

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Analýza genů indukovaných abiotickým stresem u řepky

Autor: Ing. Irena Hoštičková

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

České Budějovice

2019

Dedikace

Disertační práce byla vypracována s podporou projektů:

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

Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. Čurnovi, že mě přijal do svého týmu a po celou dobu studia mě nesmírně podporoval, dodával mi odvahu a chuť do další práce a stál při mě vždy, když bylo potřeba. Děkuji také kolegům Ondrovi Hejnovi a Martině Vráblové za jejich pomoc s analýzami a skvělé nápady, náměty a nakažlivé nadšení. Děkuji doktoru Tonkovi, že mi vždy vrátil nohy na zem nebo hlavu do oblak, podle toho, co bylo zrovna třeba. Děkuji Honzovi Harenčákovi, Petrovi Štoidlovi za pomoc v laboratoři. Také děkuji prof. Šantrůčkovi, Marušce Hronkové, Evě Jozové, Pavlovi Beranovi, že jsem se od nich spoustu věcí naučila. A hlavně děkuji svému manželovi Vládovi za jeho podporu a toleranci k neumytému nádobí a nevyžehlenému prádlu v dobách mého urputného bádání.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne

Souhrn

Šlechtění na odolnost vůči abiotickým stresorům je v současné době jedním z nosných témat šlechtění rostlin. Ve šlechtitelských programech řepky byla v případě selekce rostlin s vyšší odolností abiotickým stresům pozornost po dlouhé období věnována převážně jen popisným morfologickým a fyziologickým parametrům. V rámci této dizertační práce bylo provedeno několik experimentů zaměřených na identifikaci potenciálních genů spojených s reakcí na abiotický stres pomocí metody RT-qPCR (quantitative reverse transcription PCR). Zároveň byla použita metoda SPR (rezonance povrchového plazmonu), moderní optická metoda, která umožňuje studovat velmi nízké koncentrace nativních proteinů i v přítomnosti jiných látek, umožňuje kvantifikaci konkrétních proteinů vazbou na specifické protilátky a u řepky či jiných významných plodin nebyla doposud použita. Protein ERD10 byl pomocí metody rezonance povrchového plazmonu (SPR) identifikován jako protein účastnící se reakce na stres chladem, resp. aklimatizaci. Z výsledků vyplývá, že akumulace proteinu ERD10 ve standardních podmínkách ovlivňuje dynamiku změny jeho akumulace v průběhu stresu chladem. V případě, že hledáme genotypy, které by měly vynikat svou schopností aklimatizovat se i během krátkého teplého podzimu, nabízí se analýza akumulace dehydrinů metodou rezonance povrchového plazmonu jako vhodná metoda pro rychlý, nenáročný a relativně levný skrínink většího množství genotypů ve šlechtitelských kolekcích.

Dalšími testovanými geny byly *LTI78*, *RCI2A*, *NRP1* a dva geny pro hypotetické proteiny. Jejich relativní exprese se v průběhu stresu chladem také výrazně zvyšovala. O funkci těchto genů a proteinů se toho zatím ví velmi málo, proto budou jistě zajímavým předmětem dalších experimentů. Dále byla testována také relativní exprese genů vytipovaných podle výsledků analýzy proteinů metodou MALDI-TOF/TOF u regenerovaných mikrosporových embryí odvozených z rostlin řepky stresovaných simulovaným suchem. Byly testovány geny pro lactoylglutathione lyázu I, fosfolipázu D α 1 a peroxiredoxin antioxidantázu. U odolnější odrůdy ve standardních podmínkách a na začátku stresu byla naměřena významně nižší exprese genu pro peroxiredoxin antioxidantázu. Tento gen bude předmětem našeho dalšího zkoumání jako potenciální marker pro výběr genotypů, které mohou být odolnější stresu suchem.

Klíčová slova: *Brassica napus*, řepka olejka, abiotický stres, rezonance povrchového plazmonu, RT-qPCR

Summary

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

Also genes *LTI78*, *RCI2A*, *NRPI* and two genes for hypothetical proteins were analysed. Their relative expression during cold stress was markedly increased too. Very little is known about these genes and proteins nowadays therefore it will be interesting topic of our oncoming experiment. Relative expression of genes picked according to MALDI-TOF/TOF analysis results was also tested in microspore embryo regenerants stressed by simulated drought. Genes for lactoylglutathione lyase I, phospholipase D α 1 and peroxiredoxin antioxidant were tested. In tolerant cultivar was markedly decreased gene expression of peroxiredoxin antioxidant in standard conditions and early stress. These gene will be subject for next research as potential marker for more tolerant genotypes selection.

Key words: *Brassica napus*, oilseed rape, abiotic stress, surface plasmon resonance, RT-qPCR

Seznam publikovaných výsledků

Impaktované publikace Jimp:

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

Recenzované publikace Jrec:

- Harenčák J., Hoštičková I., Vráblová M., Jozová E., Čurn V. (2018): Expres genů ERD10 a ICE1 při aklimatizaci u odrůd řepky s kontrastní reakcí na stres chladem. *Úroda* 12, roč. LXVI, 2018, vědecká příloha, 131-134.
- Hoštičková I., Vráblová M., Rychlá A., Hronková M., Jozová E., Čurn V. (2018): Infračervená termografie jako nástroj pro výběr genotypů máku s kontrastní reakcí na stres suchem. *Úroda* 12, roč. LXVI, 2018, vědecká příloha, ISSN 0139-6013, s. 143-146.
- Klíma M., Kučera V., Jozová E., Ulvrová T., Bryxová P., Kopecký P., Havel J., Hoštičková I., Čurn V. (2018): Využití sporofytické autoinkompatibility v hybridním šlechtění řepky olejky. *Úroda* 12, roč. LXVI, 2018, vědecká příloha, 151-154.
- Jelínková, I.; Vráblová, M.; Harenčák, J.; Štoidl, P.; Čurn, V. (2017): Využití metody rezonance povrchového plazmonu k selekci chladu odolných genotypů řepky ozimé (*Brassica napus* subsp. *napus*). *Úroda* 12, roč. LXV, vědecká příloha, s. 215-217.
- Čurn, V., Jelínková, I., Jozová, E., Havlíčková, L., Klíma, M. (2016): Ověření spolehlivosti molekulárních selekčních markerů pro identifikaci obnovitelů fertility u CMS systému *Shaan 2A*. *Úroda* 12, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 39-44.
- Jelínková I., Channa Keshavaiah, Čurn V., Urban M. O., Klíma M. (2016): Analýza exprese genů indukovaných stresem chladem u řepky. *Úroda* 12, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 149-152.

- Jozová, E., Jelínková, I., Čurn, V., 2016. Hodnocení genetické diverzity genových zdrojů řepky jako podklad pro výběr rodičovských komponent pro křížení. *Úroda* 12, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 153-156.
- Vernerová K., Jelínková I., Čurn V., Olšan P., Havelka Z., Bartoš P., Špatenka P. (2016): Změna povrchové struktury semen řepky po ošetření nízkoteplotním plazmatem. *Úroda* 12, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 189-192.
- Jelínková, I., Keshavaiah, Ch., Prášil, I. T., Urban, M.O. (2014): Komparativní analýza exprese na úrovni genů/proteinů indukovaných v podmínkách abiotického stresu u řepky olejky. *Úroda* 12, roč. LXII, vědecká příloha, s. 187 – 190.
- Keshavaiah, C., Havlíčková, L., Jelínková, I. (2014): Differential expression analysis of genes involved in abiotic stress in oilseed rape. *Úroda* 12, roč. LXII, vědecká příloha, s. 167 – 170.
- Havlíčková, L., Jelínková, I., Chikkaputtaiah, Ch., Prášil, I. T., Urban, M. O. (2013): Studium exprese genů spojených s abiotickým stresem u řepky. *Úroda* 12, roč. LXI, vědecká příloha, s. 142–145.

Aplikované výstupy:

Certifikované metodiky

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

Ověřené technologie

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

Obsah

1.	Úvod.....	11
2.	Literární přehled.....	12
2.1	Brukev řepka olejka (<i>Brassica napus</i> L. subsp. <i>napus</i>).....	12
2.2	Šlechtění řepky olejky.....	13
2.3	Abiotický stres rostlin.....	14
3.	Hypotézy a cíle práce.....	27
4.	Materiál a metody.....	28
4.1	Rostlinný materiál.....	29
4.2	Podmínky pěstování.....	29
4.3	RT-qPCR.....	31
4.4	Měření akumulace proteinu ERD10.....	33
5.	Výsledky.....	34
5.1	Experiment A) Reakce rostlin na stres chladem u fenotypově kontrastních odrůd řepky – hodnocení relativní exprese ERD10 na úrovni genu a proteinu.....	34
5.2	Experiment B) Reakce rostlin řepky na stres chladem u odrůd s kontrastní akumulací proteinu ERD10.....	39
5.3	Experiment C) Reakce regenerovaných mikrosporových embryí na simulovaný stres suchem u fenotypově kontrastních odrůd řepky.....	53
6.	Diskuse.....	57
6.1	Exprese ERD10 na úrovni genu a proteinu při stresu chladem.....	57
6.2	Exprese dalších genů potenciálně zapojených v reakci na stres chladem....	63
6.3	Exprese genů potenciálně zapojených v reakci na stres suchem.....	65
6.4	Analýza genů indukovaných abiotickým stresem u řepky.....	67
7.	Závěr.....	68
8.	Seznam literatury.....	70

1. Úvod

Rostliny, přisedlé organismy, jsou nuceny čelit různým faktorům abiotického stresu, jako je sucho, horko, mraz či vysoká koncentrace solí. Společným jmenovatelem abiotických stresorů je dehydratace buňky vedoucí k jejímu poškození (Shinozaki et al., 2003), proto v průběhu evoluce došlo u rostlin k vývoji mechanismů k obraně proti buněčné dehydrataci. Hlavním cílem šlechtění zemědělských plodin je vytvářet takové odrůdy, které pomocí těchto mechanismů odolávají nepříznivým podmínkám prostředí a i za podmínek abiotického stresu jsou schopny udržet vysokou výnosovou úroveň. Šlechtění na odolnost vůči abiotickým stresorům je v současné době jedním z nosných témat šlechtění a je rozpracováno zejména u obilovin, jak na úrovni praktického šlechtění, tak na úrovni základního výzkumu (identifikace a využívání donorů suchovzdornosti, intenzivní využívání poznatků z genetiky a genomiky – MAS, QTL, microarray analýza, analýza transkriptomu a identifikace genů zapojených do reakce rostliny na stres (Fleury et al., 2010; Schmidt, 1983; Seki et al., 2001). Ve šlechtitelských programech řepky byla v případě selekce rostlin s vyšší odolností abiotických stresům pozornost po dlouhé období věnována převážně jen popisným morfologickým a fyziologickým parametrům, jako je rychlost vadnutí, polní a laboratorní mrazuvzdornost, změny na úrovni obsahu některých aminokyselin, chlorofylu, redukce výnosu u rostlin vystaveným stresu (Ashraf and Mehmood, 1990; Richards and Thurling, 1979; Shiranirad and Abbasian, 2011). V poslední době je věnována pozornost i problematice transkriptomické analýzy (He et al., 2015; Lee et al., 2008; Xian et al., 2017) a identifikaci genů přímo zapojených do reakce na stres.

2. Literární přehled

2.1 Brukev řepka olejka (*Brassica napus* L. subsp. *napus*)

Řepka olejka patří do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Je považována za fylogeneticky velmi mladý rostlinný druh. Vznikla pravděpodobně samovolným mezidruhovým křížením brukve zelné (*Brassica oleracea*) a brukve řepáku (řepice, vodnice) (*Brassica rapa*) (Kimber a McGregor, 1995; Prakash, 1980) před cca 7500 lety (Chalhoub, 2014). Jedná se tedy o amfidiploidní rostlinu s 38 chromozomy. Z brukve zelné pochází 18 chromozomů – tzv. C genom a 20 chromozomů pochází z řepice – tzv. A genom. Je možné, že C genom byl v době vzniku *B. napus* ovlivněn přikřížením některých jiných druhů rodu *Brassica*, např. *B. montana* Pourr., jak naznačují výsledky analýz chloroplastové a mitochondriální DNA (Arias a Pires, 2012). Za oblast, ze které řepka olejka pochází, dnes považujeme Středomoří, severní a západní Evropu a střední východ (Gomez-Campo, 1999; Song et al., 1988a, 1988b; Warwick a Black, 1993).

K výběru *B. napus*, jako druhu vhodného k domestikaci pravděpodobně přispěla vysoká míra její fenotypové i genotypové variability, která umožnila selekci rostlin s požadovanými vlastnostmi, a tak došlo k umělému přetvoření zdánlivě nezajímavého druhu v široké spektrum zelenin využívaných k výživě lidí i zvířat a zároveň získání rostlin pro produkci oleje pro technické využití. Podle záznamů ze starověkých civilizací střední Asie a středního východu byl řepkový olej používán ke svícení a jsou i doklady o pěstování řepky v Indii v době před 3 000 lety. Rozšíření pěstování řepky v Evropě proběhlo ve třináctém století a později řepka sehrála důležitou roli při průmyslové revoluci, neboť byla využívána k výrobě maziva (Iniguez-Luy and Federico, 2011). Využití řepkového oleje pro potravinářské účely ve větší míře umožnilo až vyšlechtění tzv. „double-low“ linií v sedmdesátých letech minulého století. Tyto linie se vyznačovaly nízkým obsahem kyseliny erukové a glukosinolátů v oleji (Shahidi, 1990). V současné době je řepkový olej doporučován nutričními specialisty po celém světě (FDA, 2018)

Ozimou řepku lze úspěšně pěstovat zejména na těžších půdách, ale v případě dostatku vody a živin i na půdách lehčích, na kterých se však musí počítat s častějším výskytem chorob a škůdců. Vyžaduje sice stanoviště s dostatečným přísunem vody, ale díky svému silně vyvinutému a hlubokému kořenovému systému je řepka schopna prospívat i oblastech s nepravidelnými srážkami. Na výši výnosu působí pozitivně vysoká vzdušná vlhkost a nižší teploty v průběhu léta. Do jisté míry je ozimá řepka odolná i proti mrazu.

V případě, že rostliny před nástupem zimního období dorostou do fáze 8 – 10 pravých listů a průměru kořenového krčku alespoň 6 mm, jsou odolné vůči teplotám -15 až -20°C (Alpmann et al., 2009).

2.2 Šlechtění řepky olejky

Od poloviny 20. století prodělalo šlechtění řepky v ČR mimořádně rychlý rozvoj, který umožnila její šlechtitelská tvárnost a přizpůsobivost. Šlechtění této plodiny bylo a je zaměřeno jak na zlepšení hospodářských vlastností, tak na zlepšení kvality oleje a šrotu a došlo i k zavedení biotechnologických technik (Baranyk et al., 2007). V průběhu let 1975 až 2004 vzrůstal výnos řepky olejky každý rok průměrně o 1%. Tohoto kontinuálního navyšování výnosu bylo dosahováno i přesto, že koncem 80-tých let došlo k přesunutí kvalitativního šlechtění z odrůd „0“ na šlechtění odrůd „00“, tedy odrůd se sníženým obsahem kyseliny erukové a glukosinolátů, a že se vlivem rozšíření pěstování této plodiny zvýšilo i riziko chorob a škůdců (Alpmann et al., 2009).

Šlechtění liniových odrůd

Řepka olejka má nyní díky intenzivnímu šlechtění charakter převážně samosprašné rostliny. Potomci vzniklí samoopylením se vyznačují nízkou úrovní inbrední deprese. Díky řízenému samoopylení dochází k homozygotnosti a tedy k zafixování požadované výnosnosti, kvality a odolnosti (Alpmann et al., 2009). K rychlejšímu ustálení vlastností linií se dnes využívá produkce dihaploidů (Klíma et al., 2015) Vývoj nové liniové odrůdy, kterou je možno uvést na trh trvá 8 – 14 let v závislosti na použití inbreedingu nebo tvorby dihaploidů (Alpmann et al., 2009). Výnosový potenciál elitních liniových odrůd se dnes vyrovnává výnosu hybridů (Baranyk, 2018; Baranyk et al., 2007).

Šlechtění hybridních odrůd

Díky heteroznímu efektu mají hybridní odrůdy o 5 – 10 % vyšší výnos než liniové odrůdy, jejich výroba je však mnohem náročnější, což se odráží na jejich ceně (Baranyk et al., 2007). Mezi jejich výhody je třeba také zmínit vyšší odolnost proti nepříznivým přírodním podmínkám, kdy tyto odrůdy poskytují výnos i při pozdním výsevu nebo při tuhé zimě (Alpmann et al., 2009). Pro hybridní šlechtění se u řepky v současnosti využívají hybridní systémy MSL Lembke, CMS Ogu-INRA, Safecross a mimo Evropu i

systemy Polima a Shaan, další hybridní systémy jsou založeny na autoinkompatibilitě (Zehnálek, 2018).

Šlechtění řepky na odolnost stresu

Vzhledem k velkému zastoupení řepky v osevním postupu, intenzivním technologiím pěstování a rozvoji škodlivých činitelů je při pěstování řepky aplikováno značné množství pesticidů. Odrůdy, které by projevily alespoň částečnou odolnost vůči některým chorobám či škůdcům jsou proto trvalým šlechtitelským cílem. Šlechtění na rezistenci proti některým houbovým chorobám – např. *Plasmodiophora brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Sclerotinia sclerotiorum* bývá méně komplikované než v případě ostatních chorob. V případě hlízenky (*Sclerotinia sclerotiorum*) se nabízí i nepřímá rezistence při použití apetalních forem řepky. Komplikovanější je šlechtění na odolnost k fómovému černání stonku, neboť existuje mnoho ras tohoto patogena a odolnost je navíc polygenně založena a během ontogeneze rostliny se projevují různé geny rezistence. Proto se využívá efektivní selekce odolných linií pomocí molekulárních markerů. Při šlechtění na rezistenci proti škůdcům se nabízí využití glukosinolátů v zelených částech rostlin, které by plnily obrannou funkci (Baranyk et al., 2007).

2.3 Abiotický stres rostlin

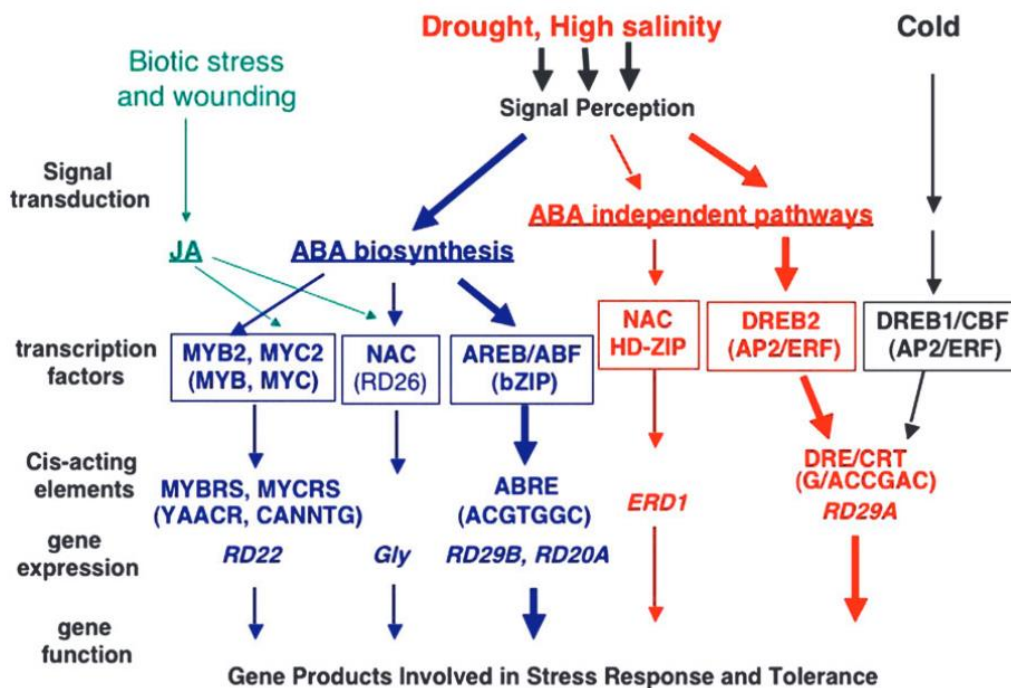
Klíčovým faktorem, který zásadně ovlivňuje růst a vývoj rostlin a tím snižuje jejich životaschopnost je abiotický stres. Jedná se o sucho, zasolení, horko, chlad, mráz, dostupnost živin, intenzita světla, ozón a nedostatek kyslíku. U odrůd zemědělsky využívaných plodin brání plnému využití jejich genetického 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). Téměř každý rok je některá část planety postižena ničivým suchem, které způsobuje ztrátu úrody (Nakashima 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 a 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 represí transkripce genů, které jsou spojeny s akumulací stresových proteinů (Örvar et al., 2000). Tyto geny můžeme dělit do dvou skupin. První skupina genů kóduje proteiny, které přímo chrání rostlinu před působením stresu, zatímco druhá skupina genů reguluje genovou expresi a přenosy signálů při reakci na stres. Řada z těchto genů kóduje signální molekuly – např. enzymy zapojené v metabolismu fosfolipidů, mitogenně aktivované proteinové kinázy (MAP kinázy), calcium-dependent proteinové kinázy (CDPK), receptorům podobné kinázy (RLK) a histidinové kinázy (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000). V indukci genů zapojených v reakci na stres je zapojeno několik transkripčních regulačních systémů, které mohou nebo nemusí být řízeny kyselinou abscisovou (jedná se tedy o ABA-dependent, či ABA-independent transkripční regulační systémy) (Nakashima et al., 2014; Thomashow, 1999).

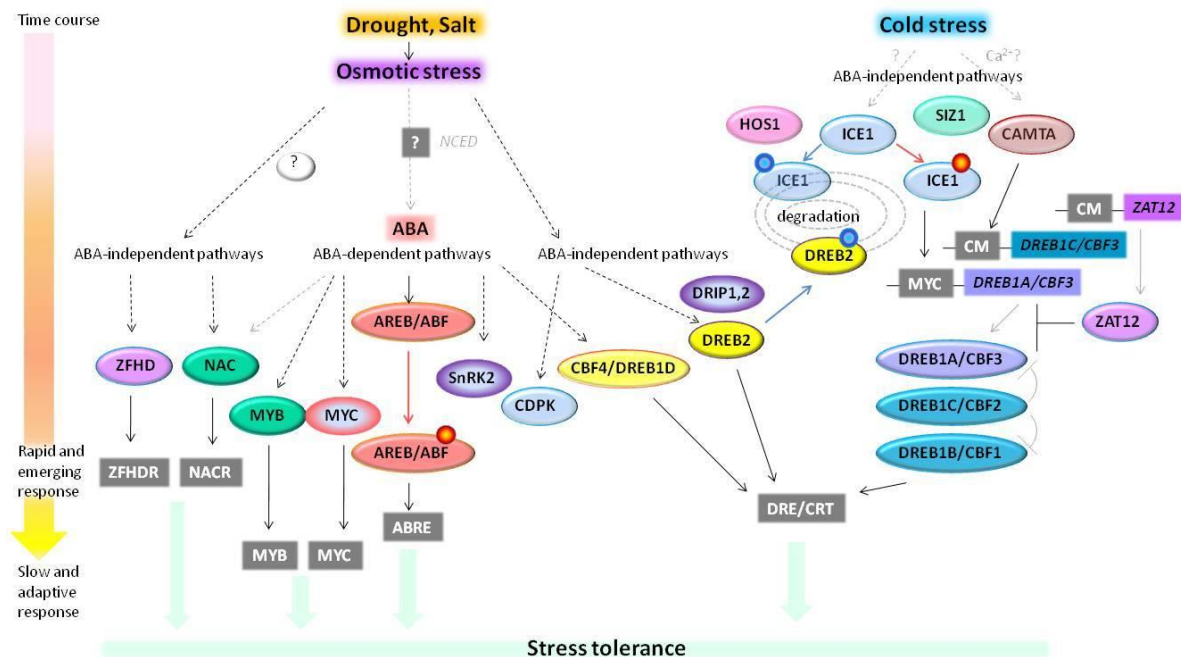
Podle Shinozaki et al. (2003) byla více než polovina genů indukovaných stresem suchem indukována zároveň i při stresu zasolením a aplikací kyseliny abscisové, což napovídá, že signální dráhy reakcí na tyto typy stresů se prolínají. Naproti tomu, pouze 10 % genů indukovaných stresem suchem bylo indukováno také při stresu chladem. Mezi těmito geny bylo identifikováno mnoho transkripčních faktorů z proteinové rodiny DREB, vazebné faktory elementu zapojeného v reakci na etylén, rodina proteinů zinkových prstů, rodina WRKY proteinů, MYB proteinů, bHLH proteinů, bZIP proteinů a NAC proteinů. Tyto transkripční faktory společně či odděleně regulují reakce na různé stresy, čím vytváří funkční síť.

