

METODICKÝ POSTUP VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍCH METOD PRO POSOUZENÍ FYZIOLOGICKÉHO STAVU TOPOLU ŠEDÉHO (POPULUS ×CANESCENS AITON SM.) V PRŮBĚHU KRYOKONZERVACE



Ing. EVA POKORNÁ, Ph.D.
a kol.

2/2023

**Metodický postup využití
molekulárních metod pro posouzení
fyziologického stavu topolu šedého
(*Populus ×canescens* Aiton Sm.)
v průběhu kryokonzervace**

Certifikovaná metodika

Ing. Eva Pokorná, Ph.D.

Mgr. Martina Komárková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Miloš Faltus, Ph.D.

Lesnický průvodce 2/2023

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

www.vulhm.cz

Publikace vydané v řadě Lesnický průvodce jsou dostupné v elektronické verzi na:

http://www.vulhm.cz/lesnicky_pruvodce

Vedoucí redaktor: Ing. Jan Řezáč; e-mail: rezac@vulhm.cz

Výkonná redaktorka: Miroslava Valentová; e-mail: valentova@vulhmop.cz

Grafická úprava a zlom: Klára Šimerová; e-mail: simerova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-255-7

ISSN 0862-7657

METHODOLOGICAL PROCEDURE USING MOLECULAR METHODS TO ASSESS PHYSIOLOGICAL STATE OF GREY POPLAR DURING CRYOPRESERVATION

Abstract

Cryopreservation is a commonly used biotechnological method for the safe storage of diverse plant cells, vegetative tissues or organs with a long-term perspective. Acclimatization to lower temperature and physical or osmotic dehydration of plant tissues before ultrarapid freezing in liquid nitrogen (-196°C) are highly significant and complex processes in plants. In response to these suboptimal conditions during precultivation, plants activate several protective and adaptative mechanisms regulated at the molecular level by a set of genes involved in various physiological processes. In this method, grey poplar (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) explants were chosen as representatives of deciduous tree species for characterization of their physiological state during three different pretreatment conditions. The main focus was genes associated with response to cold hardening and osmoprotectant treatments before ultrarapid freezing in liquid nitrogen.

Key words: grey poplar (*Populus ×canescens* Aiton Sm.); plant tissue cultures; cold hardening and osmotic stress; RNA isolation, qPCR

Oponenti: RNDr. Lucie Fischerová, Ph.D., Ústav experimentální botaniky AV
ČR, v. v. i.
Ing. Vlasta Knorová, Ministerstvo zemědělství ČR, Oddělení ochrany
lesů

Adresy autorů:

Eva Pokorná
Martina Komárková
Pavlaína Máchová

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136
252 02 Jíloviště

Ing. Miloš Faltus, Ph.D.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.
Drnovská 507/73
161 06 Praha 6
email: faltus@vurv.cz

Zástupce pro kontakt:

Ing. Eva Pokorná, Ph.D.
email: pokorna@vulhm.cz
tel.: +420 257 892 263

Podíly autorů:

Pokorná	30 %
M. Komárková	30 %
P. Máchová	20%
M. Faltus	20%

Foto na obálce:

Snímky zachycují výhony explantátů topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) na živném médiu a v médiu s aplikovaným roztokem sacharózy určené k homogenizaci a následné izolaci ribonukleové kyseliny.

Obsah:

1	ÚVOD	7
2	CÍL METODIKY	9
3	VLASTNÍ POPIS METODIKY	10
	a) Princip metody	10
	b) Materiální a technické zabezpečení pro mikropropagaci topolu šedého	11
	c) Zakládání primárních kultur, mikropropagace, multiplikace a předkultivace topolu šedého v procesu kryoprezervace	12
	d) Materiální a technické zabezpečení pro izolaci RNA a qPCR	13
	e) Izolace RNA a odstranění genomové DNA	15
	f) Reverzní transkripce (RT-PCR)	17
	g) Navržení a testování primerů pro qPCR	17
	h) qPCR a vyhodnocení naměřených dat	19
	i) Posouzení fyziologického stavu topolu šedého	20
4	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	24
5	POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	25
6	EKONOMICKÉ ASPEKTY	26
7	DEDIKACE	27
8	PODĚKOVÁNÍ	27
9	LITERATURA	27
	9.1 Seznam použité související literatury	27
	9.2 Seznam publikací, které předcházely metodice	30
	Summary	32
	PŘÍLOHY	34

Seznam použitých zkratk:

RNA	Ribonucleic Acid (ribonukleová kyselina)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (deoxyribonukleová kyselina)
cDNA	complementary Deoxyribonucleic Acid (komplementární deoxyribonukleová kyselina)
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (reverzní transkripce polymerázové řetězové reakce)
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction (kvantitativní polymerázová řetězová reakce)

1 ÚVOD

Kryokonzervace rostlinného materiálu je v současné době jeden z nejvíce inovativních a cenově dostupných biotechnologických přístupů, který umožňuje bezpečně a dlouhodobě zachovat širokou škálu genetických zdrojů rostlin bez rizika genetických modifikací (Benelli et al. 2021). Princip metody kryoprezervace rostlinných buněk, pletiv nebo orgánů je založen na odstranění mrznoucí vody pomocí fyzikální nebo osmotické dehydratace a následné zamražení. Příprava materiálu na zamražení je nezbytná zejména z důvodu zabránění formování ledových krystalů uvnitř buněk způsobující jejich nevratné poškození při ultrarychlém zamražení v kapalném dusíku (Sakai 1995). Mezi nejpoužívanější postupy patří vitrifikace a enkapsulace/dehydratace, které bývají kombinovány s dalšími postupy (Fabre a Derreuddre 1990; Sakai et al. 1990).

Principem vitrifikace je použití vysoce koncentrovaných vitrifikačních kryoprotektivních roztoků (PVS – plant vitrification solution), které účinně dehydratují rostlinné části bez jejich poškození. Aplikací vitrifikačních roztoků dochází ke zvýšení buněčné viskozity do bodu, při němž je zabráněno formování ledu uvnitř i vně buňky, ochraně buněčné membrány a navození skelného stavu v buňkách, který umožní jejich přežití v ultra-nízkých teplotách ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Matsumoto 2017; Zamecnik et al. 2021). V literatuře již bylo popsáno mnoho účinných vitrifikačních roztoků obsahujících odlišné kryoprotektivní látky (např. glycerol, dimethyl sulfoxid (DMSO), ethylen glycol, propylen glycol, sacharóza a sorbitol) aplikované v různých koncentracích, avšak u některých byl následně prokázán fytotoxický efekt (Zamecnik et al. 2021). Vliv složení vitrifikačních roztoků včetně koncentrace kryoprotektivních látek na přežití vzrostopných vrcholů sledovala např. Liu (2023), která u lokvátu (*Eriobotrya*) zjistila, že nejúčinnější testované kryoprotektivní látky jsou s obsahem sacharózy. Mezi další významné faktory ovlivňující regeneraci rostlinných segmentů ošetřených ultra-nízkou teplotou patří aklimatizace rostlinného materiálu na nízkou teplotu a působení osmoprotektantu v předkultivační fázi (Lambardi et al. 2000). Tento postup aplikovali i Pokorná et al. (2020) a popsali nejvyšší regeneraci vzrostopných vrcholů explantátů topolu šedého (*Populus ×candescens* Aiton Sm.) po jejich šestitýdenní kultivaci při nízké teplotě ($6\text{ }^{\circ}\text{C}$) společně s přidáním 0,7 M roztoku sacharózy.

