

VYUŽITÍ BIOCHEMICKÝCH METOD PRO IDENTIFIKACI TOPOLŮ ODOLNÝCH VŮČI SUCHU

LESNICKÝ PRŮVODCE



Ing. EVA POKORNÁ, Ph.D.
a kol.

Certifikované
METODIKY
PRO PRAXI

1/2020

Využití biochemických metod pro identifikaci topolů odolných vůči suchu

Certifikovaná metodika

Ing. Eva Pokorná, Ph.D.

Mgr. Martina Komárková, Ph.D.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Hana Bajajová

Strnady 2020

Lesnický průvodce 1/2020

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 978-80-7417-201-4

ISSN 0862-7657

USE OF BIOCHEMICAL METHODS FOR IDENTIFICATION OF DROUGHT RESISTANT POPLAR SPECIES

Abstract

As drought is currently one of a major environmental constraint with negative impact on forest productivity a high attention is devoted to this topic in this methodology. The work describes biochemical approaches focusing on woody plant samples preparation subsequently used for gene expression analysis at the mRNA level. Representative from deciduous species, black poplar (*Populus nigra* L.) cv. P797 was selected to identify its drought tolerance based on searching for drought responsive genes. The methodological procedures are in details described step by step focusing on isolation of total RNA in a good quality and quantity from poplar leaves, reaction leading to reverse transcription of mRNA into cDNA and quantitative real-time gene expression analysis (qPCR) following responses of several genes involved in drought stress. Obtained data from qPCR analysis enable us to evaluate and determine genes identifying tolerance to limited environmental conditions in poplar samples.

Key words: black poplar (*Populus nigra* L.); mRNA; qPCR; drought stress

Oponenti: Ing. Vlasta Knorová, Ministerstvo zemědělství ČR

Ing. Jiří Fišera, Lesy České republiky, s. p.

RNDr. Lenka Závěská Drábková, Ph.D., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Adresy autorů:

Ing. Eva Pokorná, Ph.D.

Mgr. Martina Komárková, Ph.D.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Hana Bajajová

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

Strnady 136

Jíloviště 252 02

email: pokorna@vulhm.cz

komarkova@vulhm.cz

cvrckova@vulhm.cz

machova@vulhm.cz

bajajova@vulhm.cz

Obsah

1	ÚVOD	7
2	CÍL METODIKY	10
3	VLASTNÍ POPIS METODIKY	11
	a) Princip metody	11
	b) Materiální a technické zabezpečení	11
	c) Izolace RNA a odstranění genomové DNA	12
	d) Reverzní transkripce (RT-PCR)	14
	e) qPCR a vyhodnocení naměřených dat	15
	f) Identifikace topolů odolných vůči suchu	16
4	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	21
5	POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	22
6	EKONOMICKÉ ASPEKTY	23
7	DEDIKACE	23
8	LITERATURA	24
	8.1 Seznam použité související literatury	24
	8.2 Seznam publikací, které předcházely metodice	27
	SUMMARY	28

Seznam použitých zkratk:

RNA	ribonucleic acid (ribonukleová 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

Topol černý (*Populus nigra* L.) je z ekologického hlediska významnou lesní dřevinou s výskytem po celé Evropě (vyjímaje severní část) a nachází se od Sibíře až po Altaj. Za jeho jižní hranici výskytu se považuje v Rusku rozhraní mezi stepí a lesem, ojediněle zasahuje i do pohoří (v Alpách až do 1300 m). Vyskytuje se v blízkosti řek, na půdách písčitých a písčitohlinitých i střídavě zamokřených. Má větší požadavky na vodu, avšak neprospívá na těžkých, neprovzdušněných jílovitých půdách glejového charakteru s vysokou hladinou stagnující podzemní vody. Je dřevinou světlomilnou a dobře odolává znečištění ovzduší. Dřevo topolu černého se používá k výrobě dřív (KLIKA 1947; BURIÁNEK a NOVOTNÝ 2016). V oblasti výzkumu rostlinné biologie patří topoly mezi modelové dřeviny nejen z hlediska relativně malé velikosti genomu (485 ± 10 Mb), v roce 2006 byl prvně popsán genom topolu chlupatoplodého (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) v práci TUSKAN et al., ale i pro svůj rychlý růst, možnost vegetativního rozmnožování řízků, jednoduchou manipulaci při pokusech i snadněji dostupné a aplikovatelné genetické metody. V současné době jsou různé kultivary topolů často vybírány za modelové dřeviny pro studium adaptace k podmínkám prostředí, sekundárního růstu a proměnlivosti jejich fenotypových znaků (CHU et al. 2014). Studiu genomu byla rovněž věnována pozornost u topolu černého. Například NANJO et al. (2007) uveřejnili sekvence 19 841 obohacených cDNA fragmentů získaných pomocí metod funkční genomiky. S využitím metody charakterizace jedno-nukleotidových polymorfismů (tzv. SNPs metoda) rovněž zaznamenali FAIVRE-RAMPANT et al. (2016) u topolu černého 1 878 727 SNPs referenčních sekvencí. Ve vztahu k evoluci uveřejnili ZHANG et al. (2019) rozsáhlou studii, v níž srovnávali SNP sekvence genomu 10 druhů topolů zahrnující i topol černý. Vzhledem ke genetické příbuznosti jednotlivých druhů topolů (MOTTL 1998) jsou geneticky charakterizovány i další zástupci topolů, např. topol bílý (*Populus alba* L.), topol osika (*Populus tremula* L.) a topol americký (*Populus deltoides* W. Bartram ex Marshall) (HE et al. 2019; KERSTEN et al. 2016).

Lesní dřeviny využívají různé strategie jak se vypořádat se stresem způsobeným suchem, k nimž patří i zapojení molekulárních mechanismů (FOX et al. 2018). YILDIRIM and KAYA (2017) sledovali odezvu na sucho u tří genotypů topolu černého, u nichž identifikovali 10 641 transkriptů výhradně regulovaných suchem, zejména spojených s programovanou buněčnou smrtí a senescencí listů. Do skupiny genů regulovaných suchem patří rovněž i transkripční faktory (např. HICHRİ et al. 2016), geny spojené s metabolismem rostlinných hormonů (např. ZHAO et al.