Mezi proteiny, které přímo chrání rostlinu před působením stresu byly identifikovány dehydriny (DHN), antifreeze proteiny (AFP), heat shock proteiny (HSP), proteiny obsahující cold-shock doménu (CSDP) a různé enzymy, např. alternativní oxidázy či desaturázy, případně enzymy generující/odbourávající volné kyslíkové radikály.

Na obrázku č. 1 je znázorněna síť signálních drah zapojených v reakci na abiotický stres podle znalostí v roce 2007. Na obrázku č. 2 je znázorněna prakticky ta samá síť, ale je vytvořená v roce 2010. Během několika let se znalosti těchto signálních drah výrazně prohloubily.



Obr. 1: Signální dráhy aktivující geny zapojené v reakci na abiotický stres (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007)



Obr. 2: Signální dráhy aktivující geny zapojené v reakci na abiotický stres (Hirayama and Shinozaki, 2010)

LEA (Late Embryogenesis Abundant) protein

Skupina hydrofilních proteinů, které jsou akumulovány v embryích ve stádiu dozrávání semene (Bies-Ethève et al., 2008; Hundertmark and 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 and Hinch, 2008; Ingram and Bartels, 1996; Ling et al., 2016), která byla na základě sekvenčních podobností rozdělena do několika rodin. Jejich zvýšená exprese v podmínkách vodního deficitu u rostlin a kvasinek byla zmíněna v mnoha publikacích (Imai et al., 1996; Swire-Clark and Marcotte, 1999; Xu et al., 1996; Zhang et al., 2000), stejně jako jejich akumulace při toleranci k mrazu (Danyluk et al., 1994; Ismail et al., 1999a, 1999b; Nakayama et al., 2007; Puhakainen et al., 2004). Tyto proteiny jsou přítomné prakticky u všech rostlin. Byly popsány u krytosemenných i nahosemenných rostlin (Bray, 1997), plavuní (Alpert, 2005; Iturriaga et al., 2006; Oliver et al., 2000), mechů (Alpert and Oliver, 2002; Oliver et al., 2004; Proctor et al., 2007; Saavedra et al., 2006), kapradin (Reynolds and Bewley, 1993), řas (Honjoh et al., 1995; Tanaka et al., 2004), ale i u bakterií a kvasinek (Garay-Arroyo et al., 2000), hlístic (Browne et al., 2004; Solomon et al., 2000), archeí (Campos et al., 2013) i hub (Abba' et al., 2006).

Sjednocujícím a typickým znakem většiny těchto proteinů je vysoká hydrofilnost a vysoký obsah glycinu a dalších malých aminokyselin – alaninu a serinu (Baker et al., 1988). Většina těchto proteinů se dá začlenit do známější skupiny proteinů nazývané „hydrofiliny“, které jsou charakterizovány jako proteiny, které obsahují více než 6 % glycinu a jejich index hydrofilnosti je vyšší než 1 (Battaglia et al., 2008; Garay-Arroyo et al., 2000). Na základě primární struktury některých LEA proteinů byla vymodelována pomocí modelovacích softwarů jejich konformace (Close, 1996; Dure et al., 1989), ale experimentální studie prokázaly, že žádnou terciální strukturu nemají (Dyson and Wright, 2005; Goyal et al., 2003; Ismail et al., 1999b; Kovacs et al., 2008; Mouillon et al., 2006; Russouw et al., 1997; Shih et al., 2004; Soulages et al., 2002, 2003; Tompa, 2005; Wolkers et al., 2001).

Dehydriny

Dehydriny jsou hydrofilní a termostabilní proteiny (Rurek, 2010) a jsou prakticky všudypřítomné v rámci druhů nahosemenných i krytosemenných rostlin (Close, 1996), kapradin, mechů, řas a sinic (Close, 1997), což dokazuje, že se z hlediska evoluce jedná o konzervativní proteiny (Liu et al., 2017). Dosahují molekulových hmotností v rozmezí 9 – 200 kD (Ouellet et al., 1993). Jejich typickým znakem je konzervativní doména zvaná „K-segment“, která se v minimálně v 1, ale až v 11 kopiích nachází blízko C-konci molekuly (Close, 1997). K-segment je na lysin bohatá aminokyselinová sekvence (EKK GIM E/DKI KEK LPG), která plní antioxidační, chaperonovou a proti krystalům ledu ochrannou funkci (Koag et al., 2009). Dalším motivem, který se často vyskytuje v proteinech této rodiny je tzv. Y-segment - na tyrosin bohatá aminokyselinová sekvence (V/TDE/QYGNP) vyskytující se blízko N-konce molekuly, která má pravděpodobně schopnost vázat se nespecificky na DNA a RNA (Close, 1996, 1997; Hughes et al., 2013) a S-segment tvořený 4 – 10 serinovými zbytky, které jsou začleněny v konzervativní sekvenci (LHRSGS4-10(E/D)3). S-segment může být v průběhu stresu fosforylován (Alsheikh et al., 2005; Battaglia et al., 2008; Brini et al., 2007; Haimi et al., 2017), což ovlivňuje schopnost proteinu vázat ionty (Alsheikh et al., 2005; Maszkowska et al., 2019) a umožňuje to translokaci proteinu do jádra (Brini et al., 2007).

Podle uspořádání těchto konzervativních motivů jsou dehydriny děleny do 5 podtříd: K_n , SK_n , K_nS , Y_xK_n , a Y_xSK_n , kdy písmena „n“ a „x“ označují počet opakování příslušného motivu v sekvenci (Close, 1996; Rorat, 2006). Allagulova et al., (2003) uvádí, že zatímco Y_xSK_n dehydriny jsou indukovány při stresu suchem a při působení ABA, kyselé skupiny dehydrinů SK_n , K_nS a Y_xK_n jsou akumulovány zejména při stresu chladem.

Jejich účast v reakci na abiotický stres byla prokázána např. u růží (Haimi et al., 2017; Ouyang et al., 2019), bříz (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).

Dehydriny hrají zásadní roli v průběhu závěrečné fáze embryogeneze a desikační fáze vývoje semene (Kalemba, 2007), dále jsou považovány za stresové proteiny zapojené v ochraně rostliny před dehydratací způsobenou suchem, chladem, mrazem či zasolením (Hanin et al., 2011; Kosová et al., 2014). To dokládá např. zvýšená chladová odolnost transgenních bakterií *E. coli*, či transgenních rostlin tabáku, u kterých bylo

overexprimováno několik dehydrinových genů z meruňky japonské (*PmLEA*) (Bao et al., 2017). Podobné zvýšení tolerance k osmotickému stresu u rostlin či bakterií, které overexprimují geny pro dehydriny, bylo publikováno v řadě dalších aktuálních publikací (Agarwal et al., 2017; Brini et al., 2007; Drira et al., 2013; Hara et al., 2003; Liu et al., 2015b; Lv et al., 2017; Yang et al., 2015; Zhou et al., 2017). Některé dehydriny jsou také pravděpodobně zapojeny do procesu odbourávání volných kyslíkových radikálů vazbou kovových iontů (Hara et al., 2005; Kruger et al., 2002; Mittler, 2002).

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 and Boddington, 2014; Hanin et al., 2011; Liu et al., 2017). Ve vodném prostředí dehydriny zaujímají konformaci neuspořádaného řetězce, tvoří 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 a ten je tak chráněn před další ztrátou vody, která by vedla k jeho denaturaci (Ingram, Bartels, 1996). Podle Hughesové et. al. (2013) dehydriny s delšími řetězci aminokyselin chrání proteiny před denaturací účinněji. Některé dehydriny jsou schopny tvořit homo- i heterodimery, díky čemuž mohou dehydriny s kratšími řetězci zvyšovat svoji účinnost (Hernandez-Sanchez et al., 2017) a zároveň mohou být lépe chráněny před degradací, ke které jsou proteiny s neuspořádanými řetězci náchylné (Uversky and Dunker, 2010).

Hughesová a Graether (2010) naproti tomu tvrdí, že mechanismus účinku dehydrinů je založen na phi-segmentu, který pomáhá dehydrinu udržovat neuspořádanou strukturu a díky tomu může fungovat jako tzv. molekulární štít, který chrání okolní částečně denaturované proteiny před vzájemnou interakcí a K-segment slouží spíše k udržení dehydrinu na povrchu proteinu. Oba možné mechanismy účinku jsou pouze teoretické, přesný mechanismus není zatím znám.

Dehydrin ERD10

Bndhn ERD10 je gen ze skupiny SK_n dehydrinů, tzn. obsahuje 1 S-segment a 2 K-segmenty (Deng et al., 2005). Molekulová hmotnost proteinu ERD10 je 29 kD, je termostabilní a citlivý na degradaci proteinázami (Kovacs et al., 2008). Jako typický dehydrin má za normálních podmínek neuspořádanou strukturu (Cedeño et al., 2017) a je

vysoce hydrofilní, což dokazuje fakt, že na SDS-PAGE má menší mobilitu, než odpovídá jeho skutečné molekulové hmotnosti (45 kD místo 29 kD) (Kovacs et al., 2008). Je tvořen 271 aminokyselinami (Deng et al., 2005) a je schopen tvořit homodimery i heterodimery s některými dalšími dehydriny (Hernandez-Sanchez et al., 2017). Podle přítomnosti ABRE elementů G-boxu (ACGT sekvence) v promotoru tohoto genu se dá usoudit, že se jedná o gen řízený kyselinou abscisovou (Deng et al., 2005). Protein ERD10 se vyskytuje pouze v cytosolu, není transportován do buněčného jádra (Hernandez-Sanchez et al., 2017).

Gen *Bndhn ERD10* je exprimován při stresu chladem, zasolením a při aplikaci kyseliny abscisové (Deng et al., 2005). U modelové rostliny huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) v rané fázi stresu dochází k fosforylaci S-segmentu proteinu ERD10 proteinovými kinázami SnRK2, které jsou aktivovány již během několika prvních minut působení stresového faktoru (McLoughlin et al., 2012). Fosforylovaný protein váže více dvouvazných kovových iontů, zejména vápníku (Alsheikh et al., 2005). ERD10 může ve fosforylovaném stavu díky vysoké vazebné kapacitě fungovat jako pufr Ca^{2+} iontů, čímž může ovlivňovat celou signalizaci v průběhu osmotického stresu (Maszkowska et al., 2019).

2.4 Průběh reakce rostliny na stres

1. Poplachová fáze

Jako signál z prostředí, který rostlina zaznamená, můžeme chápat např. změnu fluidity plazmatické membrány v případě působení nízkých nebo naopak vysokých teplot, či změnu vodního potenciálu, koncentrace sodíkových iontů v případě stresu suchem, či zasolením (Kosová et al., 2015). Informace je dál předána do jádra tzv. druhými posly, kterými jsou Ca^{2+} ionty. Lokalizace a nárůst koncentrace těchto iontů se liší v závislosti na druhu a intenzitě působení stresu (McAinsh and Pittman, 2009). Koncentrace těchto iontů v cytosolu je regulována pasivním (Ca^{2+} kanály) i aktivním transportem (Ca^{2+} ATPázy a Ca^{2+} antiporty) přes plazmatickou membránu či membrány organel. Změny v koncentraci Ca^{2+} iontů v cytosolu mohou být jen velmi krátké, ale i déletrvající, či se mohou pravidelně opakovat. Fyziologická odpověď pak závisí na typu buňky, pletivu, orgánu, na původu Ca^{2+} (extracelulární, z organel) a také na amplitudě a frekvenci signálů (Knight et al., 1996). Takto přenesená informace je dále přijímána Ca^{2+} vazebnými proteiny, tzv. senzory, které buďto navázáním vápenatého iontu změni svoji konformaci,

což se projeví změnou enzymové aktivity interagujícího partnera (např. stimulace aktivity ACA Ca^{2+} pumpy calmodulinem), a nebo změnou své konformace přímo vyvolá intramolekulární interakci v sobě samém (např. intramolekulární aktivace Ca^{2+} -závislé proteinové kinázy – CDPK) (Sanders et al., 2002).

Signál přenášený vápenatými ionty pomocí senzorů tedy spouští kaskádu dalších efektů vedoucích k fosforylaci signálních proteinů (MAPK, CDPK, SnRK2, PP2C), transkripčních faktorů (ABI5), transportních proteinů (aquaporiny, H^+ -ATPáza) a ochranných proteinů (COR/LEA) (Yang et al., 2013; Zhang et al., 2014). Odpověď rostliny na stres mohou také ovlivňovat tzv. 14-3-3 proteiny, které se mohou vázat na signální proteiny, kinázy regulující buněčný cyklus a iontové přenašeče (Denison et al., 2011). Přenos signálu končí úpravou genové exprese pomocí transkripčních faktorů, jejichž aktivita může být ještě ovlivněna působením fytohormonů, např. kyselina abscisová (ABA), kyselina jasmonová (JA), kyselina salicylová (SA) a jiných (Kosová et al., 2015).

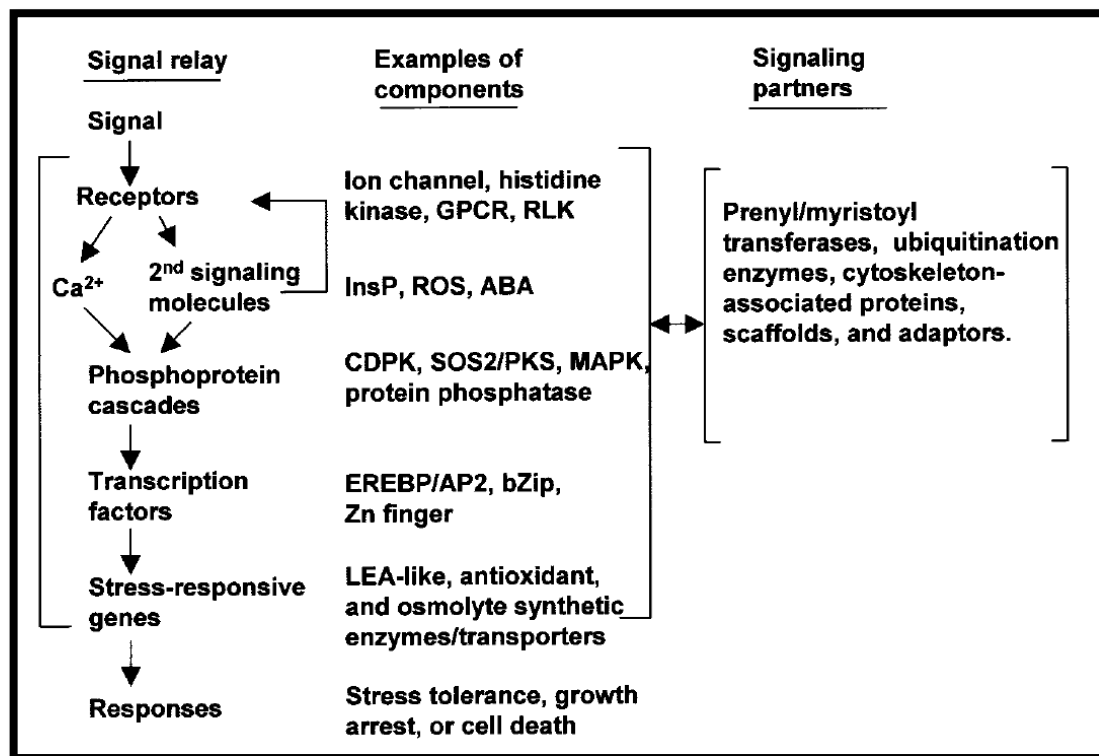
2. Fáze aklimatizace

Změny v expresi genů samozřejmě souvisejí se změnou v akumulaci proteinů, které se na základě těchto genů syntetizují. Zároveň dochází ke změnám metabolismu aminokyselin. Některé z aminokyselin totiž fungují jako prekurzory při reakci na stres či dokonce jako klíčové komponenty v metabolických drahách spojených s metabolismem uhlíku a dusíku. Součástí aktivní odpovědi rostliny na stres je také zvýšená potřeba energie, proto dochází k syntéze proteinů s ochrannou funkcí (např. RubisCO aktiváza A, RubisCO aktiváza B) (Kosová et al., 2015) a ke štěpení zásobních látek, jako jsou např. polysacharidy a zásobní proteiny (Kosová et al., 2013).

3. Fáze rezistence

Společným projevem působení většiny abiotických stresorů (sucho, chlad, mráz, horko, zasolení) na rostlinu je buněčná dehydratace, která způsobuje riziko narušení konformace proteinů v důsledku ztráty hydratačního obalu (Kosová et al., 2015). Jednou z odpovědí na dehydrataci je syntéza proteinů z rodiny COR/LEA (Ingram and Bartels, 1996; Thomashow, 1998, 1999), kam patří i dehydriny, ochranné proteiny známé také jako skupina LEA-II proteinů (Ingram and Bartels, 1996) a LEA-III proteiny, mezi které patří např. chloroplastový protein COR14b (Vágújfalvi et al., 2000). Další proteiny, které

mají stejně jako COR/LEA proteiny chránit především membránové proteiny před dehydratací, jsou heat-shock proteiny (HSP), osmoprotektanty a lapače volných radikálů (Bohnert and Sheveleva, 1998). Všeobecné znázornění reakce rostliny na abiotický stres je znázorněno na obrázku č. 3.



Obr. 3: Všeobecné znázornění dráhy pro reakci rostliny na chlad, sucho, stres suchem (Xiong et al., 2002)

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., 2012a). Vodní deficit

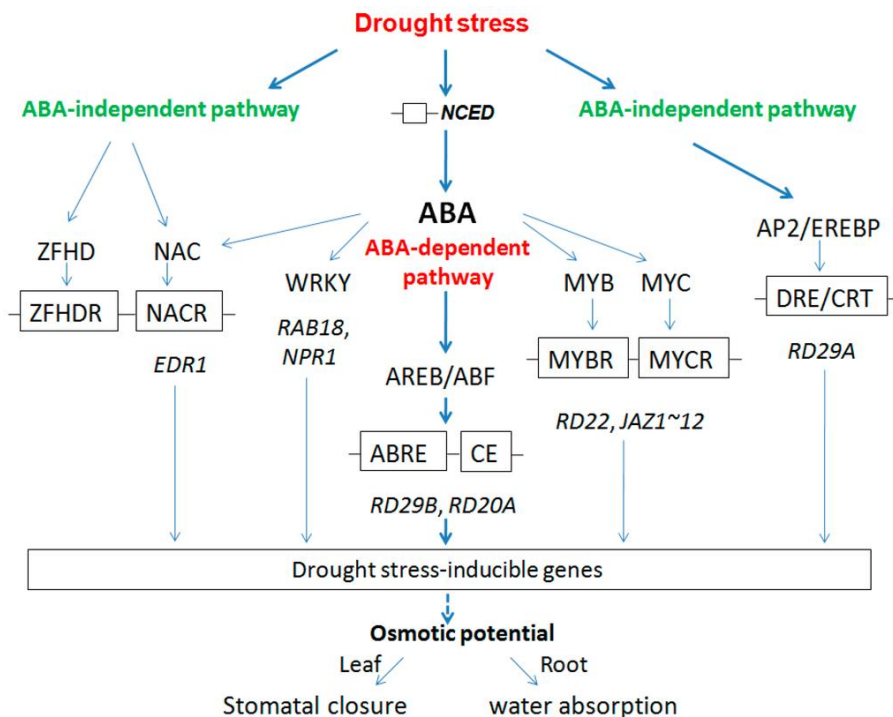
spouští biosyntézu ABA, její akumulaci a distribuci xylémem do celé rostliny (Wilkinson and Davies, 2002). ABA snižuje ztráty vody tím, že zavře průduchy a zamezí jejich znovuotevření. Modulační průduchové štěrbině je spojena se souborem buněčných biochemických procesů – aktivací G-proteinů (Coursol et al., 2003), produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) (Pei et al., 2000), syntézou oxidu dusnatého (Bright et al., 2006), zvyšováním cytosolického pH, zvyšováním obsahu Ca^{2+} , a to jak vtokem přes plasmatickou membránu, tak uvolňováním z cytosolických rezerv (Pei et al., 2000), proteinovou fosforylací i defosforylací a přeskupením cytoskeletu (Hwang and Lee, 2001). Výsledkem těchto událostí je otevření iontových kanálů a odtok K^+ , Cl^- a malátových iontů ze svěřacích 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 and Gupta, 2005), dochází k aktivaci Ca^{2+} vazebných proteinů – calmodulinů, calmodulinům podobných proteinů, calcineurin-B podobných proteinů a proteinových kináz závislých na Ca^{2+} (CDPK) výsledkem jejichž působení je aktivace exprese genů (Klimecka and Muszynska, 2007).

V reakci na stres suchem se spouští 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 proteiny (viz. kapitola LEA proteiny) (Ling et al., 2016) a proteiny, které chrání proti oxidaci kyslíkovými radikály (např. glutathion peroxidáza, superoxid dismutáza, askorbát peroxidáza a glutathion reduktáza (Amudha and Balasubramani, 2011).

Při stresu suchem byla prokázána také vyšší míra exprese transkripčních faktorů MYC, MYB, bZIP, C2H2 a NAC (Pereira et al., 2011). Tyto faktory interagují s *cis*-elementy v promotorech a tvoří transkripční komplex s TATA boxem, který aktivuje RNA polymerázu a zahajuje transkripci příslušných genů (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005). Model celé reakce rostliny na stres suchem je znázorněn na obrázku č. 4.



