

POTENCIÁL VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍCH ANALÝZ PRO GENETICKOU CHARAKTERIZACI REZISTENTNÍCH JEDINCŮ BOROVICE LESNÍ (*PINUS SYLVESTRIS* L.)

POTENTIAL OF THE USE OF MOLECULAR ANALYSES FOR GENETIC CHARACTERIZATION OF RESISTANT SCOTS PINE (*PINUS SYLVESTRIS* L.) INDIVIDUALS

EVA POKORNÁ ✉ - PAVLÍNA MÁCHOVÁ - JOHANA PECHAČOVÁ - ADAM VÉLE - MARTIN FULÍN

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

✉ e-mail: pokorna@vulhm.cz

ORCID: E. Pokorná 0000-0001-6396-768X

A. Véle 0000-0002-9141-6049

P. Máchová 0009-0002-7615-3217

M. Fulín 0009-0008-1380-846X

ABSTRACT

Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) is one of the most important economic trees with deteriorating health conditions observed in recent years. The work aimed to compare and evaluate the regulation of gene activities involved in defense mechanisms under biotic and abiotic stress conditions in a group of healthy individuals of Scots pine and individuals damaged by the pine beetle (*Phaenops cyanea*). Determination of the relative gene expression levels of twelve selected genes was carried out by qPCR analysis in samples of Scots pine needles collected at two localities, Stará Boleslav and Podbrahy. At both monitored locations we noted the same trends in the regulation of the relative gene expression profile for seven genes (*CHS*, *CH5B*, *PR_P2*, *PO12*, *PAAL*, *SUCSYN3* and *USP A*), including a significant increase in the relative gene expression level of the phenylalanine-ammonia lyase (*PAAL*) involved in the biosynthesis of flavonoids, phenylpropanoids and lignin in plants, in the group of damaged individuals compared to the control group at the locality Stará Boleslav. For both groups of samples (healthy and damaged individuals) we noticed considerable variability in the measured data related to many variable factors of the external environment and the genotype of each individual, even when comparing both habitats.

For more information see Summary at the end of the article.

Klíčová slova: borovice lesní; *Pinus sylvestris* L.; krasec borový; *Phaenops cyanea*; qPCR; stres rostlin

Key words: Scots pine; *Pinus sylvestris* L.; pine beetle; *Phaenops cyanea*; qPCR; plant stress

ÚVOD

Na území České republiky patří borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) mezi druhou nejvíce rozšířenou dřevinu s 16% podílem zastoupení v druhové skladbě lesů, rostoucí tak na celkové ploše 418 340 ha porostní půdy (Zpráva 2023). Z hlediska ekologických nároků je borovice lesní výrazně světlomilnou dřevinou, intolerantní k zastínění (s výjimkou horských ekotypů), s širokou amplitudou vlhkostních a teplotních nároků, roste v oblastech s průměrnými ročními srážkami 200–1780 mm a délkou vegetační doby 90–200 dnů. V přirozeném areálu se borovice lesní vyskytuje zejména na mělkých, sušších, chudých písčitých až kamennitých půdách, ale i na hadcích a vápencích. Na bažinných a raše-

linných půdách obvykle roste borovice lesní hůře, mnohdy až zakrsle. Z úrodnějších půd, kde vykazuje největší přírůstky, je v přirozených porostech vytlačena druhy tolerantnějšími k zastínění. Proto je borovice lesní hlavní nebo dokonce jedinou stromovitou dřevinou v oblastech, kde jiné dřeviny neobstojí. Vodu získává z větších hloubek, což umožňuje její růst i na extrémně suchých stanovištích (PILÁT 1964; MUSIL, HAMERNÍK 2007; ČÁP, NOVOTNÝ 2020).

Z ekologického i ekonomického hlediska je borovice lesní jednou z nejvýznamnějších lesních dřevin nejen ve střední Evropě, ale i v Eurasii. Vysoký obsah pryskyřice umožňuje využití odolného borového dřeva ve vodě a vlhkém prostředí, jako jsou např. vodní stavby,

čerpadla, důlní dříví, pražce, stožáry, tyče a oplocení. Při chemickém zpracování je pryskyřice využitelná na výrobu terpentýnu, kalafuny, laků, barev, leštidel, kafru a balzámu. Destilací borovicové pryskyřice se získávají silice, které mají rovněž i příznivé účinky na lidské zdraví v podobě uvolňování fytoncidních látek (např. působí proti únavě, stimulují smysly). Dřevo borovice lesní se používá také k výrobě dřevěných konstrukcí, řeziva, nábytku a obložení. Oproti tomu méně kvalitní borové dřevo se využívá na vlákno i jako zdroj paliva (BRICHTA et al. 2023; DUJKA et al. 2024).

Porosty borovice lesní jsou na území České republiky vystaveny tlakům vnějšího prostředí, např. vysokým teplotám vzduchu, nerovnoměrným a nízkým úhrnům srážek, napadení škůdci včetně nedostatečně prováděné ochrany proti nim, v důsledku čehož dochází k oslabení a často následně i k odumírání stromů (DOBBERTIN et al. 2007; LIŠKA et al. 2021). Jako následek několika period extrémně vysokých teplot v letním období roku 2015 spojených s výrazným srážkovým deficitem a poklesem hladiny podzemní vody byla u borovice lesní evidována aktivace různých druhů houbových patogenů a podkorního kambioxylofágního hmyzu (PEŠKOVÁ et al. 2016; ČHMÚ 2017). LIŠKA et al. (2016) ve své práci upozorňují na zvýšení výskytu lýkožrouta vrcholkového (*Ips acuminatus*) a krasce borového (*Phaenops cyanea*) u borovice lesní v roce 2015, kteří byli zaznamenáni na oslabených porostech v souvislosti s vlivem sucha a následným zhoršením zdravotního stavu. Trend nárůstu podkorního hmyzu v oblasti jižní a jihozápadní Moravy, ve středních a východních Čechách plynule pokračoval v následujících letech zejména v důsledku neprováděné ochrany lesa. V roce 2022 byli na Moravě mezi dominantními škůdci na borovici lesní pozorováni lýkožrout vrcholkový a lýkožrout borový (*Ips sexdentatus*), přičemž v Čechách byl kromě lýkožrouta vrcholkového zaznamenán dominantní výskyt i krasce borového (VEJPUSTKOVÁ et al. 2020; LUBOJACKÝ et al. 2022).

