



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Metodický postup selekce genotypů hořčice s vyšší odolností stresu suchem

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1910225 – Zavedení a využití komplexních biotechnologických postupů k charakterizaci a tvorbě genových zdrojů a dalších výchozích materiálů hořčice pro potravinářské a pícní účely



Autoři: Ing. Mgr. Ondřej Hejna, Ph.D., Ing. Marie Pichová, Ing. Irena Hoštičková, Ph.D., prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice, 2023

**Metodický postup selekce genotypů hořčice s vyšší odolností stresu
suchem**

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1910225 – Zavedení a využití komplexních biotechnologických postupů k charakterizaci a tvorbě genových zdrojů a dalších výchozích materiálů hořčice pro potravinářské a pícní účely

Autoři: Ing. Mgr. Ondřej Hejna, Ph.D., Ing. Marie Pichová, Ing. Irena Hoštičková,
Ph.D., prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice, 2023

Metodický postup selekce genotypů hořčice s vyšší odolností stresu suchem

hejna@fzt.jcu.cz

Katedra genetiky a biotechnologií, FZT JU v Českých Budějovicích, České Budějovice

www.fzt.jcu.cz, <http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Vypracováno za podpory projektu NAZV QK1910225 – Zavedení a využití komplexních biotechnologických postupů k charakterizaci a tvorbě genových zdrojů a dalších výchozích materiálů hořčice pro potravinářské a pícní účely

Recenzenty metodiky byli:

doc. Ing. František Hnilička, Ph.D. – FAPPZ ČZU v Praze
Ing Petr Zehnálek – ÚKZÚZ Hradec nad Svitavou

Text: ©2023 Hejna O. a kol.
Vydáno bez jazykové úpravy
ISBN: 978-80-7694-039-0

ISBN 978-80-7694-039-0



9 788076 940390

Obsah

Uvedení problému a cíl metodiky	7
Vlastní popis metodiky.....	8
Úvod.....	8
Metodický postup hodnocení reakce rostlin hořčic na stres suchem.....	11
Příprava rostlinného materiálu	11
Izolace a sekvenování RNA	12
Bioinformatické zpracování dat	12
RT-qPCR analýza	14
Analýza rezonance povrchového plasmonu – detekce a kvantifikace stresových proteinů.....	16
Srovnání novosti postupů	19
Popis uplatnění metodiky.....	19
Ekonomické aspekty	20
Seznam použité literatury	21
Seznam publikací předcházející metodice.....	25

Uvedení problému a cíl metodiky

Šlechtění na odolnost vůči abiotickým stresorům je v současné době jedním z nosných témat šlechtění rostlin. V důsledku klimatických změn je působení abiotického stresu na zemědělské plodiny stále více umocňováno. Některé oblasti jsou téměř každý rok postiženy škodlivým suchem (Nakashima et al. 2014). Proto se šlechtění na odolnost či toleranci k těmto nepříznivým faktorům prostředí stává aktuální i v našich klimatických podmínkách. Abiotické stresory obvykle vedou k dehydrataci buněk, která vede k poškození buněk a nakonec pletiv (Shinozaki et al. 2003). Proto si rostliny vyvinuly obranné mechanismy na ochranu proteinů a buněčných struktur proti tomuto poškození. Reakce rostliny zahrnuje změny na morfologické, fyziologické, biochemické a molekulární úrovni (Wang et al. 2003) vedoucí k omezení růstu, stárnutí, poklesu výnosu, a dokonce k úhynu rostlin (Ye et al. 2017). Znalost obranných mechanismů je důležitá pro šlechtění nových odrůd odolných vůči suchu.

Ve šlechtitelských programech byla v případě selekce rostlin s vyšší odolností abiotickým stresům pozornost po dlouhé období věnována převážně jen popisným morfologickým a fyziologickým parametrům. Pro efektivní selekci genotypů s odlišnou strategií adaptace na sucho je třeba najít vhodný nástroj, který by umožňoval relativně rychlý a levný, ale spolehlivý výběr rostlin/genetických zdrojů s vyšší tolerancí k abiotickému stresu suchem. Pro hodnocení tolerance rostlin ke stresu lze sice využít např. hodnocení fenotypové reakce (vadnutí) na nedostatek vody, ale tyto metody neposkytují hodnověrné výsledky. Řada studií se zabývá možnostmi hodnocení reakce na stres na molekulární úrovni, na úrovni genu či proteinu. Pro analýzu reakce genů zapojených do odpovědi na stres je možné použít metodu RT-PCR a tedy hodnocení genové exprese příslušných genů. Dále je možné využít metod založených na identifikaci dehydrinů pomocí SDS-PAGE či Western blotu. Jako alternativa k těmto metodám je stále častěji využívána metoda SPR (surface plasmon resonance, rezonance povrchového plasmonu), moderní optická metoda pro studium nativních proteinů ve velmi nízkých koncentracích, a to i za přítomnosti jiných látek.

Cílem metodiky bylo představit komplexní přístup založený na identifikaci genů spojených s reakcí rostliny na stres suchem, hodnocení odolnosti k suchu na základě analýzy exprese vybraných genů a hodnocení akumulace sledovaných proteinů. Metodický postup je uveden na příkladu experimentu s vybranými kontrastními genotypy hořčic.