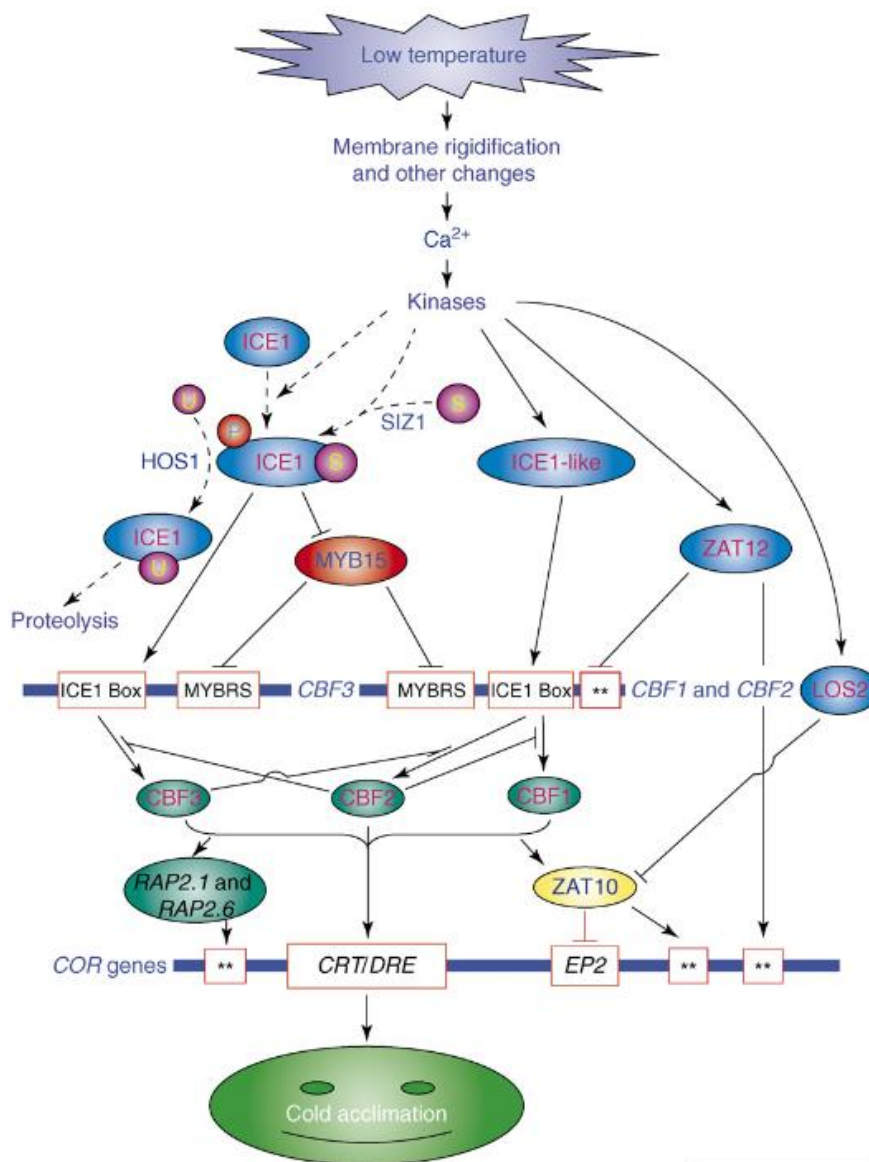
Obr. 4.: Předpokládaný model reakce na stres suchem v kořenech a listech u řepky olejky (Liu et al., 2015a)

Reakce rostliny na stres chladem

Chlad ovlivňuje růst a vývoj nejen zemědělsky využívaných rostlin po celém světě. Schopnost rostlin přežít mrazivé období závisí na jejich schopnosti aklimatizace (McKhann et al., 2008). Projevem mrazu v rostlině je tvorba ledových krystalů v mimobuněčných prostorech, které způsobuje poškození buněk (Sakai and Larcher, 1987). Díky nižšímu osmotickému potenciálu ledu (v porovnání s vodou) dochází k proudění vody skrz membrány ven z buněk. Tím dochází k buněčné dehydrataci (Rihan et al., 2017).

Vystavení rostlin nízkým teplotám nad bodem mrazu vede k aklimatizaci rostlin, díky které jsou rostliny připraveny na období teplot pod bodem mrazu (Thomashow, 2010). Při aklimatizaci k chladu dochází k redukci rychlosti růstu, snižuje se obsah vody v pletivech, zvyšuje se produkce antioxidantů, kyseliny abscisové a osmotitů v podobě cukrů či prolinu (Kurepin et al., 2015; Tao et al., 1998; Yadav, 2010). Dále dochází ke změně v expresi stovek genů, které kódují buď proteiny, které mají přímo ochrannou funkci (např. LEA proteiny) nebo proteiny, které regulují genovou expresi při stresu chladem. U *Arabidopsis* byla identifikována rodina transkripčních faktorů CBF/DREB1 zásadním článkem chladové aklimatizace. Tyto transkripční faktory se vážou na specifické sekvence v promotorech genů zapojených v reakci na chlad a dehydrataci a spouští jejich transkripci (Rihan et al., 2017). Mezi tyto geny patří např. COR geny, které jsou nezbytné při toleranci k chladu (Mizoi et al., 2012) a patří mezi dehydriny (Close, 1997). Akumulace dehydrinů je pravděpodobně hlavní fyziologickou odpovědí na stres chladem, zároveň je také aktivován antioxidantní systém jako ochrana před fotooxidativním stresem (Haimi et al., 2017).

Zvýšení exprese transkripčních faktorů CBF/DREB1 bylo pozorováno již po 15 minutách vystavení rostliny podmínkám chladu. Tato velmi rychlá reakce naznačuje, že protein fungující jako přenašeč signálu je pravděpodobně přítomen neustále, i v době, kdy je teplota prostředí příznivá. Tento protein byl nazván jako ICE (v anglickém jazyce zkratka pro „spouštěč exprese CBF“) (Gilmour et al., 1998). Tento protein (nebo další proteiny, se kterými interaguje) je aktivován nízkými teplotami a aktivuje promotor genu pro CBF transkripční faktor (Zarka et al., 2003). Model celé reakce rostliny na stres chladem je znázorněn na obrázku č. 5.



Obr. 5.: Předpokládaný model reakce na stres chladem u Arabidopsis (Chinnusamy et al., 2007)

3. Hypotézy a cíle práce

Hypotézy disertační práce

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

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

Cíle disertační práce

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

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

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

4. Materiál a metody

Dizertační práce se zabývá analýzou genů indukovaných abiotickým stresem u rostlin řepky olejky. K testování byly na základě předchozích experimentů prováděných na našem pracovišti a na pracovišti VÚRV v Ruzyni vybrány odrůdy s kontrastní reakcí na stres chladem a suchem. Testované geny byly vybrány na základě informací dostupných v literatuře nebo na základě WGCNA (Weighted Gene Co-expression Network Analysis) a GO (Gene Ontology) enrichment analýzy (Hejna, nepublikovaná data).

V rámci práce byly provedeny 3 experimenty:

A) Reakce rostlin na stres chladem u fenotypově kontrastních odrůd řepky – hodnocení relativní exprese ERD10 na úrovni genu a proteinu. Studovaný gen *ERD10* byl vybrán na základě výsledků předchozích experimentů (Jelínková et al., 2016; Keshavaiah et al., 2014)

B) Reakce rostlin řepky na stres chladem u odrůd s kontrastní akumulací proteinu ERD10.

C) Reakce regenerantů mikrosporových embryí na simulovaný stres suchem u fenotypově kontrastních odrůd řepky. Regeneranty byly vyprodukovány na pracovišti VÚRV v Ruzyni. Studované geny byly vybrány na základě analýzy akumulace proteinů u regenerantů pomocí metody MALDI-TOF/TOF.

4.1 Rostlinný materiál

V experimentu **A)** Reakce rostlin na stres chladem u fenotypově kontrastních odrůd řepky – hodnocení relativní exprese ERD10 na úrovni genu a proteinu byly použity dvě odrůdy řepky olejky Navajo a Cadeli, které byly na základě předchozích experimentů identifikovány jako kontrastní v reakci na stres chladem. Odrůda Navajo byla vybrána jako odolná a odrůda Cadeli jako náchylná k chladu.

V experimentu **B)** Reakce rostlin řepky na stres chladem u odrůd s kontrastní akumulací proteinu ERD10 byly použity odrůdy Alaska, Ladoga, Liglory a V8. Odrůdy byly vybrány na základě odlišné rychlosti akumulace proteinu ERD10 v listech.

V experimentu **C)** Reakce regenerovaných mikrosporových embryí na simulovaný stres suchem u fenotypově kontrastních odrůd řepky byla použita regenerovaná mikrosporová embrya odvozená z rostlin odrůd Cadeli a Viking a byla stresována simulovaným suchem vyvolaným pomocí PEG. Odrůda Cadeli byla v tomto případě vybrána jako odolná a odrůda Viking jako náchylná k suchu.

4.2 Podmínky pěstování

Rostliny pro experiment **A)** Reakce rostlin na stres chladem u fenotypově kontrastních odrůd řepky a **B)** Reakce rostlin řepky na stres chladem u odrůd s kontrastní akumulací proteinu ERD10 byly vysety do sadbovačů naplněných rašelinným substrátem obsahujícím Kristalon Start, smíchaným s perlitem v poměru 5:1 vždy po jednom semínku (klíčivost 98%). Sadbovače byly umístěny do dvou fytotronů (14/10 hod. fotoperioda, 21°C ve dne, 19°C v noci, vlhkost 85 %) a rostliny byly pěstovány po dobu 5 týdnů (3 – 4 pravé listy). Ve fytotronu určeném k simulaci stresu chladem byla po této době přenastavena teplota na 4°C (experiment A), resp. 2°C (experiment B) a po dosažení této teploty byly započaty odběry vzorků v pravidelných časových intervalech. Odběry vzorků byly provedeny dle následujícího rozpisu v tabulce 1 a tabulce 2. Vzorky kontrolních rostlin (teplota stejná po celou dobu experimentu) byly odebírány v časových intervalech odpovídajících DD (průměrná denní teplota x počet dnů) stresovaných rostlin.

Z každé varianty a odrůdy byly vždy odebírány plně vyvinuté listy 4 (A) resp. 2 (B), rostlin pro následnou izolaci RNA a termostabilních proteinů a ihned zamrazeny v kapalném dusíku a uloženy v mrazicím boxu při -80°C. Před vlastní izolací RNA byl celý směsný vzorek zhomogenizován.

Tabulka 1: Rozvržení odběrů rostlin v experimentu A) Reakce rostlin na stres chladem u fenotypově kontrastních odrůd řepky

Označení vzorku - RNA	počet hodin v chladu	Označení vzorku - RNA	počet hodin pro odběr kontroly	Označení vzorku -proteiny
S1	0 hod	K1	0	Kontrola
S2	1,5 hod			
S3	3 hod			
S4	4,5 hod			
S5	6 hod			
S6	7,5 hod			
S7	24 hod			
S8	2 dny			
S9	3 dny			
S10	6 dní	K10	14	
S11	7 dní			
S12	9 dní			
S13	10 dní	K13	24	
				11 dní
S14	13 dní			
				42 dní

Tabulka 2: Rozvržení odběrů rostlin v experimentu B) Reakce rostlin řepky na stres chladem u odrůd s kontrastní akumulací proteinu ERD10

Označení vzorku	počet hodin v chladu	Označení vzorku	počet hodin pro odběr kontroly	Označení vzorku -proteiny
S1	1 hod	K1	0	Kontrola
S2	2 hod			
S3	4 hod			
S4	8hod			
S5	12 hod			
S6	18 hod			
S7	24 hod			
S8	2 dny			
S9	4 dny			4 dny
S10	6 dní			
S11	9 dní			9 dní
S12	14 dní	K2	96	14 dní
S13	22 dní			
S14	34 dní			34 dní

Regenerovaná mikrosporová embrya pro experiment „C) Reakce regenerovaných mikrosporových embryí na simulovaný stres suchem u fenotypově kontrastních odrůd řepky“ byly přemístěny na pevné diferenciační médium a byly udržovány při 22/20°C, fotoperiodě 14/10 hodin. Pro simulaci stresu suchem, resp. snížení vodního potenciálu média byl použit PEG 4000 30% w/w po dobu 24 hodin podle metodiky Verslues et al. (2006). Vzorke pro izolaci RNA i proteinů (tabulka č. 3) byly odebírány 24 hodin a 7 dní po začátku stresu (přidání PEG do média). Z každé varianty bylo odebráno 10 embryí ve formě směsného vzorku, byly ihned zamrazeny v kapalném dusíku a uloženy v mrazicím boxu při -80°C. Před vlastní izolací RNA byl celý směsný vzorek zhomogenizován.

Tabulka 3: Rozvržení odběrů rostlin v experimentu C) Reakce regenerovaných mikrosporových embryí na simulovaný stres suchem u fenotypově kontrastních odrůd řepky

Odrůda	doba stresu	varianta
Cadeli	1 den	kontrola
	1 den	stres
	7 dní	kontrola
	7 dní	stres
Viking	1 den	kontrola
	1 den	stres
	7 dní	kontrola
	7 dní	stres

4.3 RT-qPCR

4.3.1 Izolace RNA, syntéza cDNA

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. Vzorke 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.

4.3.2 Reakční podmínky qPCR a primery

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 (Tabulka 4) 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.

Tabulka 4: Sekvence použitých primerů

Gen	Forward primer	Reverse primer
<i>ERD10</i> (Cab008876.1)	CGCATATGGGTTCTACGTAATG	GATGTGATCATGTGGATAGGAGAC
<i>ERD10</i> (Cab042821.1)	AGAGGAAGAAATAGAGGTGGGT	CATCTCCAACCCATTGCTAT
<i>ERD10</i> (NM_001315610.1)	ACCACCAATATTAGGAACCA	ATATAACACTCGGAGCAG
<i>HPI</i> (Bo6rg106940.1)	GAAGGAAGAGGGGACTGACTCA	TCATCTCCTCCACCACTCCGC
<i>HP2</i> (Bo1g014860.1)	AGTGTCGGCGGTAGATATTG	GAGACGACGATCACAGGATG
<i>LTI78</i> (XM_013820820.2)	CAGAGGAAGAAGAGCATCAC	TCTTGCTCGTTGCCATCAAC
<i>NRPI</i> (XM_013801908.2)	AACCGAAACAGCCAACAGGC	GTCTGACTCGTTACGAGCGG
<i>RCI2A</i> (XM_013782979.1)	GGTTCGTCGTGTTTTCGACT	CACGCAAAGAAGGATTGAG
<i>ICE1</i> (XM_013842975.2)	ATCAGCAACTATGGAGGCGT	GTTTCCGTCGAGAACCATCG
<i>PER1</i> (XM_009146775.2)	CGTCCTCTCTCTCACCCCTG	AGCGTATTTTCCCATCGCAC
<i>PLD1</i> (XM_013841229.2)	CATGTTACGCACCATCAGAAG	GAGTTTTGTTGGTGGGATCGA
<i>L-GUL</i> (XM_009112446.2)	ACAAAGGGCAACGCATATGC	TTCAGCGCTTTTGTACACATCA
<i>BnACTIN7</i> (XM_013858992.2)	CCCTGAGCACTTTTCCAACAGA	AGAAGCATTTCTGTGGACGAT

4.4 Měření akumulace proteinu ERD10

4.4.1 Izolace termostabilních 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.

4.4.2 Vlastní měření akumulace proteinu ERD10

Na základě předchozích experimentů a provedené literární rešerše byl jako vhodný kandidát pro studium mechanismu reakce na stres chladem zvolen gen *ERD10* (NM_001315610.1). Na základě jeho sekvence mRNA v databázi NCBI byla objednána protilátka od firmy Agrisera (Švédsko).

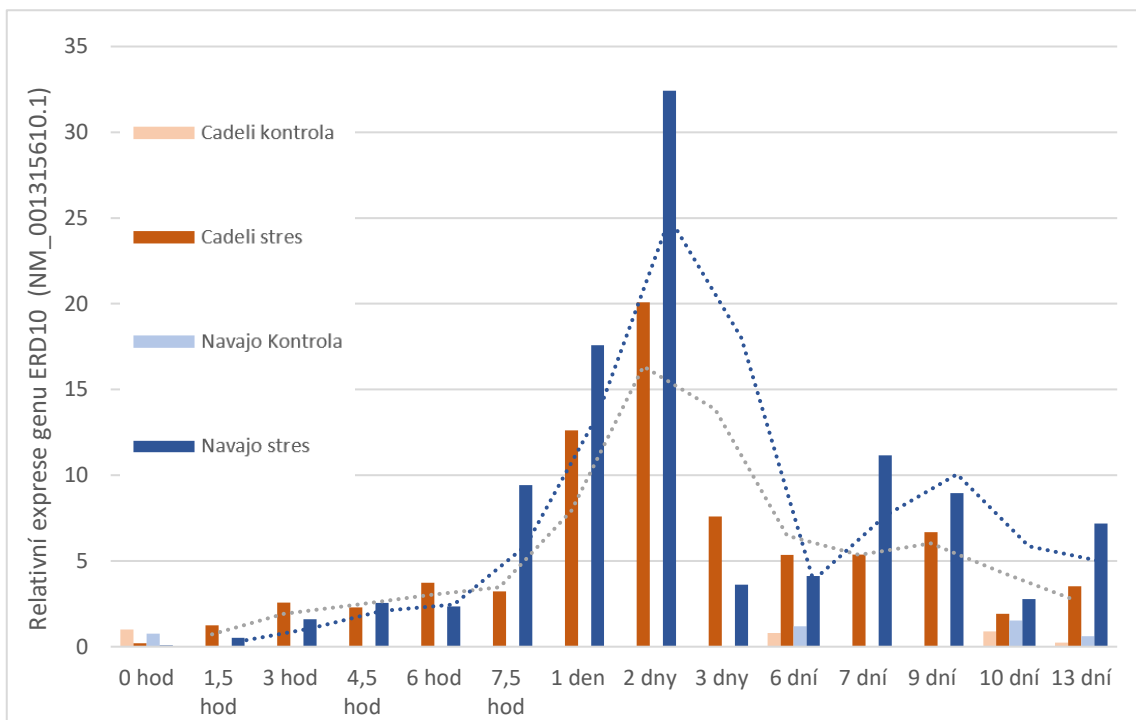
Akumulace proteinu ERD 10 byla měřena pomocí metody SPR (Surface plasmon resonance). Tato metoda využívá plazmon vznikající na rozhraní kovu a dielektrika k detekci interakcí molekul umístěných na povrchu kovu. V případě tohoto experimentu bylo kovem zlato, na němž byla nanесena speciální vrstva umožňující ukotvení makromolekul (v našem případě protilátky). Pro experimenty byl využit komerčně dodávaný biočip CS-LD (Horiba), který obsahuje chemickou vrstvu obsahující funkční skupiny vhodné pro navázání protilátky. Protilátka anti-*ERD10* (Agrisera) byla naředěna 10 mM PBS puftrem (pH 7,4) v koncentraci 1:10 000 a byla naspotována na biočip, který byl následně vyblokován etanolaminem a saturován 1% BSA. Po změření odezvy každého vzorku byl biočip regenerován 1% SDS a znovu saturován 1% BSA.

5. Výsledky

5.1 Experiment A) Reakce rostlin na stres chladem u fenotypově kontrastních odrůd řepky – hodnocení relativní exprese *ERD10* na úrovni genu a proteinu

Expresa *ERD10* na úrovni genu

Rostliny byly stresovány chladem (4°C) po dobu šesti týdnů. Pro analýzu exprese genu *ERD10* v listech rostlin byly rostliny odebírány po dobu 13 dní. Kontrolní rostliny byly odebrány na začátku experimentu, po čtrnácti hodinách a po jednom dnu trvání stresu chladem a na konci experimentu. Po přepočtu efektivních teplot odpovídá 1 den růstu v kontrolních podmínkách deseti dnům v podmínkách stresových (1 x 20°C = 10 x 2°C).



Obr. 6: Relativní exprese genu *ERD10* u rostlin odrůd Navajo a Cadeli stresovaných chladem. Graf znázorňuje hodnoty relativní exprese genu *ERD10* u chladem stresovaných (tmavě hnědé sloupce) a kontrolních (světle hnědé sloupce) rostlin odrůdy Cadeli a chladem stresovaných (tmavě modré sloupce) a kontrolních (světle modré sloupce) rostlin odrůdy Navajo v průběhu trvání stresových podmínek. Hodnoty znázorňují průměry ze tří technických opakování

U rostlin řepky odrůdy Navajo i Cadeli vystavených stresu chladem byla v porovnání s kontrolními rostlinami pozorována zvýšená exprese genu *ERD10* již v průběhu prvního dne stresu. U obou odrůd Cadeli došlo po 24 hodinách v chladu k 17násobnému zvýšení exprese v porovnání s průměrem kontrolních rostlin. Maximálních hodnot dosahovala míra exprese tohoto genu po 2 dnech stresu chladem. U odrůdy Cadeli se v porovnání s průměrem kontrolních rostlin této odrůdy zvýšila relativní exprese genu *ERD10* 27násobně. U odrůdy Navajo došlo k 32násobnému navýšení relativní exprese tohoto genu v porovnání s průměrem kontrol. Třetí den od začátku stresu došlo opět ke snížení exprese tohoto genu. Ve srovnání s kontrolami však byla relativní exprese genu *ERD10* stále u odrůdy Cadeli průměrně 7násobně a u odrůdy Navajo 6násobně vyšší.

Vliv stresu chladem na relativní expresi genu *ERD10* je u obou odrůd statisticky průkazný ($F = 984$, $p < 0,00001$). Statisticky významná je i odlišnost reakce jednotlivých odrůd na délku stresu chladem ($F = 77,2$, $p = 0,000001$). Grafické znázornění výsledků expresní analýzy je na obrázku č. 6.

Expese ERD10 na úrovni proteinu

Pro stanovení relativní akumulace proteinu ERD10 byly připraveny extrakty termostabilních proteinů z listů rostlin dvou odrůd řepky vystavených stresu chladem. Odezva biočipu byla sledována vždy současně na bodech obsahujících sérum s protilátkou a na negativní kontrole, kterou bylo pre-sérum (krevní sérum králíka před imunizací), protože k odezvě dochází i díky změně indexu lomu prostředí, případně interferencemi látek obsažených ve vzorku. Ke specifické interakci by však mělo docházet pouze na bodech obsahujících protilátku.

Vývoj biočipu probíhal v několika krocích:

1. Experimentální stanovení koncentrace protilátky vhodné k nanášení na povrch biočipu - jako nejvhodnější se ukázalo ředění protilátky 1:10000 do 10mM PBS pufru pH=7,4. Jako negativní kontrola bylo využito pre-sérum (Agrisera) dodané spolu s protilátkou.
2. Ukotvení protilátky na povrch biočipu (tzv. spotování), následované blokací zbývajících funkčních skupin povrchu etanolaminem. Pro saturaci biočipu byl použit 1% roztok BSA (obrázek č. 7).

3. Testování odezvy biočipu na různé koncentrace sledovaného proteinu. Použity byly extrakty rostlin řepky obsahující různé hladiny dehydrinu. Tyto extrakty byly ředěny v poměrech 1:30, 1:100 a 1:200 do dvou různých pufrů (10 mM PBS pH=7,4 a 10 mM Tris-HCl pH=7,5). Nejlepší odezva byla nalezena u největšího ředění a PBS pufru (obrázek č. 8).