Byly popsány studie zabývající se sledováním vlivu nárůstu teplot a stresu způsobeným suchem nejen u modelových a hospodářsky významných druhů rostlin (např. HARB et al. 2020; HASSAN et al. 2023, LIU et al. 2023), ale i u lesních dřevin (YAO et al. 2021) s použitím metod molekulárních analýz. Při působení nepříznivých podmínek vyvolaných abiotickými a biotickými činiteli aktivuje rostlina obranné mechanismy, které způsobují fyziologické a molekulární změny (ZHANG et al. 2020). Mezi jednu z klíčových strategií rostlin, jak se přizpůsobit podmínkám působení stresu a vyrovnat se se změnami prostředí je citlivá regulace genové exprese, která závisí na řadě molekulárních mechanismů souvisejících s úlohami mediátorové RNA (mRNA) v procesech transkripce, sestřihu, alternativního sestřihu, transportu, translace, skladování a rozpadu mRNA (PETRILLO et al. 2014; BUCCITELLI, SELBACH 2020). Do obranných mechanismů jsou zapojeny geny stresové tolerance rozdělené do skupiny strukturních genů, které kódují proteiny a enzymy chránící buňky přímo před stresem (např. geny pro transportéry, detoxikační enzymy, osmoprotektanty apod.) a genů exprimovaných v regulaci a signální transdukcii (např. transkripční faktory a proteinkinázy) (MOHANTY et al. 2023).

V současné době jsou zaznamenány porosty borovice lesní, ve kterých se vyskytují jedinci silně napadení podkorním hmyzem společně s jedinci bez jakýchkoliv příznaků napadení. Vyvstává proto otázka, co je důvodem odolnosti těchto zdravých jedinců oproti jedincům napadených škůdci. Záměrem naší práce byla charakterizace jedinců borovice lesní poškozených podkorním hmyzem ve srovnání se zdravými jedinci vyskytujícími se ve stejném porostu, a to s využitím analýzy qPCR. Relativní kvantitativní změny expresních hladin genů regulovaných v podmínkách stresu u zdravých a poškozených jedinců borovice lesní byly vyhodnoceny a porovnány na dvou lokalitách ve středních Čechách.

MATERIÁL A METODIKA

Východím rostlinným materiálem pro molekulární analýzy byly čerstvě naražené jehlice borovice lesní. Vzorky byly odebrány na dvou zájmových lokalitách, Stará Boleslav (50.2094314N, 14.7020256E) a Podbrahy (50.2257447N, 14.7414969E), které jsou od sebe vzdáleny přibližně 4 km. Obě stanoviště jsou chudá na živiny, vyznačují se písčítým podložím a rovným terénem s fytoecnologickou klasifikací L7 acidofilní doubravy podle CHYTRÝ et al. (2010). V porostech byly vybrány zdravé stromy bez známek poškození způsobených podkorním hmyzem (kontrola; obr. 1A) a stromy poškozené žírem podkorního hmyzu (poškozené; obr. 1B–1D) rozpoznané na základě uvedených charakteristických znaků v metodice KNÍŽEK et al. (2021). Přítomnost podkorního hmyzu byla detekována pomocí závrťových a výletových otvorů, přítomnosti drtinek, poškození kůry apod. Pro kontrolu byla u napadených jedinců po odběru vzorků provedena kontrola odloupnutím kůry. Vyšší partie kmenů byly sledovány pomocí dalekohledu a fotoaparátu s vysokým přiblížením. Intenzita napadení byla určena sledováním ve třech pruzích (každý o ploše 2 × 0,1 m). Za kontrolu byly vybrány pouze nenapadené stromy, přičemž „stresovanou“ skupinu tvořily stromy s maximální hustotou 0,15–0,2 pobytových znaků na dm². Stromy na obou lokalitách byly dominantně napadeny krascem borovým. Odběr vzorků u zdravých (5 ks) a poškozených (5 ks) stromů proběhl v červnu 2023 na obou lokalitách, kdy byly vzorky vloženy do označených mikrozkrumavek a zamrazeny v Dewarových nádobách obsahujících kapalný dusík (–196 °C). Po převezení rostlinného materiálu do laboratoře byly vzorky homogenizovány, odváženy do mikrozkrumavek a po přidání lyzačního pufru (součást kitu pro izolaci RNA) uloženy do hlubokomrazicího boxu (–80 °C). Celková RNA byla izolována z jehlic borovice lesní (cca 100 mg čerstvé hmotnosti) pomocí kitu Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Kanada) podle instrukcí uvedených výrobcem. Čistota a kvalita RNA byla změřena na spektrofotometru MaestroNano Pro (MaestroGen, USA). Izolace RNA a přepis mediátorové RNA (mRNA) do komplementární DNA (cDNA) probíhal shodně s postupem uvedeným v metodice POKORNÁ et al. (2023). Amplifikace cDNA a detekce PCR produktů byla zaznamenána měřením fluorescenčního signálu barviva SYBR Green s využitím real-time PCR termocykleru (LightCycler[®] 96 Instrument, Roche, Švýcarsko). Pro qPCR analýzu byly použity sekvence primerů dvanácti vybraných genů: protein P2 související s patogenézí (pathogenesis related protein P2, *PR_P2*), fenylalanin-amoniaklyáza (phenylalanine ammonia-lyase, *PAAL*), fosfolipid-hydroperoxidglutathionperoxidáza (phospholipid hydroperoxidglutathione peroxidase, *PHPGP*), detoxifikační protein 40 (protein DETOXIFICATION 40, *PDETOX40*), univerzální stresový protein podobný proteinu A (universal stress protein A-like protein, *USP A*), 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, *HPD*), chalkon-syntáza (chalcone synthase, *CHS*), endochitináza CH5B (endochitinase CH5B, *CH5B*), protein podobný thaumatinu (thaumatin-like protein, *Thau*), peroxidáza 12 (peroxidase 12, *PO12*), kataláza 3 (catalase 3, *Cat3*) a sacharóza syntáza (sucrose synthase 3, *SUCSYN3*) uvedených v publikaci VORNAM et al. (2019). U každého biologického opakování (n = 5) z dané lokality byly provedeny vždy tři technická opakování, výsledky byly normalizovány k referenčním genům *Actin1* a α -*Tubulin* (MOSHCHENSKAYA et al. 2023). Relativní expresní hladiny vybraných genů byly vypočítány na základě metody 2^{- $\Delta\Delta$ CT} (LIVAK; SCHMITTGEN 2001) a vztaheny ke kontrolní skupině vzorků (zdraví jedinci). Statistické hodnocení bylo provedeno na základě dvouvýběrového nepárového Studentova *t*-testu, jednocestná ANOVA, post hoc Tukeyho testu. Stanovení stability referenčních genů u všech vzorků borovice lesní odebraných na dvou lokalitách bylo provedeno v programu RefFinder (XIE et al. 2012). Vícerozměrná statistická analýza (Principal Component Analysis, PCA) qPCR dat u sledovaných skupin borovice lesní z lokality Stará Boleslav a Podbrahy byla provedena v programu Statistics Kingdom (<https://www.statkingdom.com>).