Teplota patří mezi klíčové abiotické faktory ovlivňující růst rostlin. Při vystavení nízkým teplotám dochází u rostlin ke snížení tekutosti membrán, změnám enzymové kinetiky a formování proteinů, v důsledku čehož probíhají vývojové, morfologické, fyziologické a biochemické změny, které ovlivňují vitalitu, kvalitu a přežití rostlin (Alberdi a Corcuera 1991, Alberdi et al. 1993). Tyto děje jsou provázány

změnami v expresi genů, kdy chladem jsou indukovány signální dráhy zahrnující i transkripční faktory (Lissarre et al. 2010). Taková regulace na úrovni transkripce je pro rostliny nezbytná k získání odolnosti k chladu. Identifikací genů regulovaných nízkou teplotou (4 °C) se u topolu bílého zabývali Maestrini et al. (2009), kteří zjistili vyšší hladiny transkriptů u genů zapojených do přenosu signálu, regulace proteinů, buněčného cyklu a DNA procesů po 6 hod působení chladu ve srovnání s 48 hod intervalem působení chladu. Ve své práci se zaměřili i na další geny rozdělené do funkčních skupin “stres a obrana”, “metabolismus a energie” a “regulace genové exprese”, kde na konkrétních příkladech uvedli jejich odezvu na nízkou teplotu. Za účelem objasnění úlohy transkripčního faktoru *CBF1* (C-repeat binding factor) zapojeného do signální dráhy v aklimatizaci na chlad, jehož role byla popsána u modelové byliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), zvolili Benedict et al. (2006) za modelovou dřevinu topol šedý. Ukázalo se, že po sedmi dnech působení chladu (2 °C) došlo u topolu šedého k odlišné regulaci genů ze skupiny *CBF* v jednoletých (listy) a víceletých částech rostliny, než bylo popsáno u dvoutýdenních rostlin huseníčku rolního.

V námi předložené metodice jsme pro posouzení fyziologického stavu v průběhu kryoprezervace rovněž zvolili topol šedý, neboť jsme v předchozích letech úspěšně ověřili bezpečné uchování *in vitro* kultur topolu šedého v ultranízkých teplotách (Pokorná et al. 2020; Pokorná et al. 2018) a rychlou regenerační schopnost explantátů topolu šedého (Pokorná et al. 2017; Žižková et al. 2017). Pro studium genů zapojených do fyziologických procesů a jejich regulací v průběhu předkultivace je topol šedý vhodnou modelovou dřevinou i s ohledem na genetickou příbuznost s topolem chlupatoplodým (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray), vyznačujícím se relativně malým genomem (485 ± 10 Mb), který byl popsán autory Tuskan et al. (2006) a na jeho základě můžeme snadno dohledat cílové sekvence genů.

2 CÍL METODIKY

Cílem metodického postupu je detailní popis molekulárních metod využitých pro posouzení fyziologického stavu explantátů topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) v předkultivační fázi kryokonzervace, které byly vystaveny chladovým a osmotickým podmínkám. Působení nízké teploty a osmoprotektantu během předkultivace *in vitro* rostlin vede k významně vyšší regeneraci a prorůstání výhonů po odtání z ultra-nízké teploty (Pokorná et al. 2020). Předpokládáme, že předkultivační podmínky ovlivňují nejen fyziologický stav, ale i celkový metabolismus rostliny. Fyziologický stav explantátů topolu šedého byl charakterizován ve třech typech předkultivačních podmínkách: 1) kultivace v kontrolních podmínkách (21 °C, 16 h/8 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), 2) kultivace šest týdnů při snížené teplotě (6 °C, 16 h/8 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a 3) kultivace šest týdnů při snížené teplotě s aplikací 0,7 M sacharózy 2 týdny před ukončením předkultivace (6 °C, 16 h/8 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Pro sledování odezvy vybraných genů byla zvolena metoda stanovení relativní exprese genů pomocí kvantitativní PCR (qPCR).

Uvedená metodika obsahuje postupy, které jsou rozděleny do několika částí, zahrnující a) princip metody, b – e) materiální a technické zabezpečení pro mikropropagaci topolu šedého a izolaci RNA s odstraněním genomové DNA, f) reverzní transkripci (RT-PCR), g) navržení a testování primerů pro qPCR, h) qPCR s vyhodnocením získaných dat a i) posouzení fyziologického stavu topolu šedého. Metodický postup zaměřený na posouzení fyziologického stavu explantátů topolu šedého v průběhu kryokonzervace pomocí analýzy relativní exprese genů lze využít nejen pro jiné kultivary topolů, které jsou geneticky příbuzné, ale i pro ostatní druhy listnatých dřevin, kdy je však nezbytné upravit specifické sekvence primerů a optimalizovat postup pro konkrétní druh dřeviny.

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

a) Princip metody

Využití molekulárních metod při posouzení fyziologického stavu explantátů topolu šedého v průběhu kryokonzervace je vázáno na pracoviště vybavené pro kultivaci rostlinného materiálu v *in vitro* podmínkách a práci s nukleovými kyselinami (RNA a DNA). V obou prostředích jsou vyžadovány vysoké nároky na čistotu i použití částečně, případně zcela sterilních pomůcek. Při manipulaci se vzorky je nutná opatrnost i důslednost, aby se zabránilo nejen patogenním kontaminacím při pasážování *in vitro* rostlin, ale také kontaminacím všudypřítomnými ribonukleázami (RNázy), které způsobují degradaci RNA. Explantáty topolu šedého, původem z dormantních pupenů vybraného genotypu TPE111 (Příloha 1), byly napěstovány metodou *in vitro* organogeneze. Povrchově ošetřené pupeny byly přeneseny do aseptických podmínek na agarová živná média obsahující přesný poměr fytohormonů stimulujících tvorbu výhonů (Žižková et al. 2017). *In vitro* kultury topolu šedého byly pravidelně pasážovány a multiplikovány ve zhruba 4týdenních intervalech do získání dostatečného množství rostlinného materiálu.

Pro posouzení fyziologického stavu rostlin s využitím molekulárních metod byl sledován vliv působení nízkých teplot (6 °C) a osmoprotektantu (0,7 M roztok sacharózy), které jsou v předkultivační fázi významnými faktory ovlivňujícími úspěšnost kryoprezervace (Pokorná et al. 2020). Doba aklimatizace explantátů topolu šedého v kultivační místnosti se sníženou teplotou byla šest týdnů a roztok sacharózy byl k rostlinným explantátům přidán dva týdny před ukončením předkultivace. Následně odebrané vzorky (rostlinné výhony bez kořenů) byly řádně označeny, neprodleně zamrazeny v kapalném dusíku (-196 °C) a uskladněny v hlubokomrazicích boxech (-80 °C). Z odebraných vzorků byla vizolována celková RNA, přečištěna enzymem DNázou (odstranění zbývající genomové DNA) a pomocí reakce reverzní transkripce (RT-PCR) byla v PCR termocykleru přepsána mediátorová RNA (mRNA) na komplementární DNA (cDNA). Amplifikace cDNA a detekce PCR produktů byla zaznamenána měřením fluorescenčního signálu barviva SYBR Green s využitím real-time PCR termocykleru (LightCycler® 96 Instrument, Roche). Ze získaných dat byla vyhodnocena relativní exprese námi vybraných genů, vztažená k referenčním genům *Actin2* a *UBQ7*.

Výše uvedený princip metody se využívá již řadu let v mnoha oblastech výzkumu, avšak obecně platné postupy je často nezbytné optimalizovat a modifikovat s ohledem na typ rostlinného materiálu, abychom získali spolehlivá data vypovídající o fyziologickém stavu sledované dřeviny.

b) Materiální a technické zabezpečení pro mikropropagaci topolu šedého

Přístrojové vybavení:

Analytické váhy, autokláv, horkovzdušný sterilizátor, magnetické míchadlo, lednička, laminární flow-box, sterilizátor laboratorních nástrojů, pH metr, kahan, kulturační místnost

Chemikálie:

Destilovaná voda, komponenty pro přípravu MS média (dusičnan amonný, dusičnan draselný, chlorid vápenatý, síran hořečnatý, dihydrogen fosforečnan draselný, železito-sodná sůl kyseliny etylendiaminotetraoctové, síran železnatý, kyselina boritá, síran manganatý, síran zinečnatý, síran měďnatý, jodid draselný, molybdenan disodný, chlorid kobaltnatý, thiamin a myo-inositol), 6-benzylaminopurin (BAP; Sigma), kyselina indol-3-máselná (IBA; Sigma), glutamin, glycin, agar (ČL 97, Dr. Kulich Pharma, s. r. o.), sacharóza, hydroxid draselný, ethanol, komerčně dostupné dezinfekční činidlo KORSOLEX plus (HARTMANN-RICO, a.s.), HgCl_2

Drobné pomůcky:

Pinzeta, skalpel, nůžky, lžičky, váženky, pipety a špičky, odměrný válec, stojánek na nástroje, Petriho miska skleněná (poloměr 15 cm), kruhové filtrační papíry (poloměr 12,5 cm), sirky, buničina, sterilní skleněné nádoby pro kultivaci explantátů, mikroténové sáčky, chladicí taška

Požadavky na práci:

Při zakládání primárních kultur v laminárním flow-boxu je nezbytné dodržovat aseptické podmínky při manipulaci s rostlinným materiálem, aby bylo zamezeno kontaminaci.

