

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky

a

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Centrum strukturní a funkční genomiky rostlin



Mgr. Martina Kintlová

Genetické aspekty příjmu těžkých kovů u ječmene

Disertační práce

Vedoucí práce: RNDr. Roman Hobza, Ph.D.

Olomouc 2022

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně v průběhu doktorského studia pod vedením RNDr. Romana Hobzy, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

.....

Děkuji RNDr. Romanovi Hobzovi, Ph.D. za jeho pomoc, čas a odborné rady v průběhu celého doktorského studia. Také mu děkuji za jeho přátelský přístup, inspiraci a spoustu optimismu.

Dále chci poděkovat prof. Ing. Jaroslavu Doleželovi, DrSc. za příležitost pracovat v jeho týmu, která pro mě byla cennou životní zkušeností. Děkuji i všem kolegům z Centra strukturní a funkční genomiky rostlin za jejich pomoc a přátelskou atmosféru.

Velký dík si zaslouží i Dr. Pai Pedas a jeho kolegové z Københavns Universitet, kteří mě přátelsky přijali mezi sebe a byli mi nápomocni po celou dobu mé zahraniční stáže.

V neposlední řadě děkuji i mé rodině a přátelům, kteří mi byli velkou oporou.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno autora:	Mgr. Martina Kintlová
Název:	Genetické aspekty příjmu těžkých kovů u ječmene
Typ práce:	Disertační práce
Katedra:	Katedra buněčné biologie a genetiky
Studijní program:	P1527 Biologie
Studijní obor:	1515V004 Molekulární a buněčná biologie
Vedoucí práce:	RNDr. Roman Hobza, Ph.D.
Rok obhajoby:	2022
Počet stran/příloh:	63/IV
Jazyk:	Český
Klíčová slova:	<i>Hordeum vulgare</i> , těžké kovy, měď, zinek, kadmium, abiotický stres, transkriptom, sekvenování RNA, mRNA-seq, buněčný cyklus

Abstrakt

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) je jednoděložná rostlina z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), která je ve srovnání osevních ploch čtvrtou nejrozšířenější zemědělskou plodinou na světě. Za těžké kovy můžeme označit kovy s hustotou větší než 5 g/cm³, řada z nich je pro fungování rostlin nezbytná. Ovšem i tyto mikronutrienty jsou ve vyšších koncentracích pro rostliny toxické obdobně jako těžké kovy, u nichž nebyl biologický význam zjištěn. Kovy jsou rostlinami přijímány především kořenovým systémem a v menší míře také skrze listy z atmosféry. Množství kovů v buňkách je striktně regulováno podle aktuálních potřeb rostliny. Tato regulace probíhá na transkripční úrovni, zejména transkripcí membránových transportérů. Za účelem ochrany rostliny vůči nadbytku kovů se v buňkách uplatňují detoxifikační mechanismy.

Předkládaná práce je zaměřena na hledání nových kandidátních genů zapojených do metabolismu těžkých kovů, a to pomocí analýzy transkripčních profilů rostlin ječmene pěstovaných v podmínkách zvýšené koncentrace vybraných kovů, mědi, zinku, respektive kadmia. Porovnáním kontrolních rostlin a rostlin pěstovaných ve zvýšené koncentraci kovů byl stanoven specifický expresní profil ječmene ve vybraných

stresových podmínkách. Nejvíce „upregulovaným“ genem v důsledku působení kadmia byl gen *HvPCR2* vyskytující se u ječmene v celkem pěti kopiích. Funkční analýza v kvasinkách zhodnotila roli jednotlivých kopií v detoxifikaci kadmia.

Dále byl studován vliv působení těžkých kovů na buněčný cyklus buněk kořenového meristému s využitím fluorescenční barvy EdU (5-ethynyl-2-deoxyuridin) a následného třídění značených jader pomocí průtokové cytometrie. Bylo sledováno, k jakému poškození buněk pod vlivem těžkých kovů dochází a zda se míra tohoto poškození pro jednotlivé kovy liší.

V neposlední řadě jsme se zabývali studiem jednotlivých reziduí transportéru *HvIRT1* z hlediska určení jejich role v transportu těžkých kovů a substrátové specifity. Vybrané mutantní varianty transportéru *HvIRT1* byly exprimovány v kmenech *Saccharomyces cerevisiae* citlivých na konkrétní těžké kovy. Na základě výsledků komplementačních testů bylo rozšířeno povědomí o důležitosti jednotlivých aminokyselinových reziduí transportéru *HvIRT1*.

Tato doktorská práce se věnovala pochopení reakce ječmene na přítomnost vybraných těžkých kovů v prostředí s využitím metod molekulární biologie, bioinformatiky a pokročilé cytometrie.

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's name:	Mgr. Martina Kintlová
Title:	Genetic aspects of heavy metal uptake in barley
Type of thesis:	Ph.D. thesis
Department:	Department of Cell Biology and Genetics
Study program:	P1527 Biology
Study branch:	1515V004 Molecular and cell biology
Supervisor:	RNDr. Roman Hobza, Ph.D.
The year of presentation:	2022
Number of pages/appendices:	63/IV
Language:	Czech
Keywords:	<i>Hordeum vulgare</i> , heavy metals, copper, zinc, cadmium, abiotic stress, transcriptome, RNA sequencing, mRNA-seq, cell cycle

Abstract

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is a monocotyledonous plant of the *Poaceae* family, which is the fourth most widespread agricultural crop in the world in regard to the sown area. Heavy metals can be defined as metals with a density higher than 5 g/cm³, many of them are essential for plants. However, even these micronutrients are toxic to plants at higher concentrations, similar to heavy metals for which no biological function has been identified. Plants absorb metals primarily through the root system and partially also through the leaves from the atmosphere. The amount of metals in the cells is strictly regulated depending on the current needs of the plant. This regulation takes place at the transcriptional level, in particular by the transcription of the membrane transporters. Detoxification mechanisms take place in cells to protect plants from excess metals.

The presented work is focused on the search for new candidate genes involved in heavy metal metabolism, by analyzing the transcription profiles of barley plants grown in conditions of increased concentration of selected metals, copper, zinc and cadmium, respectively. The specific expression profile of barley under selected stress

conditions was determined by comparing control plants and plants grown in increased metal concentrations. The most upregulated gene in elevated cadmium concentration was the *HvPCR2* gene, which occurs in barley in a total of five copies. Functional analysis in yeast evaluated the role of individual copies in cadmium detoxification.

Furthermore, the effect of heavy metals on the cell cycle of root meristem cells was studied using the fluorescent dye EdU (5-ethynyl-2-deoxyuridine) and subsequent sorting of labeled nuclei by flow cytometry. The extent of damage of cells under the influence of heavy metals was elucidated as well as the degree of this damage in case of individual metals.

Finally, we focused on the analysis of individual residues of the *HvIRT1* transporter in terms of determining the role in heavy metal transport and substrate specificity. Selected mutant variants of the *HvIRT1* transporter were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* strains sensitive to specific heavy metals. Based on the results of complementation assays, awareness of the importance of individual amino acid residues of the *HvIRT1* transporter was raised.

This doctoral thesis deals with the understanding of the response of barley to the presence of selected heavy metals in the environment using the methods of molecular biology, bioinformatics and advanced cytometry.

OBSAH

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
1.1 Ječmen setý.....	10
1.1.1 Taxonomické zařazení ječmene.....	10
1.1.2 Morfologie ječmene setého.....	10
1.1.3 Rozšíření ječmene.....	12
1.1.4 Využití ječmene.....	13
1.2 Těžké kovy.....	15
1.2.1 Těžké kovy v půdě.....	15
1.2.2 Dostupnost kovů v půdě.....	16
1.3 Význam mědi v rostlinách.....	18
1.3.1 Projevy deficitu mědi.....	18
1.3.2 Projevy toxicity mědi.....	19
1.4 Význam zinku v rostlinách.....	19
1.4.1 Projevy deficitu zinku.....	20
1.4.2 Projevy toxicity zinku.....	20
1.5 Působení kadmia na rostliny.....	21
1.6 Příjem kovů rostlinou.....	23
1.7 Transport kovů v rostlině.....	24
1.7.1 P _{1B} -ATPázy.....	25
1.7.2 CDF transportéry.....	26
1.7.3 NRAMP transportéry.....	26
1.7.4 ZIP transportéry.....	27
1.8 Detoxifikace těžkých kovů v rostlinách.....	28
1.8.1 Role buněčné stěny a kořenových exudátů.....	28
1.8.2 Vakuolární sekvestrace.....	29
1.8.3 Heat shock proteiny.....	30
1.8.4 Fytochelatiny.....	30
1.8.5 Metalothioneiny.....	31
1.8.6 Organické kyseliny.....	31
1.8.7 Histidin.....	32
1.8.8 Nikotianamin.....	32
1.8.9 Glutathion.....	32
1.9 Studium změny genové exprese.....	33
1.9.1 Metody založené na hybridizaci.....	33
1.9.2 Metody založené na PCR.....	34

1.9.3 Sériová analýza genové exprese	35
1.9.4 Sekvenování RNA	35
1.9.4.1 Příprava RNA na sekvenaci.....	36
1.9.4.2 Tvorba knihovny.....	37
1.9.4.3 Sekvenování.....	37
1.9.4.4 Analýza sekvenačních dat.....	40
1.10 Kvasinky, nástroj pro funkční analýzu genů.....	41
1.11 Detekce replikace DNA.....	42
2 CÍLE PRÁCE.....	43
3 VÝSLEDKY.....	44
3.1 Souhrn.....	44
3.2 Publikace.....	49
3.2.1 Transcriptome Response to Cadmium Exposure in Barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	50
3.2.2 Transcriptome of barley under three different heavy metal stress reaction...51	
3.2.3 Nové poznatky v genetice rostlin VI, Tolerance rostlin k těžkým kovům.....52	
3.2.4 Characterisation of important residues for transport ability and substrate specificity of the metal ion transporter <i>HvIRT1</i>	52
4 LITERATURA.....	53
5 PŘÍLOHA.....	63

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 Ječmen setý

1.1.1 Taxonomické zařazení ječmene

Ječmen (rod *Hordeum* L.) taxonomicky spadá do říše rostlin (*Plantae*), oddělení semenných (*Spermatophyta*), pododdělení krytosemenných (*Angiospermae*), třídy jednoděložných (*Monocotyledonae*) a čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Rod *Hordeum* L. zahrnuje celkem 32 druhů, z nichž většina je planých a pouze jeden kulturní, konkrétně ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) (Von Bothmer *et al.*, 1995).

Jaderný genom zástupců rodu *Hordeum* je převážně diploidní ($2n = 2x = 14$), tetraploidní ($2n = 4x = 28$) nebo hexaploidních ($2n = 6x = 42$), základní chromozomové číslo x je 7. Ječmen setý je diploidní rostlina, jejíž genom má velikost 5 100 Mb/1C a obsahuje více než 80 % repetitivních sekvencí (Dolezel *et al.*, 1998; Wicker *et al.*, 2009). V roce 2012 byl genom ječmene osekvenován. Pro rozluštění genetické informace byl použit kultivar Morex (Mayer *et al.*, 2012).

1.1.2 Morfologie ječmene setého

Ječmen setý je jednoletá rostlina, která vytváří svazčitý kořenový systém dosahující šířky 15 – 30 cm. Kořenový systém většinou dorůstá do hloubky 30 – 35 cm, ale v závislosti na podmínkách, textuře a struktuře půdy a teplotě může pronikat i do hloubky okolo 120 cm. V porovnání s pšenicí tvoří ječmen méně rozsáhlou kořenovou soustavu. Kořeny vytváří ve své střední části kořenové vlášení, které zvětšuje povrch kořene a tím se podílí na zvýšení příjmu vody a živin. Délka vlášení je omezená a je limitovaná množstvím vody v půdě (Zimolka, 2006).

Stéblo ječmene je většinou dlouhé 60 – 120 cm, má kruhový průřez a je duté, díky čemuž je poměrně pevné i při nízké hmotnosti. Nody (kolénka) rozdělují stéblo na několik internodií, přičemž jejich délka není konstantní. Přízemní internodium je nejkratší, každé následující je vždy delší. Dospělá rostlina vytváří jedno hlavní stéblo a 2 – 5 postranních. Z horní části nodů vyrůstají přisedlé vztyčené listy dlouhé 5 - 15 cm. Listy mají úzkou pochvu, jež objímá kolénko a spodní část internodia (Zimolka, 2006).

Ječmen setý vytváří květenství typu nevětveného klasu. Klas je tvořený klasovým vretenem, po jeho stranách střídavě vyrůstají klásky tvořené z několika květů. Květ je chráněný před mechanickým poškozením. Je uzavřen vnější plevou, pluchou s osinou a vnitřní pluškou. Uvnitř květu se nachází jednovaječný semeník se dvěma bliznami a třemi tyčinkami (Zimolka, 2006).

Plodem ječmene je obilka, též nazývaná jako zrno nebo semeno. Je tvořena obalem, endospermem a zárodkem. Většinou je světle žlutá, ale může být zabarvena i do oranžova, hněda nebo modročerna. Obalovou vrstvou na hřbetní straně je plucha, na břišní straně pluška, dále následují oplodí a osemení. Na spodní hřbetní straně obilky se nachází zárodek, základ budoucí rostliny. Největší část obilky tvoří endosperm, který je tvořen tenkostěnným parenchymatickým pletivem vyplněným škrobem, jež je v průběhu klíčení rostliny degradován enzymy a využíván jako zdroj energie. V aleuronové vrstvě uložené na okraji endospermu se nachází zásoba proteinů, minerálních látek a vitamínů. Vyžralá obilka obsahuje kolem 12 – 15 % vody, zbytek tvoří sušina obsahující organické a anorganické látky (Ehrenbergerová, 2006; Zimolka, 2006). Chemické složení obilky ječmene je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1: Chemické složení obilky ječmene (MacGregor *et* Bhatta, 1993)

Složka	Zastoupení v obilce [%]
Sacharidy	
Škrob	60 – 65
<i>Amylóza 17 – 24 % škrobu</i>	
<i>Amylopektin 76 – 83 % škrobu</i>	
Neškrobové polysacharidy	
<i>Beta-glukany</i>	3,3 – 4,9
<i>Arabinoxylany</i>	9,0
<i>Celulóza</i>	4 - 7
Nízkomolekulární sacharidy	
<i>Sacharóza</i>	1 – 2
<i>Rafinóza</i>	0,3 – 0,5
<i>Maltóza</i>	0,1
<i>Glukóza</i>	0,1
<i>Fruktóza</i>	0,1
<i>Ostatní</i>	1
Tuky	3,5
Fosfáty	
Fytin	0,9
Polyfenoly	0,1 – 0,6
Dusíkaté látky	9,5 – 11,9 (7-18)
Rozpuštěné dusíkaté látky	1,9
Albuminy a globuliny	3,5
Hordeiny (prolaminy)	3,4
Gluteliny	3,4
Minerální látky	2

1.1.3 Rozšíření ječmene

Centra diverzity rodu *Hordeum* se nachází v centrální a jihozápadní Asii, v západní části Severní Ameriky, na jihu Jižní Ameriky a v oblasti Středomoří. Ječmen osidluje různorodá stanoviště. Řada druhů se adaptovala na extrémní podmínky, například v podobě tolerance vůči chladu nebo soli. Některé druhy ječmene proto můžeme najít i v Himalájích či Andách v nadmořských výškách nad 4 500 m n. m. (Von Bothmer, 1992). Kulturní ječmen je pěstován ve všech teplotních pásmech severní i jižní polokoule. Nejrozšířenější je v mírných oblastech a ve vyšších polohách subtropických a tropických oblastí (Nevo, 1992).

Ječmen byl před zhruba 10 000 lety domestikován z planého ječmene *Hordeum spontaneum* v oblasti Středního východu, tzv. Úrodného půlměsíce (Badr *et al.*, 2000).

Až do konce 19. století vznikla řada krajových odrůd domestikovaného ječmene v důsledku jeho přizpůsobování se podmínkám prostředí. V posledních sto letech byly tyto krajové odrůdy nahrazeny agronomicky využívanými odrůdami, což vedlo ke snížení genetické diverzity (Nevo, 1992). Díky intenzivnímu šlechtění a selekci dnes existují tisíce komerčně dostupných odrůd ječmene. Komerčně dostupné odrůdy rozdělujeme dle jejich použití na krmné a sladovnické, dle způsobu pěstování na jarní a ozimé nebo podle uspořádání klasu na dvouřadé a víceřadé.

1.1.4 Využití ječmene

Ječmen setý, *Horedum vulgare* L., je oblíbeným modelovým organismem pro studium genomu obilovin již od dob znovuoobnovení Mendelových zákonů dědičnosti. Důvodem jeho využití pro vědecké účely je jeho diploidní genom, schopnost samoopylení, velikost chromozomů (6 – 8 mm), velká přirozená i indukovatelná variabilita, vysoká adaptabilita a poměrně malý vzrůst rostlin (Kleinhofs *et* Graner, 2001).