VÝSLEDKY

Studium genové exprese u borovice lesní nacházející se na dvou lokalitách v České republice, kdy byly porovnány skupiny zdravých a poškozených jedinců podkorním hmyzem, ukázalo, že dochází ke shodným trendům v regulaci genové exprese u sedmi z dvanácti sledovaných genů (*PR_P2*, *PAAL*, *PHPGP*, *PDETOX40*, *USP A*, *HPD*, *CHS*, *CH5B*, *Thau*, *PO12*, *Cat 3* a *SUCSYN3*) spojených s reakcí na biotický a abiotický stres rostlin (obr. 2). Při srovnání skupin zdravých a žírem krasce borového poškozených jedinců na lokalitě Stará Boleslav (BO_SB; obr. 2A, 2B) jsme zaznamenali nárůst relativních expresních hladin u genů *CH5B*, *PR_P2*, *Thau*, *PO12*, *Cat3*, *PAAL*, *SUCSYN3* a *USP A*, které kódují procesy spojené s obrannými mechanismy v odpovědích na stres a naopak pokles relativních expresních hladin genů *CHS*, *PHPGP*, *PDETOX40* a *HPD*, které jsou zapojené např. v biosyntéze karotenoidů a metabolických drahách kyseliny abscisové (*HPD*), při ochraně a obraně buněk a v procesu lignifika-

ce (*PDETOX40*, *CHS*). Srovnání míry relativních expresních hladin mezi skupinou poškozených a zdravých jedinců ukázalo na lokalitě BO_SB statisticky významné zvýšení hladiny genu *PAAL*, jehož aktivita je indukována v reakci na různé podněty, jako je např. poranění pletiv rostlin (obr. 2B). Na lokalitě Podbrahy (BO_P) jsme s výjimkou genů *CHS*, *Thau* a *Cat3* zjistili rovněž zvýšenou míru exprese u všech sledovaných genů ve srovnání s kontrolní skupinou, ale bez statistické významnosti (obr. 2C, 2D). Při porovnání $2^{-\Delta\Delta CT}$ hodnot mezi poškozenými skupinami z obou lokalit jsme nezjistili statisticky významný rozdíl v relativních expresních hladinách u žádného z dvanácti sledovaných genů.

Nejvyšší relativní hladiny exprese genů byly zjištěny u genu *Thau* na lokalitě BO_SB a genů *SUCSYN3* a *USP A* na lokalitě BO_P (obr. 2). U *Thau* došlo k 5,1násobnému zvýšení relativní hladiny exprese genu ve srovnání s kontrolní skupinou vzorků a u genů *SUCSYN3* a *USP A* došlo k 2,3násobnému zvýšení relativních expresních hladin v porovnání s kontrolní skupinou vzorků. Nejnižší relativní expresní hladiny



Obr. 1.

Fotodokumentace zdravotního stavu borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.). Kmen zdravého (A) a žírem krasce borového (*Phaenops cyanea*) poškozeného jedince (B). Detail poškození způsobené žírem na kmeni (C, D); (foto: A. Véle)

Fig. 1.

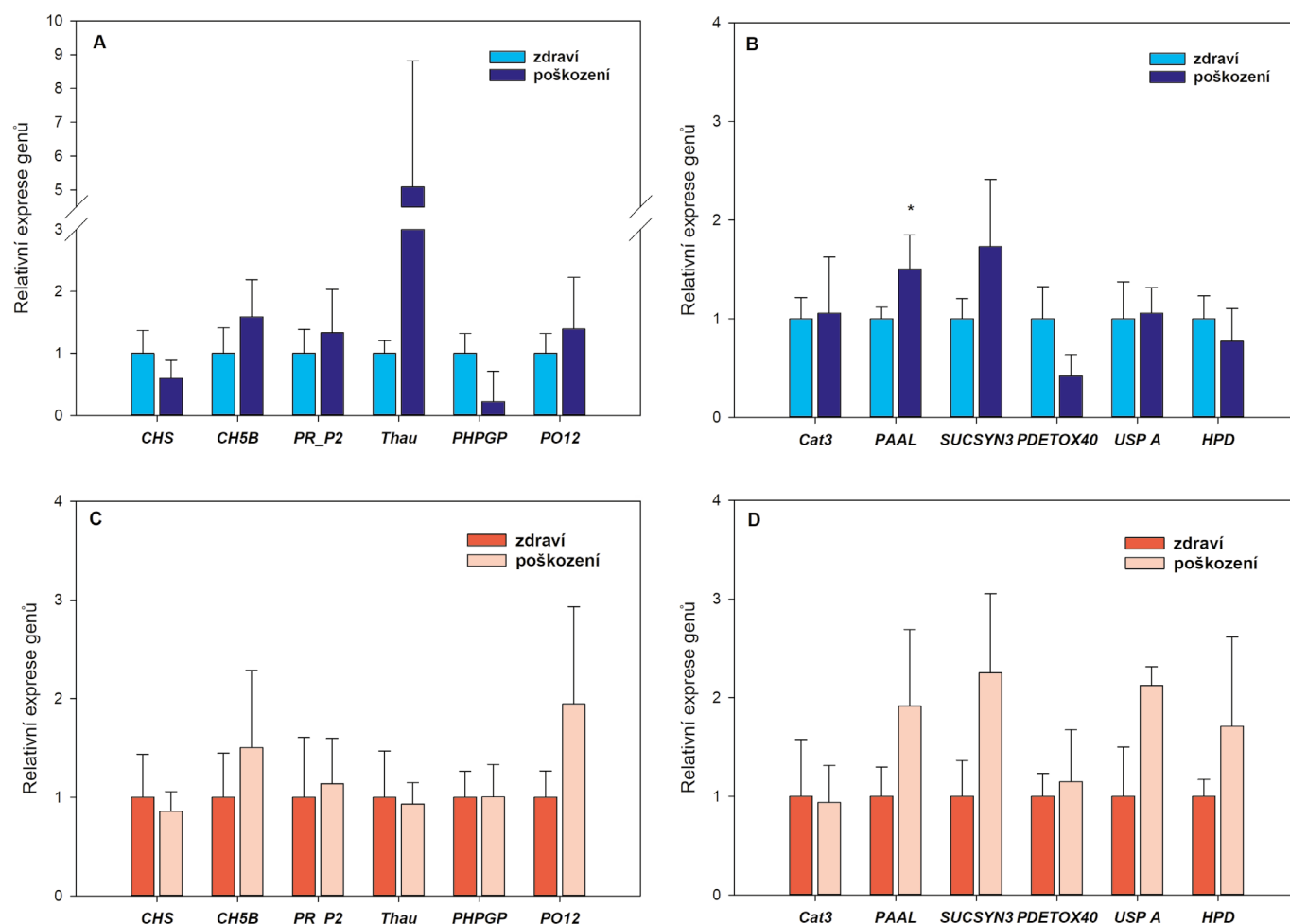
Photo documentation of the health condition of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). The trunk of healthy (A) and damaged individuals caused by the pine beetle (*Phaenops cyanea*). Detail of rot damage on the trunk (C, D); (photo: A. Véle)