Vlastní popis metodiky

Úvod

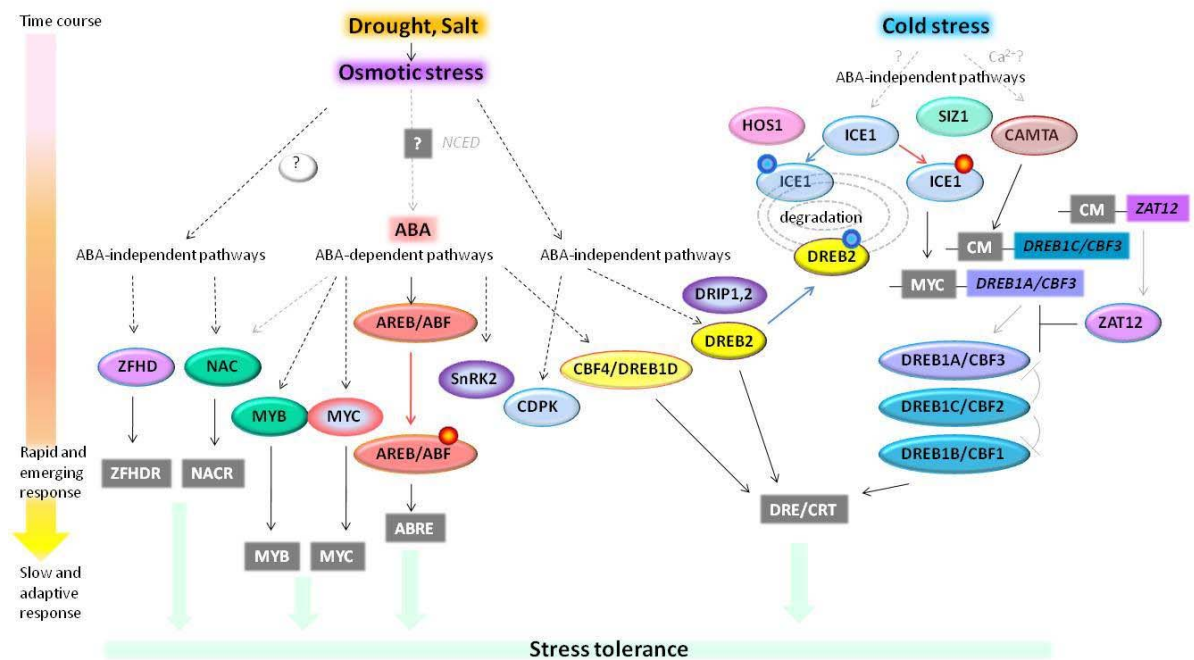
Klíčovým faktorem, který zásadně ovlivňuje růst a vývoj rostlin a tím snižuje jejich životaschopnost je abiotický stres. Jedná se hlavně o sucho, zasolení, horko, chlad, mráz, dostupnost živin, intenzita světla, ozón a nedostatek kyslíku. U odrůd zemědělsky využívaných plodin brání plnému využití jejich genetického potenciálu, ať už přímo inhibicí metabolických procesů či nepřímo vyvolaným osmotickým, oxidativním a jiným stresem (Chinnusamy et al. 2007). Reakcí rostliny je řada morfologických, fyziologických, biochemických a molekulárních změn (Wang et al. 2003), které vzhledem k energetické a substrátové náročnosti mohou omezovat růst, zrychlovat senescenci, snižovat výnos a mohou způsobit i smrt (Ye et al. 2017). V současnosti je věnována pozornost předpovědím globálních klimatických změn, které by měly přinést zvýšení průměrné roční teploty a častější výkyvy počasí do extrémů (Suzuki et al. 2014). Dá se očekávat, že působení abiotického stresu na zemědělské plodiny bude dále umocňováno, a proto je aktuální šlechtění na odolnost k těmto nepříznivým faktorům prostředí. U řady plodin je šlechtění na suchovzdornost nejvýznamnějším šlechtitelským cílem. Pro úspěšné šlechtění nových, odolných odrůd je důležitá zejména znalost obranných mechanismů. Jedním z těchto obranných mechanismů je aklimatizace, v jejímž průběhu dochází k indukci nebo naopak represi transkripce genů, které jsou spojeny s akumulací stresových proteinů (Örvar et al., 2000).

Reakce rostliny na stres suchem

Sucho je hlavním abiotickým stresorem a má velmi závažné účinky na růst rostlin. Rostliny vyvinuly mnoho vývojových a fyziologických mechanismů k přečkání období sucha, např. zkrácení jejich životního cyklu, eliminace ztrát vody zavřením průduchů či zesílením kutikuly, zefektivnění příjmu vody delšími a silnějšími kořeny, akumulací osmoprotektantů, antioxidantů a lapačů volných radikálů (Wang et al. 2017). Fyziologická reakce na stres suchem bývá velmi rychlá a je řízena rostlinným hormonem – kyselinou abscisovou (ABA), která působí jako klíčový prostředník v odpovědi na abiotický stres. Reguluje fyziologické reakce, expresi genů zapojených v odpovědi na osmotický stres a může utlumit růst (Kim et al. 2012). Vodní deficit spouští biosyntézu ABA, její akumulaci a distribuci xylémem do celé rostliny (Wilkinson a Davies 2002). ABA snižuje ztráty vody tím, že zavře průduchy a zamezí jejich znovuotevření. Modulace průduchové štěrbin je spojená se souborem buněčných biochemických procesů – aktivací G-proteinů (Coursol et al. 2003), produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) (Pei et al. 2000), syntézou oxidu

dusnatého (Bright et al. 2006), zvyšováním cytosolického pH, zvyšováním obsahu vápenatých kationtů, a to jak vtokem přes plasmatickou membránu, tak uvolňováním z cytosolických rezerv (Pei et al. 2000), proteinovou fosforylací i defosforylací a přeskupením cytoskeletu (Hwang a Lee 2001). Výsledkem těchto událostí je otevření iontových kanálů a odtok draselných, chloridových a malátových iontů ze svěracích buněk, a tím uzavření průduchu a zamezení jeho znovuotevření (Li et al. 2006).

Jako „osmosenzor“ byl identifikován transmembránový histidin kinázový receptor (ATHK1) a s ním spojené proteiny (Wohlbach et al. 2008). Aktivace a regulace genů je řízena kinázami a fosfatázami (např. MAPK) (Thirunavukkarasu et al. 2017). Dočasné zvýšení koncentrace vápenatých iontů v cytosolu, které v reakci na stres (nejen suchem) působí jako druzí poslové, zprostředkovává zapojení různých signálních drah (Kaur a Gupta 2005), dochází k aktivaci Ca²⁺ vazebných proteinů – calmodulinů, calmodulinům podobných proteinů, calcineurin-B podobných proteinů a proteinových kináz závislých na Ca²⁺(CDPK) výsledkem jejichž působení je aktivace exprese genů (Klimecka a Muszynska 2007).