Rostlinný materiál

Výchozím materiálem pro založení explantátových kultur topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) jsou rouby (čerstvé vitální větvičky, nejvhodněji z terminálních výhonů) z vybraného donorového jedince (Příloha 1) odebrané v jarním období před vyrašením pupenů (konec února/ začátek března v závislosti na klimatických podmínkách). Odebraný rostlinný materiál (cca 30 pupenů) je vložen do označeného mikroténového sáčku a uložen do chladicí tašky sloužící k přepravě vzorků do laboratoře, kde je uskladněn při teplotě 4 °C do následného zpracování.

c) Zakládání primárních kultur, mikropropagace, multiplikace a předkultivace topolu šedého v procesu kryoprezervace

Před založením primárních kultur topolu šedého si nejprve připravíme tzv. indukční živné médium (viz Žižková et al. 2017) obsahující glutamin (10 mg.l^{-1}), glycin (2 mg.l^{-1}), BAP ($0,4 \text{ mg.l}^{-1}$), IBA ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$), sacharózu (30 g.l^{-1}) a agar (7 g.l^{-1}). Pomocí 1M KOH upravíme hodnotu pH = 5,8. Živné médium sterilizujeme při 120°C v autoklávu po dobu 20 min, které rozléváme po zchladnutí do sterilních skleniček. Vychladlá média jsou uchovávána při laboratorní teplotě pro následné použití.

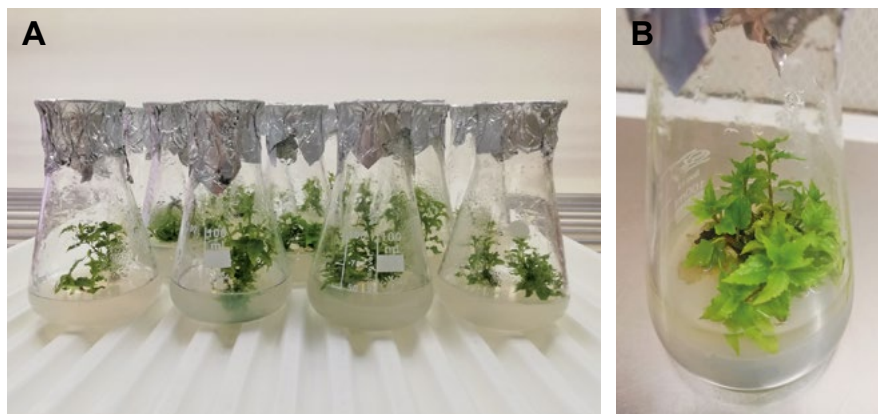
Pupeny topolu šedého se oplachují 30 min pod tekoucí vodou, 20 min v destilované vodě s přísadkou kapky Jaru, 20 min v roztoku KORSOLEX⁺plus (25 ml/500 ml destilované vody), 20 min v destilované vodě a následovně se sterilizují 15 min v 1% roztoku HgCl_2 . Na závěr jsou pupeny 3× propláchnuty sterilní destilovanou vodou po dobu 15 min a přeneseny do laminárního boxu, kde se na Petriho misce u každého pupenu odstraňují povrchové šupinky. Nepoškozené extirpované vzrostné vrcholy se pomocí pinzety vkládají do sterilních skleniček na indukční živná média. Založené primární kultury se udržují v řízených světelných i teplotních podmínkách (21°C , 16 h/8 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Po 4–6 týdnech dochází k proliferaci nasazených explantátů v průřezu. Do období zajištění dostatečného množství mikrořízků jsou axilární, případně adventivní výhony multiplikovány na živném médiu s intervalem 3–4 týdnů (Obr. 1A).

V předkultivační fázi jsou rozděleny dobře vyvinuté mikrořízky na tři skupiny, které jsou kultivovány ve třech odlišných podmínkách: 1) Varianta A – řízené světelné i teplotní podmínky (21°C , 16 h/8 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), 2) Varianta B – kultivace šest týdnů při snížené teplotě (6°C , 16 h/8 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a 3) Varianta C – kultivace šest týdnů při snížené teplotě společně s aplikací 0,7 M roztoku sacharózy dva týdny před ukončením předkultivace (6°C , 16 h/8 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Koncentrace aplikovaného roztoku 0,7 M sacharózy je propočítána s ohledem na obsah sacharózy v agarovém živném médiu tak, aby celková koncentrace osmoprotektantu byla 0,3 M sacharózy v jedné skleničce obsahující explantáty topolu šedého (Obr. 1B). Pro správnou výslednou koncentraci sacharózy v nádobě s explantátem je proto nezbytné znát objem živného média a koncentraci aplikovaného osmoprotektantu.

d) Materiální a technické zabezpečení pro izolaci RNA a qPCR

Přístrojové vybavení:

Dewarova nádoba na kapalný dusík, analytické váhy, autokláv, horkovzdušný sterilizátor, hlubokomrazicí box s nastavenou teplotou -80 °C, chladnička, digitální suchá lázeň na mikroskopu, vortex, centrifuga, termický cykler pro PCR reakci (PCR termocykler, např. Veriti Thermo cycler, Applied Biosystem), real-time PCR cykler (např. Light Cycler®96, Roche), spektrofotometrický přístroj na měření čistoty a kvantity nukleových kyselin (např. Spektrofotometr, MaestroGen Inc.), stolní minicentrifuga (Gusto, Biotech), PC



Obr. 1: Mikropropagace topolu šedého (*Populus xcanescens* Aiton Sm.). Namnožení mikrořízků topolu šedého (1A) a jejich kultivace v 0,7 M roztoku sacharózy (1B).

Fig. 1: Micropropagation of grey poplar (*Populus xcanescens* Aiton Sm.). Multiplying grey poplar microcuttings (1A) and their cultivation in 0.7 M sucrose solution (1B).

Chemikálie:

DEPC (dietyl pyrokarbonát) voda, RNasy Plant Mini Kit (QIAGEN), DNA-free Kit (Ambion), Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), oligo dT primers (QIAGEN), FastStart Essential DNA Green Master (Roche), ethanol absolute (99,97%; VWR Chemicals), β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), kapalný dusík (Linde), primery pro qPCR reakci (IDT Integrated DNA Technologies)

Drobné pomůcky:

96jamková bílá destička (LightCycler 480 Multiwell Plate 96, Roche), pinzeta, ocelové lžičky, 1,5ml Eppendorf mikrokumavky, třecí misky s tloučkem, sada pipet, sterilní špičky, skleněné kádinky, stojánek na nástroje, buničina, polystyrénový džbán, stojánek na mikrokumavky, laboratorní rukavice, aluminiová fólie

Požadavky na práci:

Při manipulaci s rostlinnými vzorky je nezbytné pracovat rychle a zajistit čistotu laboratorního zázemí, aby bylo zamezeno kontaminacím RNázami. Pro zamezení degradace RNA rovněž dbáme na čistotu osobních ochranných pomůcek a oděvů (např. nošení rukavic, laboratorního pláště, přezuvek apod.). Značné obezřetnosti je potřeba i při manipulaci s kapalným dusíkem, který může způsobit vážné poranění.

Rostlinný materiál

Jako výchozí materiál pro izolaci RNA byly použity výhony explantátů topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) kultivované v místnosti s pravidelným světelným a teplotním režimem (viz výše). Čerstvě odebraný rostlinný materiál byl neprodleně zabalen do řádně označené aluminiové fólie, rychle zamražen v Dewarově nádobě s kapalným dusíkem a uchován v hlubokomrazícím boxu pro následné zpracování.

e) Izolace RNA a odstranění genomové DNA

Před izolací RNA se vzorky topolu šedého nejprve zhomogenizují ve vymražené třecí misce pomocí tloučku a na analytických vahách se odváží ve třech opakováních od každého vzorku cca 100 mg čerstvé hmotnosti. Navážený rostlinný materiál je vložen do vymražených 1,5ml centrifugačních mikrozkuvek Eppendorf opatřených zámkem a následně se vzorky ponoří do nádoby s kapalným dusíkem. Ze zhomogenizovaných vzorků topolu šedého je izolována RNA podle protokolu uvedeného výrobcem a přiloženého u komerčně dostupného izolačního kitu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (Příloha 2).

