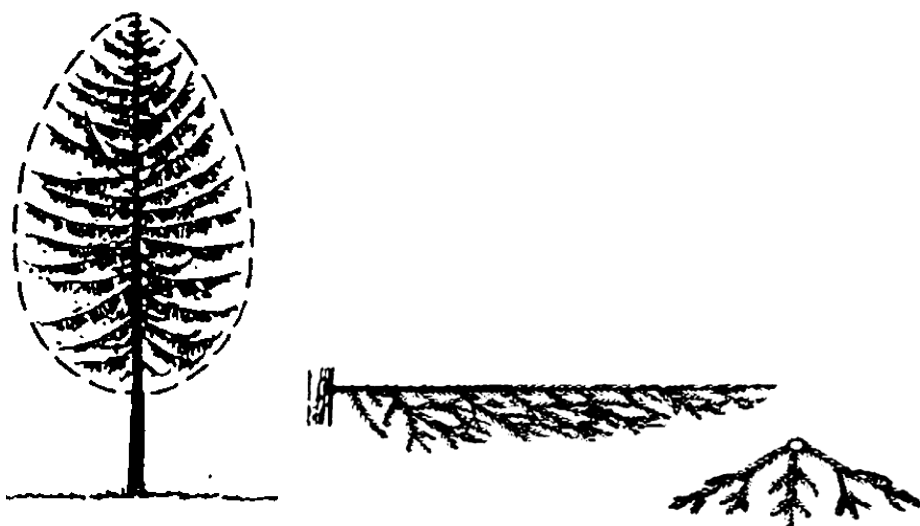
Jako ekotypy lze označit populace lesních dřevin, které vznikly přirozeným výběrem a jejich genetická struktura se adaptovala se na specifické podmínky prostředí, tyto formy jsou především proměnlivé díky nadmořské výšce a zeměpisné šířce (Morgenstern, 1996). Kromě morfologických odlišností, jsou zde ještě další adaptace jednotlivých ekotypů. Například k pučení u ekotypů pocházejících z vyšších nadmořských výšek dochází dříve než u ekotypů pocházejících z nižších nadmořských výšek, pokud jsou stromy vystavené stejným teplotním podmínkám (Sogaard et al., 2008). V České republice se vyskytují tři původní ekotypy (dědičně podmíněné geografické variety) smrku ztepilého – chlumní, horský a vysokohorský. Odlišnosti můžeme pozorovat především u tvaru korun a větví (Cvrčková et al., 2011).

Smrk chlumní (*acuminata*) se nachází ve 4-5 lesním vegetačním stupni. V mládí je pozorovatelný rychlý růst. Kmen je plnodřevný, válcovitý. Smrk chlumní má širokou, eliptickou až vejčitou korunu se štíhlými, dlouhými, větvemi kolmo nasazenými na kmen. Má dlouhé a řídké jehlice a dlouhé šišky (Palatová et Longauer, 2014).



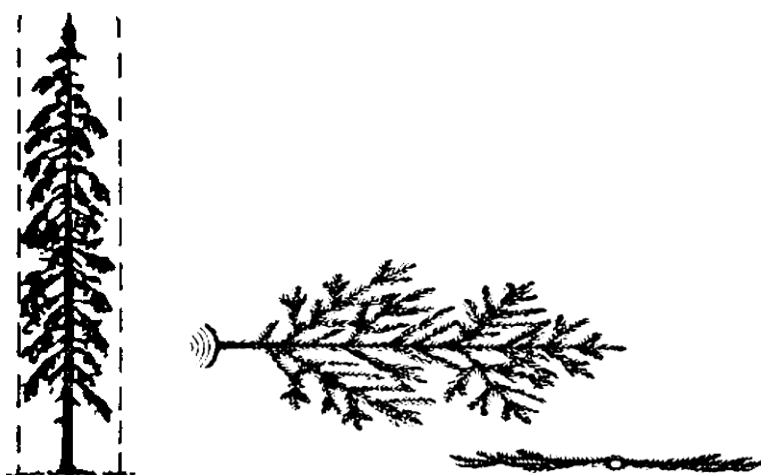
Obr. č. 16: Chlumní ekotyp - tvar koruny, typ větvení; Morgenstern, 1996; Samek, 1964

Smrk horský (*europaea*) se nachází v 6-7 lesním vegetačním stupni v nadmořské výšce 700-1050 m. Kmen je plnodřevný a válcovitý. Má kratší a řidší korunu. Větve 2. a 3. řádu jsou svazčité s přechodnými formami k typu hřebenitému (Palatová et Longauer, 2014).



Obr. č. 17: Horský ekotyp - tvar koruny a typ větvení; Samek, 1964

Smrk vysokohorský (*obovata*) se nachází v 8 lesním vegetačním stupni v nadmořské výšce nad 1050m. V mládí je jeho růst pomalý. Má štíhlou, válcovitou, hustou korunu se silnými, krátkými ostrým úhlem nasazenými větvemi. Větve 2. a 3. řádu jsou deskovité a svazčité. Jehlice má tuhé, krátké a husté. Je odlolný k větru, sněhu a námraze (Palatová et Longauer, 2014).



Obr. č. 18: Vysokohorský ekotyp - tvar koruny a typ větvení; Samek, 1964

Výzkum morfologické proměnlivosti smrku z hlediska fyto geografického je založen na metodě spekter morfologických znaků. Tuto metodu popsal v roce 1964 Samek, jedná se o zjištění rozšíření morfologických typů v autochtonní populaci a odlišností subpopulací ve vyhraněných ekotypech (Samek, 1964). V současné době probíhá výzkum genetické podmíněnosti ekotypů smrku také na Katedře genetiky a fyziologie lesních dřevin FLD ČZU.

V minulém století byly často tyto morfologické variace ve svých přirozených areálech pozměněny nekontrolovanou výsadbou nepůvodních typů smrků (Morgenstern, 1996), ovšem fenotypové nebo morfologické odlišnosti si jednotlivé ekotypy udržují i po přenosu do jiných podmínek, kde tato odlišnost není výhodná. Různé ekotypy se spolu mohou volně křížit bez snížení životaschopnosti potomstva (Palatová et Longauer, 2014).

4.3.1.6 Genom smrku ztepilého

Soubor všech molekul DNA daného organismu se nazývá genom. Znalost genomu jehličnatých rostlin umožňuje pochopení evoluce jehličnanů, rozvoj šlechtitelství, porovnávací analýzy genomové architektury, návrhy genetických markerů (Nystedt al., 2013). Vývoj přirozené populace závisí na rozmanitosti genomů jedinců, kteří ji vytvářejí. Čím jsou populace geneticky rozmanitější, tím se lépe přizpůsobí změnám podmínek na stanovišti (Paule, 1992). Znalost genetické struktury je důležitá zejména u ohrožených populací, které byly selektovány přírodními procesy na specifických stanovištích (Cvrčková et Máchová, 2015).

Většina jehličnanů jsou diploidní rostliny s 24 chromozomy. Genom u jehličnanů dosud nebyl detailně popsán a to především díky velikostí genomu u jehličnanů (20 - 30 gigabáze párů), imbrední depresi a efektivní velikosti populace. Prvním jehličnanem se zmapovaným genomem je právě smrk ztepilý. Velikost genomu smrku ztepilého je odhadována na 19,6 Gbp. Byly analyzovány kódující a nekódující sekvence genomu smrku a byly porovnávány a odhadovány od genomů příbuzných druhů: borovice lesní (*P. sylvestris*), jedle sibiřská (*A. sibirica*), jalovec chvojka (*J. communis*), tis červený (*T.baccata*) (Nystedt al., 2013).