Signální dráhy aktivující geny zapojené v reakci na abiotický stres (Hirayama and Shinozaki, 2010)

V reakci na stres suchem se používá exprese funkčních genů, mezi které patří např. geny kódující enzymy, které syntetizují osmoprotektanty (adc, BADH-1, codA, COX, CMO, Osm1, P5CS) (Amudha and Balasubramani 2011). Dalším typem exprimovaných funkčních proteinů jsou LEA (Late Embryogenesis Abundant)

proteiny (Ling et al. 2016) a proteiny, které chrání proti oxidaci kyslíkovými radikály (např. glutathion peroxidáza, superoxid dismutáza, askorbát peroxidáza a glutathion reduktáza (Amudha a Balasubramani 2011).

LEA proteiny jsou představovány skupinou hydrofilních proteinů, které jsou akumulovány v embryích ve stádiu dozrávání semene (Bies-Ethève et al. 2008; Hundertmark a Hinch 2008; Oliveira et al. 2007) a v době osmotického stresu, dehydratace a stresu extrémními teplotami vegetativních částí rostliny (Bies-Ethève et al. 2008; Bray 1997; Garay-Arroyo et al. 2000; Hoekstra et al. 2001; Hundertmark a Hinch 2008; Ingram a Bartels 1996; Ling et al. 2016). Jejich zvýšená exprese v podmínkách vodního deficitu u rostlin a kvasinek byla zmíněna v mnoha publikacích (Imai et al. 1996; Swire-Clark a Marcotte 1999; Xu et al. 1996; Zhang et al. 2000).

Jednou ze skupin LEA proteinů jsou dehydriny. Dehydriny jsou hydrofilní a termostabilní proteiny (Rurek 2010) prakticky všudypřítomné v rámci nahosemenných i krytosemenných rostlin (Close 1996), kapradin, mechů, řas a sinic (Close 1997). Tento fakt ukazuje, že z hlediska evoluce se jedná o konzervativní proteiny (Liu et al. 2017). Molekulární hmotnost těchto proteinů se pohybuje v širokém rozmezí 9 – 200 kD (Ouellet et al. 1993). Typickým znakem je konzervativní doména zvaná „K-segment“, která se nachází v minimálně v 1 až 11 kopiích blízko C-konci molekuly (Close 1997). K-segment je na lysin bohatá aminokyselinová sekvence (EKK GIM E/DKI KEK LPG), která plní antioxidantní, chaperonovou a proti krystalům ledu ochrannou funkci (Koag et al. 2009). Jejich účast v reakci na abiotický stres byla prokázána např. u růží (Haimi et al. 2017; Ouyang et al. 2019), břízy (Tatarinova et al. 2018), ječmene a pšenice (Kosová et al. 2011), paprik (Chen et al. 2015) či řepky (Jelínková et al. 2014, 2016; Urban et al. 2013). Pravděpodobný mechanismus účinku je založen na funkci dehydrinů jako molekulárních chaperonů, které interagují s povrchem membrány, s jinými proteiny nebo nukleovými kyselinami, a tím zabraňují jejich denaturaci (Graether a Boddington 2014; Hanin et al. 2011; Liu et al. 2017). Ve vodném prostředí dehydriny zaujímají konformaci neuspořádaného řetězce tvořící maximum vodíkových můstků s okolními molekulami vody, a zároveň co nejméně intramolekulárních vodíkových můstků. Při nedostatku vody zaujímá K-segment α -helikální konformaci, dochází k přeskupení vodíkových můstků, k navázání dehydrinu na povrch částečně dehydratovaného proteinu. Tímto způsobem je zamezeno další ztrátě vody, která by vedla k jeho denaturaci (Ingram a Bartels 1996).

Metodický postup hodnocení reakce rostlin hořčic na stres suchem

Příprava rostlinného materiálu

Pro účely modelového experimentu byl stres suchem v laboratorním stresovém experimentu navozen pomocí PEGu na měsíc starých rostlinách *Brassica juncea*, odrůda „PUSABOLD“. Pomocí PEGu lze přesně simulovat podmínky nedostatku vody – stresu suchem a nastavit podmínky pro analýzu exprese genů zapojených do reakce na stres suchem.

Schéma stresového experimentu:

- semena byla uložena na povrch perlitu do sadbovačů
- kultivace po dobu 4 týdnů pod umělým osvětlením s převahou modrého spektra s 12hodinovou fotoperiodou (jinak dochází k stimulaci tvorby květů ještě před čtvrtým týdnem)
- zálivka konstantní do poloviny výšky sadbovače dvousložkovým hydroponickým hnojivem Jungle garden base + Jungle garden add na listovou zeleninu
- po 4 týdnech vyměněn roztok hydroponického hnojiva za roztok hnojiva a PEGu 6000, tak aby celková koncentrace PEGu snížila dostupnost vody pro rostlin osmotický tlak $-1,0\text{MPa}$
- odběry byly provedeny před výměnou roztoku jako kontrola a následně v časových rozestupech 30 minut po dobu 3 hodin
- každý vzorek byl tvořen odběrem třetího pravého listu z 10 rostlin do tekutého dusíku
- extrakce celkové RNA trizolem a odeslání na RNA-seq s polyA selekcí, párové čtení, 40 milionů readů na vzorek

Při přípravě experimentu se vychází z předpokladu, že malá skupina genů bude mít odlišnou expresi mezi časem nula a ostatními časovými intervaly, tyto geny budou podrobeny validaci pomocí Real-time PCR.