Protokol izolace RNA z rostlinných pletiv s použitím RNeasy Plant Mini Kitu

Jako výchozí hmotnost čerstvého rostlinného materiálu pro získání maximálního výtěžku RNA je doporučeno 100 mg.

1. K zhomogenizovanému vzorku napipetujeme 450 µl pufru RLT, který obsahuje směs 10 µl β-mercaptoethanolu/ 1 ml pufr RLT.
2. Vzorky zvortexujeme a umístíme do suché digitální lázně s nastavenou teplotou 56 °C po dobu 3 min.
3. Celý objem přepipetujeme do fialových kolonek (QIAshredder spin column) umístěných ve 2ml mikrocentrifugačních zkumavkách (collection tube) a vzorky centrifugujeme 2 min při rychlosti 14 000 rpm (počet otáček za minutu). Vzniklý lyzát, bez odpadního peletu, přepipetujeme do nové mikrozkuvky.
4. K lyzátu přidáme ethanol v polovičním množství než je celkový objem lyzátu a opatrně vzniklou směs promícháme opakovaným nasátím a vypuštěním ze špičky mikropipety.
5. Vzniklou směs přepipetujeme do růžové kolonky (QIAshredder Mini spin column) umístěné ve 2ml mikrozkuvce (collection tube) a centrifugujeme při rychlosti 10 000 rpm. Přefiltrovanou kapalinu odstraníme do skleněné kádinky.
6. Na kolonku napipetujeme 700 µl pufru RW1 a centrifugujeme 15 s při rychlosti 10 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.
7. Na kolonku napipetujeme 500 µl pufru RPE a centrifugujeme 15 s při rychlosti 10 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.

8. Na kolonku napipetujeme 500 ml pufru RPE a centrifugujeme 2 min při rychlosti 10 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.
9. Růžovou Rneasy Mini spin kolonku umístíme do nové 2ml mikrocentrifugační zkumavky a centrifugujeme 1 min při plné rychlosti 14 000 rpm.
10. Kolonku Rneasy Mini spin column přemístíme do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky, přidáme 30 ml DEPC vody (RNase-free water), kterou nanese přímo na membránu kolonky a centrifugujeme 1 min při rychlosti 10 000 rpm.

Čistotu a koncentraci vyizolované celkové RNA ze vzorků topolu šedého stanovíme na spektrofotometru. Vzhledem k velmi časté kontaminaci genomovou DNA v získaném izolátu RNA je vhodné provést enzymatické ošetření u vyizolované RNA s použitím DNA-free Kitu podle postupu uvedeného výrobcem (viz níže).

Protokol odstranění zbytkové DNA u vyizolované RNA s použitím DNA-free Kitu

1. K získanému izolátu RNA přidáme 0,1násobek objemu 10X DNase I pufru společně s 1 µl rDNase I a jemně promícháme.
2. Vzorek inkubujeme při 37 °C v digitální suché lázni 45 min.
3. Ke vzorku přidáme 0,1násobek inaktivačního reagentu DNase Inactivation Reagent a dobře promícháme. Inkubujeme 2 min za občasného proklepání obsahu konečky prstů.
4. Směs centrifugujeme 2 min při rychlosti 11 000 rpm. Vzorek opatrně přepipetujeme do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky; dáváme pozor, abychom nenasáli pipetou i vrstvy inaktivačního reagentu.
5. Čistotu a koncentraci přečištěné RNA u vzorku topolu šedého stanovíme na spektrofotometru.

f) Reverzní transkripce (RT-PCR)

Přepis vyizolované RNA na komplementární DNA (cDNA) pomocí enzymu reverzní transkriptázy a dalších reagensů probíhal pomocí postupu uvedeného vý-
robem (viz níže).

Protokol přepisu RNA na cDNA s použitím Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit

1. Do centrifugační mikrokumavky (0,1 ml) odpipetujeme z našeho vzorku ob-
jem odpovídající 1 µg RNA, 1 ml oligo(dT)₁₈ primer (2,5 µM) a doplníme do
finálního objemu 13 µl DEPC vodou. Směs lehce protřepeme mezi prsty, krátce
stočíme na stolní minicentrifuze a denaturujeme v PCR termocykleru 10 min
při 65 °C. Po ukončení denaturace RNA vzorek rychle umístíme do ledu.
2. Ke vzorku připipetujeme 4 µl reakčního pufru, 0,5 µl inhibitoru RNA, 2 µl
deoxynukleotidové směsi (1 mM od každého nukleotidu) a 0,5 µl enzymu re-
verzní transkriptázy. Finální objem 20 µl směsi lehce protřepeme mezi prsty,
stočíme na stolní minicentrifuze a vložíme do předem nastaveného PCR ter-
mocykleru s programem: 1× 60 min/ 50 °C, 1× 5 min/ 85 °C a terminací při
kontinuálně udržované teplotě 10 °C.

Získaný templát komplementární DNA (cDNA) naředíme 20× sterilní deionizova-
nou vodou (5 µl cDNA a 95 µl H₂O) a zbylou část cDNA uložíme do hlubokomra-
zícího boxu.

g) Navržení a testování primerů pro qPCR

Pro kvantitativní stanovení relativní exprese vybraných genů u sledovaného úseku
cDNA topolu šedého byly nejprve navrženy a testovány primery pro qPCR.

- 1) Výběr kandidátních genů indukovaných nízkou teplotou byl zvolen na zákla-
dě publikací Maestrini et al. (2009) a Benedict et al. (2006). U vybraných genů
LTI6 (hydrophobic protein RCI2 low temperature and salt responsive pro-
tein), **ARR5** (pseudo-response regulator 5 protein), **PINI** (peptidyl-prolyl cis-
-trans isomerase NIMA-interacting 1), **HSP70** (70-kDa heat shock protein),

COP1 (E3 ubiquitin-protein ligase) a **RNPS1** (RNA binding protein with serine rich domain 1) zapojených do odpovědi na nízkou teplotu byly porovnány sekvence cDNA u *Arabidopsis thaliana* a *Populus trichocarpa* s použitím databáze TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <https://www.arabidopsis.org/>) a Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>). Pro referenční geny *Actin2* a *UBQ7* byly použity sekvence primerů uvedené v práci Pettengill et al. (2012).

- 2) Pro shodné sekvence cDNA byly navrženy primery (Tab. 1) s použitím softwaru PrimerQuest™ Tool (eu.idtdna.com), které byly testovány na zkušební genomové DNA pomocí PCR reakce s následujícími podmínkami: denaturace 94 °C/3 min, amplifikace 35 × 45 s/94 °C, 45 s/55 °C a 45 s/72 °C, elongace 15 min/72 °C a závěrečné chlazení PCR amplifikátů při 4 °C. Po skončení reakce byly vzorky okamžitě přemístěny na led. Následně byly získané amplifikační produkty (15 µl) smíchány s 4 µl pufru (gel loading buffer, Sigma – Aldrich), nanесeny do slotů 2% agarózového gelu a hodnoceny pod UV zářením pomocí kamerového systému po ukončení elektroforézy. Reakční směs v celkovém objemu 15 µl připravená pro testování jednotlivých primerů uvádí Tabulka 2.

Tab. 1: Vybrané sekvence primerů topolu šedého použité pro qPCR.

Gen	sekvence primerů „F“ (5'-3')	sekvence primerů „R“ (5'-3')
PIN1	GCTGATCGCTCTGGGAATTT	TCGGAAGAGTCGAGACAGAAA
LT16	GTTCAGAGACCTTCCTAGAAGTGA	CACAGCCATAACGCAGGAA
ARR5	GAATGACGGGTAGTGAGATGG	AGAGCAGCAATTATCTGTCTAGTT
HSP70	GTTCCCAGGGTTCAAGAGATAG	CACTGCCTCATCAGGGTTTA
COP1	GGATTTCTCTGCCCGATTT	GTTCTTGTTACGGAGGTGAGTG
RNPS1	TCCTAGACGTCAGCTGGATT	GTGTCTCACCACGACGATAAG
Actin2	TTCTACAAGTGCTTTGATGGTGAGTTC	CTATTCGATACATAGAAGATCAGAATGTTCC
UBQ7	GGAACGGGTTGAGGAGAAAGAAG	GCAAGAACAAGATGAAGCACAGAGC

Tab. 2: Optimalizované složení PCR reakční směsi pro testování primerů použitých při qPCR topolu šedého.