Z hlediska praktického využití patří ječmen setý k hospodářsky nejvýznamnějším plodinám. Ve srovnání osevních ploch je ječmen po kukuřici, rýži a pšenici čtvrtou nejrozšířenější zemědělskou plodinou na světě. V Evropě zaujímá dokonce třetí příčku za pšenicí a kukuřicí (FAO, 2016). Většina vypěstovaného ječmene se používá ke krmným účelům. Nejvyšší část produkce, představující zhruba 30 % celkového množství, slouží k výrobě sladu.

Pěstování ječmene na území České republiky je historicky spojeno s tradicí vaření piva. Šlechtění ječmene na našem území sahá až do 70. let 19. století, kdy Emanuel Proskowetz zušlechťoval krajový ječmen starohanáckého agroekotypu. Výsledkem jeho úsilí byla světově známá odrůda Proskowetz Hana Pedigree, která byla až do roku 1958 pěstována u nás i v zahraničí (Chloupek, 2011). K výrobě sladu se většinou používá zrna pluchatých dvouřadých odrůd ječmene jarního typu. Registrovány jsou u nás však i některé ozimé odrůdy, které mají vyšší teoretický výnos, ale zároveň nižší výnosovou jistotu z důvodu nízké zimuvzdornosti. Mezi hlavní kritéria pro hodnocení kvality sladovnického ječmene patří například extrakt v sušině sladu, dosažitelný stupeň prokvašení, obsah beta-glukanů ve sladině, dusíkaté látky v zrna a další (Psota *et* Ehrenbergerová, 2008).

Pro krmné účely jsou využívány jarní i ozimé odrůdy ječmene. Směrodatný je v tomto případě obsah živin, především škrobu a dusíkatých látek. Naopak limitujícím faktorem jsou antinutriční látky, tj. neškrobové polysacharidy, inhibitory proteáz a fytáty. Obsah škrobu v zrně je specifický pro jednotlivé odrůdy a je v negativním vztahu s obsahem proteinů. Nutriční hodnota proteinů je dána koncentrací esenciálních aminokyselin (lyzin, threonin, methionin a tryptofan). Využitelnost živin z krmiva negativně ovlivňuje kyselina fytová, jež je pro ječmen hlavním zdrojem fosforu. S minerálními látkami vytváří nerozpustné soli, fytáty, které u zvířat blokují některé trávicí enzymy. Nestrávené fytáty a nevyužitý fosfor přecházejí do vnějšího prostředí, kde jsou zdrojem nezanedbatelného znečištění půdy a vod. Stravitelnost zrna omezují i polyfenoly, které jsou schopny vázat se na lyzin a tryptofan a omezovat tak jejich dostupnost (Vaculová, 2006).

V některých kulturách, hlavně v Asii a severní Africe, je ječmen tradičně využíván i jako zdroj potravy. V současnosti se ovšem setkáváme s celosvětovým zájmem o jeho využití. Tuto skutečnost lze připisovat obsahu některých látek hlavně arabinoxylanů, beta-glukanů a rezistentního škrobu, které v potravě člověka fungují jako prebiotika. Ceněny jsou i jeho antioxidační vlastnosti díky obsahu superoxiddismutázy, tokoferolů, tokotrienolů a kyseliny ferulové (Psota *et al.*, 2008). Zrno ječmene ve srovnání s pšenicí obsahuje pouze malé množství lepek, nicméně není vhodné pro konzumaci lidmi trpícími celiakií. Lepek však není obsažen v nápoji z mladého ječmene, který se v posledních letech stává velmi populárním. Pro jeho výrobu se využívá nadzemní část rostliny ve vhodné růstové fázi, která obsahuje velké množství zdraví prospěšných látek, zejména vitamínů, superoxiddismutázy, katalázy, aminokyselin, polyfenolů a dalších fenolických látek (Paulíčková *et al.*, 2007).

Ječmen, který není nevhodný pro výrobu sladu, krmnému nebo potravinářskému využití, se zpracovává průmyslově. Pro průmyslové použití ječmene je primární obsah škrobu. Nachází využití při výrobě ethanolu, celulózy, papíru, lepidel, mýdel, vosků, barev, fenolformaldehydových pryskyřic a dalších produktů (Zimolka, 2006).

1.2 Těžké kovy

Definice těžkých kovů není v literatuře jednotná. Některé zdroje tuto skupinu prvků vyčleňují na základě protonového čísla, atomové hmotnosti nebo toxicity. Ovšem nejčastěji jsou termínem těžké kovy označovány prvky s hustotou větší než 5 g/cm³. Patří mezi ně například měď, nikl, kadmium, zinek, železo, chrom a další.

Řada těžkých kovů je pro fungování rostlin, resp. živých organismů obecně, nezbytná. Například měď, jako součást proteinů, hraje významnou roli v přenosu elektronů během fotosyntézy a buněčného dýchání, zinek se podílí na aktivaci různých enzymatických reakcí. Ovšem i tyto mikronutrienty se ve vyšších koncentracích stávají pro rostlinu toxickými obdobně jako těžké kovy, u nichž nebyl biologický význam zjištěn (např. kadmium). Toxicita těžkých kovů spočívá často v chemické podobnosti s jinými prvky. Při záměně mikronutrientu za toxický prvek v proteinech nebo enzymech dochází k narušení správných funkcí těchto biomolekul. Při nadbytku těžkých kovů v buňce může docházet ke vzniku volných kyslíkových radikálů (ROS) vyvolávajících oxidativní stres (Dietz *et al.*, 1999; Van Assche *et al.*, 1990).

1.2.1 Těžké kovy v půdě

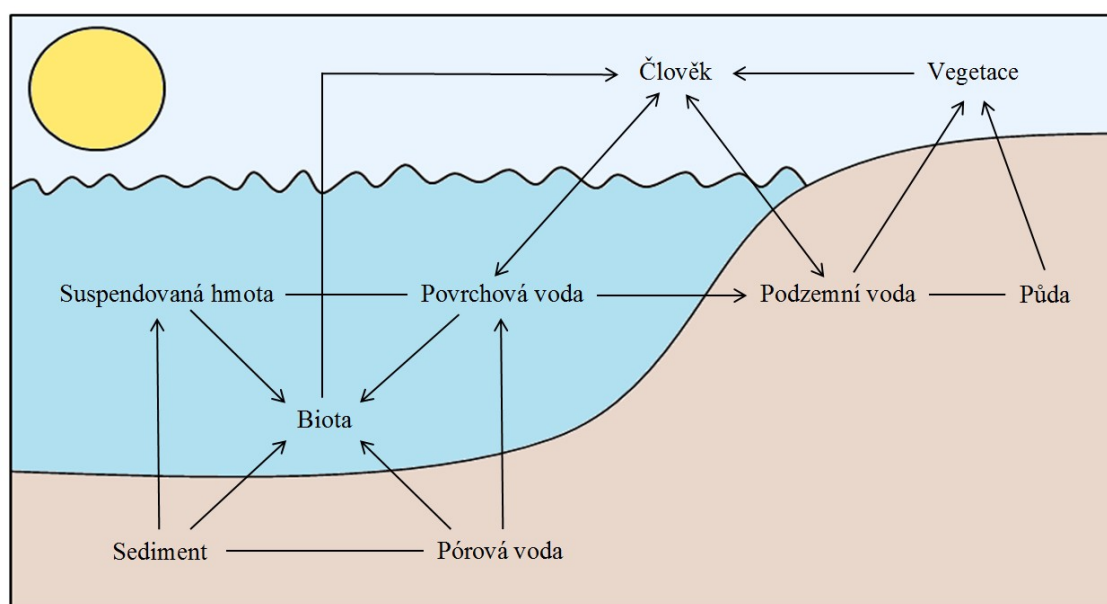
Těžké kovy se do životního prostředí dostávají přirozenými geochemickými cykly, antropogenní činností nebo v důsledku mikrobiální aktivity. Mohou být rozptýleny v půdě a sedimentech, rozpuštěny v podzemních a povrchových vodách (viz Obr. 2). Mimo to se mohou dostávat i do ovzduší. Akumulace kovů v povrchových vodách, rostlinách a živočiších má nepříznivé dopady i na člověka (John *et al.*, 1995).

Z toxikologického hlediska mezi nejvýznamnější těžké kovy v půdě patří zinek, kadmium, měď, rtuť, olovo, nikl a arsen. Toxické působení těchto kovů je různé a znatelné již při nízkých koncentracích. Těžké kovy jsou přirozenými komponenty půdy, do prostředí se uvolňují zvětráváním matečné horniny, ve které se nachází. Problémem je však jejich zvyšující se množství v životním prostředí.

V důsledku antropogenních vlivů dochází k akumulaci těžkých kovů v půdě. Rizikové prvky zde přetrvávají tisíce let a negativně ovlivňují biologické a fyzikálně-chemické procesy v půdě, dostávají se do potravinového řetězce a ohrožují zdraví člověka. Existuje mnoho cest, kterými se těžké kovy dostávají do půdy. Patří mezi ně

imise vznikající při průmyslové činnosti a dopravě, odpady z průmyslových výrob, zaplavení půd znečištěnou vodou, používání pesticidů, hnojení půdy minerálními průmyslovými hnojivy nebo komposty obsahujícími kontaminanty, havárie, ale i přírodní jevy, jako například vulkanická činnost či sesuvy půd (Němeček *et al.*, 2010).

Obr. 1: Vzájemný vztah mezi člověkem, těžkými kovy a životním prostředím (upraveno podle John *et Leventhal* 1995)



1.2.2 Dostupnost kovů v půdě

Příjem těžkých kovů rostlinami je prvním krokem jejich vstupu do potravního řetězce. Aby se toxický prvek dostal skrze rostlinu z půdy do potravního řetězce, musí být:

- dostupný kořenům rostliny
- transportován přes membránu rhizodermálních buněk
- transportován z buněk rhizodermis do xylému, skrze nějž se prvky dostávají do nadzemní části rostlin
- mobilizován z listů do pletiv využívaných člověkem k potravě (semen, hlíz, plodů) skrze floém

Limitujícím krokem je přechod kovu z půdy do kořene (John *et al.*, 1995). Příjem kovu rostlinou není lineárně závislý na množství kovů v půdě, ale na jeho dostupnosti. Mobilita prvků a transport je ovlivněn chemickými a mineralogickými charakteristikami půdy, mezi které patří pH, redoxní potenciál, kationtová výměnná kapacita, kvantita a kvalita organické hmoty, oxidů a jílových minerálů, provzdušnění půdy a v neposlední řadě též mikrobiální aktivita (Alloway, 1990; Petrangeli *et al.*, 2001). Obecně je nejmobilnějším kovem v půdě kadmium, následuje nikl, zinek a měď. Nejméně mobilním těžkým kovem je olovo (Hornburg *et Brümmer*, 1993).

Nejvýznamnějšími faktory ovlivňujícími biologickou dostupnost kovů v půdě jsou pH a redoxní potenciál. Obecně platí, že v půdním roztoku neutrálních a alkalických půd jsou rizikové kovy rostlinám přístupné méně, a to z důvodu jejich pevnější vazby v půdě. Naopak lehké půdy jsou charakteristické snadnější dostupností kovů, což je ovšem spojeno s možnými ztrátami důležitých prvků. Vyšší dostupnost kovů při nižším pH způsobují protony H^+ vykazující vyšší afinitu k záporně nabitým vazebným místům na půdních koloidech, a tak z těchto míst vytěsňují kationty kovů. V půdách s nižším pH se tedy kovy často vyskytují volně nebo v podobě organokovů. Naopak v alkalickém prostředí jsou vázány v podobě nerozpustných fosfátů a uhličitanů (Wenzel *et al.*, 1999).

Redoxní potenciál ovlivňuje dostupnost především u kovů, které se v půdě vyskytují ve více oxidačních stavech, tedy např. železa, manganu, mědi či olova. Tyto prvky jsou zpravidla méně dostupné za vyššího oxidačního stupně. V důsledku poklesu redoxního potenciálu vznikají redukované a mobilnější formy kovů (McBride, 1989).

Organické látky v půdě ovlivňují biologickou dostupnost kovů jejich sorpcí nebo tvorbou rozpustných chelátů (Tlust'oš, 1999). Organickou část půdy tvoří látky humusové a nehumusové povahy. Humusové složky jsou velmi stabilní a jsou tvořeny huminy, huminovými kyselinami a fulvokyselinami. Obsahují funkční -OH a -SH skupiny, skrze něž mohou tvořit komplexy s řadou kationtů. Huminové kyseliny těžké kovy v půdě imobilizují, naopak fulvokyseliny a další nízkomolekulární organické látky tvoří s kovy rozpustné komplexy (Wenzel *et al.*, 1999).

Jílové minerály obsažené v půdě ovlivňují kationtovou výměnnou kapacitu půdy, tedy schopnost sorbovat kationty. Kationty kovů se účastní výměnných reakcí na povrchu jílových minerálů. V kyselějších půdách je adsorpce na tyto částice reverzibilní, při zvýšení pH se reakce částečně stává nevratnou (Kabata-Pendias *et Pendias*, 2001).

1.3 Význam mědi v rostlinách

Měď hraje ve vývoji a růstu rostlin nezastupitelnou roli. V rostlinách se vyskytuje ve dvou oxidačních stavech (Cu^+ a Cu^{2+}), mezi kterými přechází. Díky tomu se v biochemických reakcích uplatňuje jako oxidační i redukční činidlo a zastává tak v rostlinách celou řadu funkcí. Více než polovina množství mědi v rostlině se vyskytuje v chloroplastech a účastní se procesu fotosyntézy, kde představuje zcela nepostradatelný kofaktor elektronového přenašeče plastochinonu. Uplatňuje se při tvorbě thylakoidních gran a syntéze chlorofylu. Účastní se procesu respirace, obrany rostliny vůči volným radikálům, je součástí enzymových oxidáz (cytochromoxidázy, askorbátoxidázy, polyfenoloxidázy), ovlivňuje syntézu kyseliny abscisové a jako složka nitridoreduktázy se spolu se železem podílí na redukci nitrátů v rostlině. Zároveň je měď díky svým oxidačně-redukčním vlastnostem pro rostliny potenciálně toxická. Může katalyzovat vznik volných radikálů poškozujících DNA, proteiny, lipidy a další biomolekuly. Proto musí být její množství v buňkách striktně regulováno v závislosti na aktuálních potřebách rostliny (Burkhead *et al.*, 2009; Halliwell *et al.*, 1984; Hänsch *et al.*, 2009).

1.3.1 Projevy deficitu mědi

Nedostatek mědi se na rostlinách zpočátku viditelně neprojevuje, později ovšem dochází k zasychání apikálních listů a změně jejich barvy na tmavě žlutou. Postižené bývají spíše starší listy, při deficienci je z nich totiž měď transportována do mladších listů. Zároveň dochází k poškození apikálních meristémů a zpomalení rychlosti růstu. Dalším projevem nedostatku mědi je zhoršení transportu vody v důsledku snížení tvorby buněčných stěn a lignifikace v pletivech včetně xylému. Narušena bývá i reprodukce rostlin. Pylová zrna se hůře vyvíjejí a mají nižší viabilitu, poškozen je i embryonální vývoj, redukuje se produkce plodů a semen. Nejcitlivější jsou na nedostatek mědi obiloviny, pšenice, ječmen, oves, méně pak žito (Marschner, 1995; Ryant *et al.*, 2006).

1.3.2 Projevy toxicity mědi

I když je měď pro rostliny nezbytným mikroprvkem, ve vyšších koncentracích je toxická. Množství mědi, které rostlina toleruje jako netoxické, se u jednotlivých druhů zásadně liší a reflektuje požadavky metabolismu. Při nadbytku mědi v půdě reaguje rostlina zpomalením růstu kořene, kde zároveň dochází k preferenčnímu ukládání nadbytečné mědi. Díky hromadění mědi v kořenovém systému dochází k narušení příjmu některých jiných prvků. Například může být spojována s deficiencí železa (Marschner, 1995). Typickým příznakem toxicity mědi je chloróza nadzemních částí, kde dochází k poškození thylakoidních membrán a inhibici fotosystému II (Bernal *et al.*, 2004). Nadbytečná měď se váže na sulfhydrylové skupiny proteinů, čímž inhibuje funkci enzymů a proteinů. Dále může narušit transport v buňkách a katalyzovat vznik volných radikálů (Van Assche *et al.*, 1990).