4.4 Dehydriny

Termínem dehydriny je označována širší skupina proteinů. V druhé polovině 20. století byla provedena studie (Galau et al., 1986), která odhalila přítomnost proteinů, syntetizujících se v rostlinách při dehydratačním stresu a tyto proteiny byly pojmenovány Late Embryogenesis Abundant protein (LEA) – proteiny pozdní fáze embryogeneze (Galau et al., 1986). LEA proteiny jsou přítomny v mnoha rostlinách a různých rostlinných tkáních. LEA proteiny můžeme klasifikovat podle různých kritérií, ovšem nejčastěji bývají rozřazeny do 6 nebo 7 skupin (Battaglia et al., 2008). Jednou z těchto skupin jsou dehydriny, ty jsou označovány jako skupina D-11 neboli skupina 2 (Close, 1997) neboli RAB (responsive to abscisic acid) (Hara, 2010).

Mráz, sucho a zasolení půdy (abiotické stresy) na stejném principu vyvolávají nedostatek vody v buňce. Odolnost vůči těmto stresům je často spojována právě s dehydriny (Close, 1997). Dále mohou mít dehydriny zásadní funkci při nástupu dormance na podzim a při rašení pupenů na jaře (Yakovlev et al., 2008).

4.4.1 Výskyt

Dehydriny se vyskytují u vyšších rostlin, nižších rostlin a sinic, jejich přítomnost může korelovat s tolerancí na nedostatek vody (Close, 1996). Nacházejí se převážně v rostlinných tkáních vystavených dehydrataci, jako v semenech při dozrávání nebo ve vegetativních tkáních vystavených environmentálním stresům (Rorat, 2006). Dehydriny mohou být lokalizovány v různých částech buňky. Nejpravděpodobnějším místem výskytu je jádro a cytoplasma. Dalšími místy výskytu jsou mitochondrie, chloroplasty, cytoplasmatická membrána (Boddington et Graether, 2014), plastidy, tonoplast a endoplasmatické retikulum (Hara, 2010).

4.4.2 Funkce dehydrinů

Biochemické analýzy a lokalizační experimenty naznačují několik funkcí dehydrinů, avšak ne všechny dehydriny musí mít všechny tyto funkce (Boddington et Graether, 2014). Vyskytují se velké rozdíly ve funkci mezi různými dehydrinovými geny (Velasco-Conde, 2012).

Dehydriny se mohou vázat na makromolekuly jako například na fosfolipidy, nukleové kyseliny a cytoskelety. Vazba na fosfolipidy je možná díky K-segmentu

(amfipatický alpha-helix), což dokázali studie interakcí těchto proteinů s buněčnými membránami. Dehydriny se specificky vážou na kyselé fosfolipidy jako je kyselina fosfatidová. To naznačuje interakci dehydrinů se specifickými oblastmi buněčných membrán. Důkaz, že dehydriny se váží na tyto makromolekuly citlivé na stres, naznačuje, že je mohou před abiotickým stresem chránit (Hara, 2010).

Dále dehydriny mohou vázat malé molekuly – vápník a dvojmocné kovové ionty (zinek, mangan, nikl, měď). Vodní stres u rostlin vyvolává vylití kovových iontů z organel, což zvyšuje intracelulární koncentraci volných kovů. Bylo prokázáno, že dehydriny jsou schopné interakce s vápníkem a dvojmocnými ionty kovů. Předpokládá se, že takto ochraňují před škodlivými účinky volných kovů na rostlinné buňky (Svensson et al., 2000).

Další funkcí je ochrana před denaturací enzymů. Denaturace je fyzikální jev, kdy proteiny ztrácí správnou sekundární strukturu vlivem nepříznivých podmínek a v rostlinných buňkách se může odehrávat při vystavení stresu. Denaturace může nastat například při nízkých teplotách, tehdy mohou mít dehydriny kryoprotektivní účinek. Tato funkce je pravděpodobně zásadní, protože nízká teplota je hlavní stres, který podporuje expresi dehydrinových genů. Dále také mohou vázat vodu, čímž mohou zabraňovat důsledkům dehydratace (Hara, 2010).

4.4.3 Struktura

Dehydriny jsou proteiny, u kterých se v primární struktuře (tj. v řetězci aminokyselin) může objevit jeden ze tří motivů K-, Y- nebo S-segment, tvořený specifickou sekvencí aminokyselin. V každém typu dehydrinu musí být alespoň jeden K-segment (bohatý na lysin). Ten to K-segment má sekvenci patnácti aminokyselin EKKGIMDKIKEKLPG, ta ovšem nemusí být naprosto identická u všech dehydrinů. K-segment tvoří amfipatický (obsahující část hydrofilní a hydrofobní) alpha-helix, (jeden ze základních motivů sekundární struktury proteinů, který je schopen interakce s membránami (Boddington et Graether, 2014). K-segment je obvykle přítomen v blízkosti C-konce (Rorat, 2006). Dalšími konzervovanými oblastmi jsou Y-segment (T/VDEEGNP), oblast bohatá na tyroxin, obvykle blízko N-konce molekuly a S-segment, sekvence tvořená řetězcem 4 až 10 serinů (Close, 1996). Díky zkratce “YSK“, která je založena na těchto sekvencích lze dehydriny klasifikovat (Battaglia et al., 2008). Počet a pořadí segmentů Y, S, K definuje různé podskupiny dehydrinů: YnSKn, YnKn, SKn, Kn and KnS. Kromě

těchto segmentů se v molekulách dehydrinů vyskytují méně konzervované sekvence tzv. Φ -segmenty, obvykle bohaté na polární aminokyseliny (Rorat, 2006).

Dehydriny v roztoku jsou neuspořádané, což znamená, že nemají dobře definovatelnou sekundární nebo terciální strukturu. I přes jejich neuspořádanost dehydriny v přítomnosti ligandů, jako jsou buněčné membrány, zaujímají uspořádanou strukturu (Boddington et Graether, 2014).

4.4.4 Genová exprese dehydrinů

Abiotický stres jako je sucho, zima, zvýšená salinita nebo zrání semen způsobují zvýšenou regulaci mRNA pro dehydriny a tím zvýší intenzitu syntézy dehydrinových proteinů. Všechny tyto abiotické vlivy vedou k redukci množství vody dostupné pro buňky a tím pádem zapříčiňují dehydrataci (Boddington et Graether, 2014). Produkce různých typů dehydrinů v rostlině může být aktivována různými abiotickými stresy (Nylander et al., 2001). Bylo dokázáno, že u geneticky modifikovaných rostlin, s implementovaným genem pro dehydriny, může být zvýšená toleranci vůči suchu a zimě (Yang et al., 2014).

Genová exprese dehydrinů je ve většině případů reakcí na fytohormon ABA, o jehož koncentraci *in vivo* v rostlinných buňkách je známo, že se zvyšuje za dehydratačních podmínek. Předpokládá se, že ABA funguje jako sekundární stimulant, který předává buňce informaci o dehydrataci a zahajuje ochranné procesy metabolismu buňky a uvádí do chodu opravné mechanismy. ABA ovšem není primárním stimulantem těchto procesů, což naznačuje, že existují další překrývající se kontrolní programy (Campbell et Close, 1997).

Přestože jsou známy důkazy o důležitosti dehydrinů při odpovědi na abiotický stres, mechanismus jejich protektivního účinku zatím nebyl zcela objasněn. Přesná role dehydrinů není zcela známá, ale byla zjištěna souvislost s jejich syntézou v reakci na stresové abiotické faktory (Boddington et Graether, 2014).

4.4.5 Exprese dehydrinů v období rašení pupenů u smrku ztepilého

U stromů, které jsou po celý svůj poměrně dlouhý život vázané na jediné stanoviště, se vyvinuly strategie ke zvládnutí sezónních abiotických změn v životním prostředí. Změna příznivých i nepříznivých teplotních a světelných podmínek zapříčinila vývoj mechanismů umožňujících synchronizaci růstu a překonání dočasně nepříznivých podmínek. Rašení pupenů je jasně patrný proces naznačující konec nepříznivých podmínek v průběhu zimy a začátek růstu. Na fyziologické úrovni je rašení poslední fází komplexních procesů souvisejících s koncem dočasně nepříznivých podmínek (Rehfeldt, 1999). Smrk ztepilý vykazuje shodné geografické vzory odchylek v době začátku rašení pupenů. To souvisí se zeměpisným a výškovým původem semen, což podle Sogaarda et al. (2008) naznačuje přizpůsobení populací místním klimatickým podmínkám. Správně načasované rašení je jedním z nejdůležitějších procesů, které ovlivňují úmrtnost, růst a kvalitu smrku na místech, kde se často vyskytuje pozdní jaro nebo časně mrazy na podzim (Yakovlev et al., 2008).

