

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

ING. IRENA HOŠTIČKOVÁ

**ČESKÉ BUDĚJOVICE
2019**

Autoreferát disertační práce

Doktorand: Ing. Irena Hoštičková

Studijní program: Biotechnologie

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Název práce : **Analýza genů indukovaných abiotickým stresem u řepky**

Školitel : **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

Oponenti: doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.
doc. Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.
doc. Dr. Ing. Pavlína Smutná

Obhajoba disertační práce se koná dne 25.4.2019 v 13:00.hod.
v zasedací místnosti KSPR ZF JU v Českých Budějovicích.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení
Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích.

prof. Ing. Jindřich Čítek.
předseda oborové rady Zemědělské biotechnologie
ZF JU v Českých Budějovicích

Grantová podpora:

- NAZV QI 111A075 Využití biotechnologických metod, nových výchozích materiálů a efektivních postupů ve šlechtění ozimé řepky
- NAZV QJ1510172 Využití nekonvenčních výchozích materiálů, biotechnologických metod a efektivních postupů v liniovém a hybridním šlechtění ozimé řepky
- NAZV QK1910070 Využití biotechnologických metod a netradičních genetických zdrojů k charakterizaci a tvorbě uniformních linií brukvovité zeleniny se specifickými parametry kvality, výnosu a rezistence k významným chorobám
- GA JU 120/2016/Z Nové přístupy a techniky v rostlinolékařství, šlechtění a ochraně biodiverzity
- GAJU 133/2016/Z Jak ovlivňuje chlad expresi a akumulaci stresových proteinů? Analýza exprese dehydrinů a jejich akumulace u řepky vystavené stresu chladem.
- GA JU 027/2019/Z Nové přístupy a techniky ve šlechtění, rostlinolékařství a hodnocení kvality rostlinných produktů
- GAJU 132/2014/Z Kvantifikace exprese dehydrinů a jim podobných genů spojených s abiotickým stresem u řepky

Summary

Breeding for abiotic stress tolerance is one of main topics in plant breeding. Oilseed rape breeding programs were for a long time focused on morphological and physiological parameters. In this thesis few experiments focused on identification of genes involved in abiotic stress reaction were performed using RT-qPCR (quantitative reverse transcription PCR). Simultaneously SPR (surface plasmon resonance) method were used as modern optical method facilitating very low native protein concentration even in presence of other substances. This method facilitates quantification of concrete proteins by binding them to specific antigen and in oilseed rape research it was not used by now. ERD10 protein was identified by SPR as protein involved in cold stress reaction (or acclimation). The results show ERD10 accumulation in standard conditions affects dynamics of its accumulation change during cold stress. In case we are searching for genotypes great in acclimation ability even during short and warm autumn SPR method should be suitable method for fast, easy and relatively cheap screening of large number of genotypes in breeding collections.

Also genes LTI78, RCI2A, NRP1 and two genes for hypothetical proteins were analysed. Their relative expression during cold stress was markedly increased too. Very little is known about these genes and proteins

nowadays therefor it will be interesting topic of our oncoming experiment. Relative expression of genes picked according to MALDI-TOF/TOF analysis results was also tested in microspore embryo regenerants stressed by simulated drought. Genes for lactoylglutathione lyase I, phospholipase D α 1 and peroxiredoxin antioxidantase were tested. In tolerant cultivar was markedly decreased gene expression of peroxiredoxin antioxidantase in standard conditions and early stress. These gene will be subject for next research as potential marker for more tolerant genotypes selection.

Úvod

Rostliny, přisedlé organismy, jsou nuceny čelit různým faktorům abiotického stresu, jako je sucho, horko, mráz či vysoká koncentrace solí. Společným jmenovatelem abiotických stresorů je dehydratace buňky vedoucí k jejímu poškození (Shinozaki et al., 2003), proto v průběhu evoluce došlo u rostlin k vývoji mechanismů k obraně proti buněčné dehydrataci. Hlavním cílem šlechtění zemědělských plodin je vytvářet takové odrůdy, které pomocí těchto mechanismů odolávají nepříznivým podmínkám prostředí a i za podmínek abiotického stresu jsou schopny udržet vysokou výnosovou úroveň. Šlechtění na odolnost vůči abiotickým stresorům je v současné době jedním z nosných témat šlechtění a je rozpracováno zejména u obilovin, jak na úrovni praktického šlechtění, tak na úrovni základního výzkumu (identifikace a využívání donorů suchovzdornosti, intenzivní využívání poznatků z genetiky a genomiky – MAS, QTL, microarray analýza, analýza transkriptomu a identifikace genů zapojených do reakce rostliny na stres (Fleury et al., 2010; Schmidt, 1983; Seki et al., 2001). Ve šlechtitelských programech řepky byla v případě selekce rostlin s vyšší odolností abiotickým stresům pozornost po dlouhé období věnována převážně jen popisným morfologickým a fyziologickým parametrům, jako je rychlost vadnutí, polní a laboratorní mrazuvzdornost, změny na úrovni obsahu některých aminokyselin, chlorofylu, redukce výnosu u

rostlin vystaveným stresu (Ashraf and Mehmood, 1990; Richards and Thurling, 1979; Shiranirad and Abbasian, 2011). V poslední době je věnována pozornost i problematice transkriptomické analýzy (He et al., 2015; Lee et al., 2008; Xian et al., 2017) a identifikaci genů přímo zapojených do reakce na stres.

Hypotézy a cíle práce

Hypotézy disertační práce

1) Je na základě qRT-PCR možné vyhodnotit změny v expresi u kontrolních rostlin a rostlin vystavených stresu a identifikovat potenciální geny zapojené do mechanismů odpovědi rostliny na abiotický stres?

2) Existuje korelace mezi výsledky transkriptomických a proteomických analýz? Je tedy možné získat odpověď na otázku mechanismu syntézy a akumulace proteinů spojených s reakcí na stres u rostlin a odvození spolehlivých markerů pro selekci cílových rostlin – podle úrovně exprese nebo podle přítomnosti stresových proteinů.