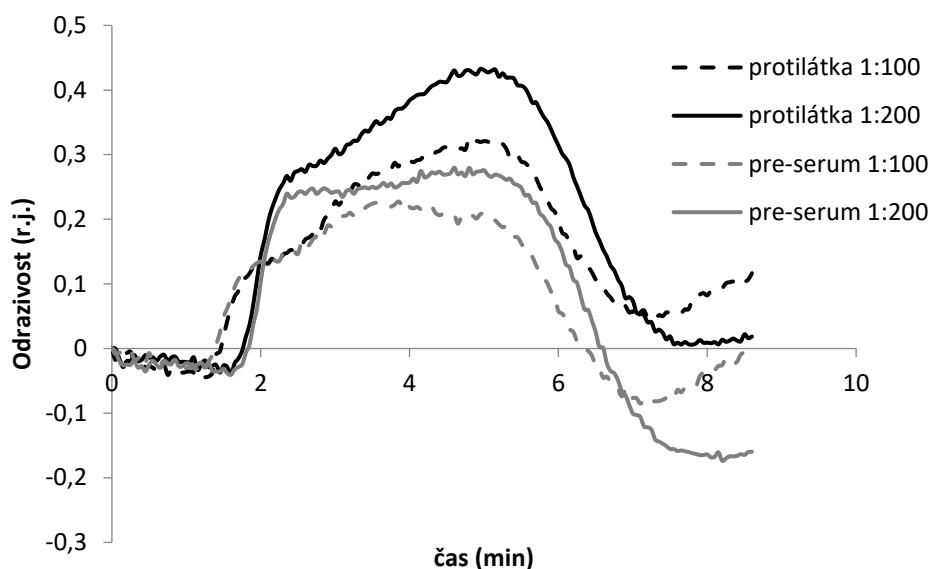
4. Regenerace biočipu, tj. vyvázání testovaného proteinu po každém vzorku, aby se postupně nesnižovala odezva biočipu. Vyzkoušeny byly roztoky solí (např. 1M NaCl), kyselin (10 - 100 mM HCl) i zásad (10 - 100 mM NaOH), jako neúčinnější byl vybrán 1% roztok SDS; tento roztok však z povrchu biočipu vymývá i BSA, po každé regeneraci je proto nutné znovu biočip saturovat 1% roztokem BSA.

5. Jako nosný pufr byl využit PBS 10mM nebo Tris 10mM. Pro kalibraci biočipu byl využit 12,5 mM Tris pufr nebo PBS pufr.

Po ukončení přípravy a testování biočipu byly měřeny jednotlivé vzorky.

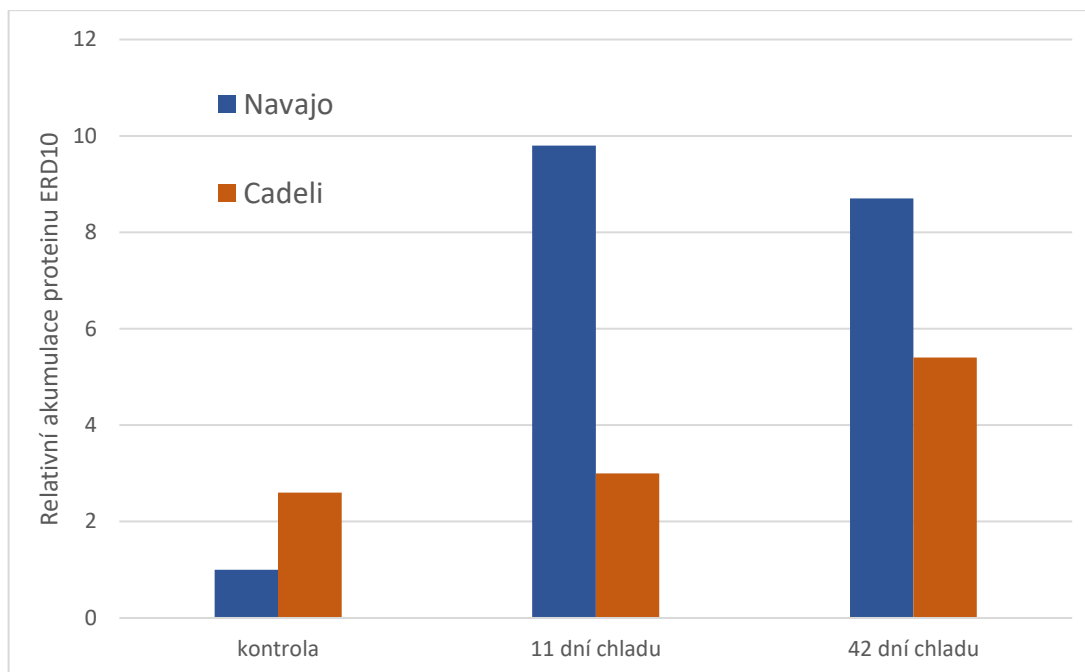


Obr. 7 Ukázka povrchu biočipu po ukotvení séra s protilátkou nebo negativní kontroly o různé koncentraci (c1 – c4). Jednotlivé koncentrace protilátky (červené body) a pre-séra (modré body) jsou na čip umísťovány v řadách. Měření pak probíhá na vybraných bodech.



Obr. 8 Příklad odezvy biočipu na různě koncentrované extrakty termostabilních proteinů

Odezva je měřena na bodech obsahujících nebo neobsahujících protilátku (protilátka resp. pre-sérum). Méně koncentrované extrakty v tomto případě dosahují lepší odezvy biočipu. Prvotní nárůst signálu je způsobený změnou indexu lomu prostředí a je společný pro oba sledované body (protilátku i pre-sérum). K dalšímu postupnému zvyšování signálu dochází vlivem interakce protein-protilátka (na bodech obsahujících protilátku). Následuje pokles signálu způsobený vymytím vzorku pufrům, přičemž na bodech obsahujících protilátku i po vymytí signál zůstává výše než na bodech s pre-sérem, což svědčí o navázání proteinu na protilátku.



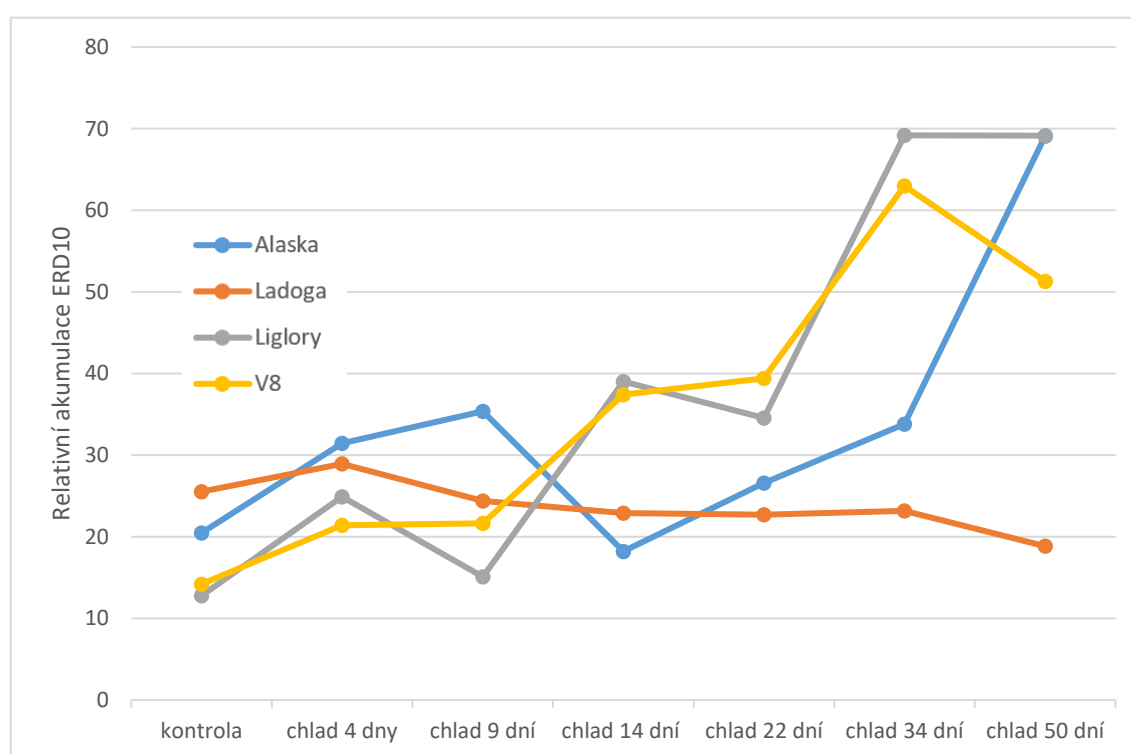
Obr. 9: Normalizované odezvy SPR – relativní akumulace proteinu ERD 10 u rostlin odrůd Navajo (modré sloupce) a Cadeli (hnědé sloupce) vystavených stresu chladem po dobu 11 a 42 dní a u rostlin kontrolních.

Grafické znázornění výsledků SPR analýzy je na obrázku č. 9. U kontrolních rostlin odrůdy Cadeli byla relativní akumulace proteinu ERD10 2,5x vyšší než u kontrolních rostlin odrůdy Navajo. Hned v průběhu 11 dní stresu chladem se akumulace tohoto proteinu u rostlin odrůdy Navajo zvýšila na téměř 10násobek akumulace u kontrolních rostlin, zatímco u rostlin odrůdy Cadeli byla akumulace proteinu s kontrolními rostlinami srovnatelná. U rostlin, které byly umístěny ve stresových podmínkách 42 dní byla relativní akumulace dehydrinu ERD 10 zvýšená u obou odrůd, u odrůdy Navajo dosahovala relativní akumulace proteinu 9ti násobku akumulace u kontrolních rostlin a u odrůdy Cadeli pouze dvojnásobku.

5.2 Experiment B) Reakce rostlin řepky na stres chladem u odrůd s kontrastní akumulací proteinu ERD10.

Expres ERD10 na úrovni proteinu

Pro stanovení relativní akumulace proteinu ERD10 byly připraveny extrakty termostabilních proteinů z listů rostlin řepky vystavených stresu chladem. Rostliny byly stresovány chladem (2°C) po dobu 34 dní. Pro analýzu akumulace proteinu ERD10 byly stresované rostliny odebrány 4., 9., 14., 34. a 50. den. Kontrolní rostliny byly odebrány na začátku experimentu.



Obr. 10: Normalizované odezvy SPR – relativní akumulace proteinu ERD10 u rostlin odrůd Alaska (modré body), Ladoga (červené body), Liglory (šedé body) a V8 (žluté body) vystavených stresu chladem po dobu 4, 6, 9, 14, 34 a 50 dní a u rostlin kontrolních.

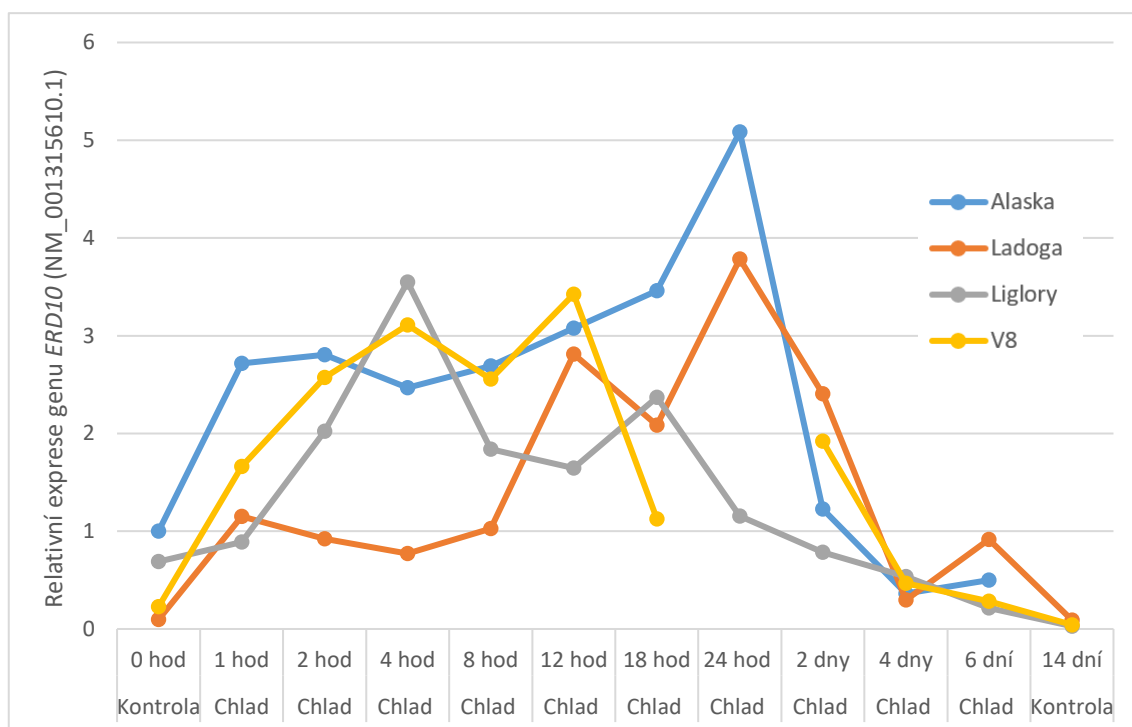
Na obrázku č. 10 je grafické znázornění výsledků SPR analýzy. Relativní akumulace proteinu ERD10 v listech kontrolních rostlin odrůd Alaska a Ladoga byla téměř dvojnásobná v porovnání s akumulací tohoto proteinu v listech kontrolních rostlin odrůd Liglory a V8. V průběhu stresu chladem bylo pozorováno navýšení relativní akumulace proteinu ERD10 v listech rostlin odrůd Liglory a V8. Po 14 dnech stresu se u rostlin těchto odrůd relativní akumulace zvýšila téměř 3x. Po 34 dnech bylo pozorováno další, téměř

pětinásobné navýšení relativní akumulace v porovnání s kontrolními rostlinami a trvá i po 50 dnech stresu chladem. U odrůdy Alaska dochází k pomalejší akumulaci proteinu v listech. Zvýšení (2,5x) akumulace proteinu ERD10 u rostlin odrůdy Alaska je pozorovatelné až po 50ti dnech stresu chladem. Z počátku vyšší relativní akumulace tohoto proteinu u kontrolních rostlin odrůdy Ladoga zůstala po dobu 50 dní stresu chladem srovnatelná i u rostlin stresovaných. Vliv stresu chladem na akumulaci dehydrinu ERD10 v listech je statisticky průkazný ($F = 10970,5$; $p < 0,0000001$), statisticky průkazná je i odlišnost akumulace tohoto proteinu u jednotlivých odrůd ($F = 4257,5$; $p < 0,0000001$). Odlišnost změny akumulace tohoto proteinu v reakci na stres chladem mezi jednotlivými odrůdami se také podařilo statisticky prokázat ($F = 3005,8$; $p < 0,0000001$).

Expresa *ERD10* na úrovni genu

Rostliny byly stresovány chladem (2°C) po dobu 34 dní. Pro analýzu exprese genu *ERD 10* v listech rostlin byly stresované rostliny odebrány po dobu 6 dní. Kontrolní rostliny byly odebrány na začátku experimentu a po 96ti hodinách. Po přepočtu efektivních teplot odpovídá 1 den růstu v kontrolních podmínkách deseti dnům v podmínkách stresových (1 x 20°C = 10 x 2°C).

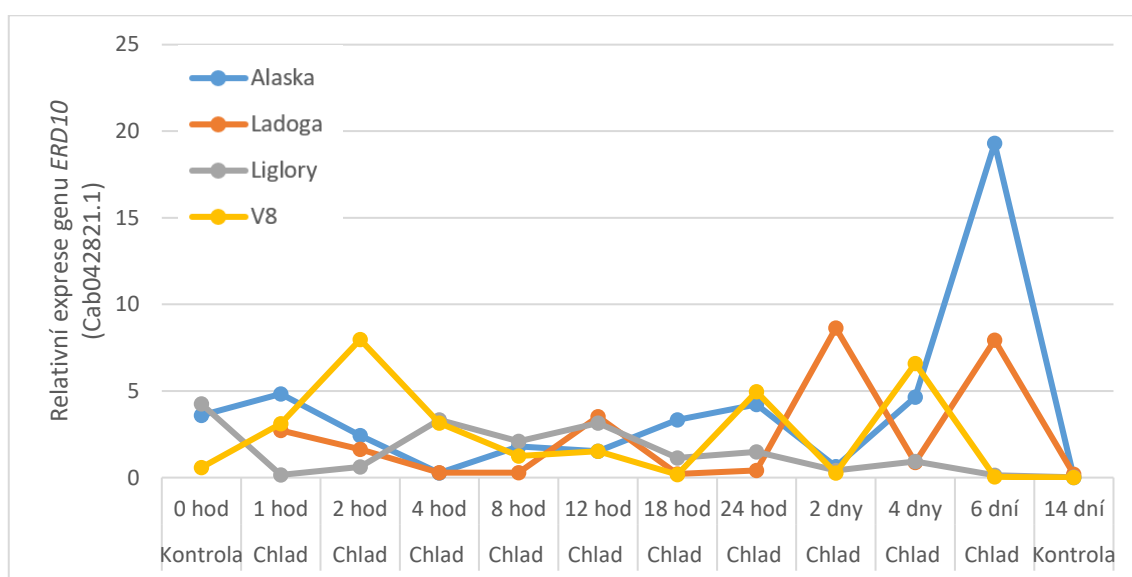
V rámci tohoto pokusu byly testovány 3 homologní geny *ERD10*: NM_001315610.1, Cab042821.1 a Cab008876.1.



Obr. 11: Relativní exprese genu *ERD10* (NM_001315610.1) u rostlin odrůd Alaska (modré body), Ladoga (červené body), Liglory (šedé body) a V8 (žluté body) vystavených stresu chladem po dobu 6 dní a u rostlin kontrolních. Hodnoty znázorňují průměry ze tří technických opakování.

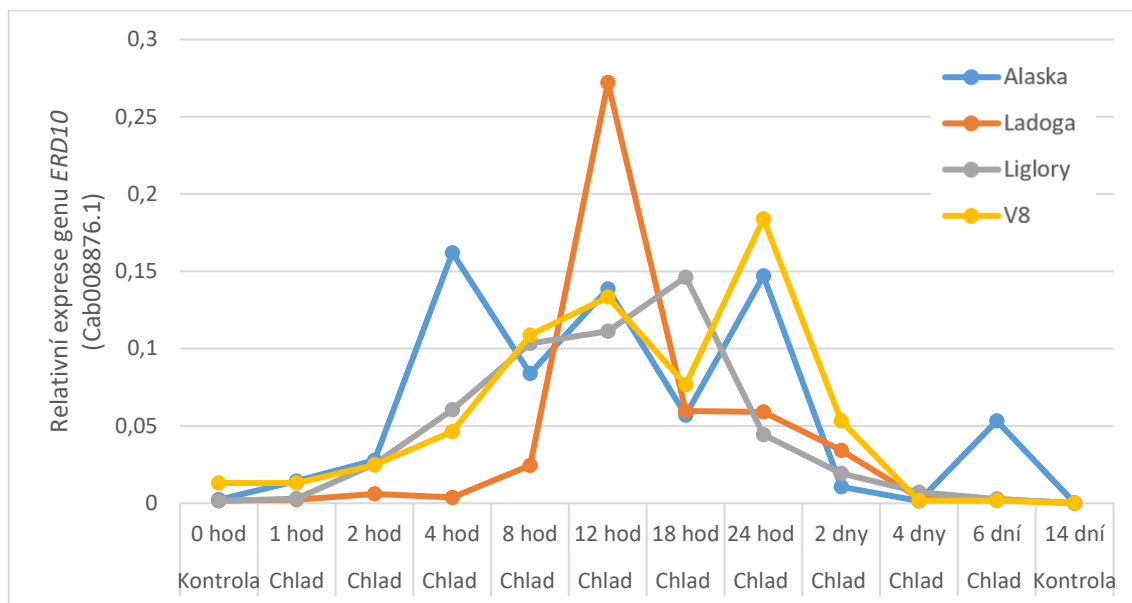
Na obrázku č. 11 je grafické znázornění expresní analýzy genu *ERD10* (NM_001315610.1). U kontrolních rostlin odrůdy Ladoga byla exprese genu *ERD10* (NM_001315610.1) na začátku experimentu přibližně 10x nižší než u kontrolních rostlin odrůdy Alaska. I u rostlin stresovaných pak byla ve většině odběrů exprese tohoto genu u odrůdy Ladoga nižší než u ostatních odrůd a u odrůdy Alaska byla spíše vyšší. U rostlin odrůd Alaska, Ladoga a V8 došlo k navýšení relativní exprese genu *ERD10* (NM_001315610.1) hned v průběhu 1. hodiny stresu chladem. U stresovaných rostlin odrůdy Ladoga byl další nárůst exprese genu *ERD10* (NM_001315610.1) zaznamenán až po 12ti hodinách stresu. Maxima dosahovala exprese tohoto genu u odrůdy Ladoga po 24 hodinách stresu, kdy byla naměřena téměř 40ti násobná exprese v porovnání s kontrolními rostlinami této odrůdy. Relativní exprese genu *ERD10* (NM_001315610.1) byla téměř po celou dobu experimentu nejvyšší u rostlin odrůdy Alaska. Maxima dosahovala exprese tohoto genu po 24 hodinách stresu, kdy došlo k 5ti násobnému navýšení v porovnání s expresí u kontrolních rostlin. U rostlin odrůdy V8 byla nejvyšší exprese genu *ERD10* (NM_001315610.1) naměřena již 12 hodin po začátku stresu chladem a dosahovala 15ti násobku exprese tohoto genu u kontrolních rostlin, poté došlo

k jejímu opětovnému poklesu. U rostlin odrůdy Liglory byla nejvyšší exprese genu *ERD10* (NM_001315610.1) naměřena dokonce již po 4 hodinách stresu chladem a v porovnání s kontrolními rostlinami této odrůdy se exprese tohoto genu zvýšila 5x. Vliv stresu chladem na relativní expresi genu *ERD10* (NM_001315610.1) v listech je u všech odrůd statisticky průkazný ($F = 23,9$; $p = 0,004$), statisticky průkazná je i odlišnost exprese tohoto genu u jednotlivých odrůd ($F = 16$; $p = 0,01$). Odlišnost změny exprese v reakci na stres chladem mezi jednotlivými odrůdami se nepodařilo statisticky prokázat.



Obr. 12: Relativní exprese genu *ERD10* (Cab042821.1) u rostlin odrůd Alaska (modré body), Ladoga (červené body), Liglory (šedé body) a V8 (žluté body) vystavených stresu chladem po dobu 6ti dní a u rostlin kontrolních. Hodnoty znázorňují průměry ze tří technických opakování.

Na obrázku č. 12 je grafické znázornění expresní analýzy genu *ERD10* (Cab042821.1). Relativní exprese homologu genu *ERD10* (Cab042821.1) byla řádově srovnatelná s relativní expesí homologu *ERD10* (NM_001315610.1). V průběhu stresu nebyl pozorován žádný výrazný trend ve změně exprese genu *ERD10* (Cab042821.1) u stresovaných rostlin, relativní exprese tohoto genu průběžně kolísá. Vliv stresu chladem na expresi genu *ERD10* (Cab042821.1), odlišnost jeho exprese u jednotlivých odrůd ani odlišnost změny exprese v reakci na stres chladem mezi jednotlivými odrůdami se nepodařilo statisticky prokázat.