Na jaře stromy reagují na několik stresů: teplota, intenzita světla (délka dne), nedostatek vody. Časně rašící smrky obsahují výrazně větší počet jedinců s vadami, zraněními, sníženým růstem ve srovnání se smrky s pozdějším rašením. Metabolismy v pupenech a větvích totiž začínají, když teplota v okolí stoupá nad bod mrazu, i když jsou kořeny stále neaktivní a nejsou schopné dodávat vodu a živiny. Rašení a prodlužování letorostů jsou procesy náročné na dostatek vody. Proto by geny související s vodním stresem mohly hrát regulační roli v procesech načasování rašení. Dehydriny pravděpodobně mají důležitou roli při zajišťování ochrany během zimní dormance a rašení (Yakovlev et al., 2008; Rehfeldt, 1999).

Rozdíl mezi časně a pozdně rašícími ekotypy smrků je v načasování molekulárních procesů vedoucích k rašení z důvodu odlišností v jejich odpovědi na zvýšení teploty na jaře. U pozdně rašících ekotypů smrků je významně vyšší exprese dehydrinů než u brzy na jaře rašících ekotypů. Ve shodných teplotních podmínkách a dostatečně dlouhých dnech se populace smrků pocházející ze severních oblastí raší dříve, než populace pocházející z jižních zeměpisných šířek, na což poukazuje ve svém článku Yakovlev et al. (2008).

Analýzu genové exprese pomocí metody qRT-PCR prováděl Yakovlev et al. (2008) pro osm různých genů pro dehydriny u smrku ztepilého v období 10 týdnů před až 1 týden po procesu rašení pupenů (vzorky pocházely z jehlic).

Typ K_n :

PaDhn1 (K_2) - Vykazuje klesající trend v období 10 týdnů před až 1 týden po procesu rašení pupenů. Nejvyšší úroveň transkripce v dubnu (10 až 7 týden před rašením), s minimem po procesu rašení. Tento trend potvrzuje u *PaDhn1* i Yakovlev et al., 2006.

PaDhn6 (K_3) - Vykazuje klesající trend v období 10 týdnů před až 1 týden po procesu rašení pupenů. Nejvyšší úroveň transkripce v dubnu (10 až 7 týden před rašením), s minimem po procesu rašení.

PaDhn7 (K_2) - *PaDhn7* vykazuje podobný klesající trend, ale s výrazně nižší amplitudou a nižší úrovní transkripce ve srovnání s *PaDhn1* a *PaDhn6*.

Typ SK_n :

PaDhn2 (SK) - Vykazoval klesající trend s nevyšší úrovní transkripce v dubnu (10 až 7 týden před rašením) a následně nižší úroveň transkripce po procesu rašení.

PaDhn3 (SK_2) - Vykazoval klesající trend s nevyšší úrovní transkripce v dubnu (10 až 7 týden před rašením) a následně nižší úroveň transkripce po procesu rašení.

PaDhn4 (SK_2) - *PaDhn4.2* a *PaDhn4.6* měly klesající trendy, ale výrazně se lišili ve své amplitudě. Úroveň transkripce *PaDhn4.6* klesla až 64 násobně (s větší amplitudou) ve srovnání s *PaDhn4.2*, kde klesla úroveň transkripce pouze 5 násobně.

PaDhn5 (SK_4) - Vykazoval klesající trend s nevyšší úrovní transkriptu v dubnu (10 až 7 týden před rašením) a následně nižší úroveň transkripce po procesu rašení.

Typ K_nS_n :

PaCAP1 (*PaCAP1.1* K_4SK_2 & *PACAP1.2* K_3SKSK_2) - Expres *PaCAP1* (Coldacclimation protein) se významně liší od ostatních dehydrinů. Má dvě délkové varianty reprezentované současně ve stejném vývojovém období, které se liší o 22 aminokyselin. Úroveň transkripce byla v období před, během a po procesu rašení stabilní, s mírně rostoucím trendem v období rašení. Úroveň transkripce *PaCAP1* pro časně rašící ekotypy je vždy vyšší než pro pozdně rašící ekotypy.

Ve stejném vývojovém stádiu byla úroveň transkripce vybraných dehydrinů u časně a pozdně rašících ekotypů velmi podobná.

4.4.6 Exprese dehydrinů v období nástupu dormance u smrku ztepilého

Dormance je adaptace rostlin k podmínkám nepříznivého období klimatického cyklu. Jedná se o období odpočinku spojené s dočasným potlačením růstu. Tato adaptace má význam pro navození zimního klidu spojeného se zvýšenou odolností k mrazu a dehydrataci (Asante, 2009). Na podzim je u stromů důležité správné načasování zastavení růstu k překonání nepříznivých podmínek v zimě. Schopnost stromů přežít teploty pod bodem mrazu závisí na mechanismech, které vedou ke vstupu do dormance. Regulace růstu stromů je řízena geneticky v reakci na podmínky životního prostředí. Stromy tak mohou uzpůsobovat jejich růst a vývoj a mohou se synchronizovat s měnícím se sezónním obdobím (Asante et al., 2011).

Typ K_n :

PaDhn1(K₂) a *PaDhn6(K₃)* - Genovou expresi způsobuje fotoperioda a teplota, se zkracující se délkou dne a klesající teplotou rostla úroveň genové exprese

Jedním ze spouštěčů exprese dehydrinových genů tak může být délka dne. Zvýšená úroveň transkripce dehydrinů také souvisí s tím, že se dny kratší fotoperiodou na podzim přichází i nízké teploty. (Asante et al., 2011).

4.4.7 Exprese dehydrinů při vystavení suchu u smrku ztepilého

Jehličnaté lesy na celém světě zažívají škody, zejména v důsledku sucha. V Evropě se předpokládá zvýšení frekvence letního sucha, což může mít dopad na vitalitu stromů (Allen et al., 2013), což zdůrazňuje potřebu poznatků o tom, jak stromy reagují na sucho. Smrk ztepilý je citlivý na nedostatek vody (Cvrčková et Máchová, 2013) a vodní stres by prokázán jako limitující faktor růstu u této dřeviny (Solberg, 2004). Sucho je způsobeno několika současně se vyskytujícími faktory, jako jsou omezené srážky a vysoké teploty, které vedou ke snížení množství vody v půdě i ve vzduchu (Eldhuset, 2013). Sucho navozuje řadu krátko- i dlouhodobých reakcí v rostlinách, včetně uzavírání průduchů a omezení růstu letorostů, odumírání kořenů, snížení množství biomasy jemných kořenů a snížení životnosti kořenů. Pod vlivem sucha dochází k morfologickým adaptacím ve vodivých pletivech, jako jsou změny v příčném průřezu cév nebo jejich zplošťování. Tyto změny jsou významnou dlouhodobou adaptací vodivých pletiv na sucho, které mění hydraulickou strukturu tak, aby se minimalizoval jejich možný hydraulický kolaps. Vedle morfologických

změn jsou do odezvy rostliny na sucho zapojeny i některé proteiny, jako například dehydriny (Chaves et al., 2003).

Eldhuset (2013) provedl Analýzu genové exprese pomocí metody qRT-PCR pro každý z těchto devíti genů pro dehydriny u smrku ztepilého v období 11 týdnů vystavení nedostatku vody (vzorky pocházely z jehlic a kůře).

Typ K_n :

PaDhn1 (K_2) - Vysoká hladina transkripce v jehlicích i v kůře.