V rámci experimentu bylo využito 21 rostlin *Brassica juncea*, odrůda „PUSABOLD“, které byly pěstovány v hydroponickém roztoku za kontrolovaných podmínek s teplotním režimem den/noc $22^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$. Osvětlení bylo zajištěno pomocí plnospektrálních LED s intenzitou $250\text{ mikromol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ a 12hodinovou periodou. Když byly všechny rostliny staré 4 týdny, odebrali jsme ze třech rostlin listy, které byly okamžitě přeneseny do kapalného dusíku. Po prvním vzorku byl nutriční roztok vyměněn za hydroponický roztok s polyetylglýkolem PEG6000 o koncentraci

snižující osmotický tlak o -1,0 mPa. Tímto způsobem byla výrazně snížena schopnost rostlin přijímat vodu. Další vzorky byly odebírány stejným způsobem každých 30 minut po dobu tří hodin:

Schéma odběru vzorků:

bj0 0 minut
bj30 po 30 minutách
bj60 po 60 minutách
bj90 po 90 minutách
bj120 po 120 minutách
bj150 po 150 minutách
bj180 po 180 minutách

Izolace a sekvenování RNA

Celková RNA byla extrahována pomocí činidla TRIzol (Invitrogen). Po precipitaci byla RNA purifikována pomocí Qiagen's RNeasy kit s štěpením DNázou na koloně podle pokynů výrobce. Purifikované vzorky RNA byly rozpuštěny v diethylpyrokarbonátem ošetřené deionizované vodě a koncentrace nukleových kyselin byla přibližně stanovena pomocí NANODROPU. Sekvenování sedmi vzorků bylo zadáno společnosti MACROGEN, která využila sekvenátory Illumina, NovaSeq s párovým čtením o velikosti fragmentů 150 bází.

Bioinformatické zpracování dat

V prvním kroku byla provedena kvalita dat pomocí softwaru FASTQC. Žádný ze vzorků nevykazoval výrazně nekvalitní data, nicméně bylo nutné provést určitou filtraci sekvencí. Dle výrobce sekvenátorů Illumina byly dohledány sekvenační adaptory:

R1 AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA
R2 AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

Pomocí programu Cutadapt byly v přečtených sekvencích hledány sekvence adaptorů a pokud byly nalezeny, sekvence byla oříznuta. Dále byl tento program využit k odstranění nekvalitně přečtených míst (phead score < 30) a oříznutí N bází. V posledním kroku byla kontrola filtrovaných dat opět ověřena programem Cutadapt. Všechny vzorky splňovaly potřebnou úroveň kvality pro další bioinformatické zpracování.

Mapování sekvenovaných fragmentů na referenční transkriptom

Sekvence všech genů v genomu *Brassica juncea* byly získány z databáze BRAD dostupné na stránkách <http://brassicadb.cn/#/GeneSequence/>. Tento transkriptom byl použit jako referenční sekvence pro rekonstrukci našich genů. K tomuto účelu byl využit program HISAT2, který pro každý jednotlivý vzorek namapoval fragmenty, a tím rekonstruoval konkrétní geny v našich vzorcích. Zároveň bylo mapování využito k odhadu exprese všech genů v transkriptomu pro jednotlivé vzorky (časové body experimentu). Pro každý vzorek byla dosažena vysoká míra (> 90 %) úspěšně namapovaných fragmentů:

Bj0	15854712	91,39 %
Bj30	16874303	91,38 %
Bj60	20370392	91,42 %
Bj90	20257411	91,18 %
Bj120	20286631	91,61 %
Bj150	20558448	91,22 %
Bj180	20909097	91,71 %

Expresní analýza

Na základě mapování sekvenovaných fragmentů byla provedena expresní analýza transkriptomu. Tato analýza genové exprese porovnává úroveň exprese všech genů a může nám pomoci identifikovat molekulární základ fenotypových rozdílů a vybrat cíle genové exprese pro další hlubší analýzu. V našem případě hledáme genovou expresi genů odezvy na sucho. Pro nalezení genových expresí byl použit program StringTie, který generuje odhady exprese ze souborů SAM/BAM generovaných HISAT2. StringTie byl použit v režimu „pouze reference“ a analyzoval pouze známé sekvence genů v rámci dříve zmíněné databáze. Odhady exprese genů byly vyjádřeny v hodnotách FPKM (Fragments Per Kilo base per Million).

Analýza diferenciální exprese

Tato analýza běžně známá pod zkratkou DGE a hodnotí rozdíly v množství genových transkriptů v transkriptomu mezi jednotlivými vzorky, v našem případě mezi jednotlivými časovými body odběru. První odběr vzorek bj0 by považován na kontrolní bod, který reprezentoval normální podmínky bez stresu suchem. Ostatní vzorky bj30 – bj180 pak stresované rostliny s odběry po 30 minutách. Obecně lze předpokládat, že některé geny v transkriptomu budou vlivem sucha aktivovány. U

této skupiny genů předpokládáme aktivní reakci na stres suchem, druhá skupina genů naopak expresi snižuje, aby se minimalizovala jejich aktivita a spotřeba zásobních zdrojů a energie obecně.

Výstupní data z expresní analýzy zpracované pomocí programu StringTie byla následně zpracována pomocí knihovny v programu R edgeR, která slouží k odhalení signifikantně exprimovaných genů v časové intervalu. Konkrétně se analýza snaží pro každý gen vygenerovat polynomickou funkci, která by co nejvíce vystihovala změnu exprese daného genu v čase. Hranice signifikance byla stanovena na 0,01.

Skupina nejvíce signifikantních genů v reakci na stres suchem:

BjuA014759	1.1561813257631E-10
BjuA038679	3.71537893740294E-10
BjuB012117	3.82223840840778E-10
BjuA005103	1.2685171564746E-09
BjuB013435	2.63538837469765E-09
BjuA036656	2.76720084343354E-09
BjuB048885	2.81602087954972E-09
BjuA035904	3.26261965747097E-09
BjuB005448	5.14502381113882E-09
BjuA019676	5.64316513230974E-09

Vybraná skupina genů byla dále hodnocena následnými analýzami a exprese v jednotlivých bodech byla ověřena pomocí RT-qPCR.