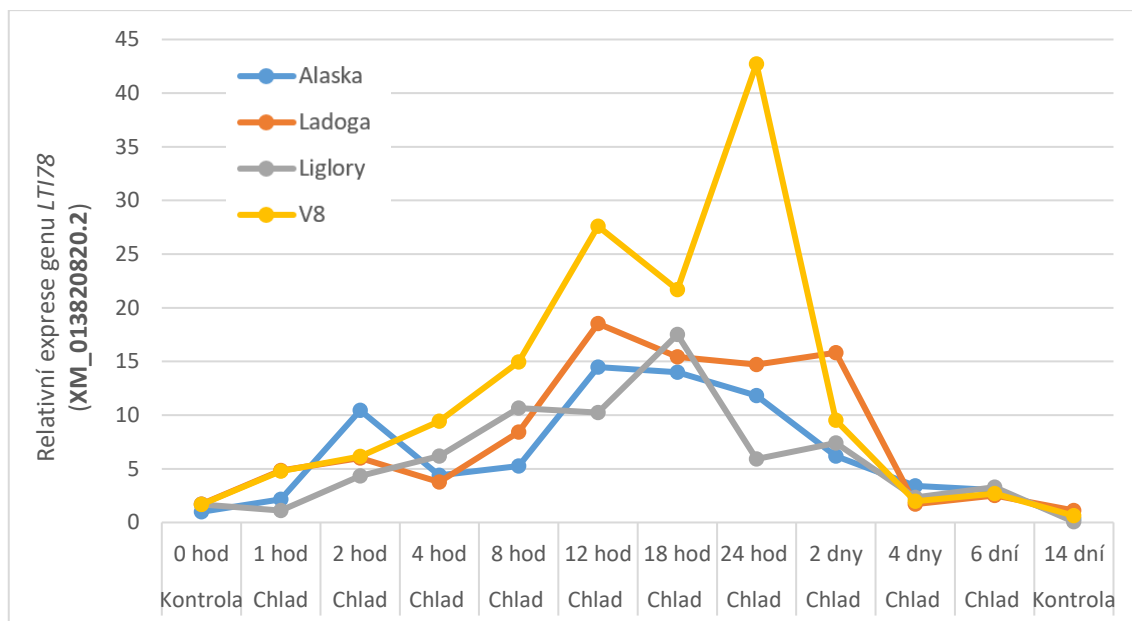
Obr. 13: Relativní exprese genu *ERD 10* (Cab008876.1) u rostlin odrůd Alaska (modré body), Ladoga (červené body), Liglory (šedé body) a V8 (žluté body) vystavených stresu chladem po dobu 6ti dní a u rostlin kontrolních. Hodnoty znázorňují průměry ze tří technických opakování.

Na obrázku č. 13 je grafické znázornění expresní analýzy genu *ERD10* (Cab008876.1). Relativní exprese homologu genu *ERD10* (Cab008876.1) u testovaných rostlin byla přibližně 100x nižší než u zbylých testovaných homologů genu *ERD10* (NM_001315610.1 a Cab042821.1). U stresovaných rostlin odrůdy Alaska byla relativní exprese genu *ERD10* (Cab008876.1) zvýšená již po 4 hodinách stresu chladem (80ti násobek relativní exprese tohoto genu v porovnání s kontrolními rostlinami) a k jejímu snížení zpět na úroveň kontrolních rostlin došlo až po dvou dnech stresu chladem, po 6ti dnech stresu chladem byla exprese tohoto genu u rostlin odrůdy Alaska opět zvýšena na 20ti násobek relativní exprese kontrolních rostlin. U chladem stresovaných rostlin odrůdy Liglory byla relativní exprese genu *ERD10* (Cab008876.1) od začátku stresu pomalu zvyšována, nejvyšší relativní exprese byla zaznamenána po 18ti hodinách stresu chladem, následně se relativní exprese tohoto genu opět snížila na úroveň kontrol. U odrůdy V8 došlo u stresovaných rostlin ke zvyšování relativní exprese genu *ERD10* (Cab008876.1), nejvyšší hodnota (14x vyšší v porovnání s kontrolními rostlinami) byla naměřena po 24 hodinách stresu chladem a následně byla relativní exprese tohoto genu opět snížena na úroveň kontrolních rostlin. U odrůdy Ladoga nebylo pozorováno pozvolné navyšování relativní exprese genu *ERD10* (Cab008876.1) jako u ostatních odrůd. U rostlin, které byly stresovány chladem po dobu 12 hodin byla naměřena 150x vyšší exprese než u rostlin

kontrolních. Při dalším působení stresu chladem se relativní exprese genu *ERD10* (Cab008876.1) u rostlin odrůdy Ladoga opět snížila, přičemž po 24 hodinách stresu byla v porovnání s relativní expresí tohoto genu u kontrolních rostlin stále 30ti násobná a po 4 dnech stresu chladem byla relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin odrůdy Ladoga srovnatelná s relativní expresí u kontrolních rostlin. Vliv stresu chladem na relativní expresi genu *ERD10* (Cab008876.1) v listech je u všech čtyř odrůd statisticky průkazný ($F = 538,7$; $p < 0,0001$), statisticky průkazná je i odlišnost exprese tohoto genu u jednotlivých odrůd ($F = 49$; $p = 0,001$). Odlišnost změny exprese v reakci na stres chladem mezi jednotlivými odrůdami se také podařilo statisticky prokázat ($F = 80,7$; $p = 0,0003$).

Genová exprese dalších vytipovaných genů potenciálně zapojených v reakci na stres chladem

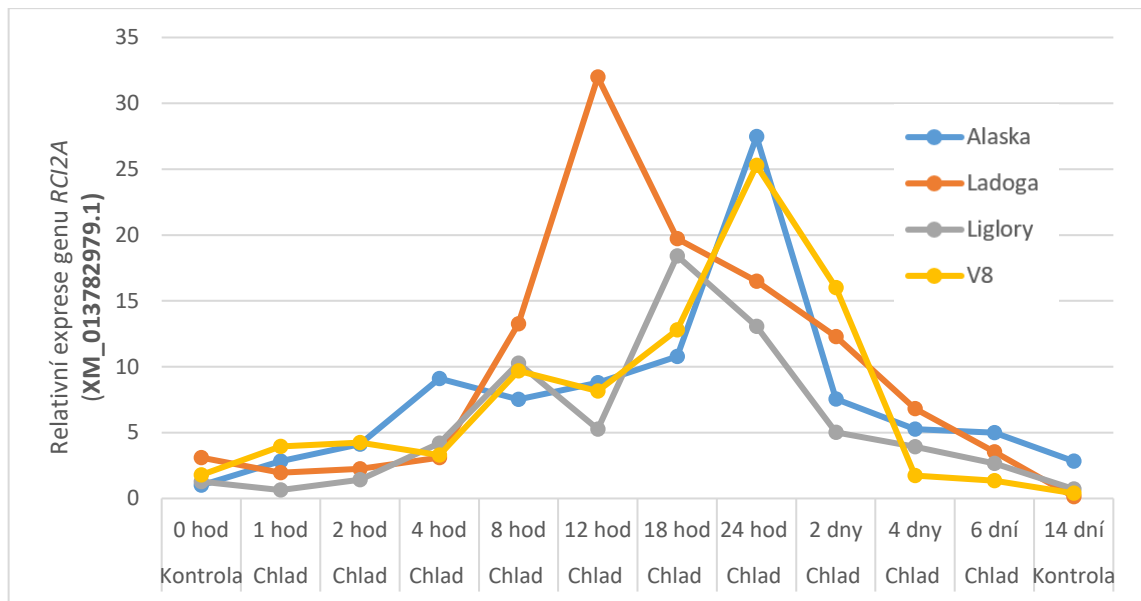
Rostliny byly stresovány chladem (2°C) po dobu 34 dní. Pro analýzu exprese genů *LTI78* (XM_013820820.2), *RCI2A* (XM_013782979.1), *NRP1* (XM_013801908.2), genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1) a genu pro hypotetický protein (Bo1g014860.1), v listech rostlin byly stresované rostliny odebírány po dobu 6 dní. Kontrolní rostliny byly odebrány na začátku experimentu a po 96ti hodinách. Po přepočtu efektivních teplot odpovídá 1 den růstu v kontrolních podmínkách deseti dnům v podmínkách stresových ($1 \times 20^\circ\text{C} = 10 \times 2^\circ\text{C}$). Studované geny a jejich sekvence byly vybrány na základě analýzy transkriptomu prováděné na pracovišti CNAP, University of York, UK.



Obr. 14: Relativní exprese genu *LTI78* (XM_013820820.2) u rostlin odrůd Alaska (modré body), Ladoga (červené body), Liglory (šedé body) a V8 (žluté body) vystavených stresu chladem po dobu 6ti dní a u rostlin kontrolních. Hodnoty znázorňují průměry ze tří technických opakování.

Na obrázku č. 14 je grafické znázornění expresní analýzy genu *LTI78* (XM_013820820.2). Relativní exprese genu *LTI78* (XM_013820820.2) se u všech sledovaných odrůd při stresu chladem zvýšila hned v průběhu prvních dvou hodin. U odrůdy Alaska došlo po dvou hodinách stresu chladem k 10ti násobnému navýšení relativní exprese tohoto genu v porovnání s kontrolními rostlinami. Po 4 a 8 hodinách byla naměřená relativní exprese genu *LTI78* (XM_013820820.2) u stresovaných rostlin odrůdy Alaska opět o něco nižší (4-5x vyšší než relativní exprese u kontrolních rostlin) a nejvyšší naměřená relativní exprese tohoto genu byla u odrůdy Alaska naměřena po 12ti hodinách stresu chladem, kdy dosahovala 14ti násobku relativní exprese kontrolních rostlin. V dalších odběrech se relativní exprese genu *LTI78* (XM_013820820.2) u odrůdy Alaska postupně snižovala. Po 6ti dnech stresu však byla stále cca 3x vyšší než u kontrolních rostlin. U odrůdy Liglory byla v průběhu stresu chladem relativní exprese genu *LTI78* (XM_013820820.2) postupně zvyšována po dobu 18ti hodin, kdy dosahovala přibližně desetinásobku relativní exprese tohoto genu u kontrolních rostlin, po 24 hodinách stresu byla relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin pouze 3x vyšší v porovnání s kontrolami a po 6ti dnech stresu byla přibližně dvojnásobná než u kontrolních rostlin odrůdy Liglory. U stresovaných rostlin odrůdy Ladoga se relativní exprese genu *LTI78* (XM_013820820.2) zvyšovala po dobu 12ti hodin stresu. Po 12ti

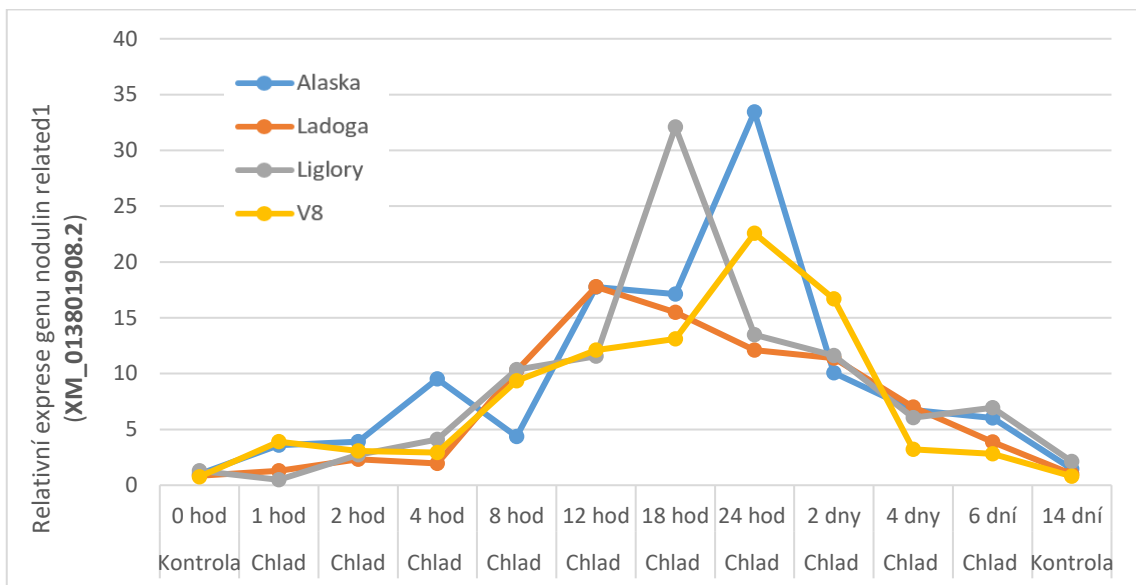
hodinách stresu chladem byla u stresovaných rostlin odrůdy Ladoga relativní exprese tohoto genu přibližně 10ti násobná v porovnání s relativní expresí tohoto genu u kontrolních rostlin. Po dvou dnech stresu chladem byla relativní exprese genu *LTI78* (XM_013820820.2) u stresovaných rostlin odrůdy Ladoga stále 9x vyšší než u kontrolních rostlin. Po 4 dnech stresu chladem byla naměřená relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin odrůdy Ladoga srovnatelná s relativní expresí tohoto genu u kontrolních rostlin. U odrůdy V8 došlo v průběhu stresu chladem k postupnému zvyšování relativní exprese genu *LTI78* (XM_013820820.2) na 16ti násobek v porovnání s relativní expresí tohoto genu u kontrolních rostlin po 12ti hodinách stresu chladem. Po 24 hodinách stresu byla relativní exprese genu *LTI78* (XM_013820820.2) zvýšená dokonce 25x v porovnání s relativní expresí tohoto genu u kontrolních rostlin odrůdy V8. Po dvou dnech stresu byla relativní exprese genu *LTI78* (XM_013820820.2) u stresovaných rostlin této odrůdy přibližně 6x vyšší než u kontrolních rostlin a po 4 dnech stresu již byla relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin srovnatelná s relativní expresí tohoto genu u kontrolních rostlin. Vliv stresu chladem na relativní expresi genu *LTI78* (XM_013820820.2) v listech je u všech čtyř odrůd statisticky průkazný ($F = 350$; $p < 0,0001$), statisticky průkazná je i odlišnost exprese tohoto genu u jednotlivých odrůd ($F = 187,5$; $p = 0,0001$). Odlišnost změny exprese v reakci na stres chladem mezi jednotlivými odrůdami se také podařilo statisticky prokázat ($F = 53,2$ $p = 0,0007$).



Obr. 15: Relativní exprese genu *RC12A* (XM_013782979.1) u rostlin odrůd Alaska (modré body), Ladoga (červené body), Liglory (šedé body) a V8 (žluté body) vystavených stresu chladem po dobu 6ti dní a u rostlin kontrolních. Hodnoty znázorňují průměry ze tří technických opakování.

Na obrázku č. 15 je grafické znázornění expresní analýzy genu *RC12A* (XM_013782979.1). Nejvyšší relativní expresi genu *RC12A* (XM_013782979.1) měly stresované rostliny odrůdy Ladoga po 12ti hodinách stresu chladem. Vzhledem k nejvyšší expresi tohoto genu u kontrolních rostlin této odrůdy (v porovnání s kontrolními rostlinami odrůdy Alaska cca 3x vyšší) bylo navýšení exprese po 12ti hodinách stresu přibližně 10ti násobné. V dalších odběrech se relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin odrůdy Ladoga postupně snižovala, po 6ti dnech byla srovnatelná s relativní expesí genu *RC12A* (XM_013782979.1) u kontrolních rostlin. U odrůdy Alaska docházelo v průběhu stresu k pozvolnému nárůstu relativní exprese genu, u stresovaných rostlin byla nejvyšší naměřená relativní exprese genu *RC12A* (XM_013782979.1) po 24 hodinách stresu chladem, kdy dosahovala 27ti násobku relativní exprese u kontrolních rostlin. U odrůdy V8 docházelo také v průběhu stresu k pozvolnému nárůstu relativní exprese genu *RC12A* (XM_013782979.1), po 24 hodinách stresu byla relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin přibližně 13x vyšší než u rostlin kontrolních. Po dvou dnech stresu byla relativní exprese genu *RC12A* (XM_013782979.1) u stresovaných rostlin odrůdy V8 9x vyšší než u rostlin kontrolních a po 4 dnech stresu byla relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin srovnatelná s relativní expesí tohoto genu u rostlin kontrolních. Vliv stresu chladem na relativní

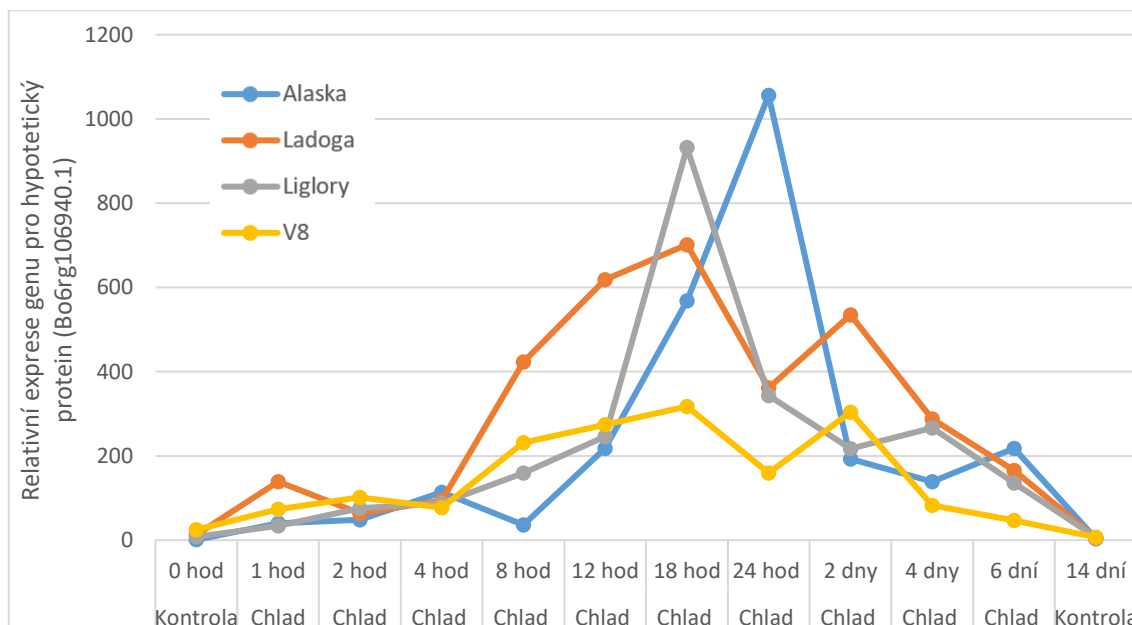
expresi genu *RC12A* (XM_013782979.1) v listech je u všech čtyř odrůd statisticky průkazný ($F = 97,6$; $p = 0,0002$), statisticky průkazná je i odlišnost exprese tohoto genu u jednotlivých odrůd ($F = 19,6$; $p = 0,007$). Odlišnost změny exprese v reakci na stres chladem mezi jednotlivými odrůdami se také podařilo statisticky prokázat ($F = 13$, $p = 0,01$).



Obr. 16: Relativní exprese genu *NRPI* (XM_013801908.2) u rostlin odrůd Alaska (modré body), Ladoga (červené body), Liglory (šedé body) a V8 (žluté body) vystavených stresu chladem po dobu 6ti dní a u rostlin kontrolních. Hodnoty znázorňují průměry ze tří technických opakování.

Na obrázku č. 16 je grafické znázornění expresní analýzy genu *NRPI* (XM_013801908.2). Relativní exprese genu *NRPI* (XM_013801908.2) se u všech sledovaných odrůd během prvních několika hodin stresu zvyšovala pozvolna. U odrůdy Ladoga došlo po 12ti hodinách stresu ke zvýšení relativní exprese genu *NRPI* (XM_013801908.2) u stresovaných rostlin na 20ti násobek relativní exprese tohoto genu u kontrolních rostlin. Nejvyšší naměřená exprese u stresovaných rostlin odrůdy Liglory byla po 18ti hodinách stresu a odpovídala přibližně 24 násobku relativní exprese tohoto genu u kontrolních rostlin. U odrůd V8 a Alaska byla nejvyšší naměřená relativní exprese genu *NRPI* (XM_013801908.2) naměřena po 24 hodinách stresu chladem, u odrůdy V8 odpovídala relativní exprese tohoto genu 29ti násobku relativní exprese kontrolních rostlin této odrůdy a u odrůdy Alaska odpovídala relativní exprese tohoto genu 33 násobku relativní exprese u kontrolních rostlin. Vliv stresu chladem na relativní expresi genu *NRPI* (XM_013801908.2) v listech je u všech čtyř odrůd statisticky průkazný ($F =$

1784; $p < 0,0001$), statisticky průkazná je i odlišnost exprese tohoto genu u jednotlivých odrůd ($F = 148$; $p = 0,0001$). Odlišnost změny exprese v reakci na stres chladem mezi jednotlivými odrůdami se také podařilo statisticky prokázat ($F = 174,6$; $p < 0,0001$).



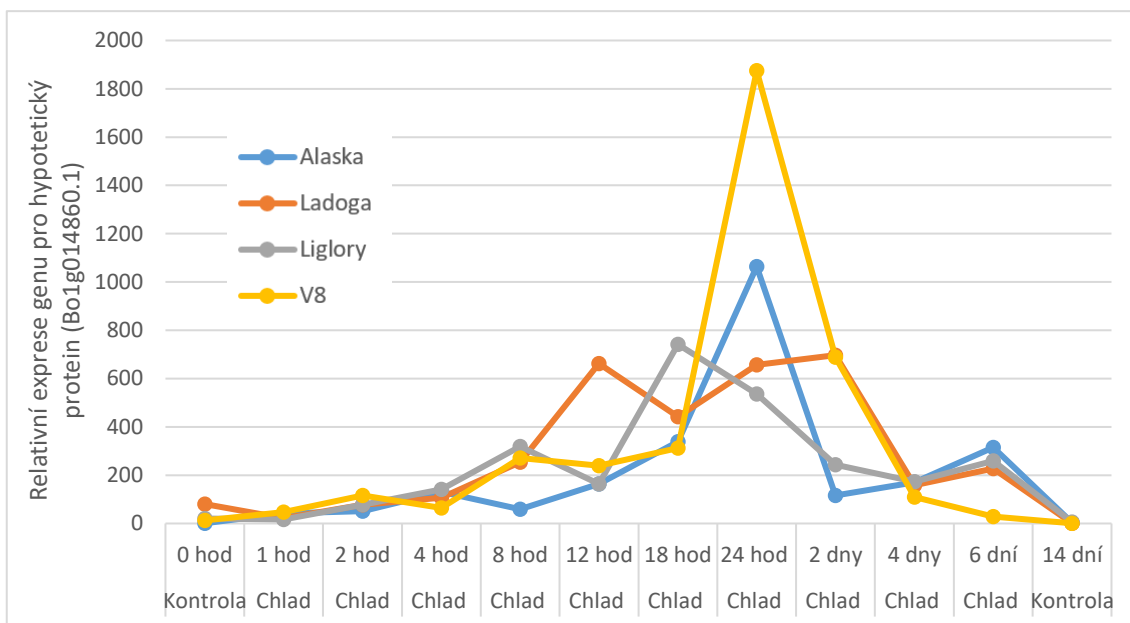
Obr. 17: Relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1) u rostlin odrůd Alaska (modré body), Ladoga (červené body), Liglory (šedé body) a V8 (žluté body) vystavených stresu chladem po dobu 6ti dní a u rostlin kontrolních. Hodnoty znázorňují průměry ze tří technických opakování.