PaDhn6 (K_3) - Velmi vysoká hladina transkripce v jehlicích i v kůře.

PaDhn7 (K_2) - Nebyla zjištěna zvýšená hladina transkripce ani v jehlicích ani v kůře.

Typ SK_n :

PaDhn2 (SK) - Mírně zvýšená hladina transkripce v jehlicích.

PaDhn3 (SK_2) - Mírně zvýšená hladina transkripce v jehlicích.

PaDhn4 (SK_2) - *Dhn4.1* a *Dhn4.5* nebyla zjištěná zvýšená hladina transkripce ani v jehlicích ani v kůře.

PaDhn5 (SK_4) - Mírně zvýšená hladina transkripce v jehlicích.

Typ K_nS_n :

PaCAP1.1 (K_4SK_2) - Zvýšená úroveň transkripce v jehlicích i v kůře až při velkém suchu.

PaCAP1.2 (K_3SKSK_2) - Zvýšená úroveň transkripce v jehlicích až při velkém suchu.

Transkripce u většiny dehydrinů se zvýšila v reakci na sucho, některé dehydriny ale nereagují na měnící se podmínky, tyto dehydriny pravděpodobně nesouvisí s reakcemi na sucho, ale s jinými procesy v rostlině. Významné změny hladin transkripce záleží na typu tkáně a genové funkci. U *PaCAP1* a *PaCAP2* byla hladina významně zvýšena v jehlicích pouze při velkém suchu, mohou souviset s odolností proti suchu v pozdější fázi, kdy jsou ztráty vody vyšší. Celkové větší transkripční změny v jehlicích než v kůře mohou naznačovat, že jehlice potřebují aktivně reagovat na nedostatek vody a mají tedy větší repertoár genů k jejich ochraně (Eldhuset, 2013).

4.4.8 Akumulace dehydrinů u smrku při extrémně nízkých teplotách

Tolerance extrémně nízkých teplot, u jehličnatých stromů boreálního pásma, které jsou schopné přežít dlouhé období teploty -40°C , je relativně málo prozkoumaná. Pochopení mechanismů vedoucích k toleranci extrémně nízkých teplot by mohlo vést k pokroku v pěstování zemědělských plodin a v lesním hospodářství. Aklimatizace boreálních a temperátních lesů (v jehlicích, pupenech a kůře) je iniciována zkracující se délkou dne a ochlazením (Welling et al., 2004; Asante et al., 2011), doprovázená četnými změnami v genové expresi (zasazeny jsou geny i celé dráhy pro tvorbu proteinů, sacharidů, lipidů).

Smrk sibiřský (*Picea obovata*) je druh, který toleruje extrémně nízké teploty a je blízce příbuzný se severní populací smrku ztepilého. U smrku sibiřského byla provedena analýza genové exprese pomocí metody qRT-PCR s použitím primerů pro dehydriny smrku ztepilého (vzorky pocházely z jehlic). Úroveň transkripce se během aklimatizace na podzim zvyšovala, největší byla v zimním období, když byla nejnižší teplota a během deaklimatizace na jaře se vzrůstající teplotou úroveň transkripce klesala. Tento průběh byl nejvýraznější u Dhn1, Dhn2, Dhn3, Dhn6, CAP1.1 a CAP1.2. O něco méně výrazný, přesto se stejným trendem, byl Dhn4 a Dhn5. Dhn7 vykazoval reverzní vzorek oproti ostatním, hladina transkripce klesala s klesající teplotou, v období aklimatizace a deaklimatizace hladina transkripce rostla. Zvýšená hladina transkripce během období s nízkými teplotami ukazuje, že dehydriny mají speciální roli v přežití extrémně nízkých teplot (Kjellsen, 2013).

U smrku sibiřského byla také provedena analýza pomocí metody Relative electrolyte leakage (REL). Jehlice smrku byly sbírány každé dva až čtyři týdny od srpna do dubna. Každý vzorek byl postupně vystavován teplotám -10 až -65°C . Bylo zjištěno, že míra poškození buněk a tkání byla větší na podzim a na jaře než v zimě. V zimě byly jehlice více rezistentní vůči nízkým teplotám (více „připravené“ na nízké teploty), což naznačuje souvislost mezi teplotou, expresí dehydrinů a odolností tkání smrku (Kjellsen, 2013).

5 METODIKA A VÝSLEDKY

5.1 Izolace RNA

5.1.1 Lyze buněk a tkání

Jehlice z letorostů rozkrájíme a vložíme do 2 ml mikorozkumavek (safe-lock; Eppendorf). Tyto zkumavky jsou použity s ohledem na jejich kvalitní víčko, tlustostěnnost a odolnost. Do zkumavky společně s materiálem vložíme 2-3 kovové drtící kuličky. Zkumavky se vzorky a kuličkami se zamrazí pomocí tekutého dusíku (-196 °C) a vloží do oscilačního mlýnu (bylo zjištěno, že ideální doba drcení je 6 minut, frekvence 30 kmitů za vteřinu). Po vyjmutí z oscilačního mlýnu zkontrolujeme kvalitu nadrcení vzorku, v případě neúplného nadrcení vzorku vložíme znovu do oscilačního mlýnu pro úplnou homogenizaci vzorku bez viditelných kusů jehlic.

5.1.2 Izolace RNA pomocí kitu

Pro izolaci RNA byla použita laboratorní souprava *MasterPure™ Plant RNA Purification Kit (Epicentre)*.

Nejdříve je nutné promíchat všechny roztoky, aby byla zajištěna jejich homogenizace před použitím. Do každého vzorku se rychle přidá 600 µl roztoku pro rozpuštění rostlinné tkáně a buněk, 6 µl 100 mM DTT a 1 µl proteinázy K. Vortexujeme 1 minutu, potom vložíme do termomixeru na 15 minut, 56°C, 600 rpm. Následuje centrifugace 5 minut, 21°C, 10 000 g (mechanické nečistoty se srazí na dno a dále pracujeme jen s roztokem). Roztok přelijeme do nové série zkumavek a vložíme na 3 minuty na led. Do každé zkumavky přidáme 250 µl MPC činidla pro srážení proteinů a vortexujeme 15 vteřin. Centrifugujeme 10 minut, 4°C, 10 000g. Supernatant (roztok) přelijeme do nové série zkumavek, přidáme 500 µl isopropanolu a 30-40x obrátíme (vysrážíme nukleové kyseliny). Centrifugujeme 10 minut, 4°C, 10 000 g. Pro každý vzorek připravíme roztok 200 µl následujícím způsobem: 173 µl vody + 10X DNazového pufru + 5 µl DNazy I + 2 µl RiboGuard RNazového inhibitoru. Roztok vylijeme, zbytek vypipetujeme, zůstane nám sražená nukleová kyselina a tu naředíme 200 µl roztoku z předešlého kroku. Vortexujeme - sraženina se rozpustí. Vložíme do termomixeru 20 minut, 37°C. Přidáme 200 µl 2X a T roztoku a vortexujeme 5 vteřin. Přidáme 200 µl MPC činidla pro srážení proteinů,

vortexujeme 10 vteřin a položíme zkumavky na 3-5 minut na led. Následuje centrifugace 10 minut, 4°C, 10 000g a přelití roztoku s RNA do nové série zkumavek. Přidáme 500 µl isopropanolu do každé zkumavky a 30-40x otočíme. Centrifugujeme 10 minut, 4°C, 10 000g. Opatrně vylijeme roztok a dvakrát propláchneme ethanolem (na sraženinu nalijeme 70% ethanol a centrifugujeme 30 vteřin, 4°C, 10 000g – ethanol vylijeme a zbytek vypipetujeme). Do každé zkumavky přidáme 40 µl vody bez RNaz a 1 µl RiboGuard RNazového inhibitoru.