ny vykazovaly geny *PHPGP*, *CHS* a *PDETOX40* na lokalitě BO_SB, u genu *PHPGP* došlo až k 4,3násobnému snížení u skupiny poškozených jedinců ve srovnání s kontrolní skupinou (obr. 2). Odlišné trendy v regulaci míry genové exprese na obou sledovaných lokalitách u skupin vzorků poškozených žírem krasce borového ve srovnání s kontrolní skupinou vzorků vykazovaly geny *Thau*, *Cat3*, *PHPGP*, *PDETOX40* a *HPD* (obr. 2).

Pro interpretaci získaných výsledků z qPCR analýzy je nezbytné zohlednit zjištěnou vysokou míru variability Δ CT hodnot např. u genů *PAAL*, *Cat3*, *PO12*, *USP A* a *Thau* na lokalitě BO_SB (obr. 3A) a *HPD*, *CHS*, *PO12* a *Thau* na lokalitě BO_P (obr. 3B). I po eliminaci odlehklých CT hodnot z datových souborů jsme zaznamenali značný rozptyl ve vypočtených Δ CT hodnotách převažující zejména u vzorků

odebraných na lokalitě Stará Boleslav ve srovnání s lokalitou Podbrahy, u které je zřejmá vyšší konzistentnost, a tedy i nižší míra variability naměřených dat (obr. 3).

Rozdíly ve zjištěné variabilitě výsledků v rámci lokalit podporuje i vícerozměrná statistická analýza PCA (Principal Component Analysis), která udává největší variabilitu v naměřených expresních hladinách genů mezi stanovišti, ve srovnání s variabilitou mezi skupinami vzorků zdravých a poškozených jedinců (obr. 4). Z analýzy stability referenčních genů *Actin1* a α -*Tubulin* u obou skupin analyzovaných vzorků (zdraví a poškození jedinci) jsme zaznamenali vyšší stabilitu u vzorků z lokality Podbrahy, která byla v rozmezí 0,724–1,104 s nejvyšší zaznamenanou hodnotou 2,698 u jediného vzorku (24A). U vzorků odebraných na lokalitě Stará Boleslav jsme zjistili menší stabilitu referenčních genů s rozmezím hodnot 1,343–2,878 (tab. 1).



Obr. 2.

Relativní hladiny exprese genů borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) u skupiny jedinců poškozených žírem krasce borového (*Phaenops cyanea*) ve srovnání se skupinou zdravých jedinců (kontrola = 1) rostoucích na lokalitě Stará Boleslav (BO_SB; 2A, 2B) a Podbrahy (BO_P; 2C, 2D). Vynesené úsečky u sloupcových grafů znázorňují směrodatné odchylky (SD). *Statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a poškozenou skupinou jedinců v rámci sledované lokality, Studentův dvouvýběrový nepárový *t*-test **P* < 0,05.

Fig. 2.

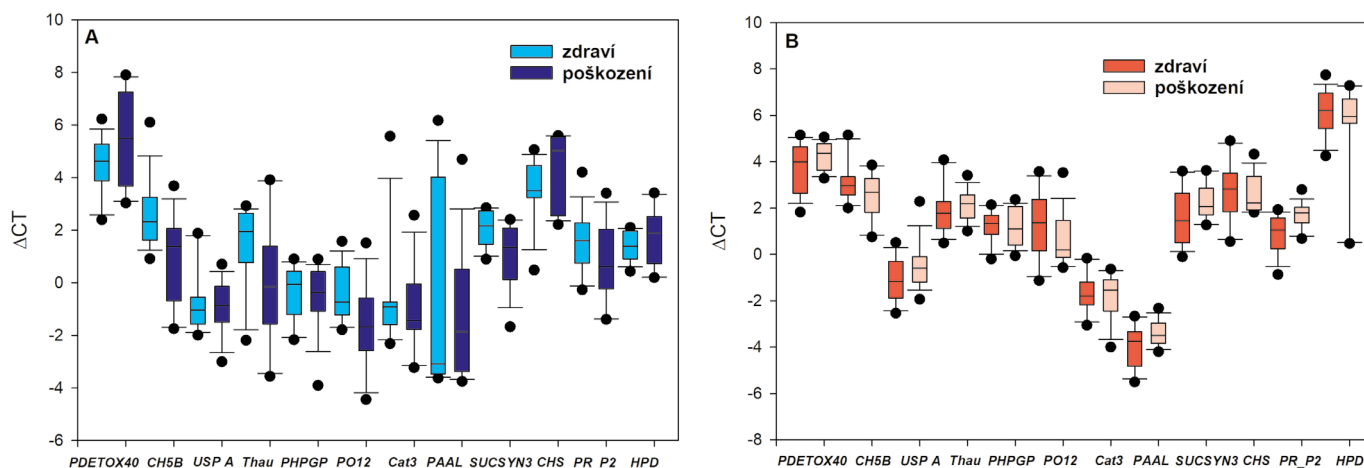
Relative gene expression levels of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in a group of individuals damaged by the pine beetle (*Phaenops cyanea*) in comparison to a group of healthy individuals (control = 1) growing at the locality Stará Boleslav (BO_SB; 2A, 2B) and Podbrahy (BO_P; 2C, 2D). Plotted lines in bar graphs represent standard deviations (SD). *Statistically significant difference between control and damage group of individuals within the monitored locality, Student's two-tailed unpaired *t*-test **P* < 0.05.