1.4 Význam zinku v rostlinách

Zinek je po železu druhý nejvíce zastoupený kov v rostlinách a jako jediný kov se vyskytuje ve všech šesti třídách enzymů (oxidoreduktasy, transferasy, hydrolasy, lyasy, isomerasy, ligasy) (Broadley *et al.*, 2007). V rostlinách se vyskytuje pouze ve formě kationtu Zn^{2+} a neúčastní se oxidačně-redukčních reakcí (Marschner, 1995). Zinek je pro rostliny naprosto nepostradatelným prvkem a přitom je jeho nedostatek jednou z nejčastějších deficiencí rostlin. Díky jeho fyzikálně-chemickým vlastnostem je vhodným kofaktorem pro řadu enzymů uplatňujících se v metabolismu nukleových kyselin, proteinů, sacharidů a lipidů (Broadley *et al.*, 2007). Atomy zinku stabilizují strukturu některých regulačních proteinů, transkripčních faktorů, a vytváří na nich tzv. motiv zinkových prstů. Touto strukturní jednotkou se regulační protein váže na specifické místo na DNA a umožňuje tím přepis daného místa do RNA (Coleman, 1992). Motiv zinkových prstů se kromě regulace transkripce uplatňuje i v interakcích mezi proteiny. Zinek tvoří nepostradatelnou součást ribozomů, jeho obsah v ribozomální RNA je 650 – 1280 $\mu\text{g/g}$ RNA. Při deficienci zinku dochází ke snížení obsahu v rRNA a k narušení celistvosti ribozomů (Marschner, 1995). Zinek ovlivňuje syntézu rostlinných hormonů, zvláště pak auxinů, a je proto nezbytný pro růst rostlin

(Cakmak *et al.*, 1989). Podílí se i na regulaci syntézy škrobu, obraně rostlin vůči nízkým teplotám a tvorbě kořenového systému.

1.4.1 Projevy deficitu zinku

Nároky jednotlivých druhů rostlin na zinek jsou rozdílné, citlivá na nedostatek tohoto prvku je například kukuřice. Normální obsah v pletivech se pohybuje od 20 do 100 ppm v sušině, při příjmu do 10 ppm rostlina vykazuje zjevné příznaky (Ryant *et al.*, 2006). Na nedostatku zinku v rostlinách se podílejí tři aspekty. Jednak nízký obsah zinku v půdě, dále vysoké pH půdy omezující dostupnost zinku pro rostliny nebo agrochemické zásahy, například hnojení za použití vyšších dávek fosforu (Adriano, 2001). Symptomy deficiencie jsou nejvíce viditelné na listech, a to zejména na mladých. Typickým projevem bývá chloróza mezi listovou žilnatinou, dále nekróza na okrajích a špičkách listů. Dochází ke zkrácení internodií a vytváření růžic s drobnými úzkými listy. Kvetení a větvení rostliny je redukováno. Při vyšším deficitu se rostliny projevují zakrněním růstu a pukáním stonku (Broadley *et al.*, 2007).

1.4.2 Projevy toxicity zinku

Nadbytek zinku v prostředí není tak častý jako jeho nedostatek. Vyskytuje se hlavně v oblastech zatížených průmyslovými emisemi nebo v okolí skládek. Jeho nadbytek se projevuje již při koncentracích nad 100 ppm v rostlině (Brown *et al.*, 1993). Prvním symptomem toxicity objevujícím se u většiny rostlinných druhů je chloróza mladých listů. V závislosti na množství zinku se tato chloróza může proměnit ve vytváření červenohnědých skvrn způsobených produkcí anthokyaninů v mladých listech. Rostliny mají většinou menší listy a může se na nich vyskytnout i nekróza, či dokonce mohou listy odumírat. Kořenový systém je postižen redukcí růstu hlavního kořene, redukcí počtu a zkrácením postranních kořenů a žloutnutím (Harmens *et al.*, 1993; Ren *et al.*, 1993). Vysoké koncentrace zinku v půdě působí depresivně na příjem fosforu, železa a manganu. Mechanismus toxicity zinku není kompletně prostudován. Pravděpodobně zahrnuje vazbu zinku na intracelulární ligandy a kompetici s ostatními ionty kovů při vazbě na aktivní místa enzymů a transportérů (Bashir *et al.*, 2012).

1.5 Působení kadmia na rostliny

Kadmium je spolu s některými dalšími těžkými kovy (např. Ag, Hg, Pb, Sb) považováno za neesenciální prvek. Doposud u něj nebyla zjištěna žádná funkce při vývoji a růstu rostlin. Naopak je pro eukaryotní organismy i mikroorganismy více či méně toxické (Sanità Di Toppi *et Gabbrielli*, 1999). U vyšších rostlin má kadmium negativní vliv na růst a vývoj vedoucí k zakrnění rostlin nebo dokonce jejich odumírání. V nízkých koncentracích je Cd běžnou součástí všech rostlinných tkání a hromadí se nejspíše v proteinové frakci rostlin (Ryant *et al.*, 2006). Za toxickou koncentraci neesenciálních těžkých kovů je považováno 3 až 10 mg/kg sušiny. Kadmium je rostlinou přijímáno ve formě kationtu Cd^{2+} z půdy nebo atmosféry, přičemž příjem z půdy převládá až při vysoké koncentraci kadmia v půdě a při kyselém pH (Ryant *et al.*, 2006).

Kadmium vykazuje třikrát vyšší afinitu k sulfhydrylovým skupinám proteinů než ionty mědi. Jeho vazba na proteiny a enzymy způsobuje špatné skládání těchto molekul, což vede k inhibici jejich aktivity nebo interferenci s jejich regulací. Další bodem podstaty jeho negativního efektu na rostliny je chemická podobnost mezi ionty Cd^{2+} a ionty Fe^{2+} a Zn^{2+} , které slouží jako kofaktory enzymů. Navázání Cd^{2+} na enzymy způsobuje akumulaci volných iontů zinku a železa, což může vést k oxidativnímu poškození buňky (Hall, 2002; Roth *et al.*, 2006; Schützendübel *et Polle*, 2002). I přes tato známá fakta není úplný mechanismus toxického účinku kadmia zatím zcela prostudován.

Reakce na zvýšenou koncentraci kadmia se liší u jednotlivých rostlinných druhů. Jsou známy geneticky resistantní druhy a hyperakumulátory, které umí účinky kadmia minimalizovat. Poškození rostlin je závislé i na době působení, koncentraci a vnějších podmínkách (Sanità Di Toppi *et al.*, 1999). Mezi rostliny citlivé na kadmium patří například špenát, sója a kořenová zelenina, odolné jsou pak brambory, tabák nebo kukuřice. Vegetativní části většinou akumulují vyšší množství Cd než semena a plody (Ryant *et al.*, 2006).

Nejvýraznějším symptomem rostlin rostoucích v toxických koncentracích kadmia je svinutí listů, jejich chloróza, narušení vodního režimu a uzavírání stomat (Clemens, 2006). Chloróza je způsobena narušením poměru iontů železa a zinku v buňkách v důsledku působení kadmia, což vede ke snížení syntézy chlorofylu (Chaffei *et al.*, 2004). Na řízení otevírání a uzavírání průduchů se podílí vápenaté ionty. Pokud

se tyto ionty hromadí ve svěracích buňkách průduchu, dojde k poklesu turgoru a k uzavření průduchu. Ionty Cd^{2+} jsou chemicky podobné vápenatým, proto mohou jejich činnost simulovat a vést tak k uzavření stomat nezávisle na obsahu vody v rostlině. Kadmium navíc inhibuje enzymy podílející se na fixaci CO_2 , což spolu s ostatními vlivy vede ke snížení intenzity fotosyntézy (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002).

Kadmium narušuje příjem vody rostlinou a metabolismus živin, například ovlivňuje příjem vápníku, hořčíku, draslíku a fosforu kořenovým systémem (Benavides *et al.*, 2005). Působení iontů Cd^{2+} významným způsobem narušuje metabolismus dusíku. Redukuje příjem dusičnanů kořeny a jejich transport z kořenů do nadzemní části rostliny. Navíc ovlivňuje aktivitu nitrátreduktázy a nitritreduktázy, což vede ke snížení asimilace dusičnanů v celé rostlině (Chaffei *et al.*, 2004; Sanità Di Toppi *et al.*, 1999).

Fenotypovým projevem intoxikace kadmiem je inhibice růstu kořene a tvorby velkého množství kořenového vlášení nebo může být kořen postižené rostliny silnější a poškození biomasy viditelnější v nadzemní části rostliny, což můžeme pozorovat například u rajčete (DalCorso *et al.*, 2008).

U některých rostlinných druhů, například u pšenice, indukuje kadmium vznik chromozomálních aberací a inhibici mitózy vedoucí k poškození buněčného cyklu a dělení (Benavides *et al.*, 2005). Díky podobnosti s ionty Zn^{2+} může inaktivovat transkripční faktory obsahující motiv zinkových prstů a v důsledku toho transkripci genů (Sanità Di Toppi *et al.*, 1999). Kadmium ovlivňuje aktivitu důležitých antioxidantů, katalázy a superoxid dismutázy, proto při intoxikaci dochází k nahromadění H_2O_2 a reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňkách (Romero-Puertas *et al.*, 2004). Hromadění ROS v buňce narušuje buněčnou signalizaci a tím reakci na biotický a abiotický stres (Sharma *et al.*, 1996; Thordal-Christensen *et al.*, 1997).

Skrze rostliny se kadmium dostává i do člověka, na kterého má rovněž velmi nepříznivý dopad. Kumuluje se především v ledvinách a z těla se vylučuje jen velmi pomalu a obtížně, což vede k chronické otravě. U mužů může být příčinou vzniku rakoviny prostaty, protože je chemicky podobné zinku, který se v prostatě přirozeně vyskytuje ve vysoké koncentraci a je zde při intoxikaci kadmiem nahrazován.

1.6 Příjem kovů rostlinou

Rostliny si kvůli svému přisedlému způsobu života vyvinuly mechanismy pro příjem látek nezbytných pro jejich život. Příjem těchto látek, ať už makronutrientů (C, H, O, N, P, K, Ca, Mg, S) i mikronutrientů (Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Cl), musí být v rovnováze s potřebami rostliny, aby nedocházelo k nadbytečné akumulaci prvků v rostlinách, a tím k jejich toxickému působení. Například měď zaujímá velmi důležitou roli oxidačního a redukčního činidla a je pro rostliny nepostradatelná. Ve vyšších koncentracích však působí toxicky narušením příjmu některých jiných prvků. Porozumění transportním mechanismům rostlin umožňuje využívat rostliny pro dekontaminaci půd procesem fytořemediace nebo využít tyto poznatky pro zlepšení výživy člověka (Salt *et al.*, 1998).

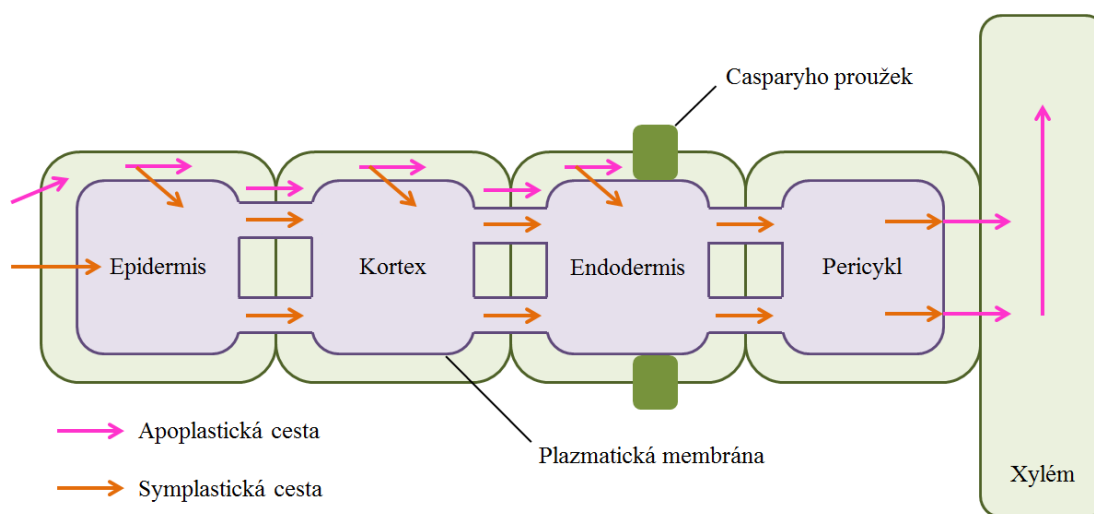
Příjem těžkých kovů rostlinami je komplexní proces zahrnující přenos kovů z půdního roztoku na povrch kořene a do kořenových buněk. Porozumění tomuto procesu je komplikované v důsledku neustálých změn probíhajících v rhizosféře. Pro rostliny jsou nejlépe dostupné kovy v podobě iontů v půdním roztoku. Pokud je iontů v půdním roztoku nedostatek, mohou rostliny vylučovat chelátory a měnit pH v rhizosféře, čímž si zajistí dostatečný příjem daného prvku (Fan *et al.*, 1997). Chelatované kovy jsou poté přeneseny přes plazmatickou membránu do buněk kořene s využitím specifických transportních mechanismů. Přítomnost elektrického náboje brání přímému vstupu kovů do buněk prostou difúzí (Lasat, 2002).

U vyšších rostlin existují dvě strategie příjmu kovů, které byly popsány na příjmu železa. První strategii využívají všechny krytosemenné rostliny kromě lipnicovitých. Spočívá v enzymatické redukci iontů Fe^{3+} vázaných v chelátech či komplexech na Fe^{2+} a příjem těchto volných iontů. Tento proces je nepříznivě ovlivňován vyšší hodnotou pH a přítomností uhličitánů v půdě (Kochian, 1993; Welch *et al.*, 1993). Druhou strategii využívají rostliny z čeledi lipnicovitých. Trávy vylučují fyto siderofory, které chelatují železo, a to je pak v podobě chelátu přeneseno do cytoplazmy kořenových buněk. Tato strategie příjmu je mnohem účinnější a není tolik závislá na pH půdy (Fan *et al.*, 1997; Kochian, 1993).

1.7 Transport kovů v rostlině

V závislosti na typu kovu a druhu rostlin tyto prvky vstupují do kořene apoplastickou nebo symplastickou cestou (viz Obr. 2). Apoplastická cesta skrze kořen je málo regulovaná, je propustná pro vodu a v ní rozpuštěné látky, které mohou prostupovat kořenem bez překročení membrány. Tento typ transportu je omezován vysokou kationtovou výměnnou kapacitou buněčné stěny. Casparyho proužky umístěné v buněčných stěnách buněk endodermis brání vstupu iontů kovů do xylému rostliny. Většina látek, které vstupují do xylému, tedy prochází symplastickou cestou, což znamená průchod skrze buňky a jejich membrány. Membránový potenciál u většiny rostlin se pohybuje v rozmezí -120 a -180 mV, což zajišťuje vysoký elektrochemický gradient pro pohyb iontů kovů. Většina kovů tedy vstupuje do kořenových buněk skrze specifické transportéry (Kochian, 1991; Welch, 1995).

Obr. 2: Průchod látek kořenem skrze apoplastickou a symplastickou cestu (upraveno podle Campbell *et* Reece 2005)



Rostliny ve svých genomech kódují celou řadu transportérů, které se liší z hlediska substrátové specifity a lokalizace v buňkách a tkáních. Obecně tyto transportéry můžeme rozdělit na dvě velké skupiny. Transportéry zprostředkovávající transport kovů směrem ven z cytoplazmy, ať už směrem ven z buňky skrze plazmatickou membránu nebo přes membrány do buněčných organel. Do této skupiny

patří rodina transportérů P_{1B} -ATPáz a rodina CDF transportérů. Druhou skupinu tvoří transportéry transportující kovy do cytoplazmy, konkrétně rodiny NRAMP a ZIP transportérů.

1.7.1 P_{1B} -ATPázy

P-typ ATPáz tvoří velkou skupinu transportérů podílejících se na transportu řady kationtů. Uplatňují se v transportu protonů, sodíku, draslíku, vápníku, hořčíku, dále sem spadají fosfolipidové flipázy a v neposlední řadě i přenašeče těžkých kovů označované jako P_{1B} -ATPázy. Na základě substrátové specifity jsou P-typ ATPázy členěny do pěti kategorií. Tyto transportéry využívají pro svou činnost energii uvolněnou při hydrolýze ATP. Označení P-typ pochází ze společného enzymatického mechanismu těchto transportérů, který zahrnuje tvorbu fosforylovaného meziprojektu. Rostlinné P-typ ATPázy jsou tvořené jednou podjednotkou, 8 až 12 transmembránovými segmenty, N a C koncem umístěným v cytoplazmě a velkou centrální cytoplazmatickou doménou, která obsahuje fosforylační a ATP-vazebné místo (Axelsen *et* Palmgren, 1998; Möller *et al.*, 1996).