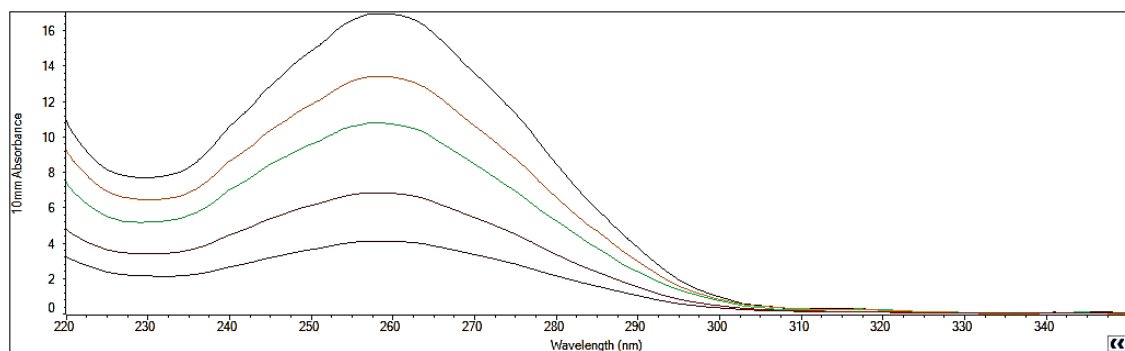
5.1.3 Měření koncentrace RNA

Koncentrace a čistota nukleových kyselin se zjišťuje spektrofotometricky. Roztok nukleových kyselin se spektrofotometricky vyhodnocuje při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci nukleové kyseliny, absorbance při 280 nm odráží její čistotu.

Vyizolovaná koncentrace je měřena spektrometrem (NanoDrop). Před použitím přístroje je nutné vzorek zvortexovat, aby bylo dosaženo homogenity vzorku. Nejprve se spektrofotometr vynuluje oproti slepému vzorku („blank“), kterým je obvykle voda nebo pufr použitý pro ředění roztoku. Pro měření koncentrace RNA postačuje 1 ul vzorku u vodných vzorků (1,5 – 2 ul pokud není jistá přesnost pipety nebo charakter vzorku). Změříme absorbanci roztoku DNA či RNA při 260 nm a následně při 280nm. Vypočteme poměr A260/A280, čistá RNA obvykle vykazuje hodnotu tohoto poměru 2 (pokud je poměr < 2 roztok je znečištěn; Zvárová et al., 2012).

A260 – 1.0 ~ 40 µg/ml; A260/A280 ~ 2.0

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type
5		NanoDrop2000	26. 7. 2016 14:57	534,7	ng/ul	13,367	6,580	2,03	2,08	RNA
4		NanoDrop2000	26. 7. 2016 14:57	428,1	ng/ul	10,703	5,243	2,04	2,08	RNA
3		NanoDrop2000	26. 7. 2016 14:56	271,2	ng/ul	6,779	3,323	2,04	2,02	RNA
2		NanoDrop2000	26. 7. 2016 14:55	677,8	ng/ul	16,944	8,494	1,99	2,21	RNA
1		NanoDrop2000	26. 7. 2016 14:54	162,5	ng/ul	4,063	2,105	1,93	1,94	RNA



Obr. č. 19: Záznam 5 vzorků a jejich výtěžnosti testovaných v laboratoři

5.2 Reverzní transkripce

Protože do PCR metody mohou vstupovat pouze molekuly DNA, je nutné informaci uloženou v RNA přepsat do formátu molekuly DNA. Toho se dosahuje pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Vznikne jednořetězcová, takzvaná komplementární (complementary) DNA - zkráceně cDNA, ta pak může sloužit pro vyhodnocení míry genové exprese v okamžiku, kdy byla z buňky získána. cDNA je oproti RNA relativně velmi stabilní, může být uchovávána delší dobu v mrazáku a není nutné dodržovat tak přísná pravidla jako při práci s RNA. Pro úspěšnou syntézu je potřeba, aby byla RNA kvalitní a nepoškozená (Zvárová et al., 2012).

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

Příprava Master Mixu:

Komponenty soupravy se nechají roztát v chladu (nejlépe položené na ledu). Je třeba vypočítat objem komponent potřebných pro přípravu požadovaného počtu reakcí (zahrnující nadměrný objem, jelikož dochází ke ztrátám během přenosu činidla).

Komponenty	Množství (μL)
pufr	2.0
dNTP mix	0.8
náhodné primery	2.0
reverzní transkriptáza	1.0
RNase inhibitor	1.0
voda (bez nukleázy)	3.2
celkem v reakci	10.0

Tab. č. 2: Komponenty Master Mix; Thermo Fisher

Připravený Master Mix jemně promícháme a uložíme na led.

Příprava reverzně transkripční reakce:

Připravíme zkumavky, do každé se napipetuje 10 μL Master Mixu, přidáme 10 μL RNA o koncentraci 1000 ng/μL a uzavřeme zkumavky. Krátce centrifugujeme a stočíme, abychom eliminovali vzduchové bubliny. Vložíme do thermo-cycleru (než vložíme do thermo-cycleru, uchováváme na ledu).

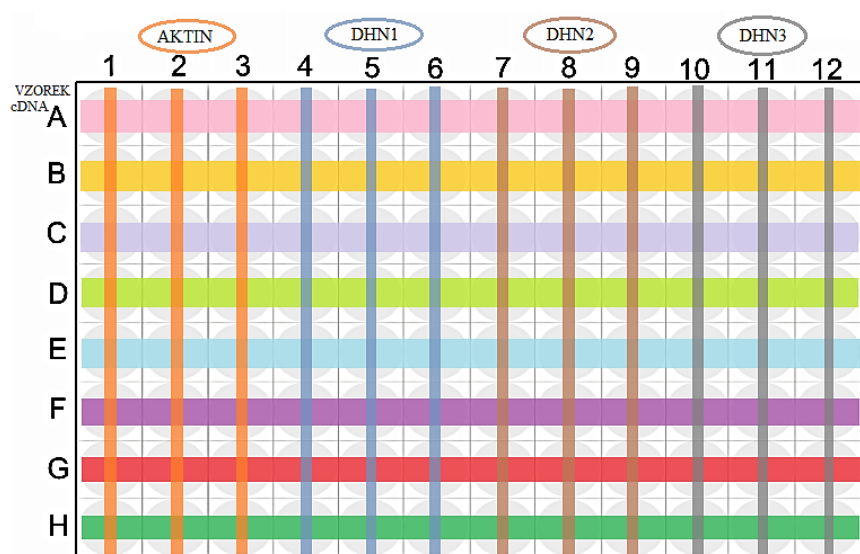
Program v thermo-cycleru:

Nastavení	Teplota (°C)	Čas (min)
krok 1	25	10
krok 2	37	120
krok 3	85	5
krok 4	4	∞

Tab. č. 3: Program thermo cycleru; Thermo Fisher

5.3 RT-qPCR

Pipetovací schéma:



Obr. č. 20: 96-jamková destička, příklad rozvržení pipetování: řádek A-H vzorky cDNA, sloupec 1-12 triplicáty primerů pro aktin, Dhn1, Dhn2, Dhn3

Příprava vzorků pro amplifikaci DNA s využitím *qPCR 2x SYBR Master Mixu (Top-Bio)*.