Na obrázku č. 17 je grafické znázornění expresní analýzy genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1). Relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1) byla u jednotlivých odrůd odlišná i u kontrolních rostlin. Nejnížší relativní expresi tohoto genu měly kontrolní rostliny odrůdy Alaska, přibližně 8x vyšší relativní expresi tohoto genu měly kontrolní rostliny odrůdy Liglory, cca 12x vyšší relativní expresi tohoto genu měly kontrolní rostliny odrůdy Ladoga a nejvyšší relativní expresi genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1) měly kontrolní rostliny odrůdy V8, které tento gen exprimovaly přibližně 24x více než kontrolní rostliny odrůdy Alaska.

U stresovaných rostlin odrůdy Alaska došlo v průběhu stresu k největšímu nárůstu relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1) ze všech sledovaných odrůd. Již v první hodině stresu chladem se relativní exprese tohoto genu zvýšila 40x v porovnání s kontrolními rostlinami a po 24 hodinách byla jeho relativní exprese u

stresovaných rostlin více než 1 000x vyšší v porovnání s relativní expresí u kontrolních rostlin odrůdy Alaska. Relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1) u stresovaných rostlin odrůdy Liglory byla po 18ti hodinách stresu chladem 116x vyšší než u kontrolních rostlin této odrůdy, což odpovídá druhé nejvyšší naměřené hodnotě relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1) v tomto experimentu. U stresovaných rostlin odrůdy Ladoga nebylo sice pozorováno tak velké navýšení relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1), ale v porovnání se stresovanými rostlinami ostatních sledovaných odrůd byla relativní exprese tohoto genu u rostlin odrůdy Ladoga zvýšená po delší dobu. Po 8 hodinách stresu byla relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1) u stresovaných rostlin této odrůdy 34x vyšší než u kontrolních rostlin, po 12ti hodinách stresu 50x vyšší, po 18ti hodinách stresu 56x vyšší a po dvou dnech stresu byla stále 43x vyšší než u kontrolních rostlin odrůdy Ladoga. U stresovaných rostlin odrůdy V8, jejíž kontrolní rostliny měly vůbec nejvyšší relativní expresi genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1), byl pozorován nejmenší nárůst relativní exprese tohoto genu v průběhu stresu chladem. Po 18ti hodinách stresu chladem byla relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin odrůdy V8 13x vyšší než u kontrolních rostlin a stejně tomu tak bylo po 2 dnech stresu chladem. Po 4 dnech byla relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin odrůdy Ladoga 4x vyšší než u kontrolních rostlin.

Nutno dodat, že zatímco po 6ti dnech stresu byla u stresovaných rostlin odrůdy V8 relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1) 2x vyšší než u rostlin kontrolních, u odrůdy Ladoga byla exprese tohoto genu u stresovaných rostlin 13x vyšší než u kontrolních rostlin této odrůdy, u odrůdy Liglory byla relativní exprese tohoto genu 16x vyšší než u kontrolních rostlin této odrůdy a u odrůdy Alaska byla relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1) dokonce 200x vyšší než u kontrolních rostlin této odrůdy. Vliv stresu chladem na relativní expresi genu pro hypotetický protein (Bo6rg106940.1) v listech je u všech čtyř odrůd statisticky průkazný ($F = 3559,7$; $p < 0,0001$), statisticky průkazná je i odlišnost exprese tohoto genu u jednotlivých odrůd ($F = 1009,5$; $p < 0,0001$). Odlišnost změny exprese v reakci na stres chladem mezi jednotlivými odrůdami se také podařilo statisticky prokázat ($F = 612,3$; $p < 0,0001$).



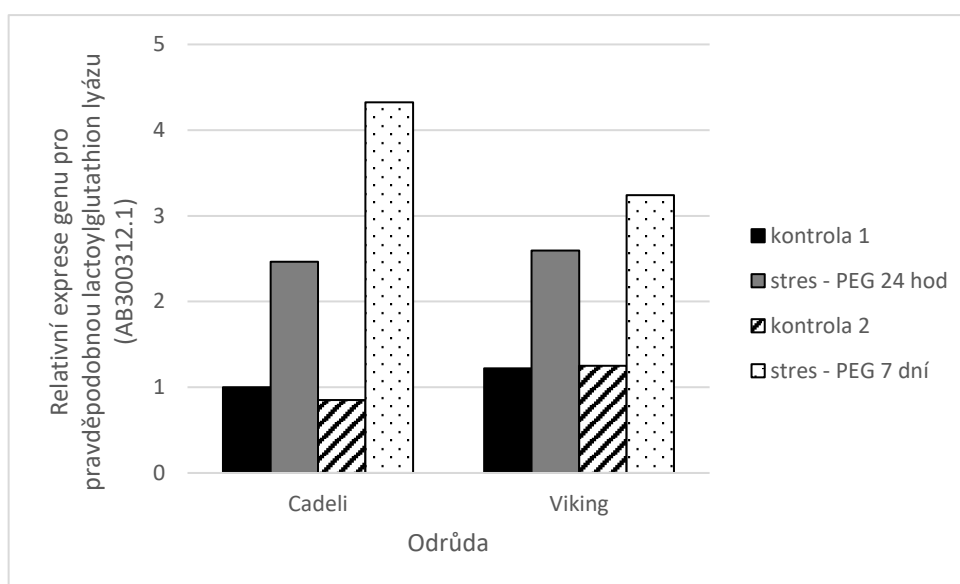
Obr. 18: Relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo1g014860.1) u rostlin odrůd Alaska (modré body), Ladoga (červené body), Liglory (šedé body) a V8 (žluté body) vystavených stresu chladem po dobu 6ti dní a u rostlin kontrolních. Hodnoty znázorňují průměry ze tří technických opakování.

Na obrázku č. 18 je grafické znázornění expresní analýzy genu pro hypotetický protein (Bo1g014860.1). Relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo1g014860.1) se u stresovaných rostlin testovaných odrůd v průběhu stresu zvyšovala. U stresovaných rostlin odrůdy Alaska byla nejvyšší relativní exprese tohoto genu pozorována po 24 hodinách stresu chladem, kdy došlo v porovnání s kontrolními rostlinami této odrůdy k více než 1000 násobnému zvýšení. Po 6ti dnech stresu chladem byla u stresovaných rostlin odrůdy Alaska 300x vyšší relativní exprese tohoto genu v porovnání s kontrolními rostlinami. U stresovaných rostlin odrůdy Liglory se relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo1g014860.1) zvýšila po 8 hodinách stresu chladem téměř 15x v porovnání s kontrolními rostlinami této odrůdy. Po 18ti hodinách stresu byla relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin odrůdy Liglory přibližně 35x vyšší než relativní exprese tohoto genu u kontrolních rostlin této odrůdy. U stresovaných rostlin odrůdy Ladoga došlo po 12ti hodinách stresu chladem k 31ti násobnému zvýšení relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo1g014860.1) v porovnání s rostlinami stresovanými pouze 1 hodinu. Toto zvýšení bylo u stresovaných rostlin odrůdy Ladoga pozorováno i po 2 dnech stresu. U odrůdy V8 došlo k nejvyššímu pozorovanému zvýšení

relativní exprese genu pro hypotetický protein (Bo1g014860.1). Po 24 hodinách stresu byla relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin této odrůdy 144x vyšší než u kontrolních rostlin. Vliv stresu chladem na relativní expresi genu pro hypotetický protein (Bo1g014860.1) v listech je u všech čtyř odrůd statisticky průkazný ($F = 437$; $p < 0,0001$), statisticky průkazná je i odlišnost exprese tohoto genu u jednotlivých odrůd ($F = 41$; $p = 0,002$). Odlišnost změny exprese v reakci na stres chladem mezi jednotlivými odrůdami se také podařilo statisticky prokázat ($F = 66,4$; $p = 0,0004$).

5.3 Experiment C) Reakce regenerovaných mikrosporových embryí na simulovaný stres suchem u fenotypově kontrastních odrůd řepky

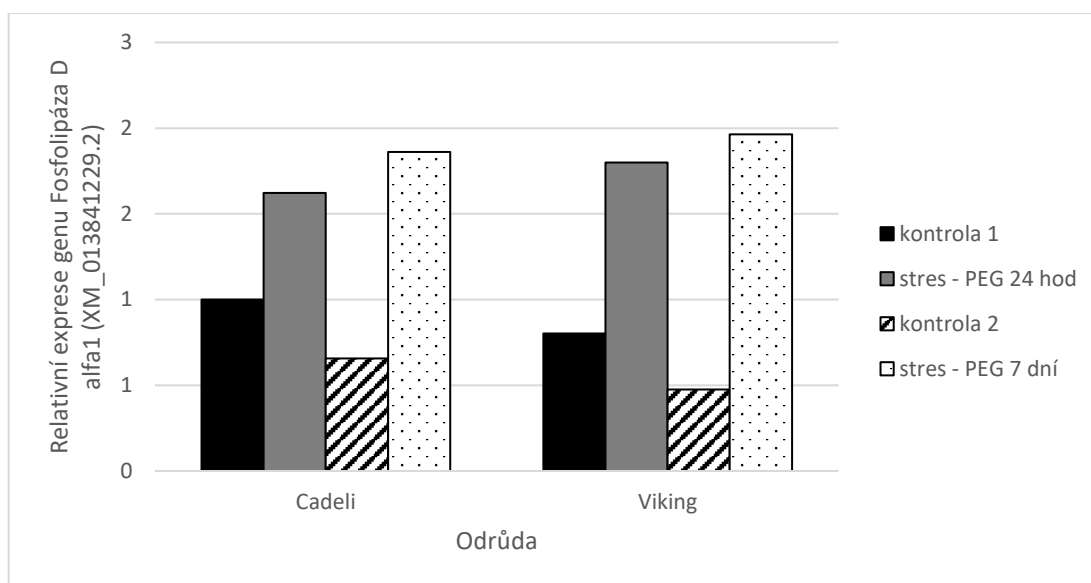
V experimentu byla použita regenerovaná mikrosporová embrya odvozená z rostlin odrůd Cadeli a Viking, která byla stresována simulovaným suchem vyvolaným přidáním PEG do kultivačního média. Odrůda Cadeli byla v tomto případě vybrána jako odolná a odrůda Viking jako náchylná k suchu. Studované geny byly vybrány na základě analýzy akumulace proteinů u regenerantů pomocí metody MALDI-TOF/TOF.



Obr. 19: Relativní exprese genu *Putative lactoylglutathion lyase* (AB300312.1) – u regenerovaných mikrosporových embryí odrůd Cadeli a Viking vystavených simulovanému stresu suchem po dobu sedmi dní a u regenerantů kontrolních. Hodnoty znázorňují průměry ze tří technických opakování.

Na obrázku č. 19 je grafické znázornění expresní analýzy genu *Putative lactoylglutathion lyase* (AB300312.1). U regenerovaných mikrosporových embryí odrůdy Cadeli, které byla stresována simulovaným suchem po dobu 24 hodin došlo k 2,6 násobnému zvýšení relativní exprese genu *Putative lactoylglutathion lyase* (AB300312.1) v porovnání s průměrnou relativní expresí tohoto genu u kontrolních regenerantů této odrůdy. Po sedmi dnech simulovaného sucha se relativní exprese tohoto genu u stresovaných regenerantů zvýšila přibližně 4,5x v porovnání s kontrolními regeneranty. U regenerantů mikrosporových embryí odrůdy Viking, které byly stresovány simulovaným suchem po dobu 24 hodin došlo k přibližně dvounásobnému zvýšení relativní exprese genu *Putative lactoylglutathion lyase* (AB300312.1), po 7 dnech

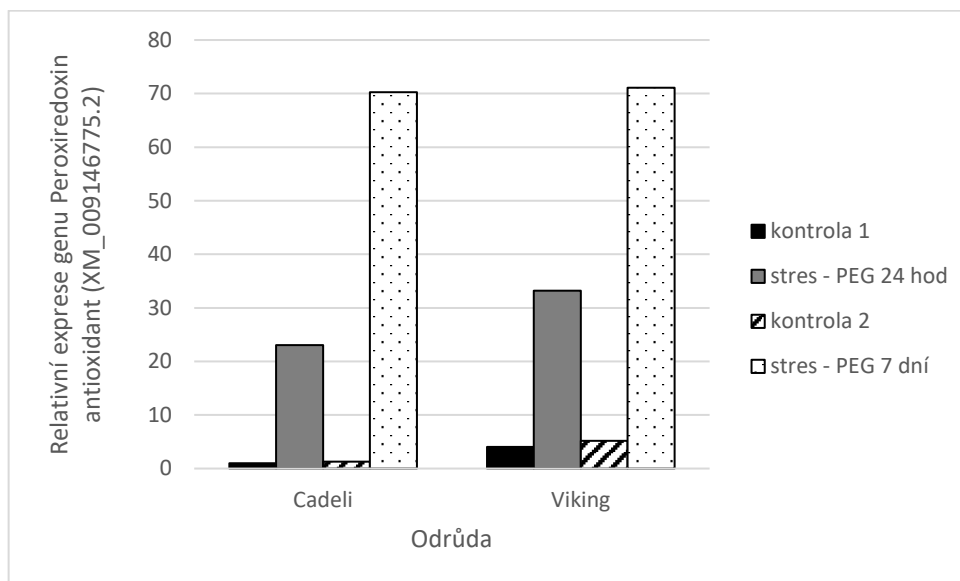
simulovaného sucha byla relativní exprese tohoto genu zvýšená přibližně 2,5x v porovnání s kontrolními regeneranty. Vliv stresu suchem na relativní expresi genu *Putative lactoylglutathion lyase* (AB300312.1) v pletivu regenerantů mikrosporových embryí je u obou odrůd statisticky průkazný ($F = 870$, $p = 0,001$). Statisticky významná je i odlišnost reakce jednotlivých odrůd na délku stresu suchem ($F = 58$, $p = 0,017$).



Obr. 20: Relativní exprese genu *Phospholipase D alpha 1* (XM_013841229.2) – u regenerovaných mikrosporových embryí odrůd Cadeli a Viking vystavených simulovanému stresu suchem po dobu sedmi dní a u regenerantů kontrolních. Hodnoty znázorňují průměry ze tří technických opakování.

Na obrázku č. 20 je grafické znázornění expresní analýzy genu *Phospholipase D alpha 1* (XM_013841229.2). U regenerovaných mikrosporových embryí odrůdy Cadeli, která byla stresována simulovaným suchem po dobu 24 hodin došlo k dvojnásobnému zvýšení relativní exprese genu *Phospholipase D alpha 1* (XM_013841229.2) v porovnání s průměrnou relativní expesí tohoto genu u kontrolních regenerantů. Po 7 dnech stresu došlo dalšímu mírnému zvýšení relativní exprese tohoto genu. U regenerantů mikrosporových embryí odrůdy Viking, které byly stresovány simulovaným suchem po dobu 24 hodin došlo k téměř trojnásobnému zvýšení relativní exprese genu *Phospholipase D alpha 1* (XM_013841229.2) a po 7 dnech stresu došlo, stejně jako u

odrůdy Cadeli, k dalšímu mírnému zvýšení relativní exprese tohoto genu v porovnání s relativní expresí tohoto genu u kontrolních regenerantů. Vliv stresu simulovaným suchem na relativní expresi genu *Phospholipase D alpha 1* (XM_013841229.2) v pletivu regenerantů mikrosporových embryí je u obou odrůd statisticky průkazný ($F = 21$, $p = 0,45$). Odlišnost reakce jednotlivých odrůd na stres není statisticky významná.



Obr. 21: Relativní exprese genu *Peroxiredoxin antioxidant* (XM_009112446.2) – u regenerovaných mikrosporových embryí odrůd Cadeli a Viking vystavených simulovanému stresu suchem po dobu sedmi dní a u regenerantů kontrolních. Hodnoty znázorňují průměry ze tří technických opakování.

Na obrázku č. 21 je grafické znázornění expresní analýzy genu *Peroxiredoxin antioxidant* (XM_009112446.2). U regenerovaných mikrosporových embryí odrůdy Cadeli, která byla stresována simulovaným suchem po dobu 24 hodin došlo 20ti násobnému zvýšení relativní exprese genu *Peroxiredoxin antioxidant* (XM_009112446.2) v porovnání s průměrnou relativní expresí tohoto genu u kontrolních regenerantů. Po 7 dnech stresu došlo dalšímu více než 60ti násobnému zvýšení relativní exprese tohoto genu. U regenerantů mikrosporových embryí odrůdy Viking, které byly stresovány simulovaným suchem po dobu 24 hodin došlo k 7 násobnému zvýšení relativní exprese genu *Peroxiredoxin antioxidant* (XM_009112446.2) a po 7 dnech stresu došlo k dalšímu 16ti násobnému zvýšení relativní exprese tohoto genu v porovnání s relativní expresí tohoto genu u kontrolních regenerantů. Vliv stresu simulovaným

suchem na relativní expresi genu *Peroxiredoxin antioxidant* (XM_009112446.2) v pletivu regenerantů mikrosporových embryí je u obou odrůd statisticky průkazný ($F = 8876$, $p = 0,0001$). Statisticky významná je i odlišnost relativní exprese tohoto genu u kontrolních rostlin ($F = 121$, $p = 0,008$) a reakce jednotlivých odrůd na délku stresu suchem ($F = 34$, $p = 0,028$).

6. Diskuse

6.1 Exprese ERD10 na úrovni genu a proteinu při stresu chladem

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

Deng et al. (2005) uvádí, že exprese genu *ERD10* je v listech řepky relativně vysoká v porovnání s jinými stresovými geny i u nestresovaných rostlin. Pravděpodobně to může znamenat, že tento gen/protein plní určitou funkci i mimo podmínky stresu, a nebo je určitou prevencí pro případný příchod nepříznivých podmínek, tak jak je tomu u některých dalších dehydrinů (Nylander et al., 2001a). Prevence pro případný stres je u zemědělských plodin v současné době jistě palčivým tématem. V důsledku klimatických změn dochází i v našich zeměpisných šířkách k výkyvům počasí, jsou celkově teplejší zimy, což vede k nedostatku sněhové pokrývky a paradoxně k vyššímu riziku vymrzání porostů (Thorsen and Hoglind, 2010). Problémy může způsobovat i teplejší průběh podzimu. U většiny ozimých plodin je aklimatizace zahájena teplotami pod 10°C a při teplotách pod 5°C se zintenzivňuje (Gray et al., 1997). Zvýšení teploty na konci léta a na začátku podzimu může však snížit schopnost rostlin ukončit růst a aklimatizovat se (Rapacz, 2002), neboť na správný průběh aklimatizace spolupůsobí kromě teploty i další faktory jako je fotoperioda, ozáření, stav fotosystému II či vodní potenciál půdy (Gray et al., 1997).

Dehydrin ERD10 a jeho expresní profil na úrovni genu i proteinu je tedy velmi zajímavým objektem zkoumání pro pochopení mechanismu reakce na stres chladem, resp. aklimatizaci. Na našem pracovišti byla analyzována relativní exprese tohoto genu v několika chladových experimentech, ve kterých bylo potvrzeno její zvýšení v průběhu stresu chladem (např. Harenčák et al., 2018) a tyto výsledky odpovídají dříve publikovaných datům (např. Deng et al., 2005; Hernández-Sánchez et al., 2017; Kovacs et al., 2008; Maszkowska et al., 2019). Tyto výsledky byly rovněž porovnávány s výsledky proteomických analýz prováděných ve VÚRV v Praze na shodném souboru rostlin. Prováděné proteomické analýzy byly však zaměřeny na celou skupinu dehydrinových proteinů a jejich porovnání s výsledky našich analýz zaměřených na konkrétní geny nebylo možné. Hledali jsme proto možnost, jak analyzovat pouze konkrétní protein. Metodu rezonance povrchového plazmonu jsme zvolili pro její relativní časovou, finanční a technickou nenáročnost jako metodu potenciálně využitelnou pro sledování dynamiky reakce jednotlivých genotypů na stres chladem.

Metoda rezonance povrchového plazmonu (SPR) je moderní optická metoda, která umožňuje studovat velmi nízké koncentrace nativních proteinů i v přítomnosti jiných látek, umožňuje kvantifikaci konkrétních proteinů vazbou na specifické protilátky (Lambert et al., 2018) a u řepky či jiných významných plodin nebyla doposud použita. V našem pilotním experimentu (experiment A) byly připraveny extrakty termostabilních proteinů z listů rostlin dvou odrůd řepky (Navajo, Cadeli) vystavených stresu chladem. Odezva biočipu byla sledována vždy současně na bodech obsahujících protilátku a na negativní kontrole, neboť k odezvě dochází i díky změně indexu lomu prostředí, případně interferencemi látek obsažených ve vzorku. Výsledky pro obě odrůdy řepky ukazují rostoucí SPR signál u stresovaných rostlin (obr. 9). U odrůdy Cadeli je tento nárůst signálu znamenající zvýšenou akumulaci dehydrinu ERD10 pozorovatelný až po 42 dnech stresu. Po 11 dnech stresu chladem je akumulace tohoto dehydrinu u stresované rostliny srovnatelná s jeho akumulací u rostliny kontrolní. Naproti tomu u odrůdy Navajo, která byla v předchozích experimentech vytipována na pracovišti VÚRV v minulosti jako odrůda odolná k chladu, je výrazný (téměř desetinásobný) nárůst akumulace dehydrinu ERD10 v porovnání s kontrolními rostlinami pozorovatelný již po 11 dnech stresu chladem. Klíma et al. (2012) uvádí, že schopnost jednotlivých genotypů řepky odolávat mrazu, se dá odhadnout na základě úrovně akumulace dehydrinů u chladem stresovaných jedinců.

V případě, že hledáme genotypy, které by měly vynikat svou schopností přezimovat v měnících se klimatických podmínkách ČR, musíme sledovat také dynamiku aklimatizace, zejména schopnost aklimatizovat se i během krátkého, teplého podzimu, kdy je rychlý přechod mezi teplým podzimem a zimou a na typickou aklimatizaci nejsou vhodné podmínky (vysoké teploty, krátký den) či hledat rostliny, které jsou schopné aklimatizace i v těchto netypických podmínkách. U odolnější odrůdy Navajo byla v našem experimentu reakce ve formě akumulace dehydrinu ERD10 výrazně dynamičtější. Náchylnější odrůda Cadeli by ale podle tvrzení Nylandera et al. (2001) měla být díky vyšší akumulaci proteinu ERD10 u kontrolních rostlin lépe připravená na příchod nepříznivých podmínek. Fenotypový projev této odrůdy tomu však publikovaným datům neodpovídá. Zde se nabízí myšlenka Maszkowske et al. (2019), že by fosforylovaný protein ERD10 mohl fungovat jako pufr Ca^{2+} iontů a tím ovlivňovat celou signalizaci reakce na stres. Vyšší počáteční akumulace tohoto proteinu by totiž mohla způsobovat pomalejší reakci rostlin odrůdy Cadeli na stres vazbou vápenatých iontů, které by tak nemohly předat signál dál a spouštět expresi genů pro transkripční faktory a další geny zapojené v signální dráze. Této domněnce by odpovídaly i výsledky expresní analýzy, které ukazují, že u stresovaných rostlin odrůdy Cadeli byla nižší exprese genu *ERD10* než u stresovaných rostlin odrůdy Navajo. Kvantitativně měření pomocí SPR nelze zatím vyhodnotit z důvodu absence standardu (čistého proteinu). Můžeme však říci, že kvalitativně lze metodu SPR pro detekci stresových proteinů velmi dobře využít. Pokud se podaří získat vhodný standard např. další separací z extraktů, bude možné i kvantitativní vyhodnocení.