Tab. 1.

Stabilita referenčních genů (*Actin1* a α -*Tubulin*) u analyzovaných vzorků borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) vyhodnocené podle metody Δ CT. Zdraví jedinci borovice lesní rostoucí na lokalitě Stará Boleslav (BO_SB) a Podbrahy (BO_P) jsou zvýrazněny tučně oproti jedincům poškozeným žírem krasce borového (*Phaenops cyanea*) (bez zvýraznění).

Stability of reference genes (*Actin1* a α -*Tubulin*) in analyzed Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) samples was evaluated according to the Δ CT method. Healthy Scots pine individuals growing in the Stará Boleslav (BO_SB) and Podbrahy (BO_P) localities are highlighted in bold, compared to individuals damaged by the pine beetle (*Phaenops cyanea*) (without highlighting).

Lokalita/ Locality	Označení vzorků/ Sample	Stabilita referenčních genů/ Stability of reference genes	Lokalita/ Locality	Označení vzorků/ Sample	Stabilita referenčních genů/ Stability of reference genes
BO_SB	11C	1,343	BO_P	18A	0,724
	19B	1,347		11A	0,755
	15C	1,374		15A	0,783
	20B	1,399		17A	0,784
	23B	1,645		22A	0,8
	21B	1,652		16A	0,861
	25B	1,688		4A	1,033
	7A	2,311		10A	1,035
	4A	2,537		1A	1,104
	8A	2,878		24A	2,698

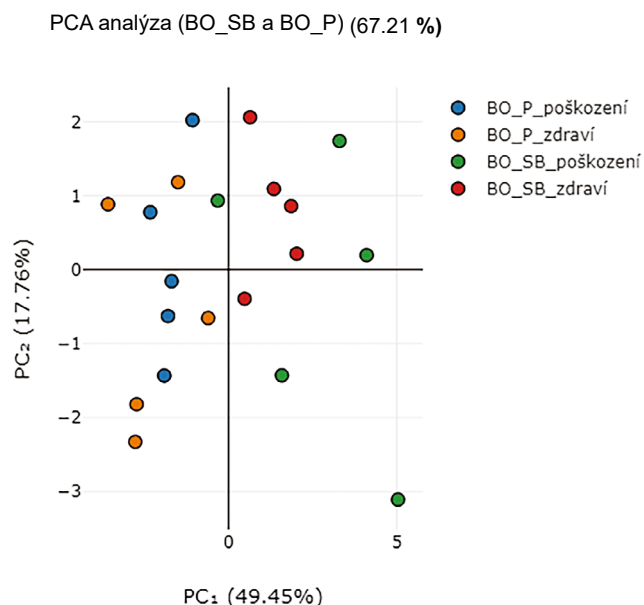


Obr. 3.

Vizualizace výsledků z qPCR analýzy borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) formou box plot grafů. Hodnoty Δ CT (cyklus prahu) pro vybrané geny u skupin jedinců poškozených žírem krasce borového (*Phaenops cyanea*) a zdravých jedinců rostoucích na lokalitě Stará Boleslav (BO_SB; 3A) a Podbrahy (BO_P; 3B). Vynesené úsečky u sloupcových grafů znázorňují směrodatné odchylky (SD). Odlehle hodnoty jsou znázorněny tečkami.

Fig. 3.

Visualization of results from qPCR analysis of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in form of box plot graphs. Values of Δ CT (cycle of threshold) from qPCR for selected genes at group of individuals damaged by the pine beetle (*Phaenops cyanea*) and healthy individuals growing at the locality Stará Boleslav (BO_SB; 3A) and Podbrahy (BO_P; 3B). Plotted lines under bar graphs represent standard deviations (SD). Individual outliers are indicated with dots.

**Obr. 4.**

Vicerozměrná statistická analýza (Principal Component Analysis, PCA) qPCR dat u skupin jedinců borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.). Byly porovnány zdraví a poškození jedinci žírem krasce borového (*Phaenops cyanea*) z lokality Stará Boleslav (BO_SB) a Podbrahy (BO_P).

Fig. 4.

Principal component analysis (PCA) plots of the qPCR dataset in groups of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) individuals. Health and damage by the pine beetle (*Phaenops cyanea*) individuals from the Stará Boleslav (BO_SB) and Podbrahy (BO_P) localities were compared.

DISKUSE

Reakce lesních dřevin k působení biotických a abiotických činitelů se může projevit zesílenou ochranou proti dalšímu poškození. Obranné mechanismy zahrnují vysoce integrovanou a koordinovanou odezvu jako je např. *de novo* syntéza nízkomolekulárních sloučenin tzv. phytoalexinů, změna anatomie rostlin, např. lignifikace a suberizace buněčné stěny, uvolnění rostlinných těkavých organických sloučenin, ale také indukce tvorby rozpustných proteinů po napadení patogenem tzv. „pathogenesis-related proteins“ (PR) (EYLES et al. 2010). Aktivací buněčné signalizace rostlin pomocí druhých posílů dochází ke spuštění výše uvedených mechanismů na transkripční úrovni (KAUR et al. 2022). V naší práci jsme u experimentálního materiálu sledovali expresní profily dvanácti genů zapojených do ochrany a obrany buňky jako jsou např. protein podobný thaumatinu (*Thau*), PR proteiny (*PR_P2*), univerzální stresový protein podobný proteinu A (*USP A*), fosfolipid-hydroperoxidglutathionperoxidáza (*PHPGP*) a peroxidáza 12 (*PO12*), kataláza 3 (*Cat3*), chalkon-syntáza (*CHS*) a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza (*HPD*) nebo geny spojené s tvorbou ligninu např. chitináza (*CH5B*), syntáza sacharózy (*SUCSYN3*), detoxifikační protein 40 (*PDETOX40*) a fenylyalanin-amoniakyláza (*PAAL*). V práci VORNAM et al. (2019) byly relativní expresní profily všech výše uvedených genů stanoveny v jehlicích boro-