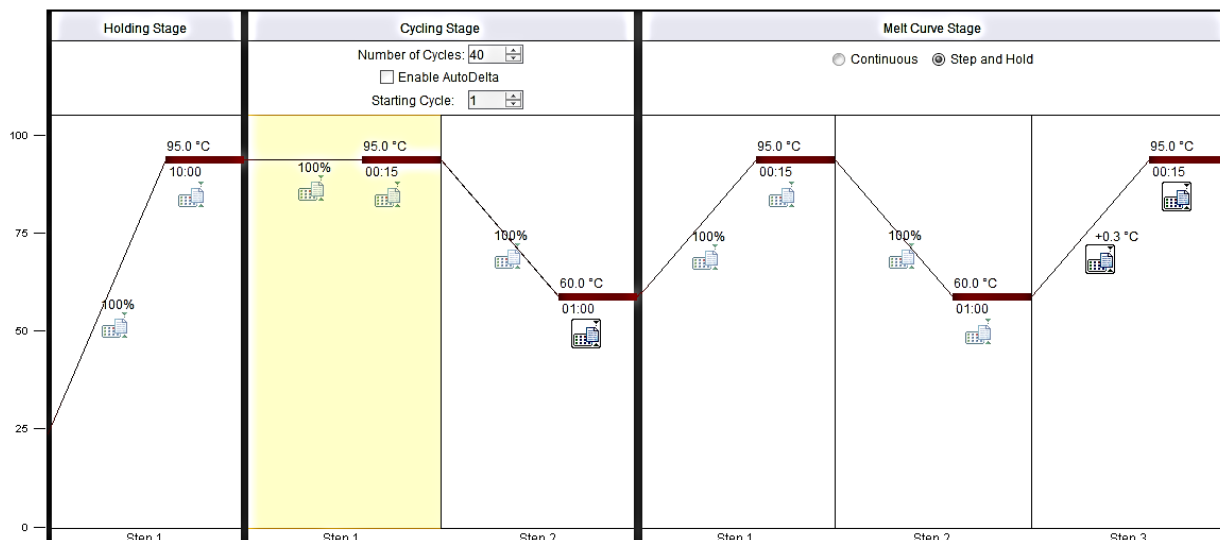
V tenkostěnných PCR mikrozkuvkách smíchat:

Reagencie	Objem (μL)
qPCR 2x SYBR Master mix	12,5
5' primer	1
3' primer	1
templátová DNA	1 (až 4μL)
PCR H2O	9,5 (až do finálního objemu 25μL)

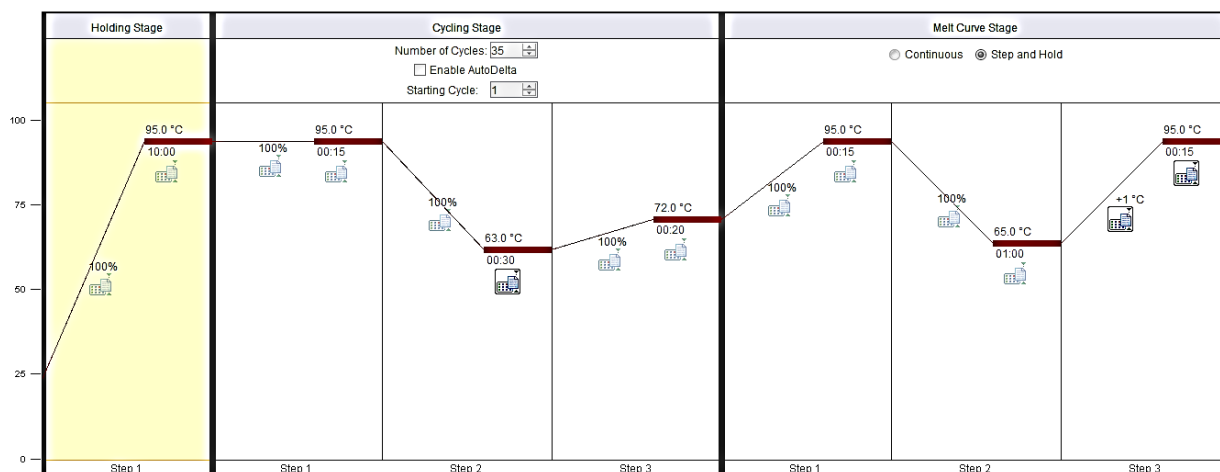
Tab. č. 4: Reagencie Master mix, Top-Bio

Reakce je u každého vzorku prováděna v triplicátech, tzn. reakci připravujeme v 3x větším objemu a počítáme s 5 – 10 % objemu navíc jako rezervu. Dále je třeba zamíchat na vortexu a krátce centrifugovat.

Následuje kvantitativní PCR za optimalizovaných podmínek:



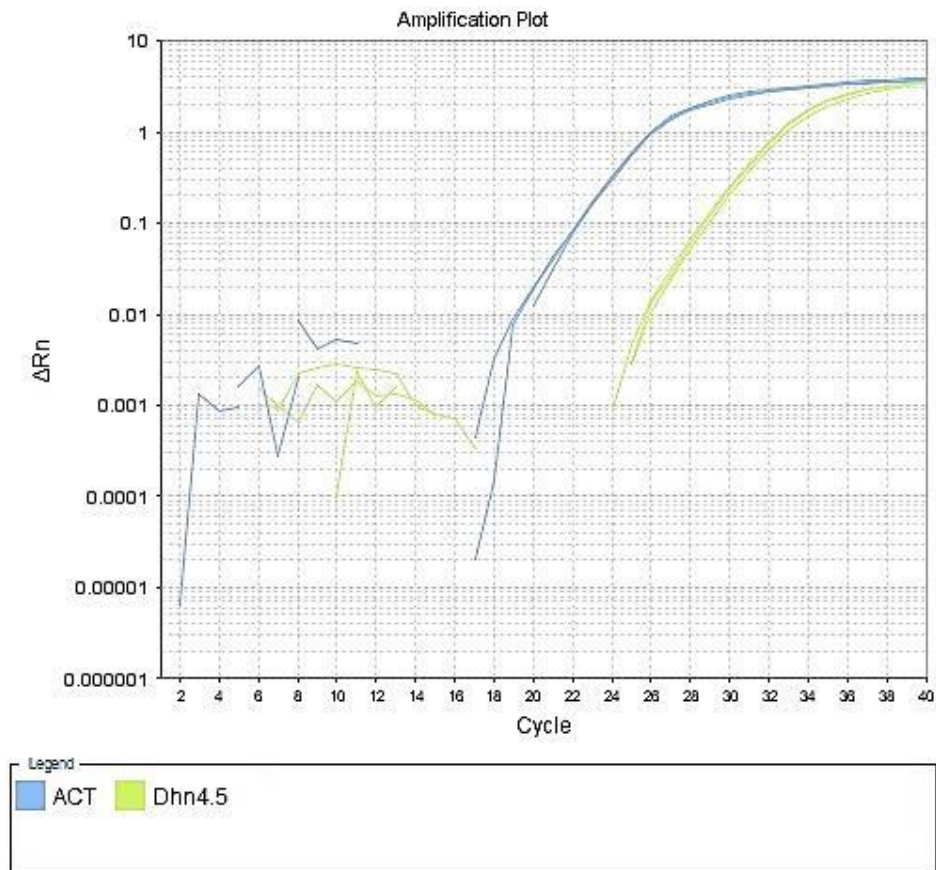
Obr. č. 21: Teplotní režim RT-qPCR; Kjellsen et al., 2013



Obr. č. 22: Optimalizovaný teplotní režim RT-qPCR

Použitý byl druhý optimalizovaný teplotní režim (obr. č. 18). V rámci prvního teplotního režimu přejatým z Kjellsen et al., 2013 (obr. č. 17) se objevovalo mnoho nežádoucích amplifikací (pravděpodobně primerových dimerů). To se nejdříve ukázalo na křivce tání - v jamkách byly dva různě tající produkty a na elektroforéze

se ukázala přítomnost krátkých úseků DNA (správná amplifikace by měla mít zhruba 100-200 bp, tyto krátké úseky měli cca 40 bp). Při druhé variantě teplotního režimu se tvorbě těchto úseků zamezilo.