2016), metabolismem cukrů (např. WILDHAGEN et al. 2018) a mnohé jiné, včetně konkrétních zástupců vybraných genů jako jsou např. dehydriny (HANIN et al. 2011) nebo cyklin dependentní kinázy (MAGWANGA et al. 2018). Avšak v přírodních podmínkách jsou lesní společenstva často vystavena několika různým abiotickým stresovým faktorům současně působících na celkový stav porostů. Kombinaci působení sucha a vysokých teplot u různých rostlinných druhů shrnují ve své práci ZANDALINAS et al. (2018), kteří upozorňují na potřebu zajistit plodiny se zvýšenou tolerancí k suchu i teplotnímu stresu, a celosvětově tak snížit negativní vlivy klimatických změn na zemědělskou produkci. V námi uvedené metodice je působení ostatních faktorů významně eliminováno založením nádobového pokusu v řízených kontrolovaných podmínkách. Sledování odezvy rostlin topolu černého na působení sucha bylo umožněno striktním dodržáním postupu, kdy rostliny nebyly zalévány, přičemž získané výsledky byly porovnány s pravidelně zalévanými kontrolními rostlinami.

K získání informací o regulaci vybraných genů se nejčastěji používá metoda stanovení relativní exprese genů (qPCR) na úrovni syntézy mRNA, která je založena na měření zvýšené fluorescence vyzařované specifickým barvivem DNA během PCR. Výchozí matricí pro stanovení transkripčních hladin sledovaných genů je komplementární DNA (cDNA), která vzniká reverzní transkripcí (RT-PCR) mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA). Prvotní krok k výše zmíněné analýze studia exprese genů je vyzolování celkové RNA ze vzorku, která však nemůže sloužit jako templát pro PCR. RNA je tedy nejdříve převedena do cDNA retrovirovou reverzní transkriptázou a následně je amplifikována PCR se dvěma specifickými primery standartním postupem, přičemž reakce se označuje jako RT-PCR. Citlivost této metody je velmi vysoká, neboť umožňuje detekci specifické mRNA v jediné buňce. Ke stanovení hladin transkriptů v reálném čase se používá přidání barviva do PCR směsi, které fluoreskuje po navázání na dvouřetězcovou DNA. Pokud se vytvoří adekvátní množství produktu a hladina fluorescence je dostatečná, je signál (míra emitované fluorescence) zachycen přístrojem, který se bude v průběhu dalších cyklů dále zvyšovat. Pro možnost srovnání hladiny exprese mRNA v různých vzorcích je možné jako standard využít referenční gen s konstitutivní expresí, který nemění míru své exprese za testovaných podmínek (ŠMARDÁ et al. 2005). Pro stanovení relativní kvantifikace genů se využívají různé matematické přístupy, které jsou vztaženy k naměřeným hodnotám cílových genů a referenčních genů (REGIER a FREY 2010).

Biochemické metody jsou klíčovým nástrojem pro identifikaci mechanismů souvisejících s tolerancí k podmínkám sucha nejen u lesních dřevin. Topol černý, který je dnes již poměrně vzácný a na jeho původních stanovištích výskytu je často nahrazován pěstovanými kultivary topolu kanadského a dalšími hybridními topoly,

s nimiž se může i křížit (BURIÁNEK a NOVOTNÝ 2016), byl vybrán za cílovou zájmovou dřevinu určenou k popsání metodického postupu stanovení tolerantních jedinců k suchu. Předpokládáme, že zjištěné a popsané postupy budou mít značné uplatnění i pro ostatní druhy listnatých dřevin a pomohou včasné rozlišit odolné jedince k podmínkám sucha.

2 CÍL METODIKY

Cílem metodiky je popsat postup zpracování rostlinného materiálu k identifikaci jedinců topolu černého (*Populus nigra* L.) odolných k suchu. U vybraného kultivaru topolu černého cv. 797 byl představen postup získání výtěžku RNA v dostatečné kvalitě i kvantitě, která je elementární matricí pro přepis na komplementární DNA (cDNA) pomocí reakce reverzní transkripce (RT-PCR). Pro identifikaci jedinců topolu černého, odolných k suchu, byl uplatněn postup využití metody stanovení relativní exprese genů (qPCR) zapojených do odezvy na stres suchem. Nedílnou součástí metodiky je pracovní postup, který podrobněji popisuje jednotlivé kroky shrnuté v částech a) princip metody, b) materiální a technické zabezpečení, c) izolace RNA a odstranění genomové DNA, d) reverzní transkripce, e) qPCR a vyhodnocení získaných dat a f) identifikace topolů odolných vůči suchu. Metodické postupy, uplatněné pro identifikaci genů souvisejících s odezvou na stres suchem u topolu černého lze využít i pro další listnaté druhy lesních dřevin. Uvedený metodický postup jsme úspěšně vyzkoušeli např. i pro topol šedý (*Populus ×canescens* Aiton Sm.).

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

a) Princip metody

Metoda identifikace jedinců topolů odolných vůči suchu je založena na přípravě a zpracování rostlinného materiálu s využitím biochemických postupů v laboratorních podmínkách. Při odběru vzorků pro RNA analýzy je nezbytné jejich okamžité uskladnění v kapalném dusíku (-196 °C). Při zpracování vzorků je nutné dbát na udržování sterilních, případně semi-sterilních podmínek v laboratoři (očištěné pracovní plochy, nástroje a sterilní pomůcky), neboť RNA je velmi citlivá na kontaminaci všudypřítomnými ribonukleázami (RNázami), které způsobují její degradaci. Po vyzolování celkové RNA následuje přečišťující krok enzymem DNáza, který odstraňuje z izolátu RNA případnou kontaminaci genomové DNA. Navazujícími kroky jsou RT-PCR přepisující mediátorovou RNA (mRNA) na cDNA s dále následující qPCR analýzou, pomocí níž je stanovena relativní exprese cíleně sledovaných genů.