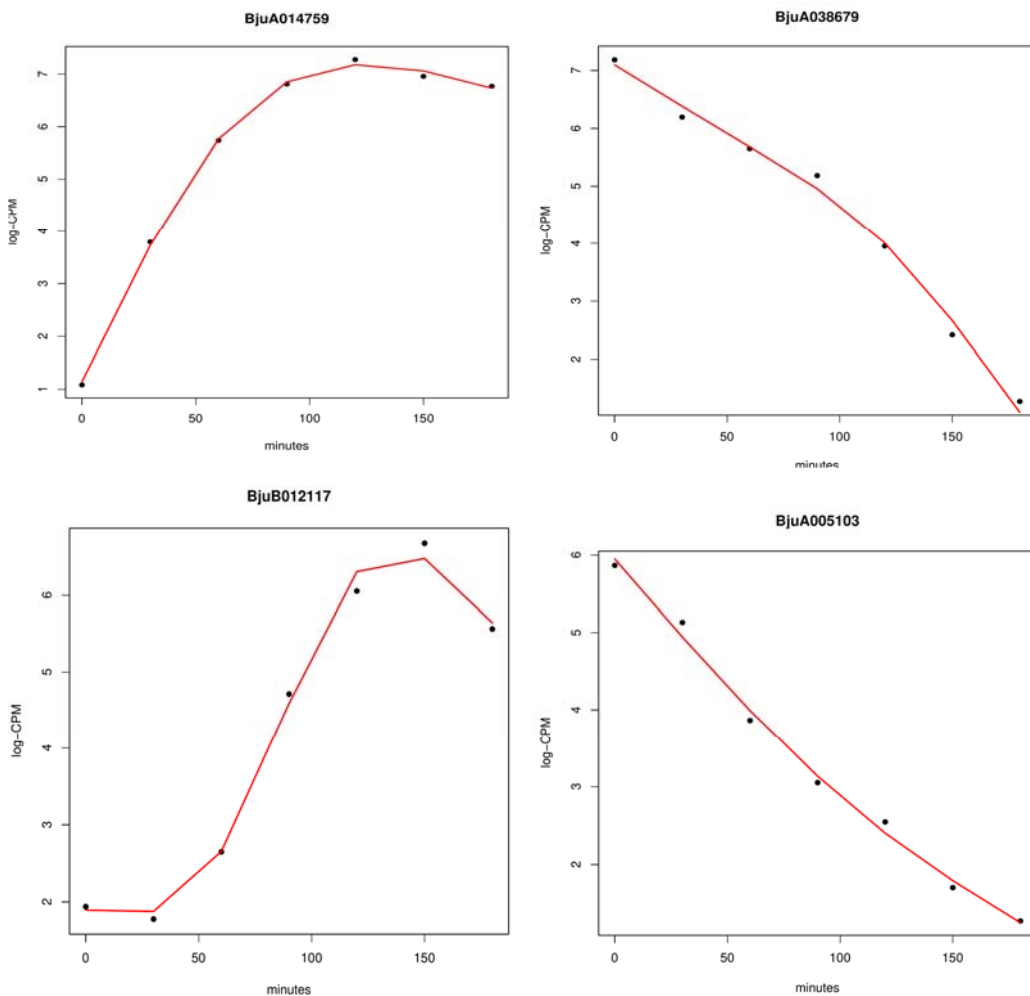
RT-qPCR analýza

RNA byla extrahována pomocí TRI Reagentu (Ambion) ze 100 mg rostlinného pletiva homogenizovaného ve třecí misce s kapalným dusíkem a dále byla zbavena zbytkové DNA pomocí kitu DNA-freeTMKit (Ambion) podle doporučení výrobce. Vzorky RNA byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -80°C. Následně byla pomocí přístroje Biospec Nano (Shimadzu) spektrofotometricky (OD260) změřena koncentrace a kvalita (poměr OD260/280 a OD260/230) získané RNA, která byla naředěna na jednotnou koncentraci 50 ng/μl. cDNA byla nasyntetizována pomocí kitu Standart Reverse Transcription System (Promega) postupem doporučeným výrobcem a skladována při -20°C.

Kvantitativní PCR (qPCR) byla provedena s použitím Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) na přístroji QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) v 96-jamkové destičce za podmínek doporučených výrobcem a to ve třech technických opakováních pro každý vzorek. Relativní exprese genu byla vypočtena podle metody $\Delta\Delta CT$ - threshold cycle (Livak, Schmittgen, 2001). Specifita reakce byla ověřena pomocí analýzy křivky tání. Mezi měřené vzorky byla pro zařazena i negativní kontrola, která neobsahovala templátovou cDNA. Jako referenční gen byl použit BnActin.

Primery pro studované geny byly navrženy v programu Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research) a Geneious (Biomatters ApS). Jejich specifita byla dále testována pomocí programu Geneious (Biomatters ApS) a Vector NTI (Thermo Fisher Scientific) a BLAST (NCBI). Získaná data byla zpracována pomocí softwaru Microsoft Excell a Statistica.

Ukázky exprese některých genů:



Použité přístroje a pomůcky:

- chladič box a termoska na kapalný dusík
- hlubokomrazicí box -80°C
- autokláv
- magnetická míchačka
- analytické váhy
- filtrační papír nebo papír typu Whatman 3MM
- 90mm Petriho misky
- pinzeta
- kultivační box/fytotron

Chemikálie:

- kapalný dusík
- polyethylenglykol 6000
- destilovaná voda
- chloramin T

Analýza rezonance povrchového plasmonu – detekce a kvantifikace stresových proteinů

Termostabilní proteiny byly izolovány z listového pletiva, které bylo homogenizováno pomocí kapalného dusíku v třecí misce. 250 mg vzorku bylo smícháno s 1 ml extrakčního pufru (20 mM Tris-HCl, pH=7,5 + 0,5 M NaCl), vortexováno a poté centrifugováno při 14 000 x g při 4°C po dobu 20 minut. Odebraný supernatant byl zahříván po dobu 15 minut na 100°C a poté 10 minut chlazen na ledu. Následovala centrifugace při 14 000 x g při 4°C po dobu 20 minut. Odebraný supernatant byl skladován při -20°C. Před vlastním měřením byly vzorky ředěny v poměru 1:200 v 10mM PBS pufru (pH=7,4), který byl využit také jako nosný pufr.