P_{1B} -ATPázy bývají označovány i jako HMA transportéry, z anglického Heavy Metal transporting ATPases. Na základě fylogenetické analýzy byly HMA rozděleny do dvou skupin, z nichž jedna se podílí na transportu monovalentních kationtů Cu^+ a Ag^+ , druhá na přenosu bivalentních kationtů Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} a Pb^{2+} (Axelsen *et* Palmgren, 2001).

P_{1B} -ATPázy bývají označovány i jako CPx-ATPázy, a to z důvodu, že obsahují konzervovaný intramembránový motiv cystein-prolin-cystein, cystein-prolin-histidin nebo cystein-prolin-serin, tzv. CPx motiv. Tento motiv se podílí na přenosu kationtu kovu (Solioz *et* Vulpe, 1996). CPx-ATPázy mají obvykle krátkou C-terminální doménu a velmi dlouhou N-terminální doménu obsahující vazebné místo pro těžký kov, které je tvořeno 31 aminokyselinou a obsahující motiv GMTcxxX (Bull *et* Cox, 1994).

HMA se uplatňují v získávání dostatečného množství kovů potřebného pro činnost buněk, ale zároveň zabraňují toxické akumulaci kovů. Jejich činnost je řízena na transkripční a post-translační úrovni (Radisky *et* Kaplan, 1999).

1.7.2 CDF transportéry

CDF – kationtové difúzní přenašeče, z anglického Cation Diffusion Facilitators, jsou skupinou transportérů podílejících se na přenosu bivalentních kationtů, zejména Zn^{2+} , ale dále i Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} a Fe^{2+} (Cubillas *et al.*, 2014; Paulsen *et al.*, 1997). Jsou považovány za skupinu transportérů primárně přenášejících ionty směrem ven z buňky, nicméně někteří jejich zástupci přenášejí ionty i opačným směrem. Tyto proteiny vykazují vysoký stupeň sekvenční i velikostní variability. Vyskytují se v plazmatické membráně, ale i na intracelulárních membránách. Všechny CDF transportéry obsahují šest transmembránových domén (Paulsen *et al.*, 1997).

Doposud není příliš informací ohledně substrátové specifity CDF proteinů, nicméně na základě bioinformatických a funkčních studií se ukazuje, že CDF obsahují určitá místa, která ji kontrolují a ovlivňují. Tato kontrolní místa se pravděpodobně nachází v jedné ze šesti transmembránových domén a v intracelulární smyčce bohaté na histidin (Blindauer *et al.*, 2010; Kawachi *et al.*, 2008).

První CDF transportér byl charakterizován v *Arabidopsis thaliana*, byl pojmenován ZAT1 a později přejmenován na MTP1 (z anglického Metal Tolerance Protein 1). Jeho zvýšená exprese byla spojena s tolerancí *A. thaliana* vůči zinku. AtMTP1 je lokalizován v membránách vakuol v listech a kořenech rostliny a předpokládá se, že hraje roli ve vakuolární sekvestraci zinku (Delhaize *et al.*, 2003; van der Zaal *et al.*, 1999).

1.7.3 NRAMP transportéry

NRAMP transportéry jsou skupinou evolučně velmi konzervovaných proteinů vykazujících vysokou homologii napříč všemi živými organismy od bakterií až po savce a vyšší rostliny. Tato podobnost naznačuje, že mají NRAMP proteiny esenciální fyziologickou funkci. NRAMP transportéry se podílí na přenosu bivalentních kationtů, obzvláště Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} a Fe^{2+} (Fleming *et al.*, 1997; Govoni *et al.*, 1998; X. F. Liu *et al.*, 1997; Supek *et al.*, 1996).

Prvním objeveným NRAMP proteinem byl Nramp1 nacházející se v membránách endozomů a lyzozomů makrofágů u savců. Název NRAMP (z anglického Natural Resistance Associated Macrophage Proteins) byl odvozen od funkce proteinu Nramp1 (Govoni *et al.*, 1998).

Struktura NRAMP transportérů je silně konzervovaná. Sestává ze dvanácti transmembránových domén s charakteristickým transportním motivem mezi osmou a devátou doménou (Gunshin *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2000).

1.7.4 ZIP transportéry

ZIP transportéry získaly své označení podle prvních objevených zástupců, z anglického ZRT, IRT-like Protein. IRT1 (z anglického Iron-Regulated Transporter) byl poprvé identifikován v rostlinách *Arabidopsis thaliana*. Jeho role v transportu železa (Fe^{2+}) byla potvrzena naklonováním do kmene kvasinek deficientního v příjmu železa (Eide *et al.*, 1996). ZRT1 a ZRT2 (z anglického Znc-Regulated Transporter) jsou transportéry s vysokou, respektive nízkou afinitou k zinku objevené v *Saccharomyces cerevisiae* (Zhao *et al.*, 1996a, 1996b). Od té doby bylo identifikováno přes 85 zástupců ZIP rodiny transportérů, kteří byli rozděleni do čtyř podrodin vyskytujících se u prokaryot i eukaryot, přičemž všichni zástupci ZIP transportérů u vyšších rostlin spadají pravděpodobně do jedné skupiny (Mäser *et al.*, 2001).

Většina ZIP proteinů má osm transmembránových domén a C a N-terminální konec umístěný extracelulárně. Jejich velikost představuje 309 – 476 aminokyselin, přičemž rozdílná velikost je dána variabilní oblastí mezi třetí a čtvrtou doménou. Tato variabilní oblast je umístěna uvnitř buňky a obsahuje vazebnou doménu pro kov bohatou na histidin. Například transportér IRT1 obsahuje vazebný motiv HGHGHGHG (Eide *et al.*, 1996; Gueriot, 2000). Podobná doména bohatá na histidin je popsána i u CDF transportérů. Ve čtvrté transmembránové doméně ZIP proteinů se nachází vysoce konzervovaná oblast podílející se na transportu kovů. Záměnou některých aminokyselin za jiné byla heterologní exprese v kvasinkách potvrzena změna selektivity a substrátové specifity transportéru AtIRT1 (Rogers *et al.*, 2000).

ZIP proteiny se liší ve své substrátové specifitě. Představují nejdůležitější skupinu proteinů řídících příjem železa a zinku, ale někteří zástupci se podílí na transportu manganu a kadmia (Gueriot, 2000; Mäser *et al.*, 2001).

1.8 Detoxifikace těžkých kovů v rostlinách

Některé těžké kovy jsou důležitými mikroprvky uplatňujícími se během vývoje a růstu rostlin. Nicméně zvýšená koncentrace esenciálních i neesenciálních kovů je pro rostliny toxická a inhibuje růst rostliny. Toxicita většinou spočívá v narušení struktury nebo inhibici funkce proteinů v důsledku vazby těžkého kovu. Dále rostlina podléhá oxidativnímu stresu, jakožto důsledku tvorby volných radikálů a ROS vlivem zvýšeného množství kovů (Dietz *et al.*, 1999; Van Assche *et al.*, 1990).

Aby byly rostliny schopny čelit toxickému působení těžkých kovů, vyvinuly si mechanismy k udržení homeostázy. Tyto mechanismy jsou zaměřené spíše na prevenci výskytu zvýšeného množství kovů v citlivých oblastech buňky, než na tvorbu proteinů kompenzujících toxické působení kovu (Dietz *et al.*, 1999).

Pouze část přijatého množství kovových iontů se dostává do cytosolu, většina z nich je imobilizována v buněčných stěnách kořenových buněk. Tím je zabráněno transportu do nadzemních částí rostliny. Nadbytečné množství kovů může být navázáno do komplexů a uloženo ve vakuolách (tzv. vakuolární sekvestrace). Nezbytná je rovněž regulace transportu kovů přes membránu, ať už snížení jejich příjmu buňkami nebo stimulací exportu z cytosolu. Ionty kovů, které se dostanou do cytosolu jsou chelátovány za pomoci chelátorů, z nichž nejdůležitější jsou v případě těžkých kovů glutathion, fytochelatiny, metalothioneiny, histidin, nikotianamin a kyselina jablečná a citronová (Hall, 2002). Důležitá je též role půdních mikroorganismů v okolí kořenového systému. Tyto mikroorganismy mohou ovlivňovat dostupnost těžkých kovů změnou pH půdy (okyselováním), změnou redoxního potenciálu nebo uvolňováním chelatuujících látek (Smith *et al.*, 2008).

1.8.1 Role buněčné stěny a kořenových exudátů

Schopnost buněčné stěny vázat ionty těžkých kovů a potažmo její uplatnění v toleranci rostlin vůči toxickým prvkům je poměrně kontroverzní otázkou. O tomto tématu není zatím příliš známo. Přestože je buněčná stěna kořenových buněk v přímém kontaktu s kovy obsaženými v půdním roztoku, musí mít omezenou vazebnou kapacitu a tedy její role v toleranci rostlin vůči kovům je malá (Ernst *et al.*, 1992). Nicméně u *Silene vulgaris* spp. *humilis* byla zjištěna akumulace Fe, Ni, Cu, Al, Sn a Zn

v buněčných stěnách epidermálních buněk. Tyto prvky byly pevně navázány na proteiny (Cu) nebo se zde nacházely ve formě silikátů (Zn a Sn) (Bringezu *et al.*, 1999).

Rostliny vylučují svými kořeny tzv. kořenové exudáty. Složení exudátů je závislé na druhu rostliny a jejích životních podmínkách. Jejich exkrece se zvyšuje při stresu a snižuje s věkem rostliny. Exudáty mohou měnit pH v rhizosféře, chelatovat a komplexovat rizikové prvky a tím ovlivňovat příjem esenciálních prvků rostlinou (Yuan-Wen *et al.*, 2003). Dále se mohou podílet na toleranci rostlin vůči toxickým prvkům. Příkladem jsou hlinité kationty, které jsou toxické pro mnoho rostlin rostoucích v kyselých půdách. Některé rostliny si vytvořily mechanismus, který jim umožňuje růst i v přítomnosti Al^{3+} . Uvolňováním jedné nebo více organických kyselin z kořenů dochází ke stabilní komplexaci Al^{3+} iontů a tím pádem nedochází k jejich toxickému působení na rostlinu. Tento mechanismus byl popsán u několika rostlin včetně *Triticum aestivum* (Ma *et al.*, 2001).

1.8.2 Vakuolární sekvestrace

Vakuolární sekvestrace, tedy ukládání volných kovových iontů ve vakuolách, je spolu se zvýšeným vylučováním kovů z buňky přes plazmatickou membránu mechanismem ke snížení množství toxických prvků v cytosolu. Na základě výsledků studií lze soudit, že je vakuolární sekvestrace důležitým mechanismem uplatňujícím se v toleranci rostlin vůči těžkým kovům.

Finálním krokem detoxifikace kadmia zahrnuje přenos navázaných iontů Cd^{2+} na fytochelatiny skrze Cd/H^+ antiportery a ATP-dependentní ABC transportéry umístěné v tonoplastu (Salt *et Rauser*, 1995; Salt *et Wagner*, 1993). Dále je tímto způsobem detoxifikován zinek a molybden. Ječmen pěstovaný v prostředí se zvýšenou koncentrací zinku, kadmia, molybdenu a niklu vykazoval akumulaci kadmia, zinku a molybdenu ve vakuolách, zatímco nikl byl ve vyšší koncentraci nalezen v cytosolu (Brune *et Dietz*, 1995). Akumulace zinku ve vakuolách byla prokázána i u *Silene vulgaris*. Vakuoly extrahované z kořenů tolerantních rostlin obsahovaly 2,5x více zinku než vakuoly citlivých rostlin. Tento fakt potvrzuje důležitost role vakuolární sekvestrace v toleranci rostlin vůči těžkým kovům (Verkleij *et al.*, 1998).

1.8.3 Heat shock proteiny

Heat shock proteiny (HSPs) fungují jako molekulární chaperony, podílejí se na sbalování (folding) jiných proteinů, jejich agregaci do funkčních celků, dále na jejich translokaci a řízené degradaci. Jsou klíčové pro zachování funkční konformace proteinů, a proto se uplatňují při abiotickém stresu. HSPs jsou exprimovány u všech živých organismů při působení zvýšené teploty prostředí, ale i při jiných typech abiotického stresu, např. při působení těžkých kovů (Vierling, 1991).

Při studiu vlivu kadmia na buněčnou kulturu *Lycopersicon peruvianum* byl lokalizován protein HSP70 v buněčném jádře, cytoplazmě, ale i v plazmatické membráně, což nasvědčuje. HSP70 tedy pravděpodobně hraje roli při ochraně buněčných membrán při toxickém působení kadmia (Neumann *et al.*, 1994). Těžké kovy mohou interferovat s procesem fotosyntézy. Při studiu *Zea mays* byla zjištěna zvýšení exprese malých HSPs v chloroplastech při působení mědi, niklu, olova a zinku. Lze konstatovat, že malé HSPs ochraňují funkci chloroplastů (Heckathorn *et al.*, 2004).

1.8.4 Fytochelatiny

Fytochelatiny (PC) jsou vysoce afinitní ligandy uplatňující se především při detoxifikaci kadmia. PC se zapojují do metabolismu síry a mohou fungovat i jako antioxidanty. Jedná se o peptidy s obecnou strukturou $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-X}$ ($n = 2\text{--}11$, X je Gly, Ser, β -Ala, Glu, Gln). Fytochelatiny vznikají z glutathionu působením fytochelatin syntázy, která je aktivována přítomností kovových iontů (C. S. Cobbett, 2000; Kotrba *et al.*, 2009).

Fytochelatiny jsou nejčastěji studovány v souvislosti s kadmiem. Cd^{2+} ionty jsou navázány na PC skrze thiolové skupiny cysteinu. Komplexy PC-Cd jsou poté sekvestrovány ve vakuolách (viz výše). Zda se PC účastní detoxifikace i jiných kovů není zatím zcela zřejmé, nicméně při *in vivo* pokusech PC vytvářely komplexy s ionty Cd^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , As^{3+} a Pb^{2+} (C. S. Cobbett, 2000).

Na základě molekulové hmotnosti rozdělujeme komplexy PC-Cd na vysokomolekulární (HMW z anglického High Molecular Weight) a nízkomolekulární (LMW z anglického Low Molecular Weight). Komplexy PC-Cd obsahují sulfidové anionty, přičemž HMW komplexy mají vyšší poměr $\text{S}^{2-}:\text{Cd}^{2+}$ než LMW. Díky tomu vznikají částice tvořené sulfidem kademnatým obaleným fytochelatiny. Zabudování

CdS do HMW komplexů zvyšuje množství Cd^{2+} iontů vázaných na molekulu a stabilitu celého komplexu (C. S. Cobbett, 2000).

1.8.5 Metalothioneiny

Vyšší rostliny obsahují dva typy na cystein bohaté proteiny, které se uplatňují v detoxifikaci těžkých kovů. První jsou výše zmíněné fytochelatiny a druhou velkou skupinu tvoří metalothioneiny (MT). Jedná se o polypeptidy s velikostí 5-10 kDa, které váží kovy skrze velké množství thiolových skupin. MT většinou obsahují dvě domény bohaté na cystein s vazebným místem pro kov, což dává těmto polypeptidům konformaci činky. Stejně jako fytochelatiny se vyskytují v rostlinách, ale navíc i v bakteriích, houbách a živočiších (Cobbett *et* Goldsbrough 2002).

U živočichů se metalothioneiny uplatňují v ochraně před kadmíem, ale u rostlin tuto funkci plní fytochelatiny (Klaassen *et al.*, 1999). U rostlin jsou MT pravděpodobně zapojeny do tolerance vůči mědi a do udržování homeostázy. Pro tuto hypotézu existuje několik důkazů. Některé rostlinné MT jsou schopny vázat měďnaté ionty, exprese některých MT je indukována přítomností mědi, exprese metalothioneinů ve stárnoucích listech je koordinována s geny zapojenými do homeostázy mědi (Murphy *et* Taiz, 1995).

Ve vztahu k mědi byly metalothioneiny studovány například u *Silene vulgaris*. U rostlin z populace tolerantní vůči mědi byla zjištěna vyšší úroveň transkripce genu SvMT2b než u rostlin z populace citlivé na měď. Rozdílná úroveň transkripce se týkala nadzemní i podzemní části rostlin, a to jak po předchozím působení mědi na rostliny, tak i bez něj (van Hoof *et al.*, 2001). Zvýšená exprese genu MT2 úzce korelovala s tolerancí k mědi i u deseti ekotypů *Arabidopsis thaliana*, zatímco exprese genu MT1 byla u všech studovaných rostlin konstantní (Murphy *et al.*, 1995).