více lesní inokulovaných houbovým patogenem *Sphaeropsis sapinea* a porovnány s kontrolními vzorky. Ve shodě s prací VORNAM et al. (2019) jsme naměřili u šesti sledovaných genů (*CH5B*, *PR_P2*, *PO12*, *PAAL*, *SUCSYN3*, *PDETOX40*, *USP A*) vyšší relativní expresní hladiny u skupiny poškozených jedinců ve srovnání se skupinou zdravých jedinců na lokalitě Stará Boleslav a Podbrahy (obr. 2). Naše výsledky ukázaly i na variabilní trendy v regulaci aktivity genů (obr. 2), které prezentovali VORNAM et al. (2019) v pokusu, kde byly porovnány výsledky z qPCR analýzy u jehlic borovice lesní, lišící se v časové délce od inokulace patogenem. Kdy např. u genu *PHPGP* bylo zaznamenáno v časovém období 2 dny, 4 dny a 6 dnů od inokulace zvýšení hladiny, snížení hladiny a hladina relativní exprese beze změny; variabilní trendy exprese genu *PHPGP* jsme shodně zaznamenali v rámci sledovaných lokalit Podbrahy a Stará Boleslav (obr. 2C). Rozdílná doba od napadení a poškození škůdcem v rámci porovnávaných lokalit může být i jedním z důvodů námi pozorovaných odlišných relativních expresních profilů u genů *PHPGP*, *Thau*, *Cat3* a *PDETOX40*.

Při porovnání hladin relativní exprese sledovaných genů mezi poškozenou a zdravou skupinou jedinců jsme zjistili statisticky významné zvýšení relativní míry exprese genu *PAAL* na lokalitě Stará Boleslav (obr. 2B), na lokalitě Podbrahy nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými skupinami (obr. 2C, 2D). BAGAL et al. (2012) popisuje gen *PAAL* (fenylalanin-amoniakyláza) za klíčový enzym fenylpropanoidní dráhy, který katalyzuje deaminaci fenylalaninu na trans-skořicovou kyselinu, prekursoru pro biosyntézu ligninu a flavonoidů, produktů s různými funkcemi v rostlinách včetně ochrany proti biotickým a abiotickým stresům. OSAKABE et al. (2009) uvedli zapojení aktivity genu *PAAL* v procesu lignifikace v reakci na stres, kdy rovněž prokázali jeho lokalizaci v xylému u borovice kadidlové (*Pinus taeda*). Dalo by se proto očekávat, že u napadených stromů škůdcem budou hladiny ligninu vyšší, ale SODERBERG et al. (2021) ve své práci zjistili u méně náchylných borovic (*P. longaeva* a *P. balfouriana*) k poškození lýkohubem (*Dendroctonus ponderosae*) nižší obsah ligninu ve floému než u citlivějšího druhu *P. flexilis*.

Získané výsledky z pilotní studie ukazují citlivost metody molekulárních analýz při studiu regulací aktivit genů u vzorků borovice lesní odebíraných v podmínkách s neřízeným světelným, vlhkostním a teplotním režimem. Přestože byly stanovištní podmínky včetně fytoecologických charakteristik stanovišť na obou lokalitách velmi podobné, zaznamenali jsme u jednotlivých skupin sledovaných jedinců i u vzorků patřících do stejné skupiny značnou variabilitu naměřených dat, což se odrazilo i ve výsledcích u relativních expresních hladin genů zapojených do odpovědi na biotický a abiotický stres. Uvědomujeme si, že významnou úlohu při studiu genové exprese má i genotyp samotného jedince, který pomocí regulačních mechanismů (např. methylace DNA a genová exprese) přispívá k adaptaci na působení škodlivých činitelů, což ukázali ve své práci i ALAKÄRPPÄ et al. (2018). Na základě prvotních výsledků s využitím qPCR analýz při studiu biotického stresu u vzorků odebíraných z jedinců z terénu předpokládáme přesnější charakterizaci změn na úrovni regulace aktivity genů při detailnějším studiu jejich transkriptomů.

ZÁVĚR

Problematické oslabení lesních porostů vlivem suchých period v předchozích letech a jejich následnému napadení podkorním hmyzem je věnována neustále velká pozornost. Naše práce prezentuje míru zapojení obranných mechanismů v reakci na biotické poškození s využitím molekulárních analýz u skupin zdravých a poškozených jedinců borovice lesní rostoucích na dvou lokalitách ve středních Čechách. Ukázalo se, že v rámci lokalit Stará Boleslav a Podbrahy dochází u poškozených skupin ke shodným trendům v relativní expresi u sedmi genů zapoje-

ných do odpovědi na stres způsobený zejména žírem krasce borového (*Phaenops cyanea*). Na lokalitě Stará Boleslav jsme zaznamenali významné zvýšení relativních hladin exprese genu fenylalanin-amoniaklyázy (PAAL) u skupiny poškozených jedinců ve srovnání s kontrolní skupinou, kdy gen PAAL je spojován se sekundárním metabolismem rostlin, zejména s dráhou biosyntézy ligninu a flavonoidů. První získané poznatky o regulaci aktivity genů u sledovaných jedinců borovice lesní jsou významné zejména s ohledem na skutečnost, že vzorky pocházejí přímo z porostů borovice lesní, ve kterých dochází k neustálému působení řady činitelů na jejich růst a vývoj a uniformita vzorků v rámci skupiny zdravých nebo poškozených jedinců je značně nízká. Zjištěná variabilita naměřených dat u námi vybraných dvanácti genů poukazuje na nutnost rozsáhlejší analýzy dat např. s využitím RNASeq analýzy pro přesnější charakterizaci změn na úrovni regulací genové exprese.