Před vlastním měřením jsou vzorky ředěny v poměru 1:200 v 10mM PBS pufru (pH=7,4), který je využit také jako nosný pufr. Pro vlastní SPRi analýzu je použit komerčně dodávaný biočip CS-LD (Horiba Scientific, France), který obsahuje chemickou vrstvu obsahující funkční skupiny vhodné pro navázání protilátky. Protilátka anti-Dehydrin (Agrisera, Sweden) je naředěna 10mM PBS pufr

(pH 7,4) v koncentraci 1:10 000 a je naspotována na biočip, který je následně vyblokován etanolaminem a saturován 1% BSA.

Po této proceduře je biočip s imobilizovanou protilátkou vložen do systému OpenPlex SPRi (Horiba Scientific, France), zaplaven 20mM Tris-HCl pufrém pH 7,5 (pracovní pufr) a je vytvořen plasmon. Měření SPRi je prováděno v pevném úhlu a vlnové délce. Je proměřováno pět spotů s protilátkou a pět spotů referenčních (povrch biočipu bez protilátky).

Vzorky jsou před kontaktem s povrchem biočipu padesátkrát zředěny pracovním pufrém. Průtok je nastaven na 50 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Reflexivita (%) získaná na referenčních místech je odečtena od signálu zjištěného na protilátce pro každý vzorek.

Po změření odezvy každého vzorku je biočip regenerován 1% SDS a znovu saturován 1% BSA.

Použité přístroje a pomůcky:

- přístroj pro SPR analýzu - např. OpenPlex SPRi (Horiba Scientific, France)
- sada automatických pipet
- vortex
- analytické váhy
- magnetická míchačka
- pH metr
- mrazák -20 °C
- mikrocentrifugační zkumavky
- biočip – např. CS-LD (Horiba Scientific, France)
- chladič box a termoska na kapalný dusík
- hlubokomrazicí box -80 °C
- porcelánová třecí miska
- centrifuga s možností chlazení
- třepací termoblok
- výrobce ledu
- mikrocentrifugační zkumavky

Chemikálie:

- nosný pufr = 10mM PBS pufr pH=7,4
- pracovní pufr = 20mM Tris-HCl pufr pH 7,5
- specifická protilátka - anti-Dehydrin (Agrisera, Sweden)
- etanolamin
- 1% BSA
- 1% SDS
- kapalný dusík
- extrakční pufr (20mM Tris-HCl, pH=7,5, 0,5M NaCl)
- destilovaná voda

Srovnání novosti postupů

Předkládanou metodiku s názvem “Metodický postup selekce genotypů hořčice s vyšší odolností stresu suchem“ lze hodnotit jako novou metodiku, neboť v současné době není šlechtitelské praxi k dispozici ucelená metodika pro identifikaci genů spojených s reakcí na stres suchem, analýzu jejich exprese a kvantifikaci dehydrinů/stresových proteinů pomocí metody rezonance povrchového plazmonu. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích. Komplexní metodický postup tedy k dispozici není.

V literatuře je popsána řada genů, které mohou být zapojeny do stresové reakce. Postup, který je uveden v této metodice naproti tomu vychází z analýzy transkriptomu, identifikaci klíčových genů řídících daný fenotypový projev – v tomto případě reakce na stres suchem – a validaci těchto kandidátních příčinných genů pomocí RT-qPCR. Dále je uveden metodický postup kvantifikace cílových proteinů pomocí moderní optické metody SPR. Limity metod představuje požadavek na specifické přístrojové vybavení, dostupnost protilátky a know-how pracovníků zpracovávajících experimentální data. Předkládaná metodika pak popisuje všechny kroky analýzy od kultivace rostlin, provedení stresového experimentu, odběru vzorku, izolaci a analýzu RNA a bílkovin po vlastní RT-qPCR a SPR analýzu tak, aby bylo dosaženo optimálního výsledku.

Popis uplatnění metodiky

Využití metodiky pro identifikaci genů zapojených do reakce na stres suchem, detekci a kvantifikaci stresových proteinů, např. dehydrinů je možné ve šlechtitelských laboratořích či v laboratořích, které se zabývají molekulárně-biologickými analýzami a detekcí proteinů. Metodika v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části jsou uvedeny přesné protokoly od přípravy odběru materiálu, izolaci a analýzu RNA a bílkovin po vlastní RT-qPCR a SPR analýzu.

Tato metodika byla vyvinuta a optimalizována pro přesnou a spolehlivou detekci genů a stresových proteinů a výběr rostlin s adekvátní reakcí na stres. Právě možnost cíleného výběru šlechtitelských materiálů s vyšší tolerancí k abiotickému stresu suchem je naprosto klíčová pro úspěšné šlechtění rostlin, které budou poskytovat optimální výnos a kvalitu i podmínkách klimatické změny a nedostatku vody. Tato metodika pak může umožnit přenos znalostí a postupů z akademických pracovišť do běžného provozu např. šlechtitelských laboratoří.