Cíle disertační práce

1) Identifikovat potenciální geny spojené s reakcí na abiotický stres (např. geny pro dehydriny a transkripční faktory) u řepky.

2) Využít moderních molekulárních a proteomických/optických metod a porovnat výsledky transkriptomických a proteomických analýz.

3) Interpretovat vztah mechanismu syntézy a akumulace proteinů spojených s reakcí na stres.

Diskuse výsledků

Expresa ERD10 na úrovni genu a proteinu při stresu chladem

ERD10 je gen ze skupiny dehydrinů, který je exprimován při stresu chladem, zasolením a při aplikaci kyseliny abscisové (Deng et al., 2005; Hernández-Sánchez et al., 2017; Kovacs et al., 2008; Maszkowska et al., 2019; Puhakainen et al., 2004). Podle databáze TAIR (Berardini et al., 2015) se u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* nachází v lokusu AT1G20450. Podle He et al. (2015) se v genomu *Brassica napus* vyskytují dva homology *ERD10* – na chromozomu A7 Cab00876.1 a na chromozomu C7 Bo7g061580.1. V databázi NCBI (Benson et al., 2018) je u *Brassica napus* ještě několik dalších sekvencí publikovaných jako *ERD10*-like. Jednou z nich je NM_001315610.1, která byla v minulosti na našem pracovišti použita k návrhu primerů a k analýze exprese genu *ERD10* u řepky. Podle podobnosti sekvence s AT1G20450 byly na našem pracovišti vytipovány ještě další sekvence z genomu *Brassica napus*, které by mohly být homologem tohoto genu (Hejna, nepublikovaná data). Jednou z nich byla sekvence Cab042821.1, která v publikaci He et al. (2015) nebyla anotována k žádnému známému genu u *Arabidopsis*. V rámci této práce byla testována relativní exprese tří z těchto sekvencí, konkrétně Cab00876.1, NM_001315610.1 a Cab042821.1.

Deng et al. (2005) uvádí, že exprese genu *ERD10* je v listech řepky relativně vysoká v porovnání s jinými

stresovými geny i u nestresovaných rostlin. Pravděpodobně to může znamenat, že tento gen/protein plní určitou funkci i mimo podmínky stresu, a nebo je určitou prevencí pro případný příchod nepříznivých podmínek, tak jak je tomu u některých dalších dehydrinů (Nylander et al., 2001a). Prevence pro případný stres je u zemědělských plodin v současné době jistě palčivým tématem. V důsledku klimatických změn dochází i v našich zeměpisných šířkách k výkyvům počasí, jsou celkově teplejší zimy, což vede k nedostatku sněhové pokrývky a paradoxně k vyššímu riziku vymrzání porostů (Thorsen and Hoglind, 2010). Problémy může způsobovat i teplejší průběh podzimu. U většiny ozimých plodin je aklimatizace zahájena teplotami pod 10°C a při teplotách pod 5°C se zintenzivňuje (Gray et al., 1997). Zvýšení teploty na konci léta a na začátku podzimu může však snížit schopnost rostlin ukončit růst a aklimatizovat se (Rapacz, 2002), neboť na správný průběh aklimatizace spolupůsobí kromě teploty i další faktory jako je fotoperioda, ozáření, stav fotosystému II či vodní potenciál půdy (Gray et al., 1997).

Dehydrin ERD10 a jeho expresní profil na úrovni genu i proteinu je tedy velmi zajímavým objektem zkoumání pro pochopení mechanismu reakce na stres chladem, resp. aklimatizaci. Na našem pracovišti byla analyzována relativní exprese tohoto genu v několika chladových experimentech, ve kterých bylo potvrzeno její zvýšení v průběhu stresu chladem (např. Harenčák et al., 2018) a

tyto výsledky odpovídají dříve publikovaných datům (např. Deng et al., 2005; Hernández-Sánchez et al., 2017; Kovacs et al., 2008; Maszkowska et al., 2019). Tyto výsledky byly rovněž porovnávány s výsledky proteomických analýz prováděných ve VÚRV v Praze na shodném souboru rostlin. Prováděné proteomické analýzy byly však zaměřeny na celou skupinu dehydrinových proteinů a jejich porovnání s výsledky našich analýz zaměřených na konkrétní geny nebylo možné. Hledali jsme proto možnost, jak analyzovat pouze konkrétní protein. Metodu rezonance povrchového plazmonu jsme zvolili pro její relativní časovou, finanční a technickou nenáročnost jako metodu potenciálně využitelnou pro sledování dynamiky reakce jednotlivých genotypů na stres chladem.

Metoda rezonance povrchového plazmonu (SPR) je moderní optická metoda, která umožňuje studovat velmi nízké koncentrace nativních proteinů i v přítomnosti jiných látek, umožňuje kvantifikaci konkrétních proteinů vazbou na specifické protilátky (Lambert et al., 2018) a u řepky či jiných významných plodin nebyla doposud použita. V našem pilotním experimentu (experiment A) byly připraveny extrakty termostabilních proteinů z listů rostlin dvou odrůd řepky (Navajo, Cadeli) vystavených stresu chladem. Odezva biočipu byla sledována vždy současně na bodech obsahujících protilátku a na negativní kontrole, neboť k odezvě dochází i díky změně indexu lomu prostředí, případně interferencemi látek obsažených

ve vzorku. Výsledky pro obě odrůdy řepky ukazují rostoucí SPR signál u stresovaných rostlin (obr. 9). U odrůdy Cadeli je tento nárůst signálu znamenající zvýšenou akumulaci dehydrinu ERD10 pozorovatelný až po 42 dnech stresu. Po 11 dnech stresu chladem je akumulace tohoto dehydrinu u stresované rostliny srovnatelná s jeho akumulací u rostliny kontrolní. Naproti tomu u odrůdy Navajo, která byla v předchozích experimentech vytipována na pracovišti VÚRV v minulosti jako odrůda odolná k chladu, je výrazný (téměř desetinásobný) nárůst akumulace dehydrinu ERD10 v porovnání s kontrolními rostlinami pozorovatelný již po 11 dnech stresu chladem. Klíma et al. (2012) uvádí, že schopnost jednotlivých genotypů řepky odolávat mrazu, se dá odhadnout na základě úrovně akumulace dehydrinů u chladem stresovaných jedinců.