Reakční směs	Objem na 1 vzorek (μl)
10 x PCR pufr bez MgCl ₂	1,5
50 mM MgCl ₂	0,6
10 mM dNTP	0,1
forward primer (1 μM)	0,75
reverse primer (1 μM)	0,75
Enzym Platinum® Taq Polymeráza	0,075
H ₂ O	10,225
Templátová DNA	1
Celkový objem	15 μl

h) qPCR a vyhodnocení naměřených dat

Pro kvantitativní stanovení relativní exprese vybraných genů u sledovaného úseku cDNA byl použit postup uvedený výrobcem s drobnými modifikacemi (viz níže).

Protokol pro přípravu qPCR reakční směsi FastStart Essential DNA Green Master

1. Do 96jamkové destičky odpipetujeme 1,5 μl ultračisté vody (PCR Grade), 1 μl „forward“ a 1 μl „reverse“ PCR primeru o koncentraci 1 μM (Tab. 1), 5 μl master mixu a 2,5 μl cDNA našeho vzorku. Směs lehce protřepeme mezi prsty, krátce stočíme na stolní minicentrifuze a vložíme do real-time PCR termocykleru s nastaveným cyklem: preinkubace 120 s/95 °C, amplifikace 45 × 10 s/95 °C, 10 s/60 °C a 10 s/72 °C. Denaturační křivka byla stanovena při 10 s/95 °C, 60 s/65 °C a 1 s/97 °C. Po ukončení reakce přendáme vzorek na led.
2. Pro všechny tři biologická opakování od každého vzorku byly změřeny exprese hladiny referenčních genů *Actin2* a *UBQ7*. Relativní exprese byla stanovena také pro negativní kontrolu (pouze reagentie bez obsahu cDNA).
3. Stanovení relativních hladin sledovaných genů bylo provedeno na základě metody $2^{\Delta CT}$ (Hošek et al. 2020).

i) **Posouzení fyziologického stavu topolu šedého**

Fyziologický stav rostlin charakterizovaný relativní mírou exprese vybraných genů se lišil v jednotlivých předkultivačních podmínkách (Obr. 2). V kontrolních podmínkách byly relativní expresní hladiny všech analyzovaných genů velmi nízké s výjimkou genu *COP1*, který je základním regulátorem fotomorfogeneze. Aktivita E3 ligázy *COP1* souvisí s cílenou degradací mnoha světlem regulovaných proteinů včetně fotoreceptorů (kryprochromy, fytochromy a UVR8) a transkripčních faktorů (např. HY5, LAF1 a PIF1), které významně ovlivňují růstové a vývojové procesy (Kim et al. 2017). Předpokládáme, že při dlouhodobém působení chladu dochází u rostlin k poklesu aktivity *COP1* a s tím spojené degradaci proteinů zejména v důsledku zpomalení růstu, jak zjistili u čiroku dvoubarevného Razmi et al. (2013). Autoři Li et al. (2021) uvádějí nízké relativní hladiny proteinů u *COP1* overexpimujících mezofylových protoplastů huseníčku rolního při teplotě 4 °C ve srovnání s kontrolními podmínkami (22 °C), přičemž u mutantních linií *cop1-4* zaznamenali vysoké hladiny proteinů. Naopak při krátkodobém působení chladu (24 hod, 4 °C) Kilian et al. (2007) pozorovali zvýšenou expresní hladinu *COP1* v nadzemní části u 18denních rostlin huseníčku rolního.

Ze skupiny genů spojených s přenosem signálu rostlinných hormonů byly sledovány hladiny exprese genů *ARR5* a *PIN1*, kde *ARR5* patří mezi geny zapojené do primární odpovědi na cytokiny (*type-A ARR*s) a *PIN1* je hlavním transportérem auxinu ve směru ven z buňky. *PIN1* je umístěn na plazmatické membráně a významně reguluje např. organogenezi (Zažímalová et al. 2010). Při sledování odpovědi *ARR5* a *PIN1* na působení chladu a osmoprotektantu, jsme zjistili nejvyšší nárůst exprese u Varianty B ve srovnání nižšími hodnotami u Varianty C. Naše data se částečně shodují s Kilian et al. (2007), kteří pozorovali rovněž nárůst expresních profilů obou genů po 24 h působení chladu včetně jejich poklesu u rostlin kultivovaných na médiu obsahujícím manitol (300 mM). Sledování cytokininové aktivity prostřednictvím změn exprese *ARR5* se využívá velmi často, např. Paul et al. (2016) v pletivech a buňkách topolu šedého popsali změny v aktivitě *ARR5* v letním a zimním období u transformovaných liniích nesoucí konstrukt *ARR5::GUS*.

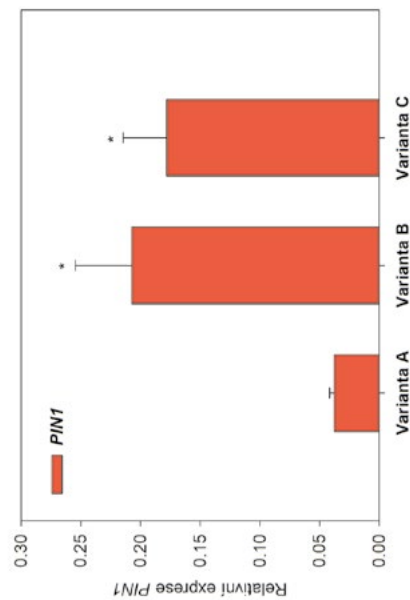
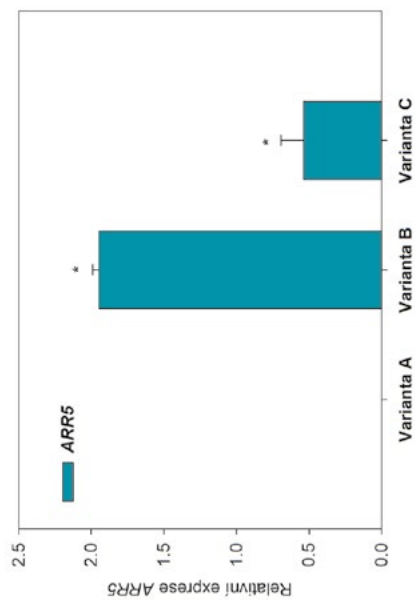
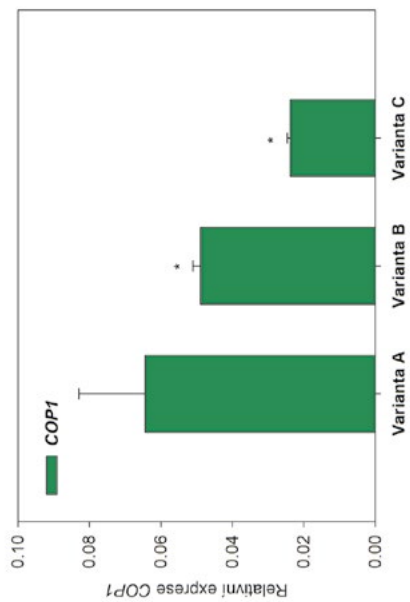
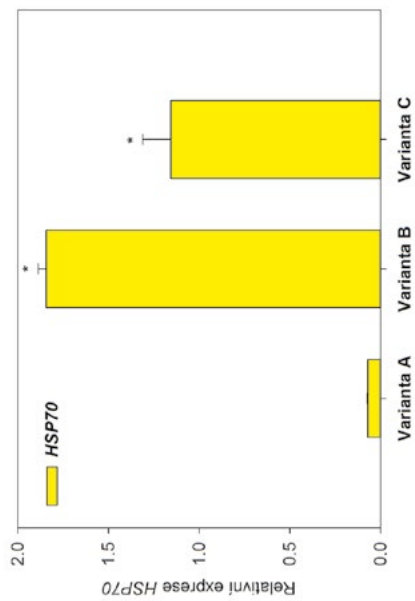
Významnou úlohu *HSP70* v adaptaci rostlin na působení abiotického stresu popsali Aghaie, Tafreshi (2020), kteří u rostlin rajčat vystavených působení sucha zjistili jeho zásadní úlohu v udržování buněčné homeostáze, neboť umlčení genu vedlo u rostlin k retardaci růstu, odumření rostliny, významnému poškození buněčné membrány, poklesu relativního obsahu vody, snížení akumulace pigmentu a poklesu antioxidační enzymové aktivity. Lze se proto domnívat, že nárůst relativních