Uživatelé metodiky jsou výzkumná pracoviště, laboratoře šlechtitelských firem, které mohou dle svých laboratorních možností využít analýzy pro rozšíření portfolia svých postupů a služeb. Metodika bude uplatněna prostřednictvím šlechtitelské firmy OSEVA PRO s.r.o. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

Ekonomické aspekty

Analýzy popisované v této metodice mají značný ekonomický význam z pohledu šlechtitelských pracovišť. V důsledku rychle postupující klimatické změny se šlechtění na odolnost či toleranci k abiotickému stresu suchem stává vysoce aktuální a celosvětově nejvýznamnějším šlechtitelským cílem. Ve šlechtitelských programech je nutné pro selekci genotypů s odlišnou strategií adaptace na sucho třeba najít vhodný nástroj, který by umožňoval spolehlivý výběr rostlin/genetických zdrojů s vyšší tolerancí k abiotickému stresu suchem.

Pomocí navrženého metodického postupu lze objektivně vyhodnotit jaké geny jsou zapojeny do reakce na stres, lze vyhodnotit úroveň jejich exprese a akumulaci stresových proteinů a selektovat genotypy s odlišnou strategií adaptace na sucho. Právě možnost cíleného výběru šlechtitelských materiálů s vyšší tolerancí k abiotickému stresu suchem je naprosto klíčová pro úspěšné šlechtění rostlin, které budou poskytovat optimální výnos a kvalitu i podmínkách klimatické změny.

Pro provedení analýz je potřebné disponovat vybavenou molekulárně-biologickou laboratoří, kde klíčovým přístrojovým vybavením je přístroj pro provedení RT-qPCR a SPR analýzy. Náklady na analýzu pak představují pořízení chemikálií, čipu a protilátky. Typová cena analýzy je pak na úrovni 3000 Kč. K této ceně je nutné započítat náklady na pořízení přístrojového vybavení, odpisy a energie. Pro molekulárně biologickou laboratoř uvedený metodický postup může znamenat zajímavé rozšíření portfolia nabízených služeb a ekonomický přínos v podobě zisku z prováděných analýz. V širším kontextu pak zcela zásadním přínosem pro šlechtitelské pracoviště je novošlechtění/odrůda s vyšší tolerancí k abiotickému stresu suchem.

Seznam použité literatury

- Amudha, J., and Balasubramani, G. (2011). Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. *BMBR* 6, 31–58.
- Bies-Ethève, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R., and Delseny, M. (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 67, 107–124.
- Bray, E.A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2, 48–54.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., and Neill, S.J. (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* 45, 113–122.
- Close, T.J. (1996). Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* 97, 795–803.
- Close, T.J. (1997). Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* 100, 291–296.
- Coursol, S., Fan, L.M., Le Stunff, H., Spiegel, S., Gilroy, S., and Assmann, S.M. (2003). Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* 423, 651–654.
- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garciarrubio, A., and Covarrubias, A.A. (2000). Highly Hydrophilic Proteins in Prokaryotes and Eukaryotes Are Common during Conditions of Water Deficit. *J. Biol. Chem.* 275, 5668–5674.
- Graether, S.P., and Boddington, K.F. (2014). Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Front. Plant Sci.* 5.
- Haimi, P., Vinskienė, J., Stepulaitienė, I., Baniulis, D., Stanienė, G., Šikšnianienė, J.B., and Rugienius, R. (2017). Patterns of low temperature induced accumulation of dehydrins in *Rosaceae* crops—Evidence for post-translational modification in apple. *Journal of Plant Physiology* 218, 175–181.
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., and Masmoudi, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signal Behav* 6, 1503–1509.
- Hirayama, T., and Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.* 61, 1041–1052.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Tetteroo, F.A.A., and Wolkers, W.F. (2001). Induction of Desiccation Tolerance in Plant Somatic Embryos: How Exclusive Is the Protective Role of Sugars? *Cryobiology* 43, 140–150.
- Hundertmark, M., and Hinch, D.K. (2008). LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9, 118.

- Hwang, J.U., and Lee, Y. (2001). Abscisic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiol.* 125, 2120–2128.
- Chen, R., Jing, H., Guo, W., Wang, S.-B., Ma, F., Pan, B.-G., and Gong, Z.-H. (2015). Silencing of dehydrin CaDHN1 diminishes tolerance to multiple abiotic stresses in *Capsicum annuum* L. *Plant Cell Rep* 34, 2189–2200.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, J.-K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12, 444–451.
- Imai, R., Chang, L., Ohta, A., Bray, E.A., and Takagi, M. (1996). A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 170, 243–248.
- Ingram, J., and Bartels, D. (1996). The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 377–403.
- Jelínková, I., Keshavaiah, C., Prášil, I.T., and Urban, M.O. (2014). Komparativní analýza exprese na úrovni genů/proteinů indukovaných v podmínkách abiotického stresu u řepky olejky. *Úroda, vědecká příloha* 187–190.
- Jelínková, I., Chickaputaiah, C., Čurn, V., Urban, M.O., and Klíma, M. (2016). Analýza exprese genů indukovaných stresem chladem u řepky. *Úroda, vědecká příloha* 149–152.
- Kaur, N., and Gupta, A.K. (2005). Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. *Curr. Sci.* 88, 1771–1780.
- Kim, H., Hwang, H., Hong, J.-W., Lee, Y.-N., Ahn, I.P., Yoon, I.S., Yoo, S.-D., Lee, S., Lee, S.C., and Kim, B.-G. (2012). A rice orthologue of the ABA receptor, OsPYL/RCAR5, is a positive regulator of the ABA signal transduction pathway in seed germination and early seedling growth. *J. Exp. Bot.* 63, 1013–1024.
- Klimecka, M., and Muszynska, G. (2007). Structure and functions of plant calciumdependent protein kinases. *Acta Biochim. Pol.* 54, 219–233.
- Koag, M.-C., Wilkens, S., Fenton, R.D., Resnik, J., Vo, E., and Close, T.J. (2009). The K-Segment of Maize DHN1 Mediates Binding to Anionic Phospholipid Vesicles and Concomitant Structural Changes. *Plant Physiol.* 150, 1503–1514.
- Kosová, K., Vítámvás, P., and Prášil, I.T. (2011). Expression of dehydrins in wheat and barley under different temperatures. *Plant Science* 180, 46–52.
- Li, S., Assmann, S.M., and Albert, R. (2006). Predicting essential components of signal transduction networks: A dynamic model of guard cell abscisic acid signaling. *PLoS. Biol.* 4, 1732–1748.
- Ling, H., Zeng, X., and Guo, S. (2016). Functional insights into the late embryogenesis abundant (LEA) protein family from *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) using an *Escherichia coli* system. *Sci Rep* 6, 39693.