Tento princip metody se využívá již řadu let, avšak obecně platné postupy je nutné optimalizovat a modifikovat s ohledem na typ rostlinného materiálu pro možnost získání spolehlivých dat vypovídajících o fyziologickém stavu konkrétního jedince

b) Materiální a technické zabezpečení

Přístrojové vybavení:

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

Chemikálie:

Voda bez nukleáz (např. DEPC voda, Sigma-Aldrich), RNesy 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

Drobné pomůcky:

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

Požadavky na práci:

Při manipulaci s rostlinnými vzorky je nutné klást důraz na rychlost a zajištění čistoty laboratorního zázemí, aby byla s nejvyšší účinností eliminována případná kontaminace RNázami a dodržovat pravidla bezpečnosti při laboratorní práci, např. při manipulaci s kapalným dusíkem (-196 °C).

Rostlinný materiál

Výchozím materiálem pro izolaci RNA byly mladé listy topolu černého (*Populus nigra* L.) odebírané z řízkovanců z nádobového pokusu, v našem případě v letním období 2019 (konec července/ začátek srpna). Řízkovanci byli pěstováni v nádobách v místnosti s pravidelným světelným a teplotním režimem (24 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 21 °C). Čerstvě odebraný rostlinný materiál byl ihned zabalen do řádně označené aluminiové fólie a umístěn do Dewarovy nádoby s kapalným dusíkem. Vzorky byly následně přemístěny a uchovány při -80 °C v hlubokomrazicím boxu pro navazující zpracování.

c) Izolace RNA a odstranění genomové DNA

Pro izolaci RNA byly vzorky uložené v hlubokomrazicím boxu přeneseny v Dewarově nádobě, obsahující kapalný dusík, do laboratoře, kde proběhla homogenizace sterilním tloučkem ve sterilní třecí misce za neustálého doplňování kapalného dusíku. Na analytických vahách jsme odvážili přibližně 100 mg čerstvé hmotnosti vzorku (doporučení výrobcem používaného izolačního kitu pro získání maximálního výtěžku celkové RNA) do 1,5ml sterilní Eppendorf centrifugační mikrozkušavky safe-lock vhodné pro manipulaci v tekutém dusíku. Takto připravené vzorky jsou

uchovávány v kapalném dusíku do dalšího zpracování. Ze zhomogenizovaných vzorků topolu černého byla izolována RNA podle protokolu uvedeného výrobcem u komerčně dostupného izolačního kitu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

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

1. Ke každému zhomogenizovanému vzorku napipetujeme 450 µl pufru RLT, který jsme si předem připravili ve směsi 10 µl β-mercaptoethanolu/ 1 ml pufru RLT (provedeno v digestoři).
2. Vzorky zvortexujeme a umístíme je do suché digitální lázně s nastavenou teplotou 56 °C po dobu 3 min.
3. Celý obsah přepipetujeme do fialových kolonek (QIAshredder spin column) umístěných ve 2ml mikrocentrifugačních zkumavkách (collection tube). Vzorky centrifugujeme 2 min při rychlosti 14 000 otáček za minutu (rpm). Vzniklý lyzát přepipetujeme do nové mikrozkušavky za vysoké opatrnosti, abychom nenabrali případný pelet, a zaznamenáme si objem lyzátu.
4. K lyzátu přidáme poloviční objem ethanolu než je celkový objem lyzátu a velmi 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 mikrozkušavce (collection tube) a centrifugujeme 15 s 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 µl 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, kterou nanese přímo na membránu kolonky a centrifugujeme 1 min při rychlosti 10 000 rpm.

Čistotu a koncentraci vyizolované celkové RNA ze vzorků topolu černého neprodleně stanovíme na spektrofotometru. Vzhledem k velmi časté kontaminaci získaného izolátu RNA genomovou DNA je ihned provedeno enzymatické ošetření RNA s použitím DNA-free Kitu, u něhož je dodržen postup uvedený výrobcem.

Protokol odstranění DNA ze získané celkové RNA z rostlinných pletiv s použitím DNA-free Kitu

1. Přidáme 0,1 násobek objemu 10X DNase I pufru k získanému izolátu RNA a 1 μ l rDNase I a jemně promícháme.
2. Vzorek inkubujeme při 37 °C v digitální suché lázni 45 min.
3. Ke vzorku přidáme 0,1 násobek inaktivačního reagentu DNase Inactivation Reagent a dobře promícháme. Inkubujeme 2 min při pokojové teplotě 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, abychom nenasáli vrstvu inaktivačního reagentu.
5. Čistotu a koncentraci přečištěné RNA u vzorku topolu černého stanovíme na spektrofotometru a naměřené hodnoty si zaznamenáme.

d) Reverzní transkripce (RT-PCR)

Pro přepis RNA na komplementární DNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy a dalších reagensů byl dodržen postup uvedený výrobcem.

Protokol přepisu RNA na cDNA s použitím RNA-dependentní DNA polymerázy - Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit

1. Do 0,2ml centrifugační mikrozkušavky odpipetujeme množství vzorku obsahující 1 μ g RNA, 1 μ l oligo(dT)₁₈ primer (2,5 μ M) a doplníme do finálního objemu 13 μ l DEPC vodou. Směs lehce protřepeme mezi prsty, krátce stočíme na stolní minicentrifuze a vložíme do PCR termocykleru na 10 min při 65 °C. Po ukončení denaturace RNA okamžitě přendáme vzorek na led.
2. Následně ke vzorku připipetujeme 4 μ l reakčního pufru, 0,5 μ l inhibitoru RNA, 2 μ l deoxynukleotidové směsi (1 mM od každého nukleotidu) a 0,5 μ l enzy-

mu reverzní transkriptázy. Finální objem 20 µl směsi lehce protřepeme mezi prsty, stočíme na stolní minicentrifuze a vložíme do PCR termocyklieru s nastaveným cyklem: 1× 60 min/ 50 °C, 1× 5 min/ 85 °C a zastavením reakce při kontinuálně udržované teplotě 10 °C.