1.8.6 Organické kyseliny

Úloha malátu a citrátu jakožto chelátorů těžkých kovů je stále diskutovaná a není zatím příliš jasná. Nicméně hyperakumulátorech těžkých kovů byly opakovaně zjištěny vyšší koncentrace organických kyselin (Montargès-Pelletier *et al.*, 2008; Ueno *et al.*, 2005). V experimentu s různými ekotypy *Silene vulgaris* bylo zjištěno 4-7x vyšší

množství malátu v listech u rostlin tolerantních vůči zinku v porovnání s rostlinami citlivými (Mathys, 1977). Role těchto látek v detoxifikačních mechanismech je pravděpodobně spojena s vakuolární sekvestrací a tvorbou komplexů kov-organická kyselina (Haydon *et al.*, 2007).

1.8.7 Histidin

Histidin je pravděpodobně nejdůležitější aminokyselinový ligand podílející se na detoxifikaci kovů. Vytváří komplexy s niklem, zinkem a kadmíem v kořenových buňkách hyperakumulátorů *Thlaspi goesingense* (Persans *et al.*, 1999). U hyperakumulátoru niklu, *Alyssum lesbiacum*, došlo po působení niklu ke zvýšení množství histidinu v xylému (Krämer *et al.*, 1996). Hyperakumulace niklu v souvislosti s histidinem byla pozorována i u *Thlaspi caerulescens* (Assuncao *et al.*, 2003).

1.8.8 Nikotianamin

Nikotianamin (NA) je aminokyselina, která je syntetizovaná ve všech rostlinách za účasti nikotianamin syntázy. NA vytváří komplexy s většinou přechodných kovů a podílí se na jejich transportu z kořenů do nadzemní části rostliny (Verbruggen *et al.*, 2009).

Nikotianamin je pravděpodobně zapojen v hyperakumulaci kovů u *Arabidopsis halleri* a *T. caerulescens*, u kterých byla prokázána zvýšená transkripce NA-syntázy (Talke *et al.*, 2006). Výsledky studie *T. caerulescens* ukazují, že NA je zapojený v hyperakumulaci niklu, ale ne železa. Pomocí LC-MS metody bylo v listech stanoveno zvýšené množství NA po expozici niklu (Callahan *et al.*, 2007).

1.8.9 Glutathion

Glutathion patří mezi nejdůležitější buněčné antioxidanty. Funguje jako chelátor těžkých kovů a je prekurzorem fytochelatinů. Role glutathionu v detoxifikaci kovů pravděpodobně souvisí s jeho antioxidační aktivitou. U *Thlaspi goesingense* a dalších hyperakumulátorů niklu z tohoto rodu poskytuje glutathion ochranu proti oxidativnímu stresu v důsledku zvýšené koncentrace niklu (Freeman *et al.*, 2004).

1.9 Studium změny genové exprese

Jednou z možností, jak sledovat odezvu rostlin na působení těžkých kovů, je studium genové exprese. Exprese genů je komplexní proces, během kterého dochází k přeměně genetické informace uložené ve formě DNA do konečného produktu, ribonukleové kyseliny (rRNA, tRNA) či proteinu. Jedná se o přísně regulovaný proces, který je na všech svých úrovních ovlivněn působením prostředí, v němž se daný organismus vyskytuje. Vlivem prostředí může docházet k urychlení, zpomalení nebo zastavení genové exprese.

Původní metody studia exprese genů byly zaměřené na sledování přítomnosti určité RNA molekuly či proteinu v buňce. Nyní existuje celá řada metod, které jsou schopny detekovat expresi obrovského množství genů najednou. Exprese může být studována na různých úrovních, na úrovni RNA (tzv. transkriptomika) nebo na úrovni proteinů (tzv. proteomika).

Metody genové exprese na úrovni RNA jsou zaměřené na studium transkriptu, přičemž sledujeme transkripční aktivitu určitého genu nebo množství určitého transkriptu v daném čase. Množství transkriptu nekoreluje přímo s transkripční aktivitou daného genu, ale je ovlivněno i stabilitou tohoto transkriptu. Ani množství konečného produktu – proteinu není přímo úměrné množství mRNA, účinnost translace totiž kolísá.

1.9.1 Metody založené na hybridizaci

Nejstarší metody studia exprese genů jsou metody založené schopnosti mRNA hybridizovat se značenými sondami. Reakce se provádí na nosiči obsahujícím polynukleotidová vlákna mRNA. K této mRNA se přidává sonda, která v případě komplementarity s mRNA hybridizuje. Aby byla reakce viditelná, jsou sondy značené, ať už radioaktivně, fluorescenčně nebo nepřímo pomocí haptenu. Metody založené na hybridizaci umožňují relativní kvantifikaci transkriptu a provádějí se na filtrech, na membránách, v gelu, v roztoku, na čípech nebo *in situ* na mikroskopických preparátech.

- **Northern blot**

Název této metody je slovní hříčkou. Jedná se o metodu, která je obdobou tzv. Southern blotu, který byl pojmenován podle svého objevitele, Edwina

Southerna, a využívá se při studiu DNA (Southern, 1975). Metoda northern blot byla vyvinuta v roce 1977 na Stanfordově Univerzitě.

Celková RNA izolovaná ze studované tkáně či pletiva je separována gelovou elektroforézou. Velikostně rozdělený vzorek je poté přenesen na nylonovou membránu, kde dochází k hybridizaci se sondou a vizualizaci detekce (Alwine *et al.*, 1977). Před elektroforetickou separací je často RNA ještě štěpena restriční endonukleázou. Výsledkem je informace o přítomnosti transkriptu, jeho velikosti a relativním množství. Stanovení úrovně exprese se provádí k referenční hybridizační sondě.

- **cDNA microarray**

První cDNA microarray byla vytvořena v roce 1995 a představuje miniaturizaci hybridizačních metod. Microarray umožňuje kvantifikovat expresi tisíců genů najednou (Schen *et al.*, 1996). Principem je kovalentní navázání sond na skleněnou mikrotitrační destičku (tzv. microarray) potaženou poly-L-lysinem. Tyto sondy pak hybridizují s cílovými molekulami cDNA nebo mRNA. Označené jsou v tomto případě cílové molekuly a měří se intenzita fluorescenčního signálu, která je úměrná množství transkriptu ve vzorku.

Pro analýzu se využívá porovnání intenzity signálu molekul kontrolního a testovaného vzorku, kdy je kontrolní a testovaný vzorek značen jinou fluorescenční barvou. Druhou možností je stanovení relativního množství transkriptu vzhledem k ostatním transkriptům z daného vzorku.

1.9.2 Metody založené na PCR

Polymerázová řetězová reakce byla vynalezena v roce 1985 Kary Mullisem a díky ní zažila v následujících letech molekulární biologie obrovský rozvoj. Je založena na amplifikaci DNA v cyklicky se opakující syntéze komplementárních řetězců ve směru 5'→3' za účasti termostabilní DNA polymerázy. Templátem pro PCR reakci nemůže být RNA, proto je potřeba při studiu exprese genů mRNA přepsat. Mediátorová RNA se z celkové RNA izolované z daného organismu přepisuje za účasti reverzní transkriptázy a oligo(dT)-primerů, které nasedají na poly(A)-konce mRNA. Teprve poté je možno provést amplifikační reakci.

- **Real-time PCR**

Historie real-time PCR sahá do roku 1991, kdy byla poprvé provedena kinetická PCR, předchůdce real-time PCR, za využití ethidium bromidu, díky kterému došlo k vizualizaci amplifikovaných molekul (Higuchi *et al.*, 1992). Později bylo prokázáno, že lze pro tuto aplikaci využít 3'→5' exonukleázovou aktivitu DNA polymerázy.

Metoda real-time PCR umožňuje amplifikaci templátu a zároveň kvantifikaci amplikonů v reálném čase. K detekci amplikonů využívá interkalační fluorescenční barviva nebo specifické sondy.

Real-time PCR umožňuje relativní i absolutní stanovení množství transkriptu a použití částečně degradované RNA, protože dochází k tvorbě malých amplikonů (50 - 150 bp). Nicméně lze při ní analyzovat pouze několik málo transkriptů najednou a je velmi ovlivněna odchylkou při pipetování a variabilní účinností reakce.

1.9.3 Sériová analýza genové exprese

Sériová analýza genové exprese (tzv. SAGE, Serial Analysis of Gene Expression) je spolehlivá metoda sloužící k určení absolutního množství tisíců transkriptů najednou (Velculescu *et al.*, 1995). Pro každý gen se odvodí tzv. visačka (tag) dlouhá 15 bp, která obsahuje dostatečnou informaci pro identifikaci unikátního transkriptu. Tyto visačky se poté spojí do konkatemeru, který je sekvenován (v jedné sekvenační reakci se sekvenuje až 50 tagů). V současnosti se SAGE používá ve spojení se sekvenačními technologiemi nové generace, kdy jsou sekvenovány jednotlivé tagy a nevyužívá se jejich spojení do konkatemerů.

1.9.4 Sekvenování RNA

Sekvenování RNA (RNA-seq) umožňuje analyzovat expresi kódující i nekódující RNA v genomu s využitím sekvenačních metod nové generace (tzv. NGS, Next Generation Sequencing). Původně bylo sekvenování RNA alternativou k cDNA mikroatrayím, sloužilo k základnímu porovnávání exprese vybraných oblastí genomu v daném čase. Avšak ukázalo se, že využití RNA-seq je oproti cDNA mikroatrayím výhodnější. Vykazuje mnohem nižší úroveň falešné positivity u nízko exprimovaných

transkriptů, má vyšší rozlišení, vysoký dynamický rozsah detekce úrovně exprese a v konečném měřítku je i levnější (Nookaew *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2009).

Díky tomu, že metody sekvenování RNA nevyužívají cDNA sondy, mají uplatnění i v mnohých dalších aplikacích. Umožňují detekovat a kvantifikovat nekódující sekvence, analyzovat transkripční izoformy, studovat neznámé transkripty nebo místa interakcí RNA a proteinů a v neposlední řadě sledovat změny genové exprese na úrovni mRNA. Díky RNA-seq lze analyzovat celý transkriptom za použití pouze malého množství vstupního materiálu. Jedná se o velmi citlivou a reprodukovatelnou metodu, která umožňuje přesnou lokalizaci a kvantifikaci jednotlivých transkriptů. RNA-seq není závislé na předchozí znalosti genů daného organismu, proto nachází využití i při studiu nemodelových organismů. Nicméně i tato metoda má své limity. Tím je především velikost transkriptů, kdy jsou větší transkripty detekovány mnohem snadněji než malé, a proto mohou malé transkripty vykazovat zdánlivě nižší expresi. Výzvou je také tvorba statistických programů, které musí zpracovat, ověřit a uchovat obrovská množství získaných dat produkovaných RNA sekvenováním (Howald *et al.*, 2012; Tarazona *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009).

1.9.4.1 Příprava RNA na sekvenaci

Prvním krokem přípravy RNA k sekvenování je její izolace z biologického vzorku. V současné době jsou za tímto účelem nejvíc používány silikagelové membrány, na které se váže extrahovaná RNA, zatímco ostatní buněčné komponenty, hlavně DNA a proteiny, jsou ze vzorku odstraněny. Aby se zamezilo kontaminacím izolované RNA deoxyribonukleovou kyselinou, tím i ovlivnění výsledku experimentu, bývá v průběhu extrakce použita DNáza. Výsledek RNA-seq analýzy je ovlivněn i kvalitou izolované RNA, která je mnohem méně stabilní než DNA a snadno degraduje. Integritu RNA je nutno ověřit, například elektroforetickou separací v agarózovém gelu. V případě nedegradované eukaryotní RNA jsou výsledkem dva jasné proužky reprezentující 28S a 18S rRNA (příčemž poměr jejich intenzity je 2:1). Jinou možností je stanovení tzv. RNA Integrity Number (RIN) pomocí Bioanalyzáru Agilent (Dündar *et al.*, 2015).

1.9.4.2 Tvorba knihovny

Příprava knihovny představuje převedení buněčné RNA na molekuly, které mohou být sekvenovány. Knihovna je připravována a sekvenována na základě specifického protokolu zvoleného dle typu experimentu a RNA použité pro analýzu. Způsob přípravy knihovny ovlivňuje výsledek sekvenace z hlediska jeho kvality a pokrytí (Dündar *et al.*, 2015).

Extrahovaná RNA obsahuje zhruba 80-85 % rRNA, 10-15 % tRNA a pouze malé množství mRNA, která je většinou předmětem studia. Sekvenování celkové buněčné RNA by bylo zbytečně náročné, drahé a negativně by ovlivnilo detekci slabě exprimovaných oblastí genomu. Z tohoto důvodu bývá rRNA enzymaticky degradována nebo je mRNA amplifikována pomocí oligo(dT) primerů. Díky tomu jsou i vzácné transkripty sekvenovány do odpovídající hloubky (Dündar *et al.*, 2015; Yi *et al.*, 2011).

Délka čtení je u NGS metod relativně krátká, proto je nutno RNA před sekvenací naštípat na fragmenty o délce cca 150 – 300 bp. Bez fragmentace lze sekvenovat pouze malé RNA molekuly, jako jsou miRNA (microRNA), piRNA (Piwi-interacting RNA), siRNA (short interfering RNA) a další. Štípání velkých RNA se provádí například hydrolýzou či nebulizací RNA nebo sonikací či použitím DNázy I v případě, že štípeme již přepsanou cDNA. Každá fragmentační metoda ovlivňuje výsledek experimentů a musí být vhodně zvolena pro konkrétní typ studie (Goodwin *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2009).

Fragmentovaná RNA je přepsána reverzní transkriptázou do komplementární DNA (cDNA). Před reverzní transkripcí a PCR amplifikací mohou být na 3' a 5' konce připojeny specifické adaptory umožňující následnou identifikaci orientace původního vlákna RNA. Na konce vzniklých cDNA fragmentů jsou připojeny adaptory, které obsahují funkční elementy nezbytné pro sekvenování (např. místo počátku sekvenace nebo amplifikační elementy).

1.9.4.3 Sekvenování

Sekvenování cDNA knihovny, může být prováděno dvěma základními přístupy, v obou případech se jedná o masivně paralelní sekvenování:

- a) Sekvenování založené na ligaci (např. platforma SOLiD): Na 3' a 5' konce jednotlivých fragmentů jsou navázány adaptory. Skrze 5' konec fragmenty hybridizují na kuličky, na kterých dochází k amplifikaci knihovny. Kuličky

s amplifikovanými fragmenty jsou kovalentně navázány na sekvenační destičku, kde probíhá sekvenace. Na jedné destičce může být sekvenováno až 8 vzorků. Najednou může být v sekvenátoru analyzováno až 256 vzorků. Sekvenace je prováděna na základě hybridizace čtyř typů fluorescenčně značených sond na templát. Po detekci fluorescenčního signálu dochází k odštěpení fluoroforu, nasednutí další sondy, ligaci nově vznikajícího vlákna a celý proces se opakuje (Goodwin *et al.*, 2016; Tomkinson *et al.*, 2006).

Platforma SOLiD vykazuje velmi vysokou přesnost sekvenování (až 99,99 %), protože používá několikanásobné sekvenování každé jednotlivé báze. I přes vysokou přesnost vykazuje tato platforma zvýšenou chybovost v oblastech bohatých na adenin/thymin a cytosin/guanin. Problematické je čtení v palindromických oblastech, které mohou vytvářet smyčku templátu a bránit tak nasednutí sondy. Největším problémem je ale velmi krátká délka čtení (pouhých 75 bp), což je limitujícím faktorem pro použití při rozsáhlejších studiích (Harismendy *et al.*, 2009; L. Liu *et al.*, 2012).

- b) Sekvenování založené na syntéze (např. platforma Illumina): Na oba konce fragmentů jsou navázány adaptory. Fragmenty hybridizují skrze adaptory na sekvenační destičku, kde dochází k amplifikaci fragmentů a vytvoření tzv. klastrů. Tvorba klastrů je nezbytná pro získání dostatečně silného signálu při sekvenaci. Vlastní sekvenování probíhá na základě nasedání fluorescenčně značených nukleotidů na templát. Každý nukleotid je na svém 3' konci upraven tak, aby nedošlo k nasednutí více nukleotidů najednou. Teprve po detekci signálu je 3' konec enzymaticky uvolněn a syntéza nově vznikajícího vlákna může pokračovat.

Illumina nabízí ve svém portfoliu různé typy sekvenátorů vhodné pro sekvenování malých genomů (Illumina MiSeq), ale i pro velké populační studie (Illumina HiSeq). Délka čtení je u této platformy možná do 300 bp a jeho přesnost se pohybuje kolem 99,5 %, přičemž problémovými jsou opět oblasti bohaté na adenin/thymin a cytosin/guanin. Rovněž může docházet k náhodným chybám při čtení. Illumina nachází své uplatnění při sekvenování celých genomů, epigenetických studiích, v transkriptomice a mnohých dalších analýzách. Díky své výkonnosti, kapacitě a ceně jsou

v současnosti Illumina sekvenátory jedny z nejvíce využívaných sekvenátorů vůbec (Goodwin *et al.*, 2016; Ju *et al.*, 2006).