Obr. č. 23: Amplifikační křivky (testovaný vzorek dehydrinu 4.5 a referenčního genu aktin v laboratoři)

6 DISKUZE

Analýza genové exprese může být provedena několika metodami, např. metodou přenosu RNA (*Northern blot*), RNA sekvenováním (*RNA-seq*), čipovou analýzou (*Microarrays*) nebo kvantifikací polymerázové řetězové reakce (*PCR*). V dnešní době se řada metod neustále zdokonaluje, nebo se vyvíjejí nové. Přispívá k tomu ve velké míře i výpočetní technika. Ta zajišťuje především automatizaci veškerých procesů a jednodušší analýzu dat pomocí složitých výpočetních algoritmů. Různé metody analýzy genové exprese mají své výhody i nevýhody. Metoda *Northern blot* patří mezi nejstarší a nejběžnější metody využívané v molekulární biologii, poskytuje především kvalitativní informace o analyzované RNA. Ovšem zaměřuje pouze na jeden gen nebo malý počet genů, zatím co např. u čipové analýzy je výhodou, že mohou být analyzovány tisíce genů najednou. Problémem při *Northern blottingu* je často degradace vzorku pomocí RNáz, také chemikálie používané ve většině *Northern blotů* mohou být rizikem pro výzkumníka, protože formaldehyd, radioaktivní materiál, ethidiumbromid, DEPC a UV světlo jsou škodlivé při určitých expozicích. Ve srovnání s *PCR* má *Northern blotting* nízkou citlivost, ale má také vysokou specificitu, což je důležité pro snížení falešně pozitivních výsledků (Zvárová et al., 2012). Další metodou analýzy genové exprese je RNA sekvenování. V posledních letech byla Sangerova metoda sekvenování nahrazena metodami nové generace zejména pro rozsáhle automatizované genomové analýzy. Metody nové generace jsou schopny masivního paralelního sekvenování. Dokáží souběžně číst miliony sekvencí a mnohonásobně převyšují schopnosti Sangerovy sekvenace. Ovšem u metod nové generace lze obecně sledovat nárůst chybovosti přečtených bází při zvětšující se délce sekvenovaného úseku. Nejvíce limitujícím faktorem Sangerovy metody je zdlouhavý proces přípravy každého analyzovaného úseku zvlášť. Výhodou Sangerovy sekvenace však zůstala délka spojitého řetězce, který je schopna v jedné reakci přečíst, až 1000bp (u metod Nové generace 150-800bp) a nízká chybovost kolem 1,5% (Kwon, 2011). Čipová analýza umožňuje měření exprese mnoha tisíců genů. Vzhledem využívání metod sekvenování nové generace se v posledních letech dostala čipová analýza do pozadí, ale stále se využívá jako levnější alternativa těchto technik. Čipové analýzy je třeba hlavně, pokud je požadována rychlá analýza velkého počtu vzorků. *PCR* má řadu

výhod, je to poměrně jednoduchá metoda, která rychle produkuje výsledky. Ta to technika je vysoce citlivá a může produkovat miliony až miliardy kopií konkrétního produktu pro sekvenování, klonování a analýzu (Zítka et al., 2010). RT-qPCR sdílí stejné výhody jako PCR s další výhodou kvantifikace syntetizovaného produktu. Proto má své použití k analýze změn hladin genové exprese. Jedním z hlavních omezení PCR je to, že předběžné informace o cílové sekvenci jsou nezbytné pro generování primerů, které umožní jejich selektivní amplifikaci. PCR je poměrně citlivá na různé chyby při přípravě vzorků (nepřesné pipetování, špatné promíchání či přítomností kontaminace) (Walker et al., 2008). Ze získaných informací je zřejmé, že až podle konkrétního výzkumu je třeba vhodně zvolit metodu analýzy a kvantifikace genové exprese.

V praktické části této bakalářské práce byla vytvořena optimalizovaná metodika výzkumu míry genové exprese, která by byla vhodná k dalšímu výzkumu, navazující na informace z rešeršní části této práce. Z rešeršní části vyplývá, že při nízkých teplotách se zvyšovala míra genové exprese u dehydrinů PaDhn1, PaDhn2, PaDhn3, PaDhn6, PaCAP1.1, PaCAP1.2 a přesně opačný trend vykazoval PaDhn7 (Kjellsen, 2013). Na nedostatek vody významně reagovala hladina exprese u PaDhn1 a PaDhn6, mírně pak u PaDhn2, PaDhn3, PaDhn5 a při extrémním suchu se zvýšená hladina genové exprese projevila i u PaCAP1.1 a PaCAP1.2 (Eldhuset, 2013). Na podzim u nástupu dormance se zvyšovala hladina exprese PaDhn1 a PaDhn6 (Asante et al., 2011) a následně pokles úrovně exprese na jaře byl zaznamenán u PaDhn1, PaDhn2, PaDhn5 a PaDhn6 (Yakovlev et al., 2008). V souladu s těmito zjištěními by bylo vhodné v případném dalším výzkumu se zaměřit na dehydriny PaDhn1, PaDhn2, PaDhn3, PaDhn5, PaDhn6, PaDhn7, PaCAP1.1, PaCAP1.2. Mohlo by se jednat o sledování míry exprese zmíněných dehydrinových genů během roku v pravidelných intervalech nebo rozklíčování rozdílů genové exprese dehydrinů u jednotlivých ekotypů smrku. Jelikož je téma klimatických změn velice aktuální a změny podnebí mají viditelný dopad. Následná studie by mohla významně přispět ke zlepšení managementu lesního hospodářství smrku, díky předpokládané vnitrodruhové rozdílnosti v odolnosti smrku ztepilého (vytipování potenciálně odolnějších subpopulací smrku), nebo by mohla vést k debatě o významu stávajících legislativních pravidlech pro nakládání a přenos sadebního materiálu.

7 ZÁVĚR

V bakalářské práci byla zpracována podrobná literární rešerše, kde byl popsán princip exprese genetické informace, základní metody analýzy genové exprese (Northern blot, RNA sekvenování, Microarrays, PCR) a také kvantifikační metoda genové exprese RT-qPCR. Součástí rešeršní části je dendrologická, ekologická a genetická charakteristika smrku ztepilého *Picea abies* (L.) H. Karst. Charakteristika zkoumané dřeviny, smrku ztepilého, byla popsána na základě doposud známých poznatků. Dřevina je velmi dobře popsána mnoha autory a to zejména díky tomu, že se jedná o nejvýznamnější lesnický využitelnou dřevinu ve střední Evropě. Další část literární rešerše je věnovaná specifickým proteinům, dehydrinům, u kterých se předpokládá spojitost jejich exprese s odolností smrku vůči stresovým faktorům. Dehydriny jsou popsány jak v obecné rovině (výskyt, funkce, struktura) tak i ve spojitosti se zájmovým organismem smrkem ztepilým (jednalo se především o nízké teploty, nedostatek vody, období nástupu dormance a období rašení pupenů). Tato práce je kompilací dosud vzniklých studií dehydrinů u smrku ztepilého. Součástí bakalářské práce je zpracovaný návrh metodiky analýzy genové exprese vybraných genů (dehydrinů) pomocí RT-qPCR, Byla navržena, otestována a optimalizována metodika pro izolaci RNA, reverzní transkripci a RT-qPCR. Tímto byla připravena část platformy pro řešení důležitých výzkumných otázek pro tým Katedry genetiky a fyziologie lesních dřevin, které jsou již nyní zkoumány.