3. Získanou komplementární DNA 20× naředíme do 1,5ml mikrozkušavek (odpipetujeme 5 µl cDNA do 95 µl ultračisté vody). Zbývající neředěnou cDNA (15 µl) přepipetujeme do 1,5ml mikrozkušavek, které uložíme do hlubokomrazicího boxu.

e) qPCR a vyhodnocení naměřených dat

Pro kvantitativní stanovení relativní exprese cílených genů u sledovaného úseku cDNA se provádí následující modifikovaný postup uvedený výrobcem.

Protokol pro přípravu qPCR reakční směsi FastStart Essential DNA Green Master

Do 96jamkové destičky odpipetujeme 1,5 µl ultračisté vody (PCR Grade), 0,5 µl „forward“ (1 µM) a 0,5 µl „reverse“ (1 µM) PCR primeru (Tab. 1), 5 µl master mixu

Tab. 1: Vybrané sekvence primerů topolu černého (*Populus nigra* L.) použité pro qPCR.

Název genu	označení	sekvence primerů	Reference
18S ribozomální RNA	<i>18S rRNA</i>	F:AGAAACGGCTACCACATCCAA R: CCAGACTTGCCCTCCAATGG	BRENTNER et al. (2008) 4,6-trinitrotoluene (TNT)
Elongační faktor 1-α	<i>EF1</i>	F: CCACACCTGTACATTGCTG R: ACCAGCATCACCGTTCTTCAG	BASA et al. (2009)
Endochitináza 2	<i>Chitin</i>	F: TACGGCAATGTGGAAAAGC R: ATTGTGGCATGAGGGCTTTG	KIEFFER et al. (2009)
Photosystém II	<i>PhotII</i>	F: ATGGTGCTAATGTGGATGGC R: AACAGCCCAGATTAGCAAGC	HE et al. (2013)
Dehydrin 1	<i>Dhn1</i>	F:GTGATTCTGATCAGTATGGCTGA R:AATAATACTGCCCGCTGCCCTAC	KIM et al. (2012)
Glutathion-S-transferáza	<i>GST</i>	F:CTTAGCCTCGTTTTCTCTCCA R:CTTAGCCTCGTTTTCTCTCCA	GAUDET et al. (2011)

a 2,5 μ l cDNA vzorku. Směs lehce protřepeme mezi prsty, krátce stočíme na stolní minicentrifuze a vložíme do real-time PCR termocyklieru s nastaveným cyklem, který byl shodný pro všechny použité primery: preinkubace 1 \times 120 s/ 95 $^{\circ}$ C, amplifikace 45 \times 10 s/ 95 $^{\circ}$ C, 10 s/ 60 $^{\circ}$ C a 10 s/ 72 $^{\circ}$ C a denaturace 10 s/ 95 $^{\circ}$ C, 60 s/ 65 $^{\circ}$ C a 1 s/ 97 $^{\circ}$ C. Po ukončení reakce byl vzorek přemístěn na led.

Každý vzorek byl proveden ve třech biologických opakováních, současně byl v analýze změřen vzorek označený jako negativní kontrola (obsahující všechny komponenty reakce s výjimkou cDNA), přičemž pro každé biologické opakování vzorku byly změřeny dva provozní geny 18S ribosomální RNA (18S rRNA) a elongační faktor 1- α (EF1).

Stanovení relativních hladin sledovaných genů bylo provedeno na základě výpočtu $2^{\Delta\Delta C_p}$ (HOŠEK et al. 2019).

Výše uvedený protokol obsahuje drobné modifikace zejména v upravení objemů jednotlivých složek reakční směsi, které však neměly vliv na celkový výsledek reakce.

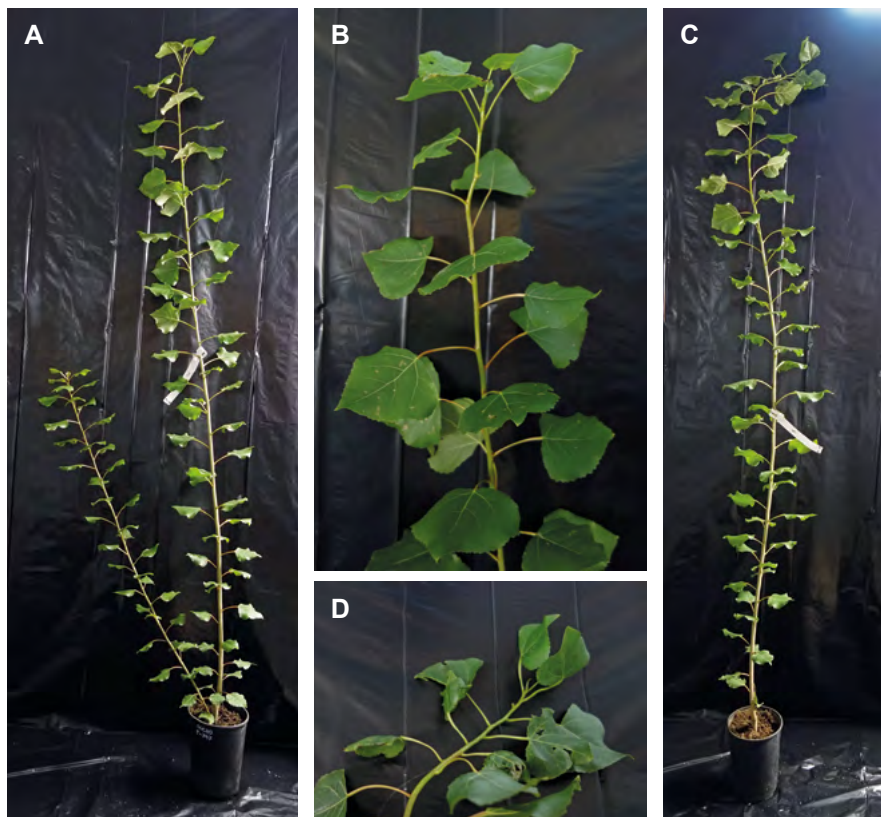
f) Identifikace topolů odolných vůči suchu

Identifikace topolů odolných vůči suchu probíhala na základě získaných dat z nádobového pokusu (Obr. 1), kdy byly odebrány listy topolu černého (cv. P797) v den zahájení pokusu (kontrola – plně zalité rostliny) a v jeho průběhu (3. – 6. den). Ode dne zahájení pokusu nebyly dále již rostliny zalévány. Vzorky z rostlin byly odebrány ve třech biologických opakováních.