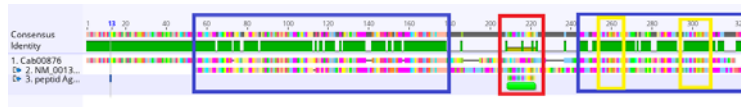
V případě, že hledáme genotypy, které by měly vynikat svou schopností přezimovat v měnících se klimatických podmínkách ČR, musíme sledovat také dynamiku aklimatizace, zejména schopnost aklimatizovat se i během krátkého, teplého podzimu, kdy je rychlý přechod mezi teplým podzimem a zimou a na typickou aklimatizaci nejsou vhodné podmínky (vysoké teploty, krátký den) či hledat rostliny, které jsou schopné aklimatizace i v těchto netypických podmínkách. U odolnější odrůdy Navajo byla v našem experimentu reakce ve formě akumulace dehydrinu ERD10 výrazně dynamičtější. Náchylnější odrůda Cadeli by ale podle tvrzení Nylandera et al. (2001)

měla být díky vyšší akumulaci proteinu ERD10 u kontrolních rostlin lépe připravená na příchod nepříznivých podmínek. Fenotypový projev této odrůdy tomu však publikovaným datům neodpovídá. Zde se nabízí myšlenka Maszkowske et al. (2019), že by fosforylovaný protein ERD10 mohl fungovat jako pufr Ca^{2+} iontů a tím ovlivňovat celou signalizaci reakce na stres. Vyšší počáteční akumulace tohoto proteinu by totiž mohla způsobovat pomalejší reakci rostlin odrůdy Cadeli na stres vazbou vápenatých iontů, které by tak nemohly předat signál dál a spouštět expresi genů pro transkripční faktory a další geny zapojené v signální dráze. Této domněnce by odpovídaly i výsledky expresní analýzy, které ukazují, že u stresovaných rostlin odrůdy Cadeli byla nižší exprese genu *ERD10* než u stresovaných rostlin odrůdy Navajo. Kvantitativně měření pomocí SPR nelze zatím vyhodnotit z důvodu absence standardu (čistého proteinu). Můžeme však říci, že kvalitativně lze metodu SPR pro detekci stresových proteinů velmi dobře využít. Pokud se podaří získat vhodný standard např. další separací z extraktů, bude možné i kvantitativní vyhodnocení.

V dalším experimentu (experiment B) jsme vybrali další odrůdy ozimé řepky, které mají odlišnou dynamiku akumulace proteinu ERD10. Byly to odrůdy s velmi dynamickou reakcí na stres chladem Liglory a V8, u kterých byla relativní akumulace tohoto dehydrinu v listech na začátku experimentu v porovnání s ostatními

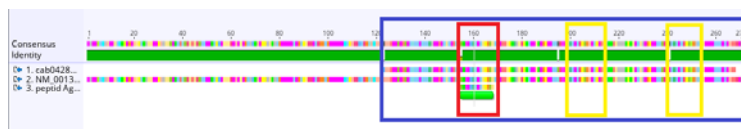
odrůdami nízká a v průběhu prvních dvou týdnů se zvýšila na téměř trojnásobek a během dalších třech týdnů se zvýšila na téměř pětinasobek. Další odrůdou byla odrůda s méně dynamickou reakcí Alaska, u které se relativní akumulace dehydrinu ERD10 zvýšila na trojnásobek až po 50ti dnech stresu chladem. Poslední vybranou odrůdou byla Ladoga, která měla na začátku experimentu nejvíce dehydrinu ERD10 v listech z testovaných odrůd. V porovnání s odrůdou Liglory byla u odrůdy Ladoga naměřena dvojnásobná akumulace tohoto proteinu. V průběhu 50ti dnů stresu chladem se akumulace tohoto proteinu dál nezvyšovala.

Protilátka, pomocí které byla testována akumulace proteinu ERD10 v listech byla vyrobena podle 15ti aminokyselinové sekvence odpovídající části homologu NM_001315610.1. Odvozené aminokyselinové sekvence pravděpodobných homologů genu *ERD10* Cab00876.1 a NM_001315610.1 jsou si po porovnání v aplikaci Geneious velmi podobné, jak lze vidět na obr. 22. Peptid, který byl použit k výrobě protilátky však se sekvencí Cab00876.1 homologní není. Protilátka použitá v našem experimentu proto s největší pravděpodobností neinteraguje s proteinem syntetizovaným podle tohoto homologu.



Obr. 1: Porovnání aminokyselinových sekvencí homologů ERD10 Cab00876.1 a NM_00135610.1 s aminokyselinovou sekvencí peptidu, který byl použit pro výrobu protilátky pro SPR analýzu. Modrý obdélník označuje místa s vysokou mírou homologie, červený obdélník označuje místo vazby protilátky, žlutý obdélník sekvenci odpovídající K-segmentu. Porovnání bylo provedeno pomocí softwaru Geneious.

Naopak s proteinem syntetizovaným podle homologu Cab042821.1 bude pravděpodobně protilátka použita v našem experimentu interagovat, neboť v sekvenci se nachází homologní místo se sekvencí peptidu použitého k výrobě protilátky, jak lze vidět na obr. 23. Aminokyselinová sekvence odvozená podle nukleotidové sekvence homologu genu *ERD10* Cab042821.1 pomocí nástroje ExPASy (Artimo et al., 2012) je vysoce homologní s druhou polovinou sekvence homologu NM_00135610.1.