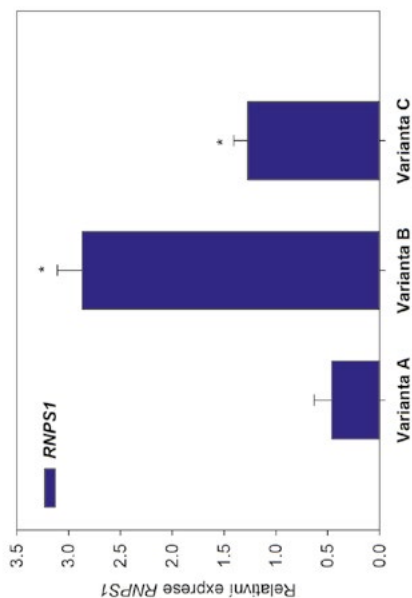
expresních hladin *HSP70* u Varianty B a Varianty C souvisí s působením obou abiotických stresů (chladu a osmoprotektantu). Během abiotického stresu dochází k posílení hlavní úlohy *HSP70* v buněčných procesech, jako jsou např. skládání nově syntetizovaných polypeptidů, opětovné skládání špatně syntetizovaných nebo agregovaných proteinů, jejich translokace přes membrány organel, řízení aktivity regulačních proteinů či napomáhání procesu degradace bílkovin (Aghaie, Tafreshi 2020).

Podobné trendy v regulaci relativních expresních hladin jsme pozorovali také u genů *LTI6* a *RNPS1*. Funkce *RNPS1* souvisí zejména s metabolismem RNA a stabilitou genomu (Duque 2011). *LTI6* je indukován nízkou teplotou, overexprese *OsLti6b* vedla ke zvýšení tolerance na chlad u rostlin rýže (Kim et al. 2007). My jsme u genu *LTI6* naměřili nejvyšší relativní expresní hladiny u všech variant, přičemž u Varianty B a C došlo až k 13násobnému, respektive 9násobnému nárůstu v porovnání s Variantou A (Obr. 2). Na základě našich výsledků můžeme považovat gen *LTI6* za pozitivní „marker“ působení nízkých teplot. Gen *LTI6* tak může být paralelou například ke genu *Rd22*, pozitivně regulovanému při působení solného stresu s potenciálem využití v genovém inženýrství nejen pro zemědělské plodiny s tolerancí k zasolení (Jamoussi et al. 2014).

Naše výsledky ukazují, že u rostlin kultivovaných při nízké teplotě (Varianta B) a souběžně i v roztoku sacharózy po dobu dvou týdnů (Varianta C) dochází k významným změnám v regulaci aktivity vybraných genů a pravděpodobně i jejich metabolismu. Při porovnání Varianty B a Varianty C se ukazuje, že samotné působení nízké teploty má výraznější efekt na aktivitu námi sledovaných genů, což může souviset s vyšším působením stresu na rostliny, a tím i horším fyziologickým stavem rostlin. Naši úvahu podporují dříve získané výsledky, kde jsme zjistili vyšší regenerační schopnost u segmentů topolu šedého ošetřených nízkou teplotou zároveň s osmoprotektantem, ve srovnání s působením pouze nízké teploty (Pokorná et al. 2020). Z výše uvedených výsledků lze poukázat na gen *HSP70*, který patří mezi nejběžnější geny teplotního šoku, kdy jsme zjistili jeho nižší relativní expresní hladinu u Varianty C ve srovnání s Variantou B, a proto by mohl být vhodným kandidátním genem při posuzování fyziologického stavu rostlin v souvislosti s otuzováním rostlin nízkou teplotou.

Získané výsledky slouží jako prvotní informace umožňující posoudit fyziologický stav rostliny v průběhu kryokonzervace. Pro komplexnější posouzení by mohly být analýzy v budoucnu doplněny např. o využití qPCR analýzy pro další vybrané geny, stanovení endogenních hladin rostlinných hormonů, obsahu aminokyselin, případně fotosyntetických pigmentů a jiných metod.





Obr. 2:

Stanovení relativní exprese genů explantátů topolu šedého (*Populus x canescens* Aiton Sm.) pěstovaných ve třech odlišných předkultivačních podmínkách (Varianta A – C). Varianta A – řízené světelné i teplotní podmínky (21 °C, 16 h/8 h světelná fotoperioda), Varianta B a Varianta C – kultivace šest týdnů při snížené teplotě (6 °C, 16 h/8 h světelná fotoperioda). U Varianty C byla aplikována 0,7 M sacharóza dva týdny před ukončením předkultivace explantátů. *PIN1* – peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1, *COP1* – E3 ubiquitin-protein ligase, *HSP70* – 70-kDa heat shock protein, *RNPS1* – RNA binding protein with serine-rich domain 1, *ARR5* – pseudo-response regulator 5 protein a *LTI16* – hydrophobic protein RC12 low temperature and salt responsive protein. *Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou (Variantou A) a rostlinami aklimatizovanými na nízkou teplotu (Variantu B a C) byly stanoveny na základě jednofaktorové analýzy rozptylu (One Way ANOVA) s Dunnovým post hoc testem ($\alpha = 0.05$). Data jsou průměrem třech nezávislých pokusů $\pm$ SD.

Fig. 2:

Relative gene expression levels in grey poplar explants (*Populus x canescens* Aiton Sm.) cultivated in three different precultivation conditions (Varianta A – C). Varianta A – control light and temperature conditions (21 °C, 16 h/8 h photoperiod), Varianta B and Varianta C – six weeks of cultivation under low temperature (6 °C, 16 h/8 h photoperiod). For the Varianta C application of 0.7 M sucrose two weeks before termination of explants precultivation. *PIN1* – peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1, *COP1* – E3 ubiquitin-protein ligase, *HSP70* – 70-kDa heat shock protein, *RNPS1* – RNA binding protein with serine-rich domain 1, *ARR5* – pseudo-response regulator 5 protein a *LTI16* – hydrophobic protein RC12 low temperature and salt responsive protein. *Statistically significant differences between the control (Varianta A) and the cold-hardening samples (Varianta B a C) were estimated according to One Way ANOVA with Dunn's post hoc test ($\alpha = 0.05$). Data are means of three independent experiments $\pm$ SD.

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Ve standardizované metodice jsou propojeny znalosti a zkušenosti biotechnologických postupů mikropropagace, kryoprezervace (zejména v předkultivační fázi rostlin) a analýzy relativní exprese genů u rychle rostoucí dřeviny topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.). Získaná data prohlubují poznatky o fyziologickém stavu rostlin, které jsou významné pro efektivnější využití kryoprezervace pro dlouhodobé uchování cenných genotypů v ultranízkých podmínkách. Přestože mnoho prací popisuje vliv nízké teploty na regulaci exprese genů u lesních dřevin (např. Welling, Palva 2006), souvislost aklimatizace rostlin v předkultivační fázi kryokonzervace nebyla dosud na této molekulární úrovni popsána. Naše výsledky ukázaly, že působení nízké teploty a společně s osmoprotektantem významně reguluje geny zapojené do signálních drah souvisejících s růstem, fotomorfogenezí, degradací světlem regulovaných proteinů a stresem. Je zřejmé, že předkultivace rostlin při nízké teplotě v kombinaci s osmoprotektantem měla pozitivní vliv na fyziologický stav rostlin, což odpovídá výsledkům naší předchozí práce, kdy nejvyšší regenerace rostlin po odtání byla získána u segmentů topolu šedého, ošetřených nízkou teplotou i osmoprotektantem (Pokorná et al. 2020).