Na základě získaných kvalitativních a kvantitativních parametrů celkové RNA, změřených v laboratoři spektrofotometrem, které byly s větší přesností ověřeny v externí laboratoři (Gene Core, Biotechnologický ústav AV ČR, Vestec, ČR), byly pro qPCR analýzu vybrány jen vzorky s vysokou hodnotou integrity RNA (RIN > 6,0; Obr. 2A). Při nižší hodnotě RIN bylo patrné poškození RNA (Obr. 2B), což by znehodnotilo i výsledky následně prováděné qPCR analýzy. Pro analýzy a následné vyhodnocení byla v popisovaném modelovém příkladu použita v některých případech jen dvě biologická opakování.

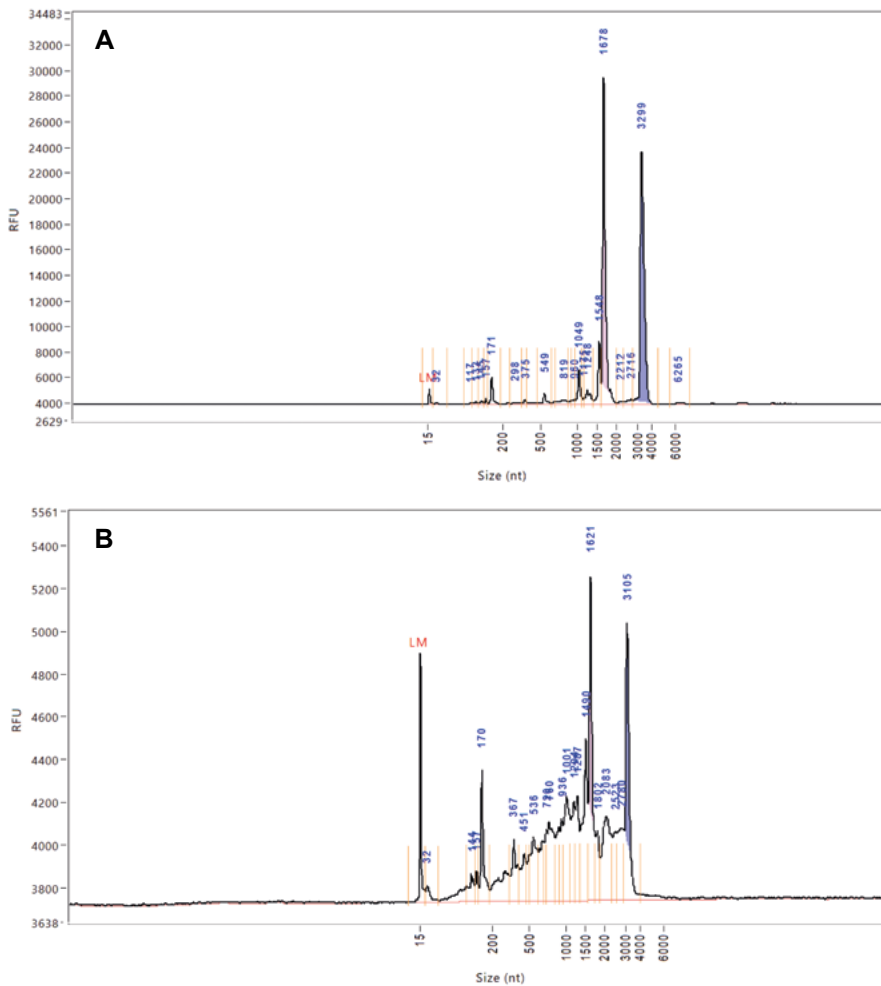
U sledovaných jedinců topolu černého cv. 797 byl zjištěn dynamický průběh změn transkriptů mRNA u všech sledovaných genů v průběhu jednotlivých dnů pokusu (Obr. 3). Významný postupně klesající trend byl zaznamenán u genu *fotosystém II* ("*PhotII*"), který úzce souvisí s primárním metabolismem rostlin. V práci RALPH et

al. (2008) zjistili, že proteiny fotosystému II úzce souvisí nejen s fotosyntézou, ale i s enzymy biosyntézy thiaminu a malát dehydrogenázou, několika tzv. „zinc finger“ transkripčními faktory a proteiny zapojenými do stresu rostlin, jako je např. malý teplotní šok. Naše výsledky naznačují, že s delším působením sucha je hladina genu *PhotII* po 6 dnech významně snížena. Působením sucha je tedy *PhotII* významně ovlivněn a může být zvolen jako vhodný kandidátní marker pro možnou identifi-



Obr. 1: Topol černý (*Populus nigra* L.), kultivar P797 pěstovaný v nádobách. 1A – fenotyp zalévané rostliny (kontrola), 1B – detail vrcholu zalévané rostliny, 1C – fenotyp rostliny 3 dny bez závlivky, 1D – detail vrcholu rostliny 3 dny bez závlivky.

Fig. 1: Black poplar (*Populus nigra* L.), cultivar P797 cultivated in pots. 1A – phenotype of watered plant (control), 1B – detail of the water plant apical, 1C – phenotype of 3 days unwatered plant, 1D – detail of the 3 days unwatered plant apical.