Obr. 2: Porovnání aminokyselinových sekvencí homologů ERD10 Cab042821.1 a NM_00135610.1 s aminokyselinovou sekvencí peptidu, který byl použit pro výrobu protilátky pro SPR analýzu. Modrý obdélník označuje místo s vysokou mírou homologie, červený obdélník označuje místo vazby protilátky, žlutý obdélník sekvenci odpovídající K-segmentu. Porovnání bylo provedeno pomocí softwaru Geneious.

Pro testování exprese ERD10 na úrovni genu byly použity primery stejné jako v předchozím experimentu (experiment A) NM_001315610.1 a navíc byly navrženy primery pro další pravděpodobné homology genu *ERD10* Cab00876.1 a Cab042821.1. Zvýšení relativní genové exprese bylo prokázáno u homologů genu *ERD10* Cab00876.1 a NM_001315610.1. U homologu genu Cab042821.1 nebylo prokázáno žádné navýšení relativní exprese v reakci na stres chladem. Jedním z možných vysvětlení je, že sekvence Cab042821.1 není homologem genu *ERD10*. Podle databáze TAIR (Berardini et al., 2015) je sice tato sekvence nejvíce podobná sekvenci genu *AtERD10* AT1G20450.1, ale velmi vysokou míru podobnosti má i se sekvencí genu *AtCOR47* AT1G20440.1, což je další gen ze skupiny dehydrinů a je pravděpodobně také zapojen v reakci na chlad (Kindgren et al., 2015; Park et al., 2018; Yin et al., 2017). To by však znamenalo změnu genové exprese i u stresovaných rostlin v našem experimentu. Podobnost tedy může být zcela náhodná a ve skutečnosti se může jednat o zcela jiný dehydrin, který není indukován stresem chladem. Vzhledem k aminokyselinové sekvenci odvozené pomocí nástroje ExPASy (Artimo et al., 2012), která je téměř o polovinu kratší, než aminokyselinová sekvence homologu NM_001315610.1 (Deng et al., 2005), jak lze vidět na obr. 23 je možné, že homolog genu *ERD10* Cab042821.1 obsahuje ve své sekvenci mutaci, díky které se nepřepisuje

celý a není funkční, což by mohlo být dalším možným vysvětlením.

Relativní exprese homologu genu *ERD10* Cab00876.1 byla u kontrolních rostlin řádově 100x nižší než relativní exprese zbylých dvou testovaných homologů. V průběhu stresu chladem se jeho exprese zvyšovala u všech čtyř testovaných odrůd a změna exprese byla u jednotlivých odrůd statisticky průkazně odlišná. Největší změna relativní exprese homologu genu *ERD10* Cab00876.1 byla zaznamenána u stresovaných rostlin odrůdy Ladoga, kde po 12 hodinách stresu relativní exprese tohoto genu prudce vzrostla na 150ti násobek relativní exprese kontrolních rostlin. Stejně tak relativní exprese homologu genu *ERD10* NM_001315610.1 se v průběhu 24 hodin stresu chladem zvýšila téměř 40x. Akumulace proteinu ERD10 se však v průběhu stresu chladem u této odrůdy neměnila. To však nemusí být ve vzájemném rozporu, neboť námi použitá protilátka pro stanovení akumulace proteinu pravděpodobně neinteraguje s proteinem syntetizovaným podle homologu genu *ERD10* Cab00876.1. Protein ERD10 Cab00876.1 tedy může být u stresovaných rostlin odrůdy Ladoga akumulován, ale sekvence aminokyselin je mimo konzervativní domény odlišná, a proto jsme ji nebyli schopni detekovat. Vzhledem ke zvýšené relativní expresi homologu genu *ERD10* NM_001315610.1 u stresovaných rostlin této odrůdy je zároveň třeba vzít v úvahu i možnost, že přítomnost transkriptů určitého

genu v pletivech neznamena, že protein bude úspěšně translatován a akumulován (Bustin et al., 2009).

U odrůdy Alaska se relativní exprese homologu genu *ERD10* Cab00876.1 zvýšila již po 4 hodinách. U stresovaných rostlin odebraných později exprese tohoto homologu kolísala. Ještě 6 dní po začátku stresu, kdy u stresovaných rostlin ostatních odrůd byla exprese homologu genu *ERD10* Cab00876.1 srovnatelná s expresí kontrolních rostlin, u odrůdy Alaska byla u stresovaných rostlin 25x vyšší než u rostlin kontrolních. Tyto výkyvy mohou být podle mého názoru způsobené např. neúčinnou translací a rostlina je nucena stále exprimovat gen, neboť nedochází k dostatečné akumulaci příslušného proteinu. K akumulaci proteinu ERD10 však v pletivech stresovaných rostlin této odrůdy dochází, i když o něco pomaleji, než u odrůd Liglory a V8. Odpovídá to zjištění, že nejvyšší relativní exprese homologu genu *ERD10* NM_001315610.1 byla právě u odrůdy Alaska.

Z výsledků obou experimentů (experiment A a experiment B) vyplývá, že akumulace proteinu ERD10 ve standardních podmínkách ovlivňuje dynamiku změny jeho akumulace v průběhu stresu chladem. Vypadá to, že čím nižší je akumulace tohoto proteinu v ambientních podmínkách, tím rychleji rostlina reaguje na ochlazení a v reakci na chlad začne akumulovat tento protein více, čímž se dokáže rychleji připravit na příchod ještě nižších teplot pod bodem mrazu. Naopak čím více proteinu ERD10 je v pletivech rostliny akumulováno tím méně

ochotně rostlina akumuluje další. Inhibice exprese genu akumulovaným proteinem, ať už vazbou signálních iontů, jak tvrdí Maszkowska et al. (2019) či jinými mechanismy je zjevná. Ani tvrzení Nylandera et al. (2001) o akumulaci proteinu ERD10 u nestresovaných rostlin jako o preventivním opatřením pro případ příchodu nízkých teplot však není zcestné. Různé genotypy zjevně disponují odlišnými strategiemi reakce na nízké teploty. Jedna skupina genotypů velmi dynamicky reaguje na chlad a začíná ihned akumulovat ochranné proteiny a investuje energii do obranné reakce. Druhá skupina genotypů reaguje pomaleji a v případě, že se po krátkodobém ochlazení znovu oteplí, může investovat energii do dalšího růstu a vývoje. V případě, že hledáme genotypy, které by měly vynikat svou schopností aklimatizovat se i během krátkého teplého podzimu, nabízí se analýza akumulace dehydrinů metodou rezonance povrchového plazmonu jako vhodná metoda pro rychlý, nenáročný a relativně levný skrínink většího množství genotypů ve šlechtitelských kolekcích.