Výrobci sekvenátorů nabízí široké spektrum přístrojů lišící se svou výkonností, délkou čtení (tzv. readů), počtem readů, rychlostí analýzy a samozřejmě i pořizovací a provozní cenou. Stejně jako výběr vhodné sekvenační platformy pro danou analýzu, je důležité i stanovení počtu readů, které se odhaduje na základě typu experimentu, velikosti transkriptomu a zohledňuje i chybovost zvolené platformy. Například, chceme-li zachytit vzácně exprimované transkripty nebo detekovat drobné nuance transkriptomu v různých podmínkách, musíme volit vyšší počet readů (Dündar *et al.*, 2015). Při studiu změn genové exprese je však důležitější zvýšit počet biologických replikátů spíše než zvýšit počet readů jednotlivých vzorků (Rapaport *et al.*, 2013).

Sekvenování RNA může být prováděno z jednoho či obou konců fragmentů. Párové čtení je sice dražší variantou, protože produkuje dvojnásobný počet readů, ale je vhodné pro použití v repetitivních oblastech a umožňuje snazší identifikaci různých variant jednotlivých transkriptů. Sekvenování z jednoho konce je levnější a rychlejší a používá se obvykle pro organismy se známou referenční sekvencí (Dündar *et al.*, 2015).

Většina experimentů využívajících RNA-seq je zaměřena na studium změny exprese vlivem určitých podmínek. To znamená, že v tomto typu analýz zjišťujeme, zda každý daný transkript změnil za daných podmínek svoji expresi. Exprese genů je však ovlivněna nejrůznějšími faktory, například pohlavím, teplotou, časem. Abychom rozlišili změny transkripce způsobené podmínkami, které jsou předmětem našeho zájmu, od variace mezi jednotlivými studovanými organismy, buňkami a podobně, musíme do experimentu zahrnout dostatečný počet replikátů, ať už technických či biologických. Technickým replikátem se rozumí opakované měření jednoho vzorku. V případě RNA-seq ENCODE konsorcium definovalo technické replikáty jako různé knihovny připravené z jednoho vzorku RNA. Tyto replikáty je rovněž vhodné sekvenovat v různých řadách sekvenační destičky, aby se předešlo zanesení případné chyby způsobené např. při amplifikaci templátu nebo rozdílnou účinností sekvenace v jednotlivých řadách. Ohledně definice biologických replikátů se stále vede diskuze, nicméně obecně přijímané stanovisko definuje biologické replikáty jako paralelní měření biologicky odlišných vzorků, která zachycují náhodnou biologickou variaci. V případě RNA-seq experimentů jsou biologickými replikáty vzorky RNA pocházející

z různých organismů či buněčných linií. Diskutabilní je i počet replikátů. V současnosti většina publikovaných RNA-seq studií využívá tři biologické replikáty. V závislosti na typu experimentu je však doporučováno šest nebo dvanáct replikátů (Dündar *et al.*, 2015; ENCODE, 2011; Schurch *et al.*, 2016).

1.9.4.4 Analýza sekvenačních dat

Díky rozvoji sekvenačních technologií nové generace, jsou produkována enormní kvanta dat, která je potřeba správně zpracovat a vyhodnotit. Výsledkem sekvenace v jedné řadě sekvenační destičky sekvenátoru HiSeq (Illumina) je až 50 GB dat. Tato data musí být správně poskládána do jednotlivých transkriptů a kvantifikována, teprve potom nám pomohou zodpovědět položenou biologickou otázku.

Data bývají nejčastěji produkována ve formátu FASTQ, který obsahuje ID číslo pro každé jednotlivé čtení, přečtenou sekvenci a skóre kvality daného čtení. Prvním krokem při zpracování dat je odstranění artefaktů (např. sekvence ligačních adaptérů apod.) a chybových čtení, která jsou odstraněna nebo opravena v závislosti na jejich skóre kvality. Poté jsou data mapována na referenční genom a vyhodnocena pomocí softwarových nástrojů s ohledem na použitou sekvenační platformu a konkrétní aplikaci dat. I přesto, že jsou metody RNA-seq na velmi vysoké úrovni, získaná data je nezbytné zpětně experimentálně ověřit, např. pomocí kvantitativní PCR se strategicky vybranými primery nebo cílenou sekvenací RNA (Chu *et al.*, 2012; Oszolák *et al.*, 2011).

1.10 Kvasinky, nástroj pro funkční analýzu genů

Po velkém rozmachu celogenomového sekvenování, kdy máme k dispozici značné množství dat, se nacházíme v době, kdy se snažíme objasnit biologický význam jednotlivých genomových produktů. V tomto nám jsou významně nápomocny kvasinky.

Kvasinky jsou skupina mikroorganismů, které patří mezi houby. Většina kvasinek se řadí mezi ascomycety (vřeckovýtrusné houby), některé mezi bazidiomycety (stopkovýtrusné houby), proto netvoří jednotnou taxonomickou skupinu. Vyskytují se především v jednobuněčné podobě, ale mohou tvořit hyfální či pseudohyfální útvary. Nevytvářejí plodnice, množí se především nepohlavně, takzvaným pučením. Kvasinky jsou nejjednodušší existující eukaryota, která sdílí s vyššími organismy všechny základní buněčné systémy, proto jsou vhodným modelovým objektem pro studium dějů probíhajících v eukaryotních buňkách. Mnohé z nich mají nezastupitelnou roli v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.

Saccharomyces cerevisiae je velmi důležitým modelovým organismem, a to z několika důvodů. Byla prvním eukaryotem, jehož genom byl rozluštěn. Genom *Saccharomyces cerevisiae* tvoří 16 chromozomů, kóduje přes 6200 genů a obsahuje malé množství nekódující DNA (Goffeau *et al.*, 1996). Obsahuje plazmid, který se v eukaryotních buňkách vyskytuje zřídka, a který se stal základem pro konstrukci řady plazmidových vektorů. Má krátkou generační dobu, snadno se kultivuje, díky homologní rekombinaci je dobře geneticky manipulovatelná a může se vyskytovat v haploidním i diploidním stavu. Její haploidní podoba usnadňuje tvorbu delečních kmenů. Existuje kompletní sbírka mutantních kmenů kvasinek, z nichž každý nese definovanou delecí v jednom z 5998 kódujících genů *Saccharomyces cerevisiae* (Winzeler *et al.*, 1999). Pomocí těchto delečních mutantů lze na základě komplementačních testů provádět funkční analýzu jednotlivých genů. V případě, že je studovaný gen funkčním homologem poškozeného genu kvasinkového mutantu, nahradí funkci poškozeného genu, což povede k obnovení funkce původního genu. Pakliže exprese heterologního genu v kvasinkách provází změna fenotypu, můžeme využít látky ovlivňující funkci proteinu, modulace funkce studovaného proteinu se totiž projeví na fenotypu kvasinky.

1.11 Detekce replikace DNA

Detekce replikace DNA je jednou ze základních metod pro hodnocení reakce buněk na působení abiotického stresu. Dříve byla za tímto účelem používána inkorporace thymidinu značeného tritiem a následná detekce autoradiografií. Pro zvýšení bezpečnosti byla metoda využívající radioaktivitu nahrazena inkorporací bromdeoxyuridinu (BrdU) s následnou imunodetekcí. Ovšem tato metoda zahrnuje denaturaci DNA či štěpení kyselinou chlorovodíkovou, což může vést ke změně morfologie vzorku. Tato metoda navíc není příliš vhodná pro rostlinné buňky, protože vyžaduje částečné naštěpení buněčné stěny, v důsledku čehož dochází k osmotickému stresu buněk a aktivaci stresové reakce buňky. (Taylor *et al.*, 1957; Gratzner, 1982; Stroobants *et al.*, 1990, Goodbody *et al.*, 1994).

Jako alternativa k BrdU se využívá 5-ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU), což je rovněž analog thymidinu, který je do DNA inkorporován v průběhu replikace, avšak k jeho detekci se používá „klik“ reakce. Jedná se o mědi katalyzovanou cykloadici, kdy koncová alkynová skupina EdU reaguje s fluorescenčně značeným azidem za vzniku stabilní kovalentní vazby (Tornøe *et al.*, 2002). Metoda využívající EdU je rychlá a velmi citlivá, ovšem během dlouhé inkubace se vzorkem může způsobit usmrcení testovaných buněk (Kohlmeier *et al.*, 2013). Signál inkorporovaného EdU je měřen průtokovou cytometrií. Při průchodu jednotlivých buněk kapilárou průtokového cytometru a ozáření paprskem světla o definované vlnové délce dochází k excitaci fluorochromu a emisi záření, které stechiometricky odpovídá množství DNA. Takto je možno určit zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu v heterogenní populaci buněk (Gratzner, 1982; Herzenberg *et al.*, 1976; Skarstad *et al.*, 1995).

2 CÍLE PRÁCE

- I. Hledání nových kandidátních genů zapojených do metabolismu těžkých kovů pomocí analýzy transkripčních profilů rostlin ječmene (cv. Morex) pěstovaných v podmínkách zvýšené koncentrace vybraných kovů a funkční analýza získaných kandidátních genů.
- II. Sledování vlivu působení těžkých kovů na buněčný cyklus buněk kořenového meristému metodou třídění fluorescenčně značených jader pomocí průtokové cytometrie.

3 VÝSLEDKY

3.1 Souhrn

Prvním krokem v hledání nových kandidátních genů zapojených do metabolismu těžkých kovů byla optimalizace pěstování ječmene v hydroponním systému za přesně definovaných podmínek (viz Obr. 3). Následně bylo potřeba získat takové rostliny ječmene, které budou dostatečně ovlivněny působením těžkého kovu, ale zároveň nebude zcela inhibován jejich růst. Za tímto účelem byla pro studovaný kultivar ječmene Morex definována střední efektivní koncentrace mědi, zinku a kadmia, tzv. EC50. Hodnota EC50 pro daný kov odpovídá koncentraci, která z 50 % inhibuje růstu kořene ovlivněných rostlin. Pro měď odpovídala stanovená hodnota EC50 koncentraci 50 μM , pro zinek 570 μM a pro kadmium 80 μM .

Obr. 3: Ukázka pěstování semenáčků ječmene v hydroponním systému během fokusace hodnoty EC50 pro kadmium.



U kontrolních i ovlivněných rostlin byl stanoven obsah studovaných kovů v kořenech a výhoncích, aby bylo zřejmé, jaká je distribuce těžkých kovů v rámci rostliny. Ke stanovení obsahu studovaných kovů v analyzovaných vzorcích byla použita atomová absorpční spektroskopie (ASS, Atomic Absorption Spectrometry). Výsledky z měření obsahu kadmia ukazují na silnou akumulaci tohoto kovu v kořenovém systému a omezení jeho translokace do nadzemní části rostliny.

V další fázi byla z kontrolních a ovlivněných rostlin izolována RNA. Kořeny a výhonky rostlin byly analyzovány zvlášť a všechny experimenty byly provedeny v biologickém triplicátu. Získaná RNA byla sekvenována metodou Illumina a výsledky byly podrobeny bioinformatické analýze. Získaná sekvenační data byla potvrzena pomocí real-time PCR. Analýza diferenciální genové exprese u rostlin ovlivněných kadmii odhalila 10 282 deregulovaných transkriptů v podzemní části rostlin a 7 104 ve výhoncích. Mezi těmito transkripty byly identifikovány geny související s metabolismem reaktivních forem kyslíku, s membránovým transportem, geny podílející se na utváření a udržování buněčné stěny a geny spojené s reakcí na stresové podmínky.

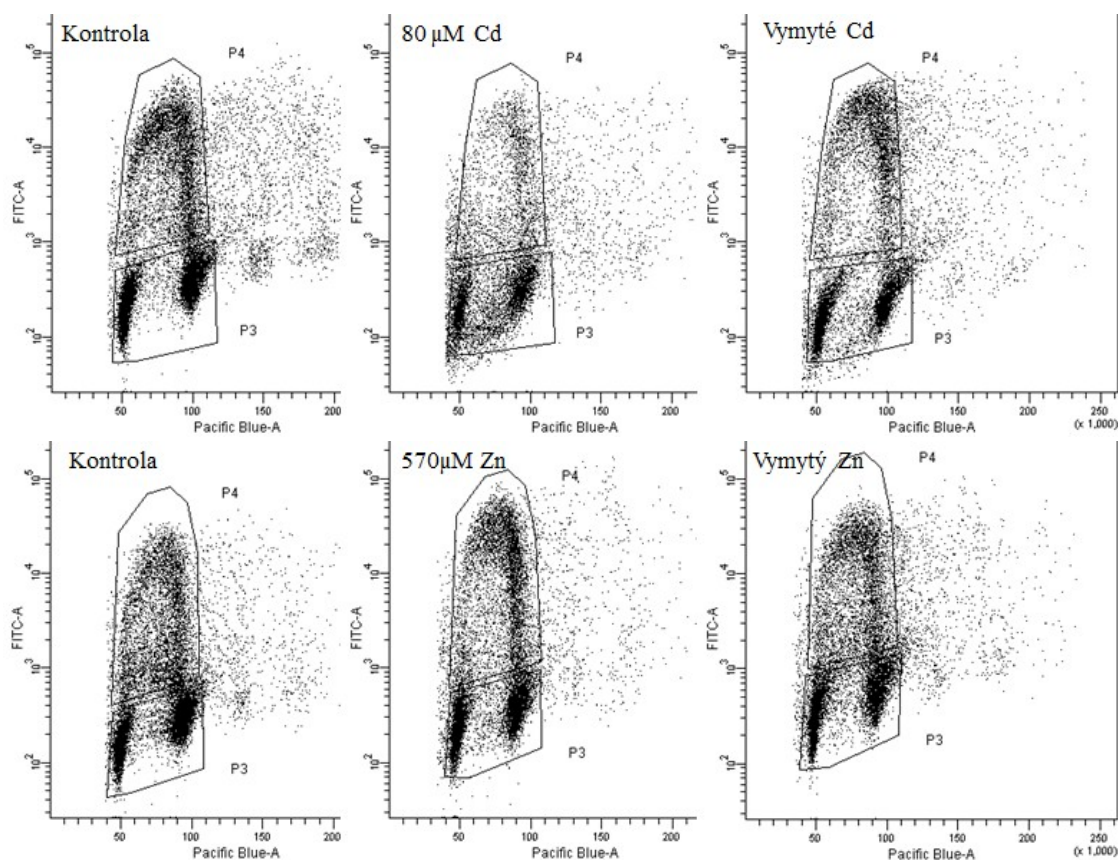
Nejvíce „upregulovaným“ genem byl gen *PCR2 (Plant Cadmium Resistance 2)*, který je známý svou účastí v detoxifikaci těžkých kovů v rostlinách. Na základě transkripční analýzy bylo nalezeno celkem pět kopií genu *HvPCR2*. Kopie genu *HvPCR2.1* vykazovala zvýšenou expresi při působení kadmia v kořenech i výhoncích ječmene. U dalších tří kopií, *HvPCR2.2-4*, byla exprese zvýšena pouze v nadzemní části. Bylo zjištěno, že kopie *HvPCR2.2-4* se nachází v tandemovém uspořádání na chromozomu 5H ječmene. V této chromozomové oblasti se fyzicky nachází i poslední kopie, *HvPCR2.5*, nicméně tato kopie nevykazovala při působení kadmia signifikantní „upregulaci“.

Pro objasnění role kopií genu *HvPCR2* v toleranci vůči kadmiu byla provedena funkční analýza v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Pro analýzu byl použit kmen DTY168 ($\Delta ycf1$), který je hypersensitivní vůči kadmiu. Růst kvasinek obsahujících prázdný vektor byl silně inhibován 50 μ M CdCl_2 , zatímco kvasinky obsahující ve vektoru jakoukoli variantu genu *HvPCR2* byly vůči kadmiu rezistentní.