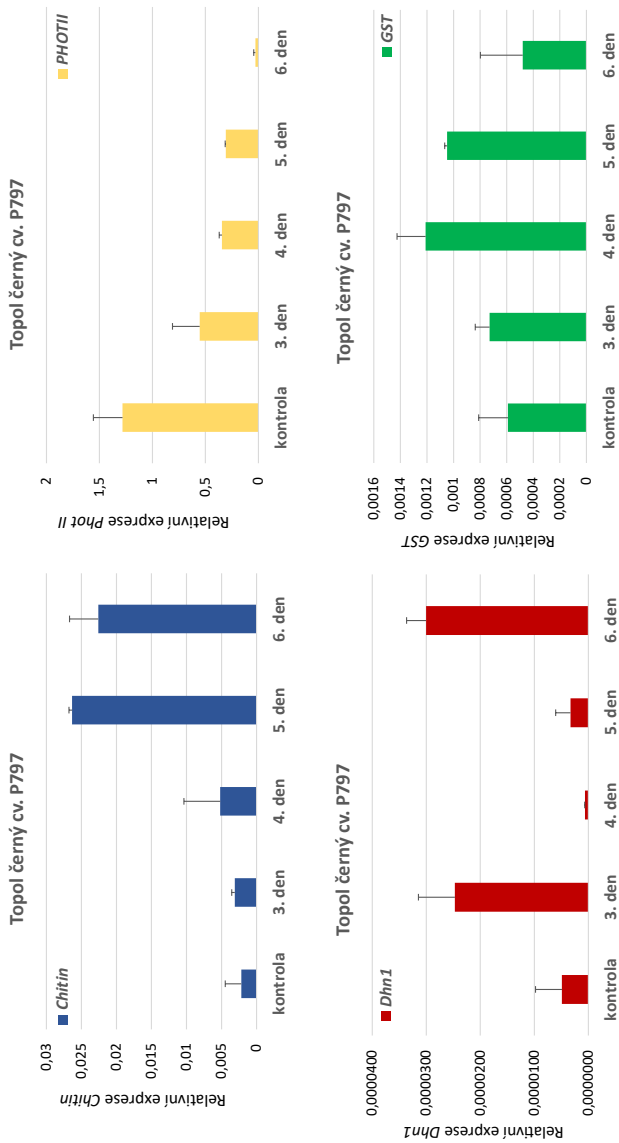


Obr. 2: Kvantifikace RNA vzorků topolu černého (*Populus nigra* L.) kultivar P797 za účelem stanovení integrity RNA (RIN RNA). 2A – příklad celkové RNA s hodnotou RIN 8,2; 2B – příklad částečně degradované celkové RNA s hodnotou RIN 4,7.

Fig. 2: Quantification of RNA in black poplar (*Populus nigra* L.) cultivar P797 samples with the aim to asses RNA integrity (RIN RNA). 2A – example of total RNA with value of RIN 8,2; 2B – example of partly degraded total RNA with value of RIN 4,7.

kaci topolů odolných vůči suchu. Stejně tak byl zjištěn jednoznačný trend u genu *Endochitináza 2* (“*Chitin*“), jehož hladiny se 5. a 6. den působením sucha významně zvýšily (Obr. 3). U genu *glutathione-S-transferáza* (*GST*) byl zaznamenán nárůst relativní exprese v průběhu 3. a 4. dne, přičemž v průběhu 5. a 6. dne pokusu došlo k jeho snížení. KIEFFER et al. (2009) shodně s našimi výsledky ve své studii uvedli, že gen *GST* patří do skupiny s časným nárůstem hladin relativní exprese. Avšak z našich výsledků je patrné, že *GST* není vhodným genem pro možnou identifikaci jedinců topolů tolerantních k podmínkám sucha. Nesouměrný nárůst vlivem působení sucha po dobu 6 dnů ve srovnání s kontrolou vykazoval gen *dehydrin 1* (“*Dhn1*“), jehož hladiny však byly velmi nízké a kolísaly (Obr. 3), a proto se domníváme, že není vhodným genem pro možnou identifikaci jedinců zasažených podmínkami sucha.

Na základě našich výsledků jsme zjistili, že se v průběhu experimentu hladiny sledovaných genů u topolu černého významně mění a je možné vybrat konkrétní kandidátní geny, které by spolehlivě charakterizovaly fyziologický stav rostlin v souvislosti s působením podmínek sucha. V našem pokusu se jedná zejména o geny *PhotII* a *Chitin*.



Obr. 3: Stanovení relativní exprese genů topolu černého (*Populus nigra* L.) kultivar P797. Sledované geny: *PhotII* – fotosystém II, *Chitin* – endochitináza 2, *GST* – glutathion-S-transferáza, *Dhn1* – dehydrin 1.

Fig. 3: Relative gene expression levels in black poplar (*Populus nigra* L.) cultivar P797. Genes of interest: *PhotII* – photosystem II, *Chitin* – endochitinase 2, *GST* – glutathion-S-transferase, *Dhn1* – dehydrin 1.

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V předložené metodice jsou propojeny znalosti a zkušenosti biochemických metod, zaměřené na získání RNA ve vysoké kvalitě, která je výchozí maticí pro navazující postupy směřující k identifikaci genů spojených s tolerancí na podmínky sucha u rychlerostoucí dřeviny topolu černého (*Populus nigra* L.). Novost námi uvedeného metodického postupu je zejména ve snadné aplikovatelnosti uvedených postupů v laboratořích, které jsou již plně vybavené přístroji, pomůckami a chemikáliemi určenými pro práci v oblasti molekulární biologie, přičemž námi získané výsledky z genetických analýz budou sloužit jako cenný zdroj informací pro přímé využití v lesnické praxi. S rozvinutím nových technologií, jako je např. sekvenování RNA (RNA-Seq), jsou v současné době dostupné databáze, kde je možné vyhledat odezvu minimálně několika stovek genů na konkrétní působení stresových podmínek, jako je sucho (např. BARGHINI et al. 2015 nebo YILDIRIM a KAYA 2017). Avšak jednotlivé studie jsou velmi specifické a unikátní, neboť se vždy liší v podmínkách pokusu, studovaným rostlinným druhem, analyzovaným rostlinným materiálem a v mnohých dalších parametrech. Ačkoliv je možné v těchto databázích vytipovat geny, případně genové rodiny spojené s podmínkami sucha, je naprosto nezbytné si je ověřit na námi zvoleném materiálu a vyspecifikovat jejich účinek v našem konkrétním uspořádání pokusu. Další nezbytností v těchto rozsáhlých transkriptomických studiích je zpětné ověření dat z RNA-Seq analýzy, což se zpravidla dokazuje qPCR analýzou pro několik vybraných genů. Proto i námi uvedený metodický postup je stále velmi aktuální i pro laboratoře, které nejsou zaměřeny na základní výzkum. Použitím námi aplikovaného metodického postupu jsme zjistili, které geny je vhodné použít k identifikaci jedinců topolů odolných vůči suchu.