Expese dalších genů potenciálně zapojených v reakci na stres chladem

Na základě WGCNA (Weighted Gene Co-expression Network Analysis) a GO (Gene Ontology) enrichment analýzy byly vybrány potenciálně klíčové geny prodílející se na odpovědi *B. napus* na stres chladem (Hejna, nepublikovaná data). Podle sekvencí mRNA byly

navrženy specifické primery, pro RT-PCR analýzu byl použit stejný soubor vzorků jako pro analýzu exprese genu a proteinu ERD10 (experiment B).

Prvním vybraným genem byl *LTI78* (XM_013820820.2). Tento gen je v literatuře spojován s reakcí na stres zasolením (Hu et al., 2013), z nedostatku vody (Kim et al., 2012b) a stres chladem (Msanne et al., 2011; Yamaguchishinozaki and Shinozaki, 1994). To odpovídá i výsledkům naší analýzy, které ukázaly, že se při stresu chladem relativní exprese genu *LTI78* statisticky významně zvyšovala. V promotoru tohoto genu se nachází několik ABRE a DRE motivů, z čehož se dá odvodit jeho účast v signálních drahách, které jsou ABA-dependenční i ABA-independenční (Msanne et al., 2011). U jednotlivých námi testovaných odrůd řepky se relativní exprese genu *LTI78* měnila statisticky významně odlišně. Nejvyšší relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin téměř po celou dobu experimentu byla naměřena u odrůdy V8. V případě, že by moje teorie o odlišných strategiích jednotlivých genotypů reakce na nízké teploty byla správná, odrůda V8 by vzhledem k dynamice akumulace proteinu ERD10 a navíc výraznému zvýšení exprese *LTI78* mohla být zajímavým genotypem pro šlechtění na rychlejší aklimatizaci. Protein kódovaný tímto genem zatím není popsán, ale odhaduje se, že se bude podobat LEA proteinům. O jeho přesné roli v reakci na stres nic nevíme, dobře známá je ale velká účinnost promotoru a jeho schopnost reagovat na změnu prostředí. Promotor

tohoto genu byl společně s CBF transkripčním faktorem využit pro transgenozi, díky čemuž se významně zlepšila tolerance k mrazu u brambor. Výhodou promotoru genu *LTI78* totiž je, že v nestresových podmínkách je jeho exprese velmi nízká, tudíž je vhodnějším promotorem pro ochranné transgeny než promotor CaMv 35S (Wei et al., 2016).

RCI2A je dalším genem, který byl vytipován jako potenciálně zapojený v reakci na chlad. Tento gen je v literatuře spojován s reakcí na kyselinu abscisovou, stres chladem, zasolením a vodním deficitem (Medina et al., 2001; Nylander et al., 2001b). Overexprese transgenu *AtRCI2A* u rajčat způsobovala snížení akumulace peroxidu vodíku a poškození membrán v důsledku stresu chladem (Sivankalyani et al., 2015). Výsledky našeho experimentu ukázaly zvýšení relativní exprese tohoto genu v průběhu stresu chladem u všech čtyř testovaných odrůd. Nejvyšší relativní expese tohoto genu byla pozorována u odrůdy Ladoga. U této odrůdy nebyla zvýšena akumulace dehydrinu ERD10 v průběhu stresu, vyvstává tedy otázka, zda gen *RCI2A* není součástí jiné dráhy zapojené v obraně rostliny proti chladu. Mechanismus účinku 6-kD proteinu *RCI2A* zatím není znám, v jeho sekvenci nebyly nalezeny žádné známé motivy, které by mohly napovědět. Vypadá to ale, že jeho role bude pravděpodobně spočívat v indukci dalších proteinů snižujících poškození buněk chladem (Sivankalyani et al., 2015). V dalších experimentech bude

jistě zajímavé zaměřit se na analýzu akumulace proteinu RCI2A u genotypů s různým expresním profilem na úrovni genu *RCI2A* a také u genotypů s odlišnou dynamikou akumulace ERD10 v reakci na stres. To by mohlo pomoci pochopit roli obou proteinů a jejich vzájemné působení v reakci na stres a následně k výběru genotypů vhodných pro šlechtění na odolnost stresu chladem.

Dalším zkoumaným genem v našem experimentu byl gen *NRP1* (XM_013801908.2). Jeho relativní exprese se zvýšila v průběhu stresu chladem u všech čtyř testovaných odrůd, což odpovídá i zjištění Fu et al. (2010). Autoři uvádějí, že exprese tohoto genu u *Arabidopsis thaliana* se zvyšuje při stresu chladem a naopak se snižuje při vystavení rostliny vysokým teplotám. Největší zvýšení (33x) relativní exprese bylo zaznamenáno u odrůdy Alaska. Nejméně se relativní exprese zvýšila u odrůdy Ladoga. Funkce proteinu NRP1 není vůbec prozkoumána. Ví se pouze, že gen je exprimován v meristémech vzrostných vrcholů a ve vyvíjejících se orgánech, které jsou velmi náchylné k poškození nízkými teplotami (Cazale et al., 2009). Studium funkce tohoto genu a proteinu bude předmětem našich dalších experimentů.