Ke sledování vlivu těžkých kovů na buněčný cyklus byla využita průtoková cytometrie. K experimentu byly použity semenáčky ječmene pěstované v přítomnosti mědi, zinku a kadmia v koncentracích odpovídající stanovým hodnotám EC50. Aby bylo možno určit, zda jsou změny související s působením vybraných kovů reverzibilní či ireverzibilní, byly pro experiment použity tři způsoby ovlivnění rostlin. K rostlinám kontrolním a rostlinám ovlivněných přítomností kovů přibýly ještě semenáčky pěstované ve zvýšené koncentraci kovu, které byly ale následně přeneseny do základního živného média. Z vypěstovaných rostlin byly odebrány meristematické buňky umístěné v kořenových špičkách a jejich DNA byla označena pomocí EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin), analogem thymidinu. Fluorescenčně značená jádra

meristematických buněk byla tříděna průtokovým cytometrem, díky čemuž byly sledovány abnormality buněčného cyklu v důsledku působení těžkých kovů. U kontrolních rostlin byla pozorována rovnoměrná distribuce buněk v rámci buněčného cyklu. Signifikantně nižší počet buněk v S fázi buněčného cyklu byl pozorován u rostlin pěstovaných v přítomnosti kadmia (viz Obr. 4). Tento pokles může znamenat, že nejvíc citlivé na působení kadmia jsou buňky na přechodu mezi G1 a S fází. Semenáčky ovlivněné kadmiem a následně přenesené do základního média vykazovaly obdobné zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu jako kontrolní rostliny. Tyto výsledky naznačují, že hlavním důvodem redukce růstu kořenů je inhibice buněčného dělení především u buněk v G1 fázi. Naproti tomu výsledky analogické analýzy vlivu zinku na buněčný cyklus ukazují, že zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu je obdobný u kontrolních i ovlivněných rostlin (viz Obr. 4). Redukce růstu kořene může být tedy způsobena spíše potlačením elongace kořenových buněk, než-li inhibicí buněčného dělení (tato data nejsou zatím publikována). V současné době je v přípravě publikace založená na komparativní analýze vlivu všech studovaných těžkých kovů, tj. kadmia, mědi a zinku, na transkriptom ječmene.

Obr. 4: Znázornění výstupu analýzy vlivu kadmia a zinku na buněčný cyklus ječmene.



Součástí doktorského studia byla i pracovní stáž na Københavns Universitet. Náplní této stáže byla příprava mutantních variant transportéru *HvIRT1* a jejich charakterizace z hlediska určení role v transportu těžkých kovů a substrátové specifity. Na základě rozdílů v aminokyselinové sekvenci transportéru *IRT1* z rýže a ječmene byla vytipována místa, která mohou ovlivňovat schopnost transportu a substrátovou specifitu. Mutantní varianty transportéru *HvIRT1* byly připraveny cílenou mutagenezí a vloženy do vektoru. Následně byla provedena transformace vybraných kmenů *Saccharomyces cerevisiae* vektorem obsahujícím mutantní a wild-type verze transportéru *HvIRT1*. Na základě komplementačních testů v kvasinkách bylo zjištěno, že záměna histidinu za alanin mezi třetí a čtvrtou transmembránovou doménou transportéru *HvIRT1* neovlivňuje příjem iontů Fe^{2+} a Fe^{3+} . Dále bylo prokázáno, že histidin v pozicích 190 a 194 je nezbytný pro zachování transportu iontů Zn^{2+} a Mn^{2+} . Substituce methioninu za alanin v pozici 223 vedla ke ztrátě schopnosti transportovat ionty Zn^{2+} a Mn^{2+} , nicméně zvýšila schopnost transportovat ionty Fe^{2+} a Fe^{3+} . Získaná

data rozšiřují povědomí o důležitosti jednotlivých aminokyselinových reziduí transportéru *HvIRT1* a mohou být potenciálně využita pro zvýšení nutriční hodnoty ječmene.

Předložená doktorská práce se věnovala pochopení reakce ječmene na přítomnost těžkých kovů v prostředí. Přestože zahrnovala kombinaci mnoha sofistikovaných metod molekulární biologie, bioinformatiky a pokročilé cytometrie, je jasné, že se jedná jen o částečný vhled do studované problematiky. V každém případě lze říci, že reakce ječmene na přítomnost těžkých kovů v prostředí je silně komplexní. Tato práce jasně ukazuje, že adaptace na abiotický stres může vést přes multiplikaci efektorových genů v genomu.

3.2 Publikace

Autorské publikace:

3.2.1 Transcriptome Response to Cadmium Exposure in Barley (*Hordeum vulgare* L.)
(viz Příloha I)

3.2.2 Transcriptome of barley under three different heavy metal stress reaction
(viz Příloha II)

3.2.3 Nové poznatky v genetice rostlin VI. Tolerance rostlin k těžkým kovům
(viz Příloha III)

Prezentace na konferenci – poster:

3.2.4 Characterisation of important residues for transport ability and substrate specificity of the metal ion transporter *HvIRT1* (viz Příloha IV)

3.2.1 Transcriptome response to cadmium exposure in barley (*Hordeum vulgare* L.)

Kintlová, M., Vrána, J., Hobza, R., Blavet, N., Hudzieczek, V.

Frontiers in Plant Science (2021)

DOI: 10.3389/fpls.2021.629089

Abstrakt:

Cadmium is an environmental pollutant with high toxicity that negatively affects plant growth and development. To understand the molecular mechanisms of plant response to cadmium stress, we have performed a genome-wide transcriptome analysis on barely plants treated with an increased concentration of cadmium. Differential gene expression analysis revealed 10,282 deregulated transcripts present in the roots and 7,104 in the shoots. Among them, we identified genes related to reactive oxygen species metabolism, cell wall formation and maintenance, ion membrane transport and stress response. One of the most upregulated genes was *PLANT CADMIUM RESISTANCE 2* (*HvPCR2*) known to be responsible for heavy metal detoxification in plants. Surprisingly, in the transcriptomic data we identified four different copies of the *HvPCR2* gene with a specific pattern of upregulation in individual tissues. Heterologous expression of all five barley copies in a Cd-sensitive yeast mutant restored cadmium resistance. In addition, four *HvPCR2* were located in tandem arrangement in a single genomic region of the barley 5H chromosome. To our knowledge, this is the first example showing multiplication of the *PCR2* gene in plants.

3.2.2 Transcriptome of barley under three different heavy metal stress reaction

Kintlová, M., Blavet, N., Čegan, R., Hobza, R.

Genomics data (2017)

DOI: 10.1016/j.gdata.2017.05.016

Abstrakt:

In the present study, we used Illumina sequencing technology (HiSeq 2000) to sequence the transcriptome of barley (*Hordeum vulgare* L., cv. Morex) under three different heavy metal stress conditions: copper, zinc and cadmium. For each of those metals, the concentration causing a 50% inhibitory effect for root growth (EC₅₀) was determined. We sequenced the total RNA of both roots and shoots from barley with and without heavy metal treatments in three replicates. Raw reads of the transcriptome project have been deposited in NCBI's BioProject accession number PRJNA382490. The obtained transcriptomic data will be useful for further studies focusing on heavy metal tolerance and comparative transcriptome analysis in barley.

3.2.3 Nové poznatky v genetice rostlin VI.

Tolerance rostlin k těžkým kovům

Hudzieczek, V., Kintlová, M., Hobza, R., Čegan, R.

Živa (2017)

Abstrakt:

Vysoké koncentrace těžkých kovů v prostředí jsou převážně výraznou komplikací pro život většiny živých organismů. Rostliny mají díky svým omezeným pohybovým schopnostem v případě výskytu v kontaminovaných oblastech jedinou možnost přežití – adaptaci. Identifikace a charakterizace genů rezistence k těžkým kovům a porozumění jejich biologickým funkcím jsou klíčovým tématem současné biologie.

Tento článek získal zvláštní ocenění časopisu Živa

3.2.4 Characterisation of important residues for transport ability and substrate specificity of the metal ion transporter *HvIRT1*

Horníková, M., Pedas, P.

Poster na konferenci Plant Biotechnology: Green for Good III, 15 – 18 června 2015,
Olomouc

4 LITERATURA

- Adriano, D. C. (2001). *Trace elements in terrestrial environments* (2nd edition). Springer-Verlag.
- Alloway, B. J. (1990). *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*. Blackie and Son Limited.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J. et Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5350-5354.
- Assuncao, A. G. L., Schat, H. et Aarts, M. G. M. (2003). *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 159(2), 351-360.
- Axelsen, K. B. et Palmgren, M. G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of Molecular Evolution*, 46(1), 84-101.
- Axelsen, K. B. et Palmgren, M. G. (2001). Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 126(2), 696-706.
- Badr, a, Müller, K., Schäfer-Pregl, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H. H., Pozzi, C., Rohde, W. et Salamini, F. (2000). On the origin and domestication history of Barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 499-510.
- Bashir, K., Ishimaru, Y. et Nishizawa, N. K. (2012). Molecular mechanisms of zinc uptake and translocation in rice. *Plant and Soil*, 361(1-2), 189-201.
- Benavides, M. P., Gallego, S. M. et Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 21-34.
- Bernal, M., Roncel, M., Ortega, J. M., Picorel, R. et Yruela, I. (2004). Copper effect on cytochrome b559 of photosystem II under photoinhibitory conditions. *Physiologia Plantarum*, 120(4), 686-694.
- Blindauer, C. A. et Schmid, R. (2010). Cytosolic metal handling in plants: determinants for zinc specificity in metal transporters and metallothioneins. *Metallomics*, 2(8), 510.
- Bringezu, K., Lichtenberger, O., Leopold, I. et Neumann, D. (1999). Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology*, 154(4), 536-546.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I. et Lux, A. (2007). Zinc in plants: Tansley review. *New Phytologist*, 173(4), 677-702.
- Brown, P. H., Cakmak, I. et Zhang, Q. (1993). Form and function of zinc plants. Dans *Zinc in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers.
- Brune, A. et Dietz, K.-J. (1995). Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation: a comparison of Cd-, Mo-, Ni- and Zn-stress. *New Phytologist*, 129(3), 403-409.
- Bull, P. C. et Cox, D. W. (1994). Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends in Genetics*, 10(7), 246-252.
- Burkhead, J. L., Gogolin Reynolds, K. A., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M. et Pilon, L.

- M. (2009). Copper homeostasis. *New Phytologist*, 182(4), 799-816.
- Cakmak, I., Marschner, H. et Bangerth, F. (1989). Effect of zinc nutritional status on growth, protein metabolism and levels of indole-3-acetic acid and other phytohormones in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany*, 40(212), 405-412.
- Callahan, D. L., Kolev, S. D., O'Hair, R. A. J., Salt, D. E. et Baker, A. J. M. (2007). Relationships of nicotianamine and other amino acids with nickel, zinc and iron in *Thlaspi* hyperaccumulators. *New Phytologist*, 176(4), 836-848.
- Campbell, N. A. et Reece, J. B. (2005). *Biology* (7th edition). Pearson/Benjamin Cummings.
- Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M. H. et Masclaux-Daubresse, C. (2004). Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant & Cell Physiology*, 45(11), 1681-1693.
- Chloupek, O. (2011). Historie šlechtění sladového ječmene na území České republiky. *Kvasný průmysl: Journal for Brewing, Malting & Beverage Industry*, 57(7/8), 180-181.
- Chu, Y. et Corey, D. R. (2012). RNA sequencing: Platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Therapeutics*, 22(4), 271-274.
- Clemens, S. (2006). Evolution and function of phytochelatins. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 319-332.
- Cobbett, C. et Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 159-182.
- Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*, 123(3), 825-832.
- Coleman, J. E. (1992). Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 61, 897-946.
- Cubillas, C., Vinuesa, P., Luisa Tabche, M., Dávalos, A., Vázquez, A., Hernández-Lucas, I., Romero, D. et García-de los Santos, A. (2014). The cation diffusion facilitator protein EmfA of *Rhizobium etli* belongs to a novel subfamily of Mn 2+ / Fe 2+ transporters conserved in α -proteobacteria. *Metallomics*, 6(10), 1808-1815.
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S. et Furini, A. (2008). How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1268-1280.
- Delhaize, E., Kataoka, T., Hebb, D. M., White, R. G. et Ryan, P. R. (2003). Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *The Plant Cell*, 15(5), 1131-42.
- Dietz, K.-J., Baier, M. et Krämer, U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. Dans *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer Berlin Heidelberg.
- Dolezel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysak, M., Nardi, L. et Obermayer, R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82, 17-26.

- Dündar, F., Skrabanek, L. et Zumbo, P. (2015). Introduction to differential gene expression analysis using RNA-seq. *Applied Bioinformatics Core*, 1-86.
- Ehrenbergerová, J. (2006). Chemické složení zrna ječmene. Dans J. Zimolka, *Ječmen - formy a užitkové směry v České republice*. Profi Press.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. et Guerinot, M. L. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5624-5628.
- ENCODE. (2011). *Standards, guidelines and best practices for RNA-Seq*. https://genome.ucsc.edu/ENCODE/protocols/dataStandards/ENCODE_RNAseq_Standards_V1.0.pdf
- Ernst, W. H. O., Verkleij, J. A. C. et Schat, H. (1992). Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica*, 41(3), 229-248.
- Fan, T. W. M., Lane, A. N., Pedler, J., Crowley, D. et Higashi, R. M. (1997). Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 251(1), 57-68.
- FAO. (2016). *FAOSTAT*. The Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>
- Fleming, M. D., Trenor, C. C., Su, M. A., Foernzler, D., Beier, D. R., Dietrich, W. F. et Andrews, N. C. (1997). Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nature Genetics*, 16(4), 383-386.
- Freeman, J. L., Persans, M. W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I. J. et Salt, D. E. (2004). Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell*, 16(8), 2176-2191.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. et Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), 546-567.
- Goodbody, K. C. et Lloyd, C. W. (1994). Immunofluorescence techniques for the analysis of the cytoskeleton. Dans N. Harris et K. J. Oparka, *Plant Cell Biology. A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press.
- Goodwin, S., McPherson, J. D. et McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333-351.
- Govoni, G. et Gros, P. (1998). Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflammation Research*, 47(7), 277-284.
- Gratzner, H. G. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218(4571), 474-475.
- Guerinot, M. Lou. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465(1-2), 190-198.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L. et Hediger, M. A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*,

388(6641), 482-488.

- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1-11.
- Halliwell, B. et Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical Journal*, 219(1), 1-14.
- Hänsch, R. et Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 259-266.
- Harismendy, O., Ng, P. C., Strausberg, R. L., Wang, X., Stockwell, T. B., Beeson, K. Y., Schork, N. J., Murray, S. S., Topol, E. J., Levy, S. et Frazer, K. A. (2009). Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biology*, 10(3), R32.
- Harmens, H., Gusmão, N. G. C. . B., Den Hartog, P. R., Verkleij, J. A. C. et Ernst, W. H. O. (1993). Uptake and transport of zinc in zinc-sensitive and zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology*, 141(3), 309-315.
- Haydon, M. J. et Cobbett, C. S. (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist*, 174(3), 499-506.
- Heckathorn, S. A., Mueller, J. K., LaGuidice, S., Zhu, B., Barrett, T., Blair, B. et Dong, Y. (2004). Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany*, 91(9), 1312-1318.
- Herzenberg, L., Sweet, R. et Herzenberg, L. (1976). Fluorescence-activated cell sorting. *Scientific American*, 234(3), 108-118.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. et Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10(4), 413-417.
- Hornburg, V. et Brümmer, G. W. (1993). Behaviour of heavy metals in soils. 1. Heavy metal mobility. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, (156), 467-477.
- Howald, C., Tanzer, A., Chrast, J., Kokocinski, F., Derrien, T., Walters, N., Gonzalez, J. M., Frankish, A., Aken, B. L., Hourlier, T., Vogel, J.-H., White, S., Searle, S., Harrow, J., Hubbard, T. J., Guigó, R. et Reymond, A. (2012). Combining RT-PCR-seq and RNA-seq to catalog all genic elements encoded in the human genome. *Genome Research*, 22(9), 1698-1710.
- John, D. A. et Leventhal, J. S. (1995). Bioavailability of metals. Dans E. A. Du Bray, *Preliminary compilation of descriptive geoenvironmental mineral deposit models*. USGS Open-File Report.
- Ju, J., Kim, D. H., Bi, L., Meng, Q., Bai, X., Li, Z., Li, X., Marma, M. S., Shi, S., Wu, J., Edwards, J. R., Romu, A. et Turro, N. J. (2006). Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52), 19635-19640.
- Kabata-Pendias, A. et Pendias, K. (2001). *Trace elements in soils and plants* (3rd edition). CRC Press.

- Kawachi, M., Kobae, Y., Mimura, T. et Maeshima, M. (2008). Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn(2+)/H(+) antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8374-8383.
- Klaassen, C. D., Liu, J. et Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 267-294.
- Kleinhofs, A. et Graner, A. (2001). An integrated map of the barley genome. Dans R. L. Phillips et I. K. Vasil, *DNA-Based Markers in Plants*. Kluwer Academic Publishers.
- Kochian, L. V. (1991). Mechanisms of micronutrient uptake and translocation in plants. Dans J. J. Mortvedt, F. R. Cox, L. M. Shuman et R. M. Welch, *Micronutrients in Agriculture* (2nd edition). Soil Science Society of America.
- Kochian, L. V. (1993). Zinc absorption from hydroponic solutions by plant roots. Dans A. D. Robson, *Zinc in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers.
- Kohlmeier, F., Maya-Mendoza, A. et Jackson, D. A. (2013). EdU induces DNA damage response and cell death in mESC in culture. *Chromosome Research*, 21(1), 87-100.
- Kotrba, P., Najmanova, J., Macek, T., Ruml, T. et Mackova, M. (2009). Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloid soil and sediment pollution. *Biotechnology Advances*, 27(6), 799-810.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A. J. M. et Smith, J. A. C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379(6566), 635-638.
- Lasat, M. M. (2002). Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*, 31(1), 109-120.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L. et Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-11.
- Liu, X. F., Supek, F., Nelson, N. et Culotta, V. C. (1997). Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(18), 11763-11769.
- Ma, J. F., Ryan, P. R. et Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, 6(6), 273-278.
- MacGregor, A. W. et Bhatt, R. S. (1993). *Barley: chemistry and technology*. American Association of Cereal Chemists.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I. N., Amtmann, A., Maathuis, F. J., Sanders, D., Harper, J. F., Tchiew, J., Gribskov, M., Persans, M. W., Salt, D. E., Kim, S. A. et Guerinot, M. L. (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126(4), 1646-1667.
- Mathys, W. (1977). The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants. *Physiologia Plantarum*, 40(2), 130-136.