5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Účelem předložené metodiky je poskytnout získané zkušenosti a poznatky z oblasti biochemických metod vyvinutých pro topol černý (*Populus nigra* L.) k identifikaci jedinců odolných k suchu. Využití poznatků, zahrnující odběr, zpracování a uchování rostlinného materiálu, izolace celkové RNA, přečištění a přepis RNA pomocí reverzní transkripce na cDNA, která je elementární pro qPCR analýzu, může být přínosným zdrojem nejen pro cílenou skupinu lidí z oboru (např. pracovníci z výzkumných a vědeckých institucí, univerzit a biotechnologických firem), ale i pro všechny, kteří se o danou problematiku zajímají, případně pracují s lesními dřevinami s možností využití laboratorního zázemí. Předpokládáme, že uvedené metodické postupy se uplatní nejen při posuzování fyziologického stavu topolů, které se vyskytují v limitujících podmínkách, ale i u jiných druhů listnatých dřevin včetně cílených genů charakterizujících jejich stav. Neboť stanovení relativní exprese hladin sledovaných genů je stále velmi využívanou metodou pro získání informace o konkrétním stavu jedince a vlivu abiotických případně biotických podmínek na něj.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice jsou odvislé od skutečnosti, jestli se zavádí zcela nová laboratoř s vybavením pro využití biochemických metod, nebo se uvedená metodika implementuje na pracovištích, kde jsou již laboratoře vybaveny přístroji a pomůckami pro práci s nukleovými kyselinami (NK). V případě, že laboratoř je plně vybavena pro práci s NK, jsou náklady na zavedení postupu dané především nákupem izolačních kitů, enzymů, chemikálií, pomůcek a spotřebního materiálu, používaných při práci. V druhém případě, kdy se zavádí zcela nový provoz laboratoře, se náklady značně navyšují o pořízení přístrojů, drobných pomůcek a chemikálií, které jsou podrobněji uvedeny výše v části 3b (Materiální a technické zabezpečení). Při pořízení přístrojového vybavení se mohou náklady pohybovat v cenové hladině 1766 tis. Kč a výše. Od nákladů na přístrojové vybavení se pak odvíjí i cena spotřebního materiálu, který bývá pro přístroje specifický.

7 DEDIKACE

Metodika byla zpracována spoluprací kolektivu autorů z Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., v rámci řešení výzkumného projektu TA ČR TJ02000217 „*Charakterizace druhů topolů a jejich odolnosti vůči suchu pomocí sekvenování nové generace*“ a za podpory Ministerstva zemědělství ČR, institucionální podpory MZE-RO0118.

8 LITERATURA

8.1 Seznam použité související literatury

- BARGHINI E., COSSU R. M., CAVALLINI A., GIORDANI T. 2015. Transcriptome analysis of response to drought in poplar interspecific hybrids. *Genomics data*, 3: 143-145.
- BASA B., SOLTÍ Á., SÁRVÁRI É., TAMÁS L. 2009. Housekeeping gene selection in poplar plants under Cd-stress: comparative study for real-time PCR normalisation. *Function Plant Biology*, 36: 1079-1087.
- BRENTNER L. B., MUKHERJI S. T., MERCHIE K. M., YOON J. M., SCHNOOR J. L. VAN AKEN B. 2008. Expression of glutathione S-transferases in poplar trees (*Populus trichocarpa*) exposed to 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Chemosphere*, 73: 657-662.
- BURIÁNEK V., NOVOTNÝ P. 2016. Metodická příručka k určování domácích druhů topolů. *Lesnický průvodce*, 11: 35 s.
- FAIVRE-RAMPANT P., ZAINA G., JORGE V., GIACOMELLO S., SEGURA V., SCALABRIN S. a kol. 2016. New resources for genetic studies in *Populus nigra*: genome-wide SNP discovery and development of a 12k infinium array. *Molecular Ecology Resources*, 16: 1023-1036.
- FOX H., DORON-FAIGENBOIM A., KELLY G., BOURSTEIN R., ATTIA Z., ZHOU J., MOSHE Y., MOSHELION M., DAVID-SCHWARTZ R. 2018. Transcriptome analysis of *Pinus halepensis* under drought stress and during recovery. *Tree Physiology*, 38: 423-441.
- GAUDET M., PIETRINI F., BERITOGNOLO I., IORI V., ZACCHINI M., MASSACCI A., MUGNOZZA G. S., SABATTI M. 2011. Intraspecific variation of physiological and molecular response to cadmium stress in *Populus nigra* L. *Tree Physiology*, 31: 1309-1318.
- HANIN M., BRINI F., EBEL C., TODA Y., TAKEDA S., MASMOUDI K. 2011. Plant dehydrins and stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 6: 1503-1509.
- HE J., LI H., LUO J., MA C., LI S., QU L., GAI Y., JIANG X., JANZ D., POLLE A., TYREE M., LUO Z. B. 2013. A transcriptomic network underlies microstructural and physiological responses to cadmium in *Populus x canescens*. *Plant Physiology*, 162: 424-439.