5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Účelem předložené metodiky je poskytnout získané zkušenosti a poznatky z oblasti biotechnologických metod vyvinutých pro topol šedý (*Populus ×canescens* Aiton Sm.), a to zejména z *in vitro* kultivace, kryoprezervace a molekulární biologie. Využití znalostí od založení primárních kultur po multiplikaci topolu šedého a posouzení fyziologického stavu v předkultivační fázi kryokonzervace s navazující možností dlouhodobého a bezpečného uchování v ultranízkých teplotách může být přínosné nejen pro cílenou skupinu odborníků (např. pracovníky z výzkumných institucí, univerzit, komerčních laboratoří a biotechnologických firem), ale i pro všechny, kteří se o danou problematiku zajímají, případně pracují s *in vitro* kulturami nebo využívají molekulární analýzy.

Předpokládáme, že uvedené metodické postupy mikropropagace a studium fyziologického stavu rostlin s využitím analýzy relativní exprese genů u rychle rostoucí dřeviny s vysokou regenerační schopností se uplatní i pro další druhy topolů (*Populus spp.*) a lesních dřevin, u nichž však bude potřeba optimalizovat konkrétní části postupů (např. složení kultivačních médií, navržení nových primerů pro konkrétní druh dřeviny, nastavení podmínek PCR reakce apod.). Domníváme se, že metodika bude sloužit i jako výchozí zdroj informací, které se budou dále rozvíjet a obohacovat pro komplexnější poznání dané problematiky.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice jsou odvislé od skutečnosti, jestli se zavádí zcela nový provoz pro mikropropagaci, kryokonzervaci a analýzu stanovení hladin relativní exprese genů, nebo se uvedená metodika implementuje na pracovištích se zavedeným provozem výše zmíněných metod. V případě, že laboratoř je plně vybavena pro práci s tkáňovými kulturami, jejich uskladnění v ultranízkyých teplotách, a nukleovými kyselinami (DNA a RNA), zahrnují nákladové položky spojené především s nákupem chemikálií pro přípravu kultivačních médií, pomůcek, izolačních kitů, enzymů a spotřebního materiálu (mikrozkumavky, špičky k pipetám apod.). V druhém případě, kdy se zavádí zcela nový provoz pro práci s *in vitro* kulturami, jejich uskladněním v ultranízkyých teplotách a molekulárními analýzami se náklady značně navyšují o vybavení pro sterilizaci materiálu a kultivačních médií: autokláv a horkovzdušný sterilizátor (celkem cca 150 tis. Kč), pro práci s tkáňovými kulturami: kultivační box a laminární box (celkem cca 450 tis. Kč), o přístroje pro přípravu a uchování kultivačních médií: analytické váhy, stolní pH-metr, laboratorní míchačka, chladnička a pipety (od 95 tis. Kč), a o spotřební materiál související s prací v laboratoři: sklo, plasty, chemikálie, pinzety, nůžky, skalpely. Náklady na uskladnění rostlinného materiálu v ultranízkyých teplotách jsou promítnuty v pořízení Dewarovy nádoby na kapalný dusík a Dewarovy nádoby na uchování vzorků v kapalném dusíku (cca 80 tis. Kč). Pro práci s nukleovými kyselinami se náklady navyšují zejména o pořízení přístrojového vybavení: spektrofotometr a real-time PCR termocykler, drobných pomůcek (např. pipety, mikrozkumavky, špičky) a chemikálií (enzymy, izolační kity apod.). Celkově se náklady na zavedení celého provozu pohybují řádově v rozmezí sta tisíců až milionů Kč.

Ekonomický přínos pro uživatele souvisí zejména s charakteristikou fyziologického stavu jedince určeného pro bezpečné a dlouhodobé uchování, neboť za situace, že jedinec nebyl v optimálním fyziologickém stavu, ačkoliv bez pozorovatelných symptomů (např. snížená vitalita, pomalejší prorůstání výhonů, napadání patogenem), může být výsledek kryokonzervace a následné regenerace cenného genotypu zcela fatální.

7 DEDIKACE

Metodika byla zpracována spoluprací kolektivu autorů z Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. (EP, MK a PM) a Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i. (MF), v rámci řešení výzkumného projektu NAZV QK1910277 „Využití metody kryoprezervace pro zefektivnění šlechtitelského procesu hospodářsky významných zemědělských plodin a uchování lesních dřevin“ a za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpory č. MZE-RO0123.

8 PODĚKOVÁNÍ

Za samostatnou a dobře organizovanou práci při zpracování rostlinného materiálu, izolaci RNA, přepisu mRNA do cDNA a přípravě destiček pro qPCR děkujeme Mgr. Marii Hynkové a Bc. Timotejovi Ťažkému.

9 LITERATURA

9.1 Seznam použité související literatury

- Aghaie P., Tafreshi S. A. H. 2020. Central role of 70-kDa heat shock protein in adaptation of plants to drought stress. *Cell Stress Chaperones*, 25(6): 1071-1081.
- Alberdi M., Corcuera L. J. 1991. Cold acclimation in plants. *Phytochemistry*, 30: 3177-3184.
- Alberdi M., Corcuera L. J., Maldonado C., Barrientos M., Fernández J., Henríquez O. 1993. Cold acclimation in cultivars of *Avena sativa*. *Phytochemistry*, 33(1): 57-60.

- Benedict C., Skinner J. S., Meng R., Chang Y., Bhalarao R., Huner N. P., Finn C. E., Chen T. H., Hurry V. 2006. The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. *Plant Cell Environment*, 29(7): 1259-1272.
- Benelli C. 2021. Plant Cryopreservation: A Look at the Present and the Future. *Plants (Basel)*, 10(12): 2744.
- Duque P. 2011. A role for SR proteins in plant stress responses. *Plant Signal Behavior*, 6(1): 49-54.
- Fabre J., Dereuddre J. 1990. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of solanum shoot-tips. *CryoLetters*, 11: 413-426.
- Hošek P., Hoyerová K., Kiran N. S., Dobrev P. I., Zahajská L., Filepová R., Motyka V., Müller K., Kamínek M. 2020. Distinct metabolism of N-glucosides of isopentenyladenine and *trans*-zeatin determines cytokinin metabolic spectrum in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 225(6): 2423-2438.
- Jamoussi R. J., Elabbassi M. M., Jouira H. B., Hanana M., Zoghلامي N., Ghorbel A. W., Mliki A. 2014. Physiological responses of transgenic tobacco plants expressing the dehydration-responsive *RD22* gene of *Vitis vinifera* to salt stress. *Turkish Journal of Botany*, 38(2): 7.
- Kilian J., Whitehead D., Horak J., Wanke D., Weinl S., Batistic O., D'Angelo C., Bornberg-Bauer E., Kudla J., Harter K. 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant Journal*, 50(2): 347-363.
- Kim S. H., Kim J. Y., Kim S. J., An K. S., An G., Kim S. R. 2007. Isolation of cold stress-responsive genes in the reproductive organs, and characterization of the *OsLti6b* gene from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reproduction*, 26(7): 1097-1110.
- Kim J. Y., Song J. T., Seo H. S. 2017. COP1 regulates plant growth and development in response to light at the post-translational level. *Journal of Experimental Botany*, 68(17): 4737-4748.
- Lambardi M., Fabbri A., Caccavale A. 2000. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. *Plant Cell Reproduction*, 19(3): 213-218.
- Li Y., Shi Y., Li M., Fu D., Wu S., Li J., Gong Z., Liu H., Yang S. 2021. The CRY2-COP1-HY5-BBX7/8 module regulates blue light-dependent cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 33(11): 3555-3573.