8 ZDROJE

ALLEN C. D., MACALADY A. K., CHENCHOUNI H. et al., 2010: A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests, *Forest Ecology and Management*, 259:660–684

ALWINE J. C., KEMP D. J., STARK G. R., 1977: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 74: 5350–4

ASANTE D. K. A., YAKOVLEV I. A., FOSSDAL C. G., HOLEFORS A., OPSETH L., OLSEN J. E., JUNTILA O., JOHNSEN Ø., 2011: Gene expression changes during short day induced terminal bud formation in Norway spruce, *Plant, Cell & Environment*, 34:332–346

ASANTE D. K. A., YAKOVLEV I. A., FOSSDAL C. G., TIMMERHAUS G., PARTANEN J., JOHNSEN Ø., 2009: Effect of bud burst forcing on transcription of selected genes in needles of Norway spruce during autumn, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47:681-689

BARTLETT J., STIRLING D., 2003: PCR protocols, Humana Press, ISBN 9781592593842

BATTAGLIA M., OLVERA-CARRILLA Y., GARCIARRUBIO A., CAMPOS F., COVARRUBIAS A. A., 2008: The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins, Departamento de Biología Molecular de Plantas (M.B., Y.O.-C., F.C., A.A.C.) and Departamento de Microbiología Molecular (A.G.), Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

BODDINGTON K. F., GRAETHER S. P., 2014: Disorder and function: a review of the dehydrin protein family, *Frontiers in Plant Science*, 5:576

BOR Y. C., SWARTZ J., LI Y., COYLE J., REKOSH D., 2006: Northern Blot analysis of mRNA from mammalian polyribosomes, *Nature Protocols*, 101:360-365

BROWN, T., 2007: Klonování genů a analýza DNA: úvod. 1. české vyd., Univerzita Palackého, Olomouc

- CAMPBELL S. A., CLOSE T. J.,** 1997: Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits, *New Phytologist*, 137: 61–74
- CHAVES M. M., MAROCO J. P., PEREIRA J. S.,** 2003: Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant, *Functional Plant Biology* 30:239 - 264
- CLOSE T. J.,** 1996: Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins, *Physiologia Plantarum* 97:795-803
- CLOSE T. J.,** 1997: Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature, *Physiol. Plant.* 100: 291-296
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P.,** 2013: Studium polymorfismu u vybraných populací Smrku ztepilého *Picea abies* (L.) karsten pomocí DNA analýz, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P.,** 2015: Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů, *Lesnický průvodce*, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti
- ELDHUSET T. D., NAGY N. E., VOLAŘÍK D. et al.,** 2013: Drought affects tracheid structure, dehydrin expression, and above- and below ground growth in 5-year-old Norway spruce, *Plant Soil*, 366:305-320
- GALAU G.A., GLENN A., HUGHES D.W., DURE L.,** 1986: Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs, *Plant Molecular Biology*, 7:155-170
- HARA M.,** 2010: The multifunctionality of dehydrins: An overview, *Plant Signaling & Behavior*, 5:503-508
- HOLUŠA J., LIŠKA J.,** 2002: Hypotéza chřadnutí a odumírání smrkových porostů ve Slezsku (Česká republika), *Zprávy lesnického výzkumu*, 47:9–15
- HRUBAN V., MAJZLÍK I.,** 2002: *Obecná genetika*, FAPPZ ČZU, Praha
- KJELLENSEN T. D., YAKOVLEV I. A., FOSSDAL C. G., STRIMBECK G. R.,** 2013: Dehydrin accumulation and extreme low-temperature tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*), *Tree Physiology*, 33:1354-1366
- KOČÁREK E.,** 2008: *Genetika*, Scientia, Praha

- KOLÍSKO M.**, 2017: Moderní metody sekvenování, Academia, SSČ AV ČR, Živa 3/2017
- KWON Y. M.**, 2011: High-Throughput Next Generation Sequencing: Methods and Applications, Methods and Applications, Humana Press
- LIU J. J., EKRAMODDOULLAH A. K. M., TAYLOR D., PIGGOTT N., LANE S., HAWKINS B.**, 2004: Characterization of Picg5 novel proteins associated with seasonal cold acclimation of white spruce (*Picea glauca*), *Trees*, 18: 649–657
- MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ**, 2016: Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2015, Ministerstvo zemědělství, Praha
- MORGENSTERN E.**, 1996: Geographic Variation in Forest Trees, UBC Press, Vancouver
- MUSIL I.**, 2003: Lesnická dendrologie 1 – Jehličnaté dřeviny, Přehled nahosemenných (i výtrusných) dřevin, ČZU FLD, Praha
- NYLANDER M., SVENSSON J., PALVA E. T., WELIN B. V.**, 2001: Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Molecular Biology*, 45:263-279
- NYSTEDT B., STREET N. R., WETTERBOM A., ZUCCOLO A., LIN Y. C. et al.**, 2013: The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution, *Nature*, 497: 579–584
- PALATOVÁ E., LONGAUER R.**, 2014: Provenienční výzkum lesních dřevin, FLD Mendeleu, Brno
- PAULE L.**, 1992: Genetika a šlachtenie lesných drevín, Bratislava, Príroda
- REHFELDT G. E., YING C. C., SPITTLEHOUSE D. L., HAMILTON D. A.**, 1999: Genetic responses to climate in *Pinus contorta*: Niche breadth, climate change, and reforestation, *Ecological Monographs*, 69:375-407
- RORAT T.**, 2006: Plant dehydrins – Tissue location, structure and function, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11:536-556
- SAMEK V.**, 1964. Metodika výzkumu morfologické proměnlivosti smrku z hlediska fytogeografického. Zprávy lesnického výzkumu. VÚLHM, Jíloviště – Strnady, 2-3:18-25

- SANGER F., COULSON A. R.**, 1975: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *Journal of Molecular Biology*, 94:441-446
- SMITH W. K., HINCKLEY T. M.**, 1995: *Ecophysiology of coniferous forests*, San Diego, Academic Press
- SIMMONS M., SNUSTAD D.**, 2009: *Genetika*, Masarykova univerzita, Brno
- SLÁVIK M., BAŽANT V.**, 2016: *Dřevařská dendrologie I., Dřeviny nahosemenné – Gymnospermophytae*, ČZU FLD, Praha
- SØGAARD G., JOHNSEN Ø., NILSEN J., JUNTILA O.**, 2008: Climatic control of bud burst in young seedlings of nine provenances of Norway spruce, *Tree Physiology*, 28:311-320
- SOLBERG S.**, 2004: Summer drought: a driver for crown condition and mortality of Norway spruce in Norway, *Forest Pathol*, 33:93-104
- STREIT S., MICHLSKI CH. W., ERKAN M., KLEEFF J., FRIESS H.**, 2009: Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues, *Nature Protocols*, 4:37-43
- SVENSSON J., PALVA E. T., WELIN B.**, 2000: Purification of recombinant *Arabidopsis thaliana* dehydrins by metal ion affinity chromatography, *Protein Expression and Purification*, 20:169-78
- ŠRÁMEK V., VEJPUSTKOVÁ M., NOVOTNÝ R., HELLEBRANDOVÁ K.**, 2008: Yellowing of Norway spruce stands in the Silesian Beskids – damage extent and dynamics, *Journal of Forest Science*, 54:55–63
- THERMO FISHER Scientific**, 2016: *Real-time PCR handbook*
- VELASCO-CONDE T., YAKOVLEV I., MAJADA J. P., ARANDA I., JOHNSEN Ø.**, 2012: Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response, *Tree Genet Genomes*, 8:957–973
- WALKER J. M., RAPLEY R.**, 1998: *Molecular Biomethods Handbook*, Humana Press
- WALKER J. M., RAPLEY R.**, 2008: *Molecular Biomethods Handbook*, Humana Press

WELLING A., RINNE P., VIHARA-AARNIO A., KONTUNEN-SOPPELA S, HEINO P., PALVA E. T., 2004: Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.), *Journal of Experimental Botany*, 55:507-516

YAKOVLEV I. A., ASANTE D. K. A., FOSSDAL C.G. et al., 2008: Dehydrins expression related to timing of bud burst in Norway spruce, *Planta*, 228: 459-472

YAKOVLEV I. A., FOSSDAL C. G., JOHNSEN Ø., JUNTILA O., SKROPA T., 2006: Analysis of gene expression during bud burst initiation in Norway spruce via ESTs from subtracted cDNA libraries, 2:39-52

YANG Y., SUN X., YANG S., LI X., YANG Y., 2014: Molecular cloning and characterization of a novel SK3-type dehydrin gene from *Stipa purpurea*, *Biochemical and biophysical research communications*, 448:145-150

ZÍTKA O. et al., 2010: Použití automatizované elektroforézy na čipu pro studium laktoferinu a matrixových metaloproteinás, *Chemické listy*, 104:197-201

ZVÁROVÁ J., MAZURA I. et al., 2012: Metody molekulární biologie a bioinformatiky, *Biomedicínská informatika V.*, Karolinum, Praha