- HICHRI I., MUHOVSKI Y., ŽIŽKOVÁ E., DOBREV P. I., GHARBI E., FRANCO-ZORILLA J. M., LOPEZ-VIDIERO I., SOLANO R., CLIPPE ANDRÉ, ERRACHID A., MOTYKA V., LUTTS S. 2016. The *Solanum lycopersicum* WRKY3 Transcription factor *SlWRKY3* is involved in salt stress tolerance in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1343-1361.
- HOŠEK P., HOYEROVÁ K., KIRAN N. S., DOBREV P. I., ZAHAJSKÁ L., FILEPOVÁ R., MOTYKA V., MÜLLER K., KAMÍNEK M. 2019. Distinct metabolism of N-glucosides of isopentenyladenine and trans-zeatin determines cytokinin metabolic spectrum in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 225: 2423-2438.
- CHU Y., HUANG Q., ZHANG B., DING C. SU X. 2014. Expression and molecular evolution of two *DREB1* genes in black poplar (*Populus nigra*). *PLoS One*, 9: e98334.
- KERSTEN B., RAMPANT P. F., MADER M., PASLIER M. C. L., BOUNON R., BERARD A., VETTORI C., LEPLÉ J. C., FLADUNG M. 2016. Genome sequence of *Populus tremula* chloroplast and mitochondrion: implications for holistic poplar breeding. *PLoS One*, 11: e0147209.
- KIEFFER P., SCHRÖDER P., DOMMES J., HOFFMANN L., RENAUT J., HAUSMAN J. F. 2009. Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *Journal of Proteomics*, 72: 379-396.
- KIM E. C., LEE H. S., CHOI D. W. 2012. Sequence variability and expression pattern of the dehydrin gene family in *Populus alba* x *P. tremula* var. *glandulosa*. *Plant Omics Journal*, 5: 122-127.
- KLIKA J. 1947. Lesní dřeviny. Lesnická dendrologie. Československá matice lesnická v Písku: 393 s.
- MAGWANGA R. O., LU P., KIRUNGU J. N., CAI X., ZHOU Z., WANG X., DIOUF L., XU Y., HOU Y., HU Y., DONG Q., WANG K., LIU F. 2018. Whole genome analysis of cyclin dependent kinase (CDK) gene family in cotton and functional evaluation of the role of *CDKF4* gene in drought and salt stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 2625-2652.
- MOTTL J. 1998. Sortiment topolů vhodný pro krajinářské a sadovnické úpravy. In: Tábor I. (ed.): Využití topolů v sadovnické a krajinářské tvorbě. Průhonice, Výzkumný ústav okrasného zahradnictví Průhonice. *Acta Pruhoniana*: 85 s.
- NANJO T., SAKURAI T., TOTOKI Y., TOYODA A., NISHIGUCHI M., KADO T. IGASAKI T., FUTAMURA N., SEKI M., SAKAKAI Y., SHINOZAKI K., SHINOHARA K. 2007. Functional annotation of 19841 *Populus nigra* full-length enriched cDNA clones. *BMC Genomics*, 8: 448-458.

- RALPH S. G., CHUN H. J. E., COOPER D., KIRKPATRICK R., KOLOSOVA N., GUNTER L., TUSKAN G. E., DOUGLAS C. J., HOLT R. A., JONES S. J. M., MARRA M. A., BOHLMANN J. 2008. Analysis of 4,664 high-quality sequence-finished poplar full-length cDNA clones and their utility for the discovery of genes responding to insect feeding. *BMC Genomics*, 9: 57-75.
- REGIER N., FREY B. 2010. Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Molecular Biology*, 11: 57-65.
- ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTUČEK R., RŮŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita: 188 s.
- TUSKAN G. A., DIFAZIO S., JANSSON S., BOHLMANN J., GRIGORIEV I., HELLSTEN U., PUTMAN N., RALPH S., ROMBAUTS S., SALAMOV A., SCHEIN J., STERCK L., AERTS A. a kol. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Tor. & Gray). *Science*, 313: 1596-1604.
- YILDIRIM K., KAYA Z. 2017. Gene regulation network behind drought escape, avoidance and tolerance strategies in black poplar (*Populus nigra* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 115: 183-199.
- WILDHAGEN H., PAUL S., ALLWRIGHT M., SMITH H. K., MALINOWSKA M., SCHNABEL S. K. et al. 2018. Genes and gene clusters related to genotype and drought-induced variation in saccharification potential, lignin content and wood anatomical traits in *Populus nigra*. *Tree Physiology*, 38: 320-339.
- ZANDALINAS S. I., MITTER R., BALFAGÓN D., ARBONA V., GÓMEZ-CADENAS A. 2018. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum*, 162: 2-12.
- ZHANG B., ZHU W., DIAO S., WU X., LU J., DING C., SU X. 2019. The poplar pangenome provides insights into the evolutionary history of the genus. *Communications Biology*, 2: 215-223.
- ZHAO Y., CHAN Z., GAO J., XING L., CAO M., YU C., HU Y., YOU J., SHI H., ZHU Y., GONG Y., MU Z., WANG H., DENG X., WANG P., BRESSAN R. A., ZHU J. K. 2016. ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 113: 1949-1954.

7.2 Seznam publikací, které předcházely metodice

POKORNÁ E., FALTUS M., MÁCHOVÁ P., ZÁMEČNÍK J., FULÍN M. 2018. Grey poplar explant acclimation to improve the dehydration tolerance and cryoconservation. *Biologia Plantarum*, 64: 119-128.

USE OF BIOCHEMICAL METHODS FOR IDENTIFICATION OF DROUGHT RESISTANT POPLAR SPECIES

Summary

This method presents biochemical approaches leading to identification of drought resistant poplar species based on characterization of stress-inducible genes encoding proteins and enzymes involved in plant stress metabolism. We used black poplar (*Populus nigra* L.) cv. P797 as a representative deciduous species due to its easily vegetative reproduction, fast growth ability and biomass production and available genomic databases as well as literature resources. This methodology contains several protocols describing in details individual steps of total RNA isolation, removal of genomic DNA, reverse transcription and quantitative real-time gene expression analysis (qPCR), including data evaluation. For verification our method we used samples of black poplar cultivated in pots (Figure 1) for 6 days without watering the plants. Response to drought stress was followed continuously during the treatment and results were compared with watered plants (control). According to RNA integrity number (RIN) we observed in few samples low quality of RNA (Figure 2B), therefore we applied the protocols only for samples with RIN > 6.0 (Figure 2A). Obtained data from qPCR analysis enable us to evaluate and determine genes identifying tolerance in poplar to limited environmental conditions. Using this method we selected two specific candidate genes *PhotII* and *Chitin* that would reliably characterize physiological state of plants related with the effects of drought conditions (Figure 3).

In summary, we suppose that investigated biochemical method will serve as a valuable source of information for identification deciduous plant species growing under limited environmental conditions.



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

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 1/2020