- Liu, Y., Song, Q., Li, D., Yang, X., and Li, D. (2017). Multifunctional Roles of Plant Dehydrins in Response to Environmental Stresses. *Front. Plant Sci.* 8, 1018.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-8.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2014). The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Front. Plant Sci.* 5, 170.
- Oliveira, E., Amara, I., Bellido, D., Odena, M.A., Domínguez, E., Pagès, M., and Goday, A. (2007). LC-MSMS identification of *Arabidopsis thaliana* heat-stable seed proteins: Enriching for LEA-type proteins by acid treatment. *J. Mass Spectrom.* 42, 1485–1495.
- Örvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F., and Dhindsa, R.S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal* 23, 785–794.
- Ouellet, F., Houde, M., and Sarhan, F. (1993). Purification, Characterization and cDNA Cloning of the 200 kDa Protein Induced by Cold Acclimation in Wheat. *Plant Cell Physiol* 34, 59–65.
- Ouyang, L., Leus, L., De Keyser, E., and Van Labeke, M.-C. (2019). Seasonal changes in cold hardiness and carbohydrate metabolism in four garden rose cultivars. *J. Plant Physiol.* 232, 188–199.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406, 731–734.
- Rurek, M. (2010). Diverse accumulation of several dehydrin-like proteins in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), *Arabidopsis thaliana* and yellow lupin (*Lupinus luteus*) mitochondria under cold and heat stress. *BMC Plant Biol.* 10, 181.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 410–417.
- Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E., and Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol* 203, 32–43.
- Swire-Clark, G.A., and Marcotte, W.R. (1999). The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol* 39, 117–128.
- Tatarinova, T.D., Vetchinnikova, L.V., Bubyakina, V.V., Perk, A.A., Ponomarev, A.G., Vasilieva, I.V., Serebryakova, O.S., and Petrova, N.E. (2018). Dehydrins in

- Buds of Main Birch Species under Conditions of Karelia. *Russ J Plant Physiol* 65, 295–301.
- Thirunavukkarasu, N., Sharma, R., Singh, N., Shiriga, K., Mohan, S., Mittal, S., Mittal, S., Mallikarjuna, M.G., Rao, A.R., Dash, P.K., et al. (2017). Genomewide Expression and Functional Interactions of Genes under Drought Stress in Maize. *Int. J. Genomics* 2568706.
- Urban, M.O., Klima, M., Vitamvas, P., Vasek, J., Hilgert-Delgado, A.A., and Kucera, V. (2013). Significant relationships among frost tolerance and net photosynthetic rate, water use efficiency and dehydrin accumulation in cold-treated winter oilseed rapes. *Journal of Plant Physiology* 170, 1600–1608.
- Wang, P., Yang, C., Chen, H., Song, C., Zhang, X., and Wang, D. (2017). Transcriptomic basis for drought-resistance in *Brassica napus* L. *Scientific Reports* 7, 40532.
- Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1–14.
- Wilkinson, S., and Davies, W.J. (2002). ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ.* 25, 195–210.
- Wohlbach, D.J., Quirino, B.F., and Sussman, M.R. (2008). Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell* 20, 1101–1117.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T., and Wu, R. (1996). Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice. *Plant Physiol.* 110, 249–257.
- Ye, Y., Ding, Y., Jiang, Q., Wang, F., Sun, J., and Zhu, C. (2017). The role of receptorlike protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant Cell Reports* 36, 235–242.
- Zhang, L., Ohta, A., Takagi, M., and Imai, R. (2000). Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. *J. Biochem.* 127, 611–616.

Seznam publikací předcházející metodice

- Jelínková, I., Keshavaiah, C., Prášil, I.T., and Urban, M.O. (2014). Komparativní analýza exprese na úrovni genů/proteinů indukovaných v podmínkách abiotického stresu u řepky olejky. *Úroda, vědecká příloha* 187–190.
- Jelínková, I., Chickaputaiah, C., Čurn, V., Urban, M.O., and Klíma, M. (2016). Analýza exprese genů indukovaných stresem chladem u řepky. *Úroda, vědecká příloha* 149–152.
- Hoštičková I., Vráblová M., Hejna O., Čurn V. (2021): Využití metody SPRi pro studium reakce rostlin máku na stres suchem. *Úroda* 12, roč. LXIX, vědecká příloha, s. 145-148. ISSN 0139-6013.
- Kundrátová K., Bartas M., Pečinka P., Hejna O., Rychlá A., Čurn V., Červeň J. (2021): Transcriptomic and Proteomic Analysis of Drought Stress Response in Opium Poppy Plants during the First Week of Germination. *Plants* 10: 1878.
- Čurn V., Jozová E., Rost M., Rychlá A., Stehlíková D. (2022): Analýza genetické struktury odrůd hořčice bílé pomocí Bayesovských metod modelování. *Úroda* 12, roč. LXIX, vědecká příloha, ISSN 0139-6013. s. 17-24.

Název: Hejna O. a kol. (2023): Metodický postup selekce genotypů hořčice s vyšší odolností stresu suchem

Autorský kolektiv: Ing. Mgr. Ondřej Hejna, Ph.D.
Ing. Marie Pichová
Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D..

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská a technologická
Studentská 1668
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 21.12.2023 (č.j. MZE-74214/2023-13132; osvědčení č. UKZUZ 213658/2023), jako certifikovaná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: hejna@fzt.jcu.cz

ISBN: 978-80-7694-039-0