Na základě WGCNA enrichment analýzy (Hejna, nepublikovaná data) byly také vytipovány dvě sekvence pro hypotetické proteiny. Jedna z těchto sekvencí označená jako Bo6rg106940.1 by po porovnání s databází TAIR (Lamesch et al., 2012) mohla patřit homologu genu

z *Arabidopsis thaliana* AT1G68500. U rostlin v našem experimentu byla v průběhu stresu chladem relativní exprese tohoto genu značně zvýšená. Zejména u stresovaných rostlin odrůdy Alaska se relativní exprese tohoto genu zvýšila více než 1000x. Za zmínku stojí, že u kontrolních rostlin této odrůdy byla relativní exprese tohoto genu nejnižší z kontrolních rostlin sledovaných odrůd. Naopak u stresovaných rostlin odrůdy V8, jejíž kontrolní rostliny exprimovaly tento gen ze sledovaných odrůd nejvíce (25x více než kontroly odrůdy Alaska), bylo zvýšení relativní exprese tohoto genu jen velmi malé, na 13ti násobek relativní exprese kontrolních rostlin. O genu AT1G68500 se téměř nic neví. Vypadá to, že se jedná o signální peptid, který je schopen přenášet jiné molekuly do endoplazmatického retikula nebo do jádra, což lze odvodit z předpokládaného uspořádání aminokyselin v řetězci pomocí webového nástroje InterPro (Mitchell et al., 2019). Podle Vergnolle et al., (2005) je gen AT1G68500 indukován kyselinou fosfatidovou produkovanou enzymem fosfolipáza D α , její funkce podle Rajashekar et al. (2006) přispívá k poškození buněk mrazem. Mohlo by se tedy jednat o transkripční faktor indukující expresi genů zapojených v ochraně před poškozením nízkými teplotami.

Druhou sekvencí označenou jako hypotetický protein je Bo1g014860.1, která by po porovnání s databází TAIR (Lamesch et al., 2012) mohla patřit homologu genu z *Arabidopsis thaliana* AT4G29905. Relativní exprese

tohoto genu se u stresovaných rostlin v našem experimentu výrazně zvyšovala. U stresovaných rostlin odrůdy Alaska byla relativní exprese po 1 dnu stresu více než 1000x vyšší než u kontrolních rostlin. U odrůdy V8 byla relativní exprese tohoto genu po 1 dnu stresu ještě téměř dvojnásobná v porovnání s nejvyšší relativní expresí u rostlin odrůdy Alaska. O genu AT4G29905 se neví vůbec nic. Z předpokládaného uspořádání aminokyselin v řetězci sekvence z řepky se pomocí webového nástroje InterPro (Mitchell et al., 2019) podařilo zjistit, že tento gen možná disponuje doménou typickou pro methionyl-tRNA syntetázu. Tento enzym je nezbytný pro syntézu proteinů, neboť váže methionin na jeho tRNA. Námi testovaná sekvence by tedy mohla tento protein kódovat, neboť v případě stresu chladem rostlina potřebuje syntetizovat ochranné proteiny. Oba hypotetické proteiny budou předmětem našeho dalšího zkoumání.

Expresa genů potenciálně zapojených v reakci na stres suchem

V experimentu provedeném na pracovišti VÚRV v Praze byla použita regenerovaná mikrosporová embrya odvozená z rostlin odrůd Cadeli a Viking, která byla stresována simulovaným suchem vyvolaným přidáním PEG do kultivačního média. Po 24 hodinách a po 7 dnech byly odebrány vzorky pro proteomickou i transkriptomickou analýzu. Podle výsledků analýzy

akumulace proteinů pomocí metody MALDI-TOF/TOF byly vybrány 3 proteiny, které byly významně akumulovány u stresovaných embryí. V databázi NCBI byly pro tyto geny vyhledány kandidátní sekvence a byly navrženy a optimalizovány primery.

Jedním z těchto genů byl AB300312.1, gen pro pravděpodobnou lactoylglutathione lyázu I. Tento enzym společně s glyoxalázou II katalyzuje odbourávání vysoce toxického metabolitu methylglyoxalu, který se akumuluje v rostlinných buňkách mimo jiné i v důsledku stresu suchem (Hasan et al., 2016). Relativní exprese tohoto genu se u obou testovaných odrůd podle očekávání v průběhu stresu zvyšovala. Po 7 dnech stresu byla vyšší exprese u odrůdy Cadeli, která byla v tomto případě vybrána jako odolná suchu. Je možné, že tato odrůda je odolnější právě proto, že dokáže i po 7 dnech nepříznivých podmínek exprimovat geny a akumulovat dostatek obranných proteinů.

Dalším vybraným genem byl XM_013841229.2, gen pro fosfolipázu D α 1. Tento protein už byl výše zmíněn v souvislosti se stresem chladem, při kterém je jeho funkce spíše nežádoucí a zvyšuje míru poškození. Při stresu suchem ale naopak hraje důležitou roli při přenosu signálních molekul (Fan et al., 1997). V našem experimentu byla prokázána zvýšená exprese tohoto genu v důsledku stresu suchem. Fosfolipáza D α 1 je enzym, který katalyzuje hydrolýzu fosfolipidů (Pappan and Wang, 1999). Podle Fan et al. (1997) je tento enzym inhibován

Gα proteinem, který produkuje tzv. druhé posly v signálních drahách ovlivňovaných kyselinou abscisovou. Overexprese tohoto genu zvyšovala účinnost kyseliny abscisové při signalizaci stresu suchem a urychlovala zavírání průduchů (Wang, 2005). Vzhledem k tomu, že v našem experimentu nebyl pozorován významný rozdíl v expresi u odolné a náchylné odrůdy, předpokládám, že tento gen nebude způsobovat rozdíly v odolnosti jednotlivých genotypů.