- Lissarre M., Ohta M., Sato A., Miura K. 2010. Cold-responsive gene regulation during cold acclimation in plants. *Plant Signal Behavior*, 5(8): 948-952.
- Liu Y., Huang T., Lin S., Jiang Y. 2023. Programmed Cooling and Vitrification Method Applied to the Germplasm Preservation of Eriobotrya Plants. *HortScience*, 58(2): 164-169.
- Maestrini P., Cavallini A., Rizzo M., Giordani T., Bernardi R., Durante M., Natali L. 2009. Isolation and expression analysis of low temperature-induced genes in white poplar (*Populus alba*). *Journal of Plant Physiology*, 166(14): 1544-1556.
- Matsumoto T. 2017. Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. *Reviews in Agricultural Science*, 5: 13-20.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-47.
- Paul S., Wildhagen H., Janz D., Teichmann T., Hänsch R., Polle A. 2016. Tissue- and Cell-Specific Cytokinin Activity in *Populus* × *canescens* Monitored by ARR5::GUS Reporter Lines in Summer and Winter. *Frontiers in Plant Science*, 7:652. doi: 10.3389/fpls.2016.00652.
- Pettengill E. A., Parmentier-Line C., Coleman G. D. 2012. Evaluation of qPCR reference genes in two genotypes of *Populus* for use in photoperiod and low-temperature studies. *BMC Research Notes* 5, 366. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-366>.
- Pokorná E., Faltus M., Máchová M., Zámečník J., Fulín M. 2020. Grey poplar explant acclimation to improve the dehydration tolerance and cryopreservation. *Biologia Plantarum*, 64: 119-128.
- Pokorná E., Faltus M., Máchová P., Semerák M., Zámečník J. 2018. Metodika pro bezpečné uchování *in vitro* kultur topolu šedého (*Populus* × *canescens* Aiton Sm.) v ultranízkých teplotách. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 24 s. Lesnický průvodce 5/2018.
- Pokorná E., Buriánek V., Máchová P., Dostál M., Komárková M. 2017. Nové poznatky o reprodukci topolu šedého v *in vitro* podmínkách. *Zprávy lesnického výzkumu*, 62 (4): 213-223.
- Razmi Z., Hamidi R., Pirasteh-Anosheh, H. 2013. Seed germination and seedling growth of three sorghum (*Sorghum bicolor* L.) genotypes as affected by low temperatures. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 2(20): 851-856.

- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reproduction*, 9: 30-33.
- Sakai A. 1995. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: *Cryopreservation of plant germplasm*, 1. Ed. Y. S. Bajaj. Berlin, Springer: 53-69. *Biotechnology in agriculture and Forestry*, 32.
- Tuskan G. A., Difazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts A. a kol. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313(5793):1596-1604.
- Welling A., Palva E. T. 2006. Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiologia Plantarum*, 127(2): 167-181.
- Zamecnik J., Faltus M., Bilavcik A. 2021. Vitrification Solutions for Plant Cryopreservation: Modification and Properties. *Plants (Basel)*, 10(12): 2623. doi: 10.3390/plants10122623.
- Zažímalová E., Murphy A. S., Yang H., Hoyerová K., Hošek P. 2010. Auxin transporters – why so many? *Cold Spring Harbor Perspective Biology*, 2 (3):a001552. doi: 10.1101/cshperspect.a001552.
- Žižková E., Komárková M., Máchová P., Cvrčková H. 2017. Metoda rychlé regenerace topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) s využitím *in vitro* organogeneze. *Lesnický průvodce*, 5: 20 s.

9.2 Seznam publikací, které předcházely metodice

- Pokorná E., Komárková M., Cvrčková H., Máchová P., Bajajová H. 2020. Využití biochemických metod pro identifikaci topolů odolných vůči suchu. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 28 s. *Lesnický průvodce* 1/2020.
- Pokorná E., Faltus M., Máchová M., Zámečník J., Fulín M. 2020. Grey poplar explant acclimation to improve the dehydration tolerance and cryopreservation. *Biologia Plantarum*, 64: 119-128.
- Pokorná E., Faltus M., Máchová P., Semerák M., Zámečník J. 2018. Metodika pro bezpečné uchování *in vitro* kultur topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) v ultranízkých teplotách. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 24 s. *Lesnický průvodce* 5/2018.

- POKORNÁ E., BURIÁNEK V., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL M., KOMÁRKOVÁ M. 2017. Nové poznatky o reprodukci topolu šedého v *in vitro* podmínkách. *Zprávy lesnického výzkumu*, 62 (4): 213-223.
- ŽIŽKOVÁ E., KOMÁRKOVÁ M., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H. 2017. Metoda rychlé regenerace topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) s využitím *in vitro* organogeneze. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 20 s. Lesnický průvodce 5/2017

METHODOLOGICAL PROCEDURE USING MOLECULAR METHODS TO ASSESS PHYSIOLOGICAL STATE OF GREY POPLAR (*POPULUS* × *CANESCENS* AITON SM.) DURING CRYOPRESERVATION

Summary

This method is focused on the characterization of the physiological state of grey poplar (*Populus* × *canescens* Aiton Sm.) explants during precultivation period which is an important part of the cryopreservation process. We described in detail a combination of several biotechnologies leading to the evaluation of plant metabolism affected by low temperature and sucrose treatment. Micropropagation technique using dormant buds for establishing grey poplar primary cultures was shortly presented. Reaching sufficient amounts of explants *via* four weeks interval of multiplication enable us to continue with precultivation treatment of grey poplar explants (Figure 1). Three precultivation conditions involved in the cryopreservation protocol were followed: 1) Variant A – explants were cultivated in control conditions (24 °C, 16 h/8 h photoperiod), 2) Variant B and Variant C – explants were cold hardened at 6 °C for 6 weeks under 16 h/8 h photoperiod whereas explants of Variant C were additionally treated with an application of 0.7 M sucrose (final concentration in each culture vessel was 0.3 M sucrose) last two weeks of cold hardening. After the treatments samples from each Variant (A - C) were rapidly frozen and prepared for molecular analysis including necessary steps such as RNA isolation, transcription, and mRNA translation to cDNA. Gene expression analysis was run with attention to genes involved in responses of plant acclimatization to low temperature (Table 1). Our results showed that gene expression levels are significantly changed under both pretreatment conditions in comparison to the control treatment (Figure 2). We observed similar trends in relative gene expression profiles in most of the followed genes (*ARR5*, *HSP70*, *PIN1*, *RNPS1*, and *LTI6*) where explants of Variant B showed a higher increase in their expression levels than explants of Variant C. The only exception represents gene *COPI* involved in the control of light signaling by mediating the ubiquitination and proteasomal degradation of photoreceptors and other various light-responsive proteins, which decreased in both Variant B and C. The highest relative gene expression levels exhibited gene *LTI6*, which is directly involved in response to cold treatment in other plant systems. Our results suggest that grey poplar explants cultivated in low temperature for six weeks (Variant B) and

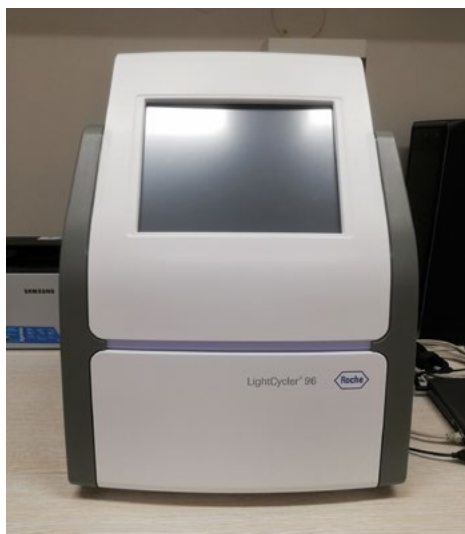
simultaneously in sucrose solution for two weeks (Variant C) showed significant changes in the regulation of gene activities. A comparison of Variant B and Variant C revealed that the effect of cold hardening has a more pronounced effect on gene expression in Variant B what should be related to a higher level of cold stress than in Variant C, thus leading to a worse physiological state of plants. Our suggestion is supported by previously obtained results where we reached the highest regrowth levels in grey poplar shoot tips after simultaneous cold and osmotic pretreatments (Pokorná et al. 2020).

We suppose that our investigated method will serve as a valuable source of information for the evaluation of the physiological state of plants use not only in cryopreservation process.

PŘÍLOHY



Příloha 1: Topol šedý (*Populus xcanescens* Aiton Sm.), genotyp TPE111, lokalita Dyjákovice, revír Jaroslavice, LS Znojmo.



Příloha 2: Příprava vzorků topolu šedého (*Populus xcanescens* Aiton Sm.) pro stanovení relativní exprese genů.



Výzkumný ústav
lesního hospodářství
a myslivosti, v. v. i.

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 2/2023