Poděkování:

Článek vznikl za podpory projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum NAZV QK22020062 – „Identifikace přeživších jedinců lesních dřevin na kalamitních plochách, jejich záchrana a výzkum jejich rezistence“ a za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpory č. MZE-RO0123. Autoři děkují Jaroslavu Dostálovi za odbornou pomoc při odběru vzorků a Jiřímu Čápovi za pomoc s vyhledáním literárních zdrojů.

LITERATURA

- ALAKÁRPÁ E., SALO H.M., VALLEDOR L., CAÑAL M.J., HÄGGMAN H., VUOSKU J. 2018. Natural variation of DNA methylation and gene expression may determine local adaptations of Scots pine populations. *Journal of Experimental Botany*, 69 (21): 5293–5305. DOI: 10.1093/jxb/ery292
- BAGAL U.R., LEEBENS-MACK J.H., LORENZ W.W., DEAN J.F. 2012. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. *BMC Genomics*, 13 (Suppl 3): S1. DOI: 10.1186/1471-2164-13-S3-S1
- BRICHTA J., VACEK S., VACEK Z., CUKOR J., MIKESKA M., BÍLEK L., ŠIMŮNEK V., GALLO J., BRABEC P. 2023. Importance and potential of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in 21st century. *Central European Forestry Journal*, 69 (1): 3–20. DOI: 10.2478/forj-2022-0020
- BUCCITELLI C., SELBACH M. 2020. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature Reviews Genetics*, 10: 630–644. DOI: 10.1038/s41576-020-0258-4
- ČÁP J., NOVOTNÝ P. 2020. Rozšíření a ekologické nároky borovice lesní. *Zpravodaj ochrany lesa*, 23: 39–41.
- ČHMÚ. 2017. Výroční zpráva 2016. Praha, ČHMÚ: 67 s. Dostupné na/Available on: http://www.chmi.cz/files/portal/docs/reditel/vyrocní_zpravy/vz2016.pdf
- DOBBERTIN M., WERMELINGER B., BIGLER C., BÜRGI M., CARRON M., FORSTER B., GIMMI U., RIGLING A. 2007. Linking increasing drought stress to Scots pine mortality and bark beetle infestations. *The Scientific World Journal*, 7: 231–239. DOI: 10.1100/tsw.2007.58
- DUJKA P. 2024. Malenovická borovice. Brandýs nad Labem, Ústav pro hospodářskou úpravu lesů: 237 s.
- EYLES A., BONELLO P., GANLEY R., MOHAMMED C. 2010. Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytologist*, 185 (4): 893–908. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03127.x
- HARB A., SIMPSON C., GUO W., GOVINDAN G., KAKANI V.G., SUNKAR R. 2020. The effect of drought on transcriptome and hormonal profiles in barley genotypes with contrasting drought tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 11: 618491. DOI: 10.3389/fpls.2020.618491
- HASSAN M.A., DAHU N., HONGNING T., QIAN Z., YUEMING Y., YIRU L., SHIMEI W. 2023. Drought stress in rice: morpho-physiological and molecular responses and marker-assisted breeding. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1215371. DOI: 10.3389/fpls.2023.1215371
- CHYTRÝ M., KUČERA T., KOČÍ M., GRULICH V., LUSTYK P. (ed.) 2010. Katalog biotopů České republiky. Praha, Agentura ochrany přírody a krajiny ČR: 445 s.
- KAUR S., SAMOTA M.K., CHOUDHARY M., CHOUDHARY M., PANDEY A.K., SHARMA A., THAKUR J. 2022. How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28 (2): 485–504. DOI: 10.1007/s12298-022-01146-y
- KNÍŽEK M., LIŠKA J., VÉLE A., ZAHRADNÍK P., LUBOJACKÝ J. 2021. Ochrana borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) před podkorním a dřevokazným hmyzem. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 120 s. Lesnický průvodce 9/2021.
- LIŠKA J., KNÍŽEK M., LUBOJACKÝ J., MODLINGER R. 2016. Živočišná škůdci v lesích Česka v roce 2015. *Zpravodaj ochrany lesa* 19/2016.
- LIŠKA J., KNÍŽEK M., VÉLE A. 2021. Evaluation of insect pest occurrence in areas of calamitous mortality of Scots pine. *Central European Forestry Journal*, 67 (2): 85–90. DOI: 10.2478/forj-2021-0006
- LIU M., ZHAO G., HUANG X., PAN T., CHEN W., QU M., OUYANG B., YU M., SHABALA S. 2023. Candidate regulators of drought stress in tomato revealed by comparative transcriptomic and proteomic analyses. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1282718. DOI: 10.3389/fpls.2023.1282718
- 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 (4): 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- LUBOJACKÝ J., LORENC F., SAMEK M., KNÍŽEK M., LIŠKA J. 2022. Hlavní problémy v ochraně lesa v Česku v roce 2021 a prognóza na rok 2022. *Zpravodaj ochrany lesa*, 25/2022: 17–26.
- MOHANTY S., MAHAPATRA S.K., DASGUPTA M., PANIGRAHY M., SWAIN D., ROUT G.R. 2023. Regulation of gene expression in plant growth and metabolism: A review. *Trends in Horticulture*, 6 (2): 1. DOI: 10.24294/th.v6i2.3023
- MOSHCHENSKAYA Y.L., GALIBINA N.A., KORZHENEVSKIY M.A., CHIRVA O.V., TARELKINA T.V., NIKEROVA K.M. 2023. High-quality RNA extraction and evaluation of reference genes for qPCR assay of *Pinus sylvestris* L. trunk tissues. *Russian Journal of Developmental Biology*, 54: 24–36. DOI: 10.1134/S1062360423010095
- MUSIL I., HAMERNÍK J. 2007. Jehličnaté dřeviny. Praha, Academia: 352 s.
- OSAKABE Y., OSAKABE K., CHIANG V.L. 2009. Characterization of the tissue-specific expression of phenylalanine ammonia-lyase gene promoter from loblolly pine (*Pinus taeda*) in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Reproduction*, 28: 1309–1317. DOI: 10.1007/s00299-009-0707-1
- PEŠKOVÁ V., SOUKUP F., KNÍŽEK M. 2016. Biotičtí škodliví činitelé na borovici a sucho. *Lesnická práce*, 95 (4): 8 s. Příloha.