Posledním vybraným genem je XM_009146775, gen pro peroxiredoxin antioxidantu. Tento enzym má zásadní roli při toleranci extrémního sucha (Mowla et al., 2002). Odpovídá to výsledkům našeho experimentu, ve kterém se exprese tohoto genu výrazně zvyšovala již po 24 hodinách stresu suchem. Kontrolní rostliny náchylné odrůdy Viking měly téměř 5x vyšší relativní expresi tohoto genu než kontrolní rostliny odolné odrůdy Cadeli. I po 24 hodinách stresu byla relativní exprese tohoto genu u odolné odrůdy Cadeli nižší než u náchylné odrůdy Viking. Po týdnu stresu suchem byla relativní exprese peroxiredoxin antioxidantu u obou sledovaných odrůd výrazně zvýšená, avšak rozdíl mezi odrůdami již nebyl pozorovatelný. Podle Tripathi et al. (2009) zajišťuje tento enzym odbourávání peroxidu vodíku, peroxydusitanů, dusitanů a alkoholů. U odolnější odrůdy ve standardních podmínkách a na začátku stresu byla statisticky významně nižší exprese tohoto genu. Může to znamenat, že tato odrůda disponuje účinnějším systémem prevence nadměrné produkce těchto

molekul v počátečním stadiu stresu suchem. Tento gen bude předmětem našeho dalšího zkoumání jako potenciální marker pro výběr genotypů, které mohou být odolnější stresu suchem.

Analýza genů indukovaných abiotickým stresem u řepky

Různé abiotické stresory mají často velmi podobné projevy jejich působení. Sucho a zasolení se projevují formou osmotického stresu, který má za následek narušení rovnováhy buňky a pohybu iontů (Wang et al., 2003). Oxidativní stres často spojený s vysokými teplotami, zasolením, či suchem může způsobovat denaturaci funkčních i strukturních proteinů (Smirnoff, 1998). Důsledkem je aktivace podobných signálních drah, jejichž části se často prolínají (Knight and Knight, 2001; Shinozaki et al., 2003) a na buněčné úrovni dochází k produkci stresových proteinů, anti-oxidantů a jiných látek (Cushman and Bohnert, 2000). Navzdory tomu, každý stresor vyvolává v rostlině jinou reakci, která je na míru ušitá potřebám konkrétního jedince a zároveň každá varianta kombinace působení dvou a více stresorů opět vyvolává odlišnou reakci (Wang et al., 2003). Rizhsky et al. (2002), jako jedna z prvních autorů ve své studii prokázala odlišnost reakce rostliny na stres suchem a na působení extrémních teplot od reakce na kombinaci působení těchto dvou stresorů. Ukázala tak, že výsledky experimentů prováděných v kontrolovaných podmínkách

a zabývajících se působením pouze jednoho stresového faktoru mohou být zavádějící. Následovaly další práce zabývající se odpovědí rostlin na kombinace stresorů jako je např. sucho, zasolení, extrémní teploty, těžké kovy, nadměrná ozářenost, ozon a další (např. Mittler, 2006), které její tvrzení potvrdily. Z toho vyplývá, že pro další pochopení těchto obranných mechanismů a jejich využití při tvorbě nových odrůd kulturních plodin je potřeba rozšířit oblast zájmu výzkumníků a šlechtitelů o kombinace stresových faktorů (Mittler, 2006).

Další oblastí, která je nedostatečně prozkoumaná, ale neméně důležité je období regenerace po skončení stresových podmínek. Většina studií zabývajících se abiotickým stresem a jeho působením na plodiny je zaměřena na fázi aklimatizace. Období, které následuje, však ovlivňuje další růst rostliny a její vývoj (Kosová et al., 2015).

Závěr

V rámci této dizertační práce bylo provedeno několik experimentů zaměřených na identifikaci potenciálních genů spojených s reakcí na abiotický stres. Protein ERD10 byl pomocí metody rezonance povrchového plazmonu (SPR) identifikován jako protein účastnící se reakce na stres chladem, resp. aklimatizaci. Z výsledků vyplývá, že akumulace proteinu ERD10 ve standartních podmínkách ovlivňuje dynamiku změny jeho akumulace v průběhu stresu chladem. Vypadá to, že čím nižší je akumulace tohoto proteinu v ambientních podmínkách, tím rychleji rostlina reaguje na ochlazení a v reakci na chlad začne akumulovat tento protein více, čímž se dokáže rychleji připravit na příchod ještě nižších teplot pod bodem mrazu. Naopak čím více proteinu ERD10 je v pletivech rostliny akumulováno tím méně ochotně rostlina akumuluje další.

V genomu řepky byly vytipovány geny (homology genu) potenciálně kódující tento protein. 3 z těchto sekvencí byly testovány pomocí RT-qPCR. Různé homology genu jsou při stresu chladem exprimovány odlišně. Relativní exprese homologů genu *ERD10* NM_001315610.1 a Cab008876.1 se při stresu chladem zvyšovala. Na základě metody RT-PCR lze tedy vyhodnotit změny v expresi na úrovni genu *ERD 10*, což může být jedním z důkazů, že se jedná o gen kódující studovaný protein. Korelace mezi výsledkem expresní analýzy na úrovni genu a na úrovni akumulace proteinu je u *Brassica napus* velmi komplikovaná, neboť v genomu

řepky se – vzhledem k jejímu genetickému založení – nachází více homologů jednotlivých genů a je velmi těžké je rozlišit v rámci genetických analýz. V případě, že hledáme genotypy, které by měly vynikat svou schopností aklimatizovat se i během krátkého teplého podzimu, se jako vhodnější metoda pro skrínink většího množství genotypů ve šlechtitelských kolekcích jeví metoda SPR pro hodnocení přítomnosti stresových proteinů.

Dalšími testovanými geny byly *LTI78*, *RCI2A* a *NRPI*. Jejich relativní exprese se v průběhu stresu chladem také výrazně zvyšovala. O funkci těchto genů a proteinů se toho zatím ví velmi málo, proto budou jistě zajímavým předmětem dalších experimentů. Stejně tak budou zajímavé i dva geny pro hypotetické proteiny, které byly také testovány. Jejich exprese se velmi výrazně zvyšovala při stresu chladem. Sekvence Bo6rg106940.1 pravděpodobně patří signálnímu peptidu. Mohlo by se jednat o transkripční faktor indukující expresi genů zapojených v ochraně před poškozením nízkými teplotami. Sekvence Bo1g014860.1 by podle uspořádání aminokyselin v řetězci mohl disponovat doménou typickou pro methionyl-tRNA syntetázu nezbytnou pro syntézu proteinů. Výrazné zvýšení jeho exprese je tedy také velmi zajímavým předmětem dalšího zkoumání, neboť by se mohlo jednat o důležitý článek syntézy ochranných proteinů při reakci na nepříznivé podmínky.