V dalším experimentu (experiment B) jsme vybrali další odrůdy ozimé řepky, které mají odlišnou dynamiku akumulace proteinu ERD10. Byly to odrůdy s velmi dynamickou reakcí na stres chladem Liglory a V8, u kterých byla relativní akumulace tohoto dehydrinu v listech na začátku experimentu v porovnání s ostatními odrůdami nízká a v průběhu prvních dvou týdnů se zvýšila na téměř trojnásobek a během dalších třech týdnů se zvýšila na téměř pětinašobek. Další odrůdou byla odrůda s méně dynamickou reakcí Alaska, u které se relativní akumulace dehydrinu ERD10 zvýšila na trojnásobek až po 50ti dnech stresu chladem. Poslední vybranou odrůdou byla Ladoga, která měla na začátku experimentu nejvíce dehydrinu ERD10 v listech z testovaných odrůd. V porovnání s odrůdou Liglory byla u odrůdy Ladoga naměřena dvojnásobná akumulace

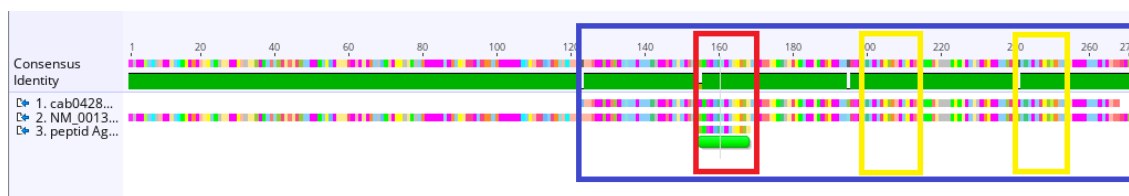
tohoto proteinu. V průběhu 50ti dnů stresu chladem se akumulace tohoto proteinu dál nezvyšovala.

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



Obr. 22: Porovnání aminokyselinových sekvencí homologů ERD10 Cab00876.1 a NM_001315610.1 s aminokyselinovou sekvencí peptidu, který byl použit pro výrobu protilátky pro SPR analýzu. Modrý obdélník označuje místa s vysokou mírou homologie, červený obdélník označuje místo vazby protilátky, žlutý obdélník sekvenci odpovídající K-segmentu. Porovnání bylo provedeno pomocí softwaru Geneious.

Naopak s proteinem syntetizovaným podle homologu Cab042821.1 bude pravděpodobně protilátka použitá v našem experimentu interagovat, neboť v sekvenci se nachází homologní místo se sekvencí peptidu použitého k výrobě protilátky, jak lze vidět na obr. 23. Aminokyselinová sekvence odvozená podle nukleotidové sekvence homologu genu *ERD10* Cab042821.1 pomocí nástroje ExPASy (Artimo et al., 2012) je vysoce homologní s druhou polovinou sekvence homologu NM_001315610.1.



Obr. 23: Porovnání aminokyselinových sekvencí homologů ERD10 Cab042821.1 a NM_001315610.1 s aminokyselinovou sekvencí peptidu, který byl použit pro výrobu protilátky pro SPR analýzu. Modrý obdélník označuje místo s vysokou mírou homologie,

červený obdélník označuje místo vazby protilátky, žlutý obdélník sekvenci odpovídající K-segmentu. Porovnání bylo provedeno pomocí softwaru Geneious.

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

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

konzervativní domény odlišná, a proto jsme ji nebyli schopni detekovat. Vzhledem ke zvýšené relativní expresi homologu genu *ERD10* NM_001315610.1 u stresovaných rostlin této odrůdy je zároveň třeba vzít v úvahu i možnost, že přítomnost transkriptů určitého genu v pletivech neznamena, že protein bude úspěšně translatován a akumulován (Bustin et al., 2009).

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

Z výsledků obou experimentů (experiment A a experiment B) vyplývá, že akumulace proteinu ERD10 ve standardních podmínkách ovlivňuje dynamiku změny jeho akumulace v průběhu stresu chladem. Vypadá to, že čím nižší je akumulace tohoto proteinu v ambientních podmínkách, tím rychleji rostlina reaguje na ochlazení a v reakci na chlad začne akumulovat tento protein více, čímž se dokáže rychleji připravit na příchod ještě nižších teplot pod bodem mrazu. Naopak čím více proteinu ERD10 je v pletivech rostliny akumulováno tím méně ochotně rostlina akumuluje další. Inhibice exprese genu akumulovaným proteinem, ať už vazbou signálních iontů, jak tvrdí Maszkowska et al. (2019) či jinými mechanismy je zjevná. Ani tvrzení Nylandera et al. (2001) o akumulaci proteinu ERD10 u nestresovaných rostlin jako o preventivním opatření pro případ příchodu nízkých teplot však není zcestné. Různé genotypy zjevně disponují odlišnými strategiemi reakce na nízké teploty. Jedna skupina genotypů velmi dynamicky reaguje na chlad a začíná ihned akumulovat ochranné proteiny a investuje energii do obranné reakce. Druhá skupina genotypů reaguje pomaleji a v případě, že se po krátkodobém ochlazení znovu oteplí, může investovat energii do dalšího růstu a vývoje. V případě, že hledáme genotypy, které by měly vynikat svou schopností aklimatizovat se i během krátkého teplého podzimu, nabízí se analýza akumulace dehydrinů metodou rezonance

povrchového plazmonu jako vhodná metoda pro rychlý, nenáročný a relativně levný skrínink většího množství genotypů ve šlechtitelských kolekcích.

6.2 Exprese dalších genů potenciálně zapojených v reakci na stres chladem

Na základě WGCNA (Weighted Gene Co-expression Network Analysis) a GO (Gene Ontology) enrichment analýzy byly vybrány potenciálně klíčové geny profílející se na odpovědi *B. napus* na stres chladem (Hejna, nepublikovaná data). Podle sekvencí mRNA byly navrženy specifické primery, pro RT-PCR analýzu byl použit stejný soubor vzorků jako pro analýzu exprese genu a proteinu ERD10 (experiment B).

Prvním vybraným genem byl *LTI78* (XM_013820820.2). Tento gen je v literatuře spojován s reakcí na stres zasolením (Hu et al., 2013), z nedostatku vody (Kim et al., 2012b) a stres chladem (Msanne et al., 2011; Yamaguchishinozaki and Shinozaki, 1994). To odpovídá i výsledkům naší analýzy, které ukázaly, že se při stresu chladem relativní exprese genu *LTI78* statisticky významně zvyšovala. V promotoru tohoto genu se nachází několik ABRE a DRE motivů, z čehož se dá odvodit jeho účast v signálních drahách, které jsou ABA-dependentní i ABA-independentní (Msanne et al., 2011). U jednotlivých námi testovaných odrůd řepky se relativní exprese genu *LTI78* měnila statisticky významně odlišně. Nejvyšší relativní exprese tohoto genu u stresovaných rostlin téměř po celou dobu experimentu byla naměřena u odrůdy V8. V případě, že by moje teorie o odlišných strategiích jednotlivých genotypů reakce na nízké teploty byla správná, odrůda V8 by vzhledem k dynamice akumulace proteinu ERD10 a navíc výraznému zvýšení exprese *LTI78* mohla být zajímavým genotypem pro šlechtění na rychlejší aklimatizaci. Protein kódovaný tímto genem zatím není popsán, ale odhaduje se, že se bude podobat LEA proteinům. O jeho přesné roli v reakci na stres nic nevíme, dobře známá je ale velká účinnost promotoru a jeho schopnost reagovat na změnu prostředí. Promotor tohoto genu byl společně s CBF transkripčním faktorem využit pro transgenozi, díky čemuž se významně zlepšila tolerance k mrazu u brambor. Výhodou promotoru genu *LTI78* totiž je, že v nestresových podmínkách je jeho exprese velmi nízká, tudíž je vhodnějším promotorem pro ochranné transgeny než promotor CaMv 35S (Wei et al., 2016).

RCI2A je dalším genem, který byl vytipován jako potenciálně zapojený v reakci na chlad. Tento gen je v literatuře spojován s reakcí na kyselinu abscisovou, stres chladem, zasolením a vodním deficitem (Medina et al., 2001; Nylander et al., 2001b). Overexprese transgenu *AtRCI2A* u rajčat způsobovala snížení akumulace peroxidu vodíku a poškození

membrán v důsledku stresu chladem (Sivankalyani et al., 2015). Výsledky našeho experimentu ukázaly zvýšení relativní exprese tohoto genu v průběhu stresu chladem u všech čtyř testovaných odrůd. Nejvyšší relativní expese tohoto genu byla pozorována u odrůdy Ladoga. U této odrůdy nebyla zvýšena akumulace dehydrinu ERD10 v průběhu stresu, vyvstává tedy otázka, zda gen *RCI2A* není součástí jiné dráhy zapojené v obraně rostliny proti chladu. Mechanismus účinku 6-kD proteinu *RCI2A* zatím není znám, v jeho sekvenci nebyly nalezeny žádné známé motivy, které by mohly napovědět. Vypadá to ale, že jeho role bude pravděpodobně spočívat v indukcii dalších proteinů snižujících poškození buněk chladem (Sivankalyani et al., 2015). V dalších experimentech bude jistě zajímavé zaměřit se na analýzu akumulace proteinu *RCI2A* u genotypů s různým expresním profilem na úrovni genu *RCI2A* a také u genotypů s odlišnou dynamikou akumulace ERD10 v reakci na stres. To by mohlo pomoci pochopit roli obou proteinů a jejich vzájemné působení v reakci na stres a následně k výběru genotypů vhodných pro šlechtění na odolnost stresu chladem.

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

Na základě WGCNA enrichment analýzy (Hejna, nepublikovaná data) byly také vytipovány dvě sekvence pro hypotetické proteiny. Jedna z těchto sekvencí označená jako Bo6rg106940.1 by po porovnání s databází TAIR (Lamesch et al., 2012) mohla patřit homologu genu z *Arabidopsis thaliana* AT1G68500. U rostlin v našem experimentu byla v průběhu stresu chladem relativní exprese tohoto genu značně zvýšená. Zejména u stresovaných rostlin odrůdy Alaska se relativní exprese tohoto genu zvýšila více než 1000x. Za zmínku stojí, že u kontrolních rostlin této odrůdy byla relativní exprese tohoto genu nejnižší z kontrolních rostlin sledovaných odrůd. Naopak u stresovaných rostlin odrůdy V8, jejíž kontrolní rostliny exprimovaly tento gen ze sledovaných odrůd nejvíce

(25x více než kontroly odrůdy Alaska), bylo zvýšení relativní exprese tohoto genu jen velmi malé, na 13ti násobek relativní exprese kontrolních rostlin. O genu AT1G68500 se téměř nic neví. Vypadá to, že se jedná o signální peptid, který je schopen přenášet jiné molekuly do endoplazmatického retikula nebo do jádra, což lze odvodit z předpokládaného uspořádání aminokyselin v řetězci pomocí webového nástroje InterPro (Mitchell et al., 2019). Podle Vergnolle et al., (2005) je gen AT1G68500 indukován kyselinou fosfatidovou produkovanou enzymem fosfolipáza D α , její funkce podle Rajashekar et al. (2006) přispívá k poškození buněk mrazem. Mohlo by se tedy jednat o transkripční faktor indukující expresi genů zapojených v ochraně před poškozením nízkými teplotami.

Druhou sekvencí označenou jako hypotetický protein je Bo1g014860.1, která by po porovnání s databází TAIR (Lamesch et al., 2012) mohla patřit homologu genu z *Arabidopsis thaliana* AT4G29905. Relativní exprese tohoto genu se u stresovaných rostlin v našem experimentu výrazně zvyšovala. U stresovaných rostlin odrůdy Alaska byla relativní exprese po 1 dnu stresu více než 1000x vyšší než u kontrolních rostlin. U odrůdy V8 byla relativní exprese tohoto genu po 1 dnu stresu ještě téměř dvojnásobná v porovnání s nejvyšší relativní expresí u rostlin odrůdy Alaska. O genu AT4G29905 se neví vůbec nic. Z předpokládaného uspořádání aminokyselin v řetězci sekvence z řepky se pomocí webového nástroje InterPro (Mitchell et al., 2019) podařilo zjistit, že tento gen možná disponuje doménou typickou pro methionyl-tRNA syntetázu. Tento enzym je nezbytný pro syntézu proteinů, neboť váže methionin na jeho tRNA. Námí testovaná sekvence by tedy mohla tento protein kódovat, neboť v případě stresu chladem rostlina potřebuje syntetizovat ochranné proteiny. Oba hypotetické proteiny budou předmětem našeho dalšího zkoumání.

6.3 Exprese genů potenciálně zapojených v reakci na stres suchem

V experimentu provedeném na pracovišti VÚRV v Praze byla použita regenerovaná mikrosporová embrya odvozená z rostlin odrůd Cadeli a Viking, která byla stresována simulovaným suchem vyvolaným přidáním PEG do kultivačního média. Po 24 hodinách a po 7 dnech byly odebrány vzorky pro proteomickou i transkriptomickou analýzu. Podle výsledků analýzy akumulace proteinů pomocí metody MALDI-TOF/TOF byly vybrány 3 proteiny, které byly významně akumulovány u stresovaných embryí. V databázi NCBI

byly pro tyto geny vyhledány kandidátní sekvence a byly navrženy a optimalizovány primery.

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

Dalším vybraným genem byl XM_013841229.2, gen pro fosfolipázu D α 1. Tento protein už byl výše zmíněn v souvislosti se stresem chladem, při kterém je jeho funkce spíše nežádoucí a zvyšuje míru poškození. Při stresu suchem ale naopak hraje důležitou roli při přenosu signálních molekul (Fan et al., 1997). V našem experimentu byla prokázána zvýšená exprese tohoto genu v důsledku stresu suchem. Fosfolipáza D α 1 je enzym, který katalyzuje hydrolýzu fosfolipidů (Pappan and Wang, 1999). Podle Fan et al. (1997) je tento enzym inhibován G α proteinem, který produkuje tzv. druhé posly v signálních drahách ovlivňovaných kyselinou abscisovou. Overexprese tohoto genu zvyšovala účinnost kyseliny abscisové při signalizaci stresu suchem a urychlovala zavírání průduchů (Wang, 2005). Vzhledem k tomu, že v našem experimentu nebyl pozorován významný rozdíl v expresi u odolné a náchylné odrůdy, předpokládám, že tento gen nebude způsobovat rozdíly v odolnosti jednotlivých genotypů.

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

tohoto genu. Může to znamenat, že tato odrůda disponuje účinnějším systémem prevence nadměrné produkce těchto molekul v počátečním stadiu stresu suchem. Tento gen bude předmětem našeho dalšího zkoumání jako potenciální marker pro výběr genotypů, které mohou být odolnější stresu suchem.

6.4 Analýza genů indukovaných abiotickým stresem u řepky

Různé abiotické stresory mají často velmi podobné projevy jejich působení. Sucho a zasolení se projevují formou osmotického stresu, který má za následek narušení rovnováhy buňky a pohybu iontů (Wang et al., 2003). Oxidativní stres často spojený s vysokými teplotami, zasolením, či suchem může způsobovat denaturaci funkčních i strukturních proteinů (Smirnov, 1998). Důsledkem je aktivace podobných signálních drah, jejichž části se často prolínají (Knight and Knight, 2001; Shinozaki et al., 2003) a na buněčné úrovni dochází k produkci stresových proteinů, anti-oxidantů a jiných látek (Cushman and Bohnert, 2000). Navzdory tomu, každý stresor vyvolává v rostlině jinou reakci, která je na míru ušitá potřebám konkrétního jedince a zároveň každá varianta kombinace působení dvou a více stresorů opět vyvolává odlišnou reakci (Wang et al., 2003). Rizhsky et al. (2002), jako jedna z prvních autorů ve své studii prokázala odlišnost reakce rostliny na stres suchem a na působení extrémních teplot od reakce na kombinaci působení těchto dvou stresorů. Ukázala tak, že výsledky experimentů prováděných v kontrolovaných podmínkách a zabývajících se působením pouze jednoho stresového faktoru mohou být zavádějící. Následovaly další práce zabývající se odpovědí rostlin na kombinace stresorů jako je např. sucho, zasolení, extrémní teploty, těžké kovy, nadměrná ozářenost, ozon a další (např. Mittler, 2006), které její tvrzení potvrdily. Z toho vyplývá, že pro další pochopení těchto obranných mechanismů a jejich využití při tvorbě nových odrůd kulturních plodin je potřeba rozšířit oblast zájmu výzkumníků a šlechtitelů o kombinace stresových faktorů (Mittler, 2006).

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

7. Závěr

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

V genomu řepky byly vytipovány geny (homology genu) potenciálně kódující tento protein. 3 z těchto sekvencí byly testovány pomocí RT-qPCR. Různé homology genu jsou při stresu chladem exprimovány odlišně. Relativní exprese homologů genu *ERD10* NM_001315610.1 a Cab008876.1 se při stresu chladem zvyšovala. Na základě metody RT-PCR lze tedy vyhodnotit změny v expresi na úrovni genu *ERD 10*, což může být jedním z důkazů, že se jedná o gen kódující studovaný protein. Korelace mezi výsledkem expresní analýzy na úrovni genu a na úrovni akumulace proteinu je u *Brassica napus* velmi komplikovaná, neboť v genomu řepky se – vzhledem k jejímu genetickému založení – nachází více homologů jednotlivých genů a je velmi těžké je rozlišit v rámci genetických analýz. V případě, že hledáme genotypy, které by měly vynikat svou schopností aklimatizovat se i během krátkého teplého podzimu, se jako vhodnější metoda pro skrínink většího množství genotypů ve šlechtitelských kolekcích jeví metoda SPR pro hodnocení přítomnosti stresových proteinů.

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

Výrazné zvýšení jeho exprese je tedy také velmi zajímavým předmětem dalšího zkoumání, neboť by se mohlo jednat o důležitý článek syntézy ochranných proteinů při reakci na nepříznivé podmínky.

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

8. Seznam literatury

Abba', S., Ghignone, S., and Bonfante, P. (2006). A dehydration-inducible gene in the truffle *Tuber borchii* identifies a novel group of dehydrins. *BMC Genomics* 7, 39.

Agarwal, T., Upadhyaya, G., Halder, T., Mukherjee, A., Majumder, A.L., and Ray, S. (2017). Different dehydrins perform separate functions in *Physcomitrella patens*. *Planta* 245, 101–118.

Allagulova, C.R., Gimalov, F.R., Shakirova, F.M., and Vakhitov, V.A. (2003). The plant dehydrins: Structure and putative functions. *Biochem.-Moscow* 68, 945–951.

Alpert, P. (2005). The Limits and Frontiers of Desiccation-Tolerant Life. *Integr Comp Biol* 45, 685–695.

Alpert, P., and Oliver, M.J. (2002). Drying without dying. In *Desiccation and Survival in Plants: Drying without Dying*, M. Black, and H.W. Pritchard, eds. (Wallingford: CABI), pp. 3–43.

Alpmann, L., Baranyk, P., Bothe, C.H., Feiffer, A., Gertz, A., Heger, M., Humpisch, G., Jevič, P., Klaassen, H., Kurpjuweit, H., et al. (2009). Řepka - plodina s budoucností (Zemědělské nakladatelství Münster-Hiltrup a BASF AG Lumburgerhof).

Alsheikh, M.K., Svensson, J.T., and Randall, S.K. (2005). Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. *Plant Cell Environ.* 28, 1114–1122.

Amudha, J., and Balasubramani, G. (2011). Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. *BMBR* 6, 31–58.

Arias, T., and Pires, J.C. (2012). A fully resolved chloroplast phylogeny of the brassica crops and wild relatives (*Brassicaceae: Brassiceae*): Novel clades and potential taxonomic implications. *Taxon* 61, 980–988.

Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., et al. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* 40, W597–W603.

- Ashraf, M., and Mehmood, S. (1990). Response of four *Brassica* species to drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 30, 93–100.
- Baker, J., dennSteele, C.V., and Dure, L. (1988). Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* 11, 277–291.
- Bao, F., Du, D., An, Y., Yang, W., Wang, J., Cheng, T., and Zhang, Q. (2017). Overexpression of *Prunus mume* Dehydrin Genes in Tobacco Enhances Tolerance to Cold and Drought. *Front. Plant Sci.* 8, 151.
- Baranyk, P. (2018). Stanovisko k odrůdové skladbě řepky pro rok 2018/19.
- Baranyk, P., Fábry, A., and et al. (2007). Řepka - pěstování, využití, ekonomika (Praha: Profi Press, s. r. o.).
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., and Covarrubias, A.A. (2008). The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiol.* 148, 6–24.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K.D., and Sayers, E.W. (2018). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 46, D41–D47.
- Berardini, T.Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., and Huala, E. (2015). The arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *Genesis* 53, 474–485.
- 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.
- Bohnert, H.J., and Sheveleva, E. (1998). Plant stress adaptations — making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 267–274.
- 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.

Brini, F., Hanin, M., Lumbreras, V., Amara, I., Khoudi, H., Hassairi, A., Pages, M., and Masmoudi, K. (2007). Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* *26*, 2017–2026.

Browne, J.A., Dolan, K.M., Tyson, T., Goyal, K., Tunnacliffe, A., and Burnell, A.M. (2004). Dehydration-Specific Induction of Hydrophilic Protein Genes in the Anhydrobiotic Nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryotic Cell* *3*, 966–975.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* *55*, 611–622.

Campos, F., Cuevas-Velazquez, C., Fares, M.A., Reyes, J.L., and Covarrubias, A.A. (2013). Group 1 LEA proteins, an ancestral plant protein group, are also present in other eukaryotes, and in the archaea and bacteria domains. *Mol. Genet. Genomics* *288*, 503–517.

Cazale, A.-C., Clement, M., Chiarenza, S., Roncato, M.-A., Pochon, N., Creff, A., Marin, E., Leonhardt, N., and Noel, L.D. (2009). Altered expression of cytosolic/nuclear HSC70-1 molecular chaperone affects development and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* *60*, 2653–2664.

Cedeño, C., Žerko, S., Tompa, P., and Koźmiński, W. (2017). 1H, N, 13C resonance assignment of plant dehydrin early response to dehydration 10 (ERD10). *Biomol NMR Assign* *11*, 127–131.

Chalhoub, B. (2014). Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome (vol 348, 1260782, 2014). *Science* *345*, 1255–1255.

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.

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.

Cushman, J.C., and Bohnert, H.J. (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* *3*, 117–124.

Danyluk, J., Houde, M., Rassart, É., and Sarhan, F. (1994). Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant gramineae species. *FEBS Letters* *344*, 20–24.

Deng, Z., Pang, Y., Kong, W., Chen, Z., Wang, X., Liu, X., Pi, Y., Sun, X., and Tang, K. (2005). A novel ABA-dependent dehydrin ERD10 gene from *Brassica napus*. *DNA Sequence* *16*, 28–35.

Denison, F.C., Paul, A.-L., Zupanska, A.K., and Ferl, R.J. (2011). 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *22*, 720–727.

Drira, M., Saibi, W., Brini, F., Gargouri, A., Masmoudi, K., and Hanin, M. (2013). The K-Segments of the Wheat Dehydrin DHN-5 are Essential for the Protection of Lactate Dehydrogenase and beta-Glucosidase Activities In Vitro. *Mol. Biotechnol.* *54*, 643–650.

Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.H., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T., and Sung, Z.R. (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* *12*, 475–486.

Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 197–208.

Fan, L., Zheng, S.Q., and Wang, X.M. (1997). Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 9, 2183–2196.

FDA (2018). CFR - Code of Federal Regulations Title 21.

Fleury, D., Jefferies, S., Kuchel, H., and Langridge, P. (2010). Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* 61, 3211–3222.

Fu, Q., Li, S., and Yu, D. (2010). Identification of an *Arabidopsis* Nodulin-related protein in heat stress. *Molecules and Cells* 29, 77–84.

Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garcarrubio, 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.

Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., and Thomashow, M.F. (1998). Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J.* 16, 433–442.

Gomez-Campo, C. (1999). *Biology of Brassica Coenospecies* (Elsevier).

Goyal, K., Tisi, L., Basran, A., Browne, J., Burnell, A., Zurdo, J., and Tunnacliffe, A. (2003). Transition from Natively Unfolded to Folded State Induced by Desiccation in an Anhydrobiotic Nematode Protein. *J. Biol. Chem.* 278, 12977–12984.

Graether, S.P., and Boddington, K.F. (2014). Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Front. Plant Sci.* 5.

Gray, G.R., Chauvin, L.P., Sarhan, F., and Huner, N.P.A. (1997). Cold acclimation and freezing tolerance - A complex interaction of light and temperature. *Plant Physiol.* 114, 467–474.

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.

Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T., and Kuboi, T. (2003). Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* 217, 290–298.

Hara, M., Fujinaga, M., and Kuboi, T. (2005). Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *J. Exp. Bot.* 56, 2695–2703.

Harenčák, J., Hoštičková, I., Vráblová, M., Jozová, E., and Čurn, V. (2018). Expres genů ERD10 a ICE1 při aklimatizaci u odrůd řepky s kontrastní reakcí na stres chladem. 131–134.

Hasan, M.R., Ghosh, A., Kaur, C., Pareek, A., and Singla-Pareek, S.L. (2016). Glyoxalase Pathway and Drought Stress Tolerance in Plants. In *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1: Physiology and Biochemistry*, M.A. Hossain, S.H. Wani, S. Bhattacharjee, D.J. Burritt, and L.-S.P. Tran, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 379–399.

He, Z., Cheng, F., Li, Y., Wang, X., Parkin, I.A.P., Chalhoub, B., Liu, S., and Bancroft, I. (2015). Construction of *Brassica* A and C genome-based ordered pan-transcriptomes for use in rapeseed genomic research. *Data in Brief* 4, 357–362.

Hernandez-Sanchez, I.E., Maruri-Lopez, I., Graether, S.P., and Jimenez-Bremont, J.F. (2017). In vivo evidence for homo- and heterodimeric interactions of *Arabidopsis thaliana* dehydrins AtCOR47, AtERD10, and AtRAB18. *Sci Rep* 7, 17036.

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.

Honjoh, K., Yoshimoto, M., Joh, T., Kajiwar, T., Miyamoto, T., and Hatano, S. (1995). Isolation and Characterization of Hardening-Induced Proteins in *Chlorella vulgaris* C-27: Identification of Late Embryogenesis Abundant Proteins. *Plant Cell Physiol* 36, 1421–1430.

Hu, Y., Chen, L., Wang, H., Zhang, L., Wang, F., and Yu, D. (2013). Arabidopsis transcription factor WRKY8 functions antagonistically with its interacting partner VQ9 to modulate salinity stress tolerance. *The Plant Journal* 74, 730–745.

Hughes, S.L., Schart, V., Malcolmson, J., Hogarth, K.A., Martynowicz, D.M., Tralman-Baker, E., Patel, S.N., and Graether, S.P. (2013). The Importance of Size and Disorder in the Cryoprotective Effects of Dehydrins. *Plant Physiol.* 163, 1376–1386.

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.

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.

Iniguez-Luy, F.L., and Federico, M.L. (2011). The Genetics of *Brassica napus*. In *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*, R. Schmidt, and I. Bancroft, eds. (Springer New York), pp. 291–322.

Ismail, A.M., Hall, A.E., and Close, T.J. (1999a). Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. *PNAS* 96, 13566–13570.

Ismail, A.M., Hall, A.E., and Close, T.J. (1999b). Purification and Partial Characterization of a Dehydrin Involved in Chilling Tolerance during Seedling Emergence of Cowpea. *Plant Physiol.* 120, 237–244.

Iturriaga, G., Cushman, M.A.F., and Cushman, J.C. (2006). An EST catalogue from the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* reveals abiotic stress-adaptive genes. *Plant Science* 170, 1173–1184.

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.

Kalemba, E.M. (2007). Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection:

Kaur, N., and Gupta, A.K. (2005). Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. *Curr. Sci.* 88, 1771–1780.

Keshavaiah, C., Havlíčková, L., and Jelínková, I. (2014). Differential expression analysis of genes involved in abiotic stress in oilseed rape. *Úroda, vědecká příloha* 167–170.

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. (2012a). 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.

Kim, J.-M., To, T.K., Ishida, J., Matsui, A., Kimura, H., and Seki, M. (2012b). Transition of Chromatin Status During the Process of Recovery from Drought Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 53, 847–856.

Kimber, D., and McGregor, D.I. (1995). *Brassica* Oilseeds: Production and Utilization (Wallingford: CABI).

Kindgren, P., Dubreuil, C., and Strand, Å. (2015). The Recovery of Plastid Function Is Required for Optimal Response to Low Temperatures in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* 10, e0138010.

Klíma, M., Kucera, V., Vyvadilová, M., Hilgert, A., Urban, M., Endlová, L., Vrbovský, V., Macháková, I., Belská, K., Ricica, M., et al. (2015). Utilization of Doubled Haploids in the Breeding of Winter Oilseed Rape (Prague 6: Czech University Life Sciences Prague).

Klimecká, M., and Muszyńska, G. (2007). Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim. Pol.* *54*, 219–233.

Knight, H., and Knight, M.R. (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* *6*, 262–267.

Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. (1996). Cold Calcium Signaling in *Arabidopsis* Involves Two Cellular Pools and a Change in Calcium Signature after Acclimation. *The Plant Cell* *8*, 489–503.

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.

Kosová, K., Vítámvás, P., Planchon, S., Renaut, J., Vanková, R., and Prášil, I.T. (2013). Proteome Analysis of Cold Response in Spring and Winter Wheat (*Triticum aestivum*) Crowns Reveals Similarities in Stress Adaptation and Differences in Regulatory Processes between the Growth Habits. *J. Proteome Res.* *12*, 4830–4845.

Kosová, K., Vitamvas, P., and Prasil, I.T. (2014). Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity - what can LEA-II proteins tell us about plant stress response?

Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M.O., Klíma, M., Roy, A., and Prášil, I.T. (2015). Biological Networks Underlying Abiotic Stress Tolerance in Temperate Crops--A Proteomic Perspective. *Int J Mol Sci* *16*, 20913–20942.

Kovacs, D., Kalmar, E., Torok, Z., and Tompa, P. (2008). Chaperone Activity of ERD10 and ERD14, Two Disordered Stress-Related Plant Proteins. *Plant Physiol* *147*, 381–390.

Kruger, C., Berkowitz, O., Stephan, U.W., and Hell, R. (2002). A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* *277*, 25062–25069.

Kurepin, L.V., Ivanov, A.G., Zaman, M., Pharis, R.P., Allakhverdiev, S.I., Hurry, V., and Hüner, N.P.A. (2015). Stress-related hormones and glycinebetaine interplay in protection of photosynthesis under abiotic stress conditions. *Photosynth Res* *126*, 221–235.

Lambert, A., Yang, Z., Cheng, W., Lu, Z., Liu, Y., and Cheng, Q. (2018). Ultrasensitive Detection of Bacterial Protein Toxins on Patterned Microarray via Surface Plasmon Resonance Imaging with Signal Amplification by Conjugate Nanoparticle Clusters. *ACS Sens.* *3*, 1639–1646.

Lamesch, P., Berardini, T.Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D.L., Garcia-Hernandez, M., et al. (2012). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res* *40*, D1202–D1210.

Lee, S.-C., Lim, M.-H., Kim, J.A., Lee, S.-I., Kim, J.S., Jin, M., Kwon, S.-J., Mun, J.-H., Kim, Y.-K., Kim, H.U., et al. (2008). Transcriptome Analysis in *Brassica rapa* under the Abiotic Stresses Using *Brassica* 24K Oligo Microarray. *Molecules and Cells* *26*, 595–605.

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, C., Zhang, X., Zhang, K., An, H., Hu, K., Wen, J., Shen, J., Ma, C., Yi, B., Tu, J., et al. (2015a). Comparative Analysis of the *Brassica napus* Root and Leaf Transcript Profiling in Response to Drought Stress. *International Journal of Molecular Sciences* *16*, 18752–18777.

Liu, H., Yu, C., Li, H., Ouyang, B., Wang, T., Zhang, J., Wang, X., and Ye, Z. (2015b). Overexpression of ShDHN, a dehydrin gene from *Solanum habrochaites* enhances tolerance to multiple abiotic stresses in tomato. *Plant Sci.* 231, 198–211.

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.

Lv, A., Fan, N., Xie, J., Yuan, S., An, Y., and Zhou, P. (2017). Expression of CddHN4, a Novel YSK2-Type Dehydrin Gene from Bermudagrass, Responses to Drought Stress through the ABA-Dependent Signal Pathway. *Front. Plant Sci.* 8, e748.

Maszkowska, J., Dębski, J., Kulik, A., Kistowski, M., Bucholc, M., Lichočka, M., Klimecka, M., Sztatelman, O., Szymańska, K.P., Dadlez, M., et al. (2019). Phosphoproteomic analysis reveals that dehydrins ERD10 and ERD14 are phosphorylated by SNF1-related protein kinase 2.10 in response to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment* 42, 931–946.

McAinsh, M.R., and Pittman, J.K. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytologist* 181, 275–294.

McKhann, H.I., Gery, C., Berard, A., Leveque, S., Zuther, E., Hinch, D.K., De Mita, S., Brunel, D., and Teoule, E. (2008). Natural variation in CBF gene sequence, gene expression and freezing tolerance in the Versailles core collection of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 8, 105.

McLoughlin, F., Galvan-Ampudia, C.S., Julkowska, M.M., Caarls, L., van der Does, D., Laurière, C., Munnik, T., Haring, M.A., and Testerink, C. (2012). The Snf1-related protein kinases SnRK2.4 and SnRK2.10 are involved in maintenance of root system architecture during salt stress: Salt-induced protein kinases controlling root growth. *The Plant Journal* 72, 436–449.

Medina, J., Catala, R., and Salinas, J. (2001). Developmental and stress regulation of RCI2A and RCI2B, two cold-inducible genes of *Arabidopsis* encoding highly conserved hydrophobic proteins. *Plant Physiol.* 125, 1655–1666.

Mitchell, A.L., Attwood, T.K., Babbitt, P.C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S.D., Chang, H.-Y., El-Gebali, S., Fraser, M.I., et al. (2019). InterPro in 2019: improving

coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* *47*, D351–D360.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* *7*, 405–410.

Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* *11*, 15–19.

Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech.* *1819*, 86–96.

Mouillon, J.-M., Gustafsson, P., and Harryson, P. (2006). Structural Investigation of Disordered Stress Proteins. Comparison of Full-Length Dehydrins with Isolated Peptides of Their Conserved Segments. *Plant Physiol.* *141*, 638–650.

Mowla, S.B., Thomson, J.A., Farrant, J.M., and Mundree, S.G. (2002). A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. *Planta* *215*, 716–726.

Msanne, J., Lin, J., Stone, J.M., and Awada, T. (2011). Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* RD29A and RD29B genes and evaluation of transgenes. *Planta* *234*, 97–107.

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.

Nakayama, K., Okawa, K., Kakizaki, T., Honma, T., Itoh, H., and Inaba, T. (2007). *Arabidopsis* Cor15am is a chloroplast stromal protein that has cryoprotective activity and forms oligomers. *Plant Physiol.* *144*, 513–523.

Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T., and Welin, B.V. (2001a). Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* *45*, 263–279.

Nylander, M., Heino, P., Helenius, E., Palva, E.T., Ronne, H., and Welin, B.V. (2001b). The low-temperature- and salt-induced RCI2A gene of *Arabidopsis* complements the sodium sensitivity caused by a deletion of the homologous yeast gene SNA1. *Plant Mol.Biol.* *45*, 341–352.

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.

Oliver, M.J., Tuba, Z., and Mishler, B.D. (2000). The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology* *151*, 85–100.

Oliver, M.J., Dowd, S.E., Zaragoza, J., Mauget, S.A., and Payton, P.R. (2004). The rehydration transcriptome of the desiccation-tolerant bryophyte *Tortula ruralis*: transcript classification and analysis. *BMC Genomics* *5*, 89.

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.

Pappan, K., and Wang, X. (1999). Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* *1439*, 151–166.

Park, J., Lim, C.J., Shen, M., Park, H.J., Cha, J.-Y., Iniesto, E., Rubio, V., Mengiste, T., Zhu, J.-K., Bressan, R.A., et al. (2018). Epigenetic switch from repressive to permissive chromatin in response to cold stress. *PNAS* *115*, E5400–E5409.

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.

Pereira, S.S., Guimaraes, F.C.M., Carvalho, J.F.C., Stolf-Moreira, R., Oliveira, M.C.N., Rolla, A. a. P., Farias, J.R.B., Neumaier, N., and Nepomuceno, A.L. (2011). Transcription factors expressed in soybean roots under drought stress. *Genet. Mol. Res.* 10, 3689–3701.

Prakash, S. (1980). Taxonomy, cytogenetics, and origin of crop *Brassicas*: A review (Lund, Sweden : Stockholm, Sweden: [Distributor] Swedish Natural Science Research Council).

Proctor, M.C.F., Oliver, M.J., Wood, A.J., Alpert, P., Stark, L.R., Cleavitt, N.L., and Mishler, B.D. (2007). Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. *The Bryologist* 110, 595–621.

Puhakainen, T., Hess, M.W., Mäkelä, P., Svensson, J., Heino, P., and Palva, E.T. (2004). Overexpression of Multiple Dehydrin Genes Enhances Tolerance to Freezing Stress in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 54, 743–753.

Rajashekar, C.B., Zhou, H.-E., Zhang, Y., Li, W., and Wang, X. (2006). Suppression of phospholipase D α 1 induces freezing tolerance in *Arabidopsis*: Response of cold-responsive genes and osmolyte accumulation. *Journal of Plant Physiology* 163, 916–926.

Rapacz, M. (2002). Regulation of frost resistance during cold de-acclimation and re-acclimation in oilseed rape. A possible role of PSII redox state. *Physiol. Plant.* 115, 236–243.

Reynolds, T.L., and Bewley, J.D. (1993). Characterization of Protein Synthetic Changes in a Desiccation-Tolerant Fern, *Polypodium virginianum*. Comparison of the Effects of Drying, Rehydration and Abscisic Acid. *J Exp Bot* 44, 921–928.

Richards, R.A., and Thurling, N. (1979). Genetic analysis of drought stress response in rapeseed (*Brassica campestris* and *B. Napus*). II. Yield improvement and the application of selection indices. *Euphytica* 28, 169–177.

Rihan, H.Z., Al-Issawi, M., and Fuller, M.P. (2017). Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance. *J. Plant Interact.* *12*, 143–157.

Rizhsky, L., Liang, H., and Mittler, R. (2002). The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiol.* *130*, 1143–1151.

Rorat, T. (2006). Plant dehydrins — Tissue location, structure and function. *Cellular and Molecular Biology Letters* *11*, 536–556.

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 Biology* *10*, 181.

Russouw, P.S., Farrant, J., Brandt, W., and Lindsey, G.G. (1997). The most prevalent protein in a heat-treated extract of pea (*Pisum sativum*) embryos is an LEA group I protein; its conformation is not affected by exposure to high temperature. *Seed Science Research* *7*, 117–124.

Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B., and Vidal, S. (2006). A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal* *45*, 237–249.

Sakai, A., and Larcher, W. (1987). *Frost Survival of Plants: Responses and Adaptation to Freezing Stress* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).

Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., and Harper, J.F. (2002). Calcium at the Crossroads of Signaling. *Plant Cell* *14*, S401–S417.

Schmidt, J. (1983). Drought Resistance and Wheat Breeding. *Agric. Water Manage.* *7*, 181–194.

Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K. (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* *13*, 61–72.

Shahidi, F. (1990). Rapeseed and Canola: Global Production and Distribution. In *Canola and Rapeseed*, F. Shahidi, ed. (Springer US), pp. 3–13.

Shih, M., Lin, S., Hsieh, J., Tsou, C., Chow, T., Lin, T., and Hsing, Y.C. (2004). Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. *Plant Mol Biol* 56, 689–703.

Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 217–223.

Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58, 221–227.

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.

Shiranirad, A.H., and Abbasian, A. (2011). Evaluation of Drought Tolerance in Rapeseed Genotypes under Non Stress and Drought Stress Conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 39, 164–171.

Sivankalyani, V., Geetha, M., Subramanyam, K., and Girija, S. (2015). Ectopic expression of *Arabidopsis* RCI2A gene contributes to cold tolerance in tomato. *Transgenic Res* 24, 237–251.

Smirnoff, N. (1998). Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 9, 214–219.

Solomon, A., Salomon, R., Paperna, I., and Glazer, I. (2000). Desiccation stress of entomopathogenic nematodes induces the accumulation of a novel heat-stable protein. *Parasitology* 121, 409–416.

Song, K.M., Osborn, T.C., and Williams, P.H. (1988a). *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Theoret. Appl. Genetics* 75, 784–794.

Song, K.M., Osborn, T.C., and Williams, P.H. (1988b). *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) : 2. Preliminary analysis of

subspecies within *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea*. *Theor Appl Genet* 76, 593–600.

Soulages, J.L., Kim, K., Walters, C., and Cushman, J.C. (2002). Temperature-Induced Extended Helix/Random Coil Transitions in a Group 1 Late Embryogenesis-Abundant Protein from Soybean. *Plant Physiol.* 128, 822–832.

Soulages, J.L., Kim, K., Arrese, E.L., Walters, C., and Cushman, J.C. (2003). Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly (L-proline)-type II structure. *Plant Physiol.* 131, 963–975.

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.

Tanaka, S., Ikeda, K., and Miyasaka, H. (2004). Isolation of a new member of group 3 late embryogenesis abundant protein gene from a halotolerant green alga by a functional expression screening with cyanobacterial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 41–45.

Tao, D.L., Oquist, G., and Wingsle, G. (1998). Active oxygen scavengers during cold acclimation of Scots pine seedlings in relation to freezing tolerance. *Cryobiology* 37, 38–45.

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.

Thomashow, M.F. (1998). Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing Tolerance. *Plant Physiol.* 118, 1–8.

Thomashow, M.F. (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 571–599.

Thomashow, M.F. (2010). Molecular Basis of Plant Cold Acclimation: Insights Gained from Studying the CBF Cold Response Pathway. *Plant Physiol.* 154, 571–577.

Thorsen, S.M., and Hoglind, M. (2010). Assessing winter survival of forage grasses in Norway under future climate scenarios by simulating potential frost tolerance in combination with simple agroclimatic indices. *Agric. For. Meteorol.* 150, 1272–1282.

Tompa, P. (2005). The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Letters* 579, 3346–3354.

Tripathi, B.N., Bhatt, I., and Dietz, K.-J. (2009). Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma* 235, 3–15.

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.

Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2010). Understanding protein non-folding. *BBA-Proteins Proteomics* 1804, 1231–1264.

Vágújfalvi, A., Galiba, G., Dubcovsky, J., and Cattivelli, L. (2000). Two loci on wheat chromosome 5A regulate the differential cold-dependent expression of the *cor14b* gene in frost-tolerant and frost-sensitive genotypes. *Mol Gen Genet* 263, 194–200.

Vergnolle, C., Vaultier, M.N., Taconnat, L., Renou, J.P., Kader, J.C., Zachowski, A., and Ruelland, E. (2005). The cold-induced early activation of phospholipase C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiol.* 139, 1217–1233.

Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J.H., and Zhu, J.K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 45, 523–539.

Wang, X.M. (2005). Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiol.* 139, 566–573.

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.

Warwick, S.I., and Black, L.D. (1993). Molecular relationships in subtribe *Brassicinae* (Cruciferae, tribe Brassiceae). *Can. J. Bot.* 71, 906–918.

Wei, T., Deng, K., Liu, D., Gao, Y., Liu, Y., Yang, M., Zhang, L., Zheng, X., Wang, C., Song, W., et al. (2016). Ectopic Expression of DREB Transcription Factor, AtDREB1A, Confers Tolerance to Drought in Transgenic *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Cell Physiol.* 57, 1593–1609.

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.

Wolkers, W.F., McCready, S., Brandt, W.F., Lindsey, G.G., and Hoekstra, F.A. (2001). Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1544, 196–206.

Xian, M., Luo, T., Khan, M.N., Hu, L., and Xu, Z. (2017). Identifying Differentially Expressed Genes Associated with Tolerance against Low Temperature Stress in *Brassica napus* through Transcriptome Analysis. *Int. J. Agric. Biol.* *19*, 273–281.

Xiong, L.M., Schumaker, K.S., and Zhu, J.K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* *14*, S165–S183.

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.

Yadav, S.K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agron. Sustain. Dev.* *30*, 515–527.

Yamaguchishinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994). A Novel Cis-Acting Element in an *Arabidopsis* Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress. *Plant Cell* *6*, 251–264.

Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* *10*, 88–94.

Yang, W., Zhang, L., Lv, H., Li, H., Zhang, Y., Xu, Y., and Yu, J. (2015). The K-segments of wheat dehydrin WZY2 are essential for its protective functions under temperature stress. *Front. Plant Sci.* *6*, 406.

Yang, Z.-B., Eticha, D., Führs, H., Heintz, D., Ayoub, D., Van Dorselaer, A., Schlingmann, B., Rao, I.M., Braun, H.-P., and Horst, W.J. (2013). Proteomic and phosphoproteomic analysis of polyethylene glycol-induced osmotic stress in root tips of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Exp Bot* *64*, 5569–5586.

Ye, Y., Ding, Y., Jiang, Q., Wang, F., Sun, J., and Zhu, C. (2017). The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant Cell Reports* *36*, 235–242.

Yin, M., Wang, Y., Zhang, L., Li, J., Quan, W., Yang, L., Wang, Q., and Chan, Z. (2017). The Arabidopsis Cys2/His2 zinc finger transcription factor ZAT18 is a positive regulator of plant tolerance to drought stress. *J Exp Bot* 68, 2991–3005.

Zarka, D.G., Vogel, J.T., Cook, D., and Thomashow, M.F. (2003). Cold induction of *Arabidopsis* CBF genes involves multiple ICE (Inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiol.* 133, 910–918.

Zehnálek, P. (2018). Seznam doporučených odrůd řepky olejky 2018.

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.

Zhang, M., Lv, D., Ge, P., Bian, Y., Chen, G., Zhu, G., Li, X., and Yan, Y. (2014). Phosphoproteome analysis reveals new drought response and defense mechanisms of seedling leaves in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Proteomics* 109, 290–308.

Zhou, Y., He, P., Xu, Y., Liu, Q., Yang, Y., and Liu, S. (2017). Overexpression of CsLEA11, a Y3SK2-type dehydrin gene from cucumber (*Cucumis sativus*), enhances tolerance to heat and cold in *Escherichia coli*. *AMB Express* 7, 182.