- PETRILLO E., GODOY HERZ M.A., BARTA A., KALYNA M., KORNBLIHTT A.R. 2014. Let there be light: regulation of gene expression in plants. *RNA Biology*, 11 (10): 1215–1220. DOI: 10.4161/15476286.2014.972852
- PILÁT A. 1964. Jehličnaté stromy a keře našich zahrad a parků. Praha, Nakl. Československé akademie věd: 507 s.
- POKORNÁ E., KOMÁRKOVÁ M., MÁCHOVÁ P., FALTUS M. 2023. Metodický postup využití molekulárních metod pro posouzení fyziologického stavu topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) v průběhu kryokonzervace – certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 35 s. Lesnický průvodce 2/2023.
- SODERBERG D.N., KYRE B., BONELLO P., BENTZ B.J. 2021. Lignin concentrations in phloem and outer bark are not associated with resistance to mountain pine beetle among high elevation pines. *PLoS One*, 16 (9): e0250395. DOI: 10.1371/journal.pone.0250395
- VEJPUŠTKOVÁ M., NEUDERTOVÁ HELLEBRANDOVÁ K., ČIHÁK T., VÍCHA Z., FABIÁNEK P. 2020. Zdravotní stav borových porostů hodnocený metodikou ICP Forests. *Zpravodaj ochrany lesa*, 23: 42–47.
- VORNAM B., LEINEMANN L., PETERS F.S., WOLFF A., LEHA A., SALINAS G., SCHUMACHER J., GAILING O. 2019. Response of Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings subjected to artificial infection with the fungus *Sphaeropsis sapinea*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 37: 214–223. DOI: 10.1007/s11105-019-01149-2
- XIE F., XIAO P., CHEN D., XU L., ZHANG B. 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant molecular biology* 80 (1): 75–84. DOI: 10.1007/s11103-012-9885-2
- YAO T., ZHANG J., XIE M., YUAN G., TSCHAPLINSKI T.J., MUCHERO W., CHEN J.G. 2021. Transcriptional regulation of drought response in Arabidopsis and woody Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11: 572137. DOI: 10.3389/fpls.2020.572137
- ZHANG H., ZHAO Y., ZHU J.K. 2020. Thriving under stress: How plants balance growth and the stress response. *Developmental Cell*, 55 (5): 529–543. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.10.012
- Zpráva. 2023. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2022. Praha, Ministerstvo zemědělství: 134 s.

POTENTIAL OF THE USE OF MOLECULAR ANALYSES FOR GENETIC CHARACTERIZATION OF RESISTANT SCOTS PINE (*PINUS SYLVESTRIS* L.) INDIVIDUALS

SUMMARY

Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) is the second most represented tree species based on forest tree species composition in the Czech Republic, which also hits the activation of several fungal pathogens and bark cambioxylophagous insects in 2015 as a result of extremely high temperatures. In our work we focused on the characterization of gene expression profile levels of genes involved in defense mechanisms in response to abiotic and biotic stress conditions in the control group (health, Fig. 1A) and the group damaged by the pine beetle (*Phaenops cyanea*) which caused rot damage on the trunk (damage, Fig. 1B, 1C and 1D) in Scots pine trees. Needle samples of healthy and damaged trees were collected from the same stand at two localities in Central Bohemia, Stará Boleslav (BO_SB) and Podbrahy (BO_P). Using qPCR molecular analysis, the changes in the relative expression levels of twelve genes regulated under stress conditions in healthy and damaged Scots pine individuals from BO_SB and BO_P localities were evaluated and compared.

When studying gene expression in Scots pine, we found variable trends in the regulation of gene expression levels associated with response to abiotic and biotic stress in plants. Comparing groups of healthy and pine beetle damaged individuals at localities BO_SB and BO_P, we found similar trends in relative gene expression levels of chalcone synthase (*CHS*), endochitinase CH5B (*CH5B*), pathogenesis related protein P2 (*PR_P2*), peroxidase 12 (*PO12*), phenylalanine ammonia-lyase (*PAAL*), sucrose synthase 3 (*SUCSYN3*) and universal stress protein A-like protein (*USP A*), genes with an important role in physiological reactions, such as flavonoid biosynthesis, cell wall modification, lignification, defense against pathogens and repair of damaged cell structures (Fig. 2). The other five genes (phospholipid hydroperoxidglutathione peroxidase, *PHPGP*; catalase 3, *Cat3*; protein DETOXIFICATION 40, *PDETOX40*; thaumatin-like protein, *Thau* and 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, *HPD*) showed completely different trends in the regulation of gene expression levels at both localities (Fig. 2). A comparison of the group of healthy and damaged individuals at the locality BO_SB showed a statistically significant increase of *PAAL* relative expression level, where *PAAL* is associated with the metabolism of phenylpropanoids (lignin and flavonoids). Based on a high degree of measured CT values variability in our samples we performed analysis of reference genes stability. We found that the most stable reference genes were among samples originating from the locality BO_P compared with the samples from the locality BO_SB, where we detected lower stability of reference genes (Tab. 1). Our findings correspond with a higher consistency and a lower degree of variability of the measured data at the BO_P compared to the BO_SB, where the measured Δ CT values were more variable (Fig. 3). In addition, PCA analysis of the gene expression profiles among all samples revealed the strongest variability among localities rather than among the groups of health and damage individuals (Fig. 4). The obtained results prove a high sensitivity of qPCR method to several factors such as quality, uniformity and storage conditions of samples, the use of standardized procedures in RNA isolation and qPCR analysis as well as RNA integrity and its quality.

The weakening of forest stands due to the dry periods in previous years and their subsequent attack by bark beetles is constantly under higher attention. Our work presents preliminary results focusing on the degree of involvement in defense mechanisms in response to biotic damage using molecular analyses in groups of healthy and damaged Scots pine individuals growing at two localities in Central Bohemia. It has been shown that at locality Stará Boleslav we noted a significant increase in the relative gene expression level of *PAAL* in the group of damaged individuals compared to the control group.

The knowledge obtained is significant because our samples were directly collected from Scots pine stands, where many factors constantly influence their growth and development, and the individual's genotype plays a crucial role as well.

Zasláno/Received: 23. 05. 2024

Přijato do tisku/Accepted: 08. 08. 2024