V rámci této práce byla testována také relativní exprese genů vytipovaných podle výsledků analýzy proteinů

metodou MALDI-TOF/TOF u regenerovaných mikrosporových embryí odvozených z rostlin řepky stresovaných simulovaným suchem. Byly testovány geny pro lactoylglutathione lyázu I, fosfolipázu D α 1 a peroxiredoxin antioxidantázu. U odolnější odrůdy ve standardních podmínkách a na začátku stresu byla naměřena významně nižší exprese tohoto genu. Tato odrůda možná disponuje účinnějším systémem prevence nadměrné produkce těchto molekul v počátečním stadiu stresu suchem. Tento gen bude předmětem našeho dalšího zkoumání jako potenciální marker pro výběr genotypů, které mohou být odolnější stresu suchem.

Publikace a metodiky

Impaktované publikace Jimp:

- Klíma, M., Jozová, E., Jelínková, I., Kučera, V., Hu, S., and Čurn, V. (2019). Early in vitro selection of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) plants with the fertility restorer gene for CMS Shaan 2A via non-destructive molecular analysis of microspore-derived embryos. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding (accepted)*.

Recenzované publikace Jrec:

- Harenčák J., Hoštičková I., Vráblová M., Jozová E., Čurn V. (2018): Expres genů ERD10 a ICE1 při aklimatizaci u odrůd řepky s kontrastní reakcí na stres chladem. *Úroda* 12, roč. LXVI, 2018, vědecká příloha, 131-134.
- Hoštičková I., Vráblová M., Rychlá A., Hronková M., Jozová E., Čurn V. (2018): Infračervená termografie jako nástroj pro výběr genotypů máku s kontrastní reakcí na stres suchem. *Úroda* 12, roč. LXVI, 2018, vědecká příloha, ISSN 0139-6013, s. 143-146.
- Klíma M., Kučera V., Jozová E., Ulvrová T., Bryxová P., Kopecký P., Havel J., Hoštičková I., Čurn V. (2018): Využití sporofytické autoinkompatibility v hybridním šlechtění řepky olejky. *Úroda* 12, roč. LXVI, 2018, vědecká příloha, 151-154.

- Jelínková, I.; Vráblová, M.; Harenčák, J.; Štoidl, P.; Čurn, V. (2017): Využití metody rezonance povrchového plazmonu k selekci chladu odolných genotypů řepky ozimé (*Brassica napus* subsp. *napus*). Úroda 12, roč. LXV, vědecká příloha, s. 215-217.
- Čurn, V., Jelínková, I., Jozová, E., Havlíčková, L., Klíma, M. (2016): Ověření spolehlivosti molekulárních selekčních markerů pro identifikaci obnovitelů fertility u CMS systému *Shaan 2A*. Úroda 12, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 39-44.
- Jelínková I., Channa Keshavaiah, Čurn V., Urban M. O., Klíma M. (2016): Analýza exprese genů indukovaných stresem chladem u řepky. Úroda 12, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 149-152.
- Jozová, E., Jelínková, I., Čurn, V., 2016. Hodnocení genetické diverzity genových zdrojů řepky jako podklad pro výběr rodičovských komponent pro křížení. Úroda 12, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 153-156.
- Vernerová K., Jelínková I., Čurn V., Olšan P., Havelka Z., Bartoš P., Špatenka P. (2016): Změna povrchové struktury semen řepky po ošetření nízkoteplotním plazmatem. Úroda 12, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 189-192.
- Jelínková, I., Keshavaiah, Ch., Prášil, I. T., Urban, M.O. (2014): Komparativní analýza exprese na úrovni genů/proteinů indukovaných v podmínkách

abiotického stresu u řepky olejky. Úroda 12, roč. LXII, vědecká příloha, s. 187 – 190.

- Keshavaiah, C., Havlíčková, L., Jelínková, I. (2014): Differential expression analysis of genes involved in abiotic stress in oilseed rape. Úroda 12, roč. LXII, vědecká příloha, s. 167 – 170.
- Havlíčková, L., Jelínková, I., Chikkaputtaiah, Ch., Prášil, I. T., Urban, M. O. (2013): Studium exprese genů spojených s abiotickým stresem u řepky. Úroda 12, roč. LXI, vědecká příloha, s. 142–145.

Aplikované výstupy:

Certifikované metodiky

- Čurn V., Havlíčková L., Jozová E., Jelínková I., Hejna O., Kučera V., Vyvadilová M., Klíma M. (2014): Využití molekulárních technik při selekci rodičovských komponent v programech hybridního šlechtění řepky (*Brassica napus* L.). Certifikovaná metodika. ZF JU České Budějovice.
- Čítek J., Hanuš O., Večerek L., Samková E., Křížová Z., Jelínková I., Kala R. (2018): Izolace bovinní genomové DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků. Certifikovaná metodika. ZF JU České Budějovice.
- Čítek J., Večerek L., Hanusová L., Samková E., Hanuš O., Křížová Z., Kávová T., Jelínková I., Kala R. (2018): Genetické polymorfismy pro

kvalitu kravského mléka. Certifikovaná metodika.
ZF JU České Budějovice.

Ověřené technologie

- Klíma M., Kučera V., Prášil I.T., Vítámvás P., Kosová K., Macháčková I., Bělská K., Jozová E., Hoštičková I., Čurn V. (2018): Technologie tvorby hybridů na bázi CMS Shaan 2A. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Ověřená technologie.
- Barták P., Šoch M., Čurn V., Vejčík A., Tonka T., Vernerová K., Farková B., Štoidl P., Jozová E., Hoštičková I., Stehlíková D., Šimek B., Václavek P., Plodková H. (2018): Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. Ověřená technologie