- Mayer, K. F. X., Waugh, R., Langridge, P., Close, T. J., Wise, R. P., Graner, A., Matsumoto, T., Sato, K., Schulman, A., Muehlbauer, G. J., Stein, N., Ariyadasa, R., Schulte, D., Poursarebani, N., Zhou, R., Steuernagel, B., Mascher, M., Scholz, U., Shi, B., ... Stein, N. (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491(7426), 711-716.
- McBride, M. B. (1989). Reaction controlling heavy metal solubility in soils. *Advances in Soil Science*, (10), 1-56.
- Møller, J. V, Juul, B. et le Maire, M. (1996). Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1286(1), 1-51.
- Montargès-Pelletier, E., Chardot, V., Echevarria, G., Michot, L. J., Bauer, A. et Morel, J.-L. (2008). Identification of nickel chelators in three hyperaccumulating plants: An X-ray spectroscopic study. *Phytochemistry*, 69(8), 1695-1709.
- Murphy, A. et Taiz, L. (1995). Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten Arabidopsis ecotypes (correlation with copper tolerance). *Plant Physiology*, 109(3), 945-954.
- Němeček, J., Vácha, R. et Podlešáková, P. (2010). *Hodnocení kontaminace půd v ČR*. Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy.
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Günther, D., Tschiersch, K. et Nover, L. (1994). Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta*, 194(3), 360-367.
- Nevo, E. (1992). Origin, evolution, population genetics and resources for breeding of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the fertile crescent. Dans P. R. Shewry, *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*. C.A.B. International.
- Nookaew, I., Papini, M., Pornputtapong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlén, M. et Nielsen, J. (2012). A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 40(20), 10084-10097.
- Ozsolak, F. et Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 87-98.
- Paulíčková, I., Ehrenbergerová, J., Fiedlerová, V., Gabrovská, D., Havlová, P., Holasová, M., Kopáček, J., Ouhrabková, J., Pinkrová, J., Rysová, J., Vaculová, K. et Winterová, R. (2007). Evaluation of barley grass as a potential source of some nutritional substances. *Czech Journal of Food Sciences*, 25(2), 65-72.
- Paulsen, I. T. et Saier, M. H. (1997). A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *The Journal of Membrane Biology*, 156(2), 99-103.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A. et Forestier, C. (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal*, 32(4), 539-548.
- Persans, M. W., Yan, X., Patnoe, J. M., Krämer, U. et Salt, D. E. (1999). Molecular

- dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Plant Physiology*, 121(4), 1117-1126.
- Petrangeli, P. M., Majone, M. et Rolle, E. (2001). Kaolinite sorption of Cd, Ni and Cu from landfill leachates: influence of leachate composition. *Water science and technology*, 44(2-3), 343-350.
- Psota, V. et Ehrenbergerová, J. (2008). Ječmen. Dans J. Prugar, *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. TISKAP.
- Radisky, D. et Kaplan, J. (1999). Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 4481-4484.
- Rapaport, F., Khanin, R., Liang, Y., Pirun, M., Krek, A., Zumbo, P., Mason, C. E., Socci, N. D. et Betel, D. (2013). Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. *Genome Biology*, 14(9), R95.
- Ren, F., Liu, T., Liu, H. et Hu, B. (1993). Influence of zinc on the growth, distribution of elements, and metabolism of one year old American ginseng plants. *Journal of Plant Nutrition*, 16(2), 393-405.
- Rogers, E. E., Eide, D. J. et Guerinot, M. L. (2000). Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12356-12360.
- Romero-Puertas, M. C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F. J., Gómez, M., Del Río, L. A. et Sandalio, L. M. (2004). Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂ .- and H₂O₂ in pea leaves. *Plant Cell and Environment*, 27(9), 1122-1134.
- Roth, U., Von Roepenack-Lahaye, E. et Clemens, S. (2006). Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd²⁺. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 4003-4013.
- Ryant, P., Richter, R., Hlušek, J. et Fryščajová, E. (2006). *Multimediální učební texty z výživy rostlin*. http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/index.htm
- Salt, D. E. et Wagner, G. J. (1993). Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd²⁺/H⁺ antiport activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12297-12302.
- Salt, D. E. et Rauser, W. E. (1995). MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of Oat roots. *Plant Physiology*, 107(4), 1293-1301.
- Salt, D. E., Smith, R. D. et Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 643-668.
- Sanità Di Toppi, L. et Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41(2), 105-130.
- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. O. et Davis, R. W. (1996). Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), 10614-10619.
- Schurch, N. J., Schofield, P., Gierliński, M., Cole, C., Sherstnev, A., Singh, V., Wrobel, N., Gharbi, K., Simpson, G. G., Owen-Hughes, T., Blaxter, M. et Barton, G. J. (2016). How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and

- which differential expression tool should you use? *RNA*, 22(6), 839-851.
- Schützendübel, A. et Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1351-1365.
- Sharma, Y. K., Leon, J., Raskin, I. et Davis, K. R. (1996). Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(10), 5099-5104.
- Skarstad, K., Bernander, R. et Boye, E. (1995). Analysis of DNA replication *in vivo* by flow cytometry. *Methods in Enzymology*, 262, 604-613.
- Smith, S. E. et Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.
- Solioz, M. et Vulpe, C. (1996). CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(7), 237-241.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), 503-517.
- Stroobants, C., Sossountzov, L. et Miginiac, E. (1990). DNA synthesis in excised tobacco leaves after bromodeoxyuridine incorporation: immunohistochemical detection in semi-thin spurr sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 38(5), 641-647.
- Supek, F., Supekova, L., Nelson, H. et Nelson, N. (1996). A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(10), 5105-5110.
- Talke, I. N., Hanikenne, M. et Krämer, U. (2006). Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology*, 142(1), 148-167.
- Tarazona, S., García-Alcalde, F., Dopazo, J., Ferrer, A. et Conesa, A. (2011). Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Research*, 21(12), 2213-2223.
- Taylor, J. H., Woods, P. S. et Hughes, W. L. (1957). The organization and duplication of chromosomes as 457 revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43(1), 122-128.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. et Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal*.
- Tlust'oš, P. (1999). *Mobilita arsenu, kadmia a zinku v půdách s možností omezení jejich příjmu rostlinami*. Habilitační práce, ČZU Praha.
- Tomkinson, A. E., Vijayakumar, S., John M. Pascal, A. et Ellenberger, T. (2006). DNA Ligases: Structure, Reaction Mechanism, and Function. *Chemical Reviews*, 106(2), 687-699.

- Tornøe, C. W., Christensen, C. et Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]- triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of Organic Chemistry*, 67(9), 3057-3064.
- Ueno, D., Ma, J. F., Iwashita, T., Zhao, F.-J. et McGrath, S. P. (2005). Identification of the form of Cd in the leaves of a superior Cd-accumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens* using ^{113}Cd -NMR. *Planta*, 221(6), 928-936.
- Vaculová, K. (2006). Ječmen krmný. Dans J. Zimolka, *Ječmen - formy a užitkové směry v České republice*. Profi Press.
- Van Assche, F. et Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell and Environment*, 13(3), 195-206.
- van der Zaal, B. J., Neuteboom, L. W., Pinas, J. E., Chardonens, A. N., Schat, H., Verkleij, J. A. et Hooykaas, P. J. (1999). Overexpression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiology*, 119(3), 1047-1055.
- van Hoof, N. A., Hassinen, V. H., Hakvoort, H. W., Ballintijn, K. F., Schat, H., Verkleij, J. A., Ernst, W. H., Karenlampi, S. O. et Tervahauta, A. I. (2001). Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiology*, 126(4), 1519-1526.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. et Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*, 270(5235), 484-487.
- Verbruggen, N., Hermans, C. et Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 181(4), 759-776.
- Verkleij, J. A. C., Koevoets, P. L. M., Blake-Kalff, M. M. A. et Chardonens, A. N. (1998). Evidence for an important role of the tonoplast in the mechanism of naturally selected zinc tolerance in *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology*, 153(1-2), 188-191.
- Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), 579-620.
- Von Bothmer, R. (1992). The wild species of *Hordeum*: Relationships and potential use for improvement of cultivated barley. Dans P. R. Shewry, *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*. C.A.B. International.
- Von Bothmer, R., Jacobsen, N., Baden, C., Jorgensen, R. B. et Linde-Laursen, I. (1995). *An ecogeographical study of the genus Hordeum* (2nd edition). IPGRI.
- Wang, Z., Gerstein, M. et Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63.
- Welch, R. M. (1995). Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 14, 49-82.
- Welch, R. M., Norvell, W. A., Schaefer, S. C., Shaff, J. E. et Kochian, L. V. (1993). Induction of iron(III) and copper(II) reduction in pea (*Pisum sativum* L) roots by Fe and Cu status: Does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake. *Planta*, (190), 555-561.

- Wenzel, W. W., Lombi, E. et Adriano, D. C. (1999). Biogeochemical processes in the rhizosphere: role in phytoremediation of metal-polluted soils. Dans M. N. V. Prasad et J. Hagemeyer, *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer-Verlag.
- Wicker, T., Taudien, S., Houben, A., Keller, B., Graner, A., Platzer, M. et Stein, N. (2009). A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley. *Plant Journal*, 59(5), 712-722.
- Williams, L. E., Pittman, J. K. et Hall, J. L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465(1-2), 104-126.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K.,..., Johnston, M. et Davis, R. W. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285(5429), 901-906.
- Yi, H., Cho, Y.-J., Won, S., Lee, J.-E., Jin Yu, H., Kim, S., Schroth, G. P., Luo, S. et Chun, J. (2011). Duplex-specific nuclease efficiently removes rRNA for prokaryotic RNA-seq. *Nucleic Acids Research*, 39(20), e140.
- Yuan-Wen, K., Da-Zhi, W., Chuan-Wen, Z., Guo-Yi, Z., Yuan-Wen, K., Da-Zhi, W., Chuan-Wen, Z. et Guo-Yi, Z. (2003). Root exudates and their roles in phytoremediation. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 27(5), 709-717.
- Zhao, H. et Eide, D. (1996a). The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), 2454-2458.
- Zhao, H. et Eide, D. (1996b). The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(38), 23203-23210.
- Zimolka, J. (2006). *Ječmen - formy a užitkové směry v České republice*. Profi Press.

5 PŘÍLOHA

Autorské publikace:

Příloha I Transcriptome response to cadmium exposure in barley
(*Hordeum vulgare* L.)

Příloha II Transcriptome of barley under three different heavy metal stress reaction

Příloha III Nové poznatky v genetice rostlin VI. Tolerance rostlin k těžkým kovům

Prezentace na konferenci:

Příloha IV Characterisation of important residues for transport ability and substrate specificity of the metal ion transporter *HvIRT1*

PŘÍLOHA I

Transcriptome response to cadmium exposure in barley (*Hordeum vulgare* L.)

Kintlová M, Vrána J, Hobza R, Blavet N, Hudzieczek V

Frontiers in Plant Science (2021)

DOI: 10.3389/fpls.2021.629089

IF: 5,753



Transcriptome Response to Cadmium Exposure in Barley (*Hordeum vulgare* L.)

Martina Kintlová¹, Jan Vrána¹, Roman Hobza^{1,2}, Nicolas Blavet^{1,2} and Vojtěch Hudzieczek^{2*}

¹ Czech Academy of Sciences, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany, Olomouc, Czechia, ² Czech Academy of Sciences, Institute of Biophysics, Brno, Czechia

OPEN ACCESS

Edited by:

Eduardo Gusmão Pereira,
Universidade Federal de Viçosa, Brazil

Reviewed by:

Huseyin Tombuloglu,
Imam Abdulrahman Bin Faisal
University, Saudi Arabia
Colleen J. Doherty,
North Carolina State University,
United States

*Correspondence:

Vojtěch Hudzieczek
hudzieczek@ibp.cz

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Abiotic Stress,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 13 November 2020

Accepted: 11 June 2021

Published: 15 July 2021

Citation:

Kintlová M, Vrána J, Hobza R,
Blavet N and Hudzieczek V (2021)
Transcriptome Response to Cadmium
Exposure in Barley (*Hordeum
vulgare* L.).
Front. Plant Sci. 12:629089.
doi: 10.3389/fpls.2021.629089

Cadmium is an environmental pollutant with high toxicity that negatively affects plant growth and development. To understand the molecular mechanisms of plant response to cadmium stress, we have performed a genome-wide transcriptome analysis on barley plants treated with an increased concentration of cadmium. Differential gene expression analysis revealed 10,282 deregulated transcripts present in the roots and 7,104 in the shoots. Among them, we identified genes related to reactive oxygen species metabolism, cell wall formation and maintenance, ion membrane transport and stress response. One of the most upregulated genes was *PLANT CADMIUM RESISTANCE 2* (*HvPCR2*) known to be responsible for heavy metal detoxification in plants. Surprisingly, in the transcriptomic data we identified four different copies of the *HvPCR2* gene with a specific pattern of upregulation in individual tissues. Heterologous expression of all five barley copies in a Cd-sensitive yeast mutant restored cadmium resistance. In addition, four *HvPCR2* were located in tandem arrangement in a single genomic region of the barley 5H chromosome. To our knowledge, this is the first example showing multiplication of the *PCR2* gene in plants.

Keywords: barley, cadmium, transcriptomic analysis, *HvPCR2*, gene duplication

INTRODUCTION

Cadmium (Cd) is a particularly dangerous environmental pollutant with a high toxicity to plants and other living organisms, including humans. Its concentration increases rapidly in the environment as an effect of anthropogenic factors such as mining, metal-work industries, urban traffic or the application of phosphate fertilizers (Nriagu and Pacyna, 1988). Cadmium contamination of soils can cause losses in agricultural yield and present a potential health risk for people from Cd transfer through the food chain.

Cadmium has no known function as a nutrient and its uptake by plants is dependent on soil concentration, bioavailability, redox potential, temperature, quantity of organic matter, and concentrations of other elements. Cd accumulation in plants affects various processes such as water and mineral uptake, photosynthesis and respiration, resulting in inhibition of growth and even death (Sanità Di Toppi and Gabbriellini, 1999). Cd ions compete with other nutrients for plant uptake and enter the plant via $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Zn^{2+} , and Mn^{2+} transporters because of their limited specificity (Pedas et al., 2008; Sasaki et al., 2012). Thus, the plant damage caused by cadmium and other heavy metals comes from competition with essential mineral nutrients leading to deficient nutrition

(Clarkson and Lüttge, 1989). Once Cd enters the root, it can be sequestered in root vacuoles or translocated in the xylem through the apoplastic and/or symplastic pathway and transported into the aboveground parts of the plant (Salt and Rauser, 1995; Yang et al., 1998).

In addition, heavy metals may accumulate in cell compartments that impede the general metabolism of the plant (Thurman and Collins, 1983). As a response to biotic or abiotic stress, plants produce common stress-related transcripts like transcriptional factors, transporter proteins and other genes involved in signal transduction and secondary metabolite pathways (Atkinson and Urwin, 2012). Plants have developed a complex network of mechanisms to minimize the toxic effect of cadmium import. These active and passive strategies based on exclusion of the Cd^{2+} from the cellular environment are applied at several levels. As a first response, malate or citrate is secreted and binds to metal ions thereby restricting Cd root absorption (Delhaize and Ryan, 1995). If Cd is absorbed, it can be immobilized by cell wall or extracellular carbohydrates in the root (Sanità Di Toppi and Gabbriellini, 1999). Once Cd enters the cytosol, metal ions activate the synthesis of sulfur-containing ligands such as phytochelatins or metallothioneins (DalCorso et al., 2008) and these ligand-metal complexes are stored in special cellular compartments.

A previous study in *Arabidopsis* detected important genes encoding enzymes and proteins involved in sulfur assimilation, GSH metabolism, indole-3-acetic acid (IAA) and jasmonic acid (JA) biosynthesis activated by lead treatment (Liu et al., 2009). In rice, Lin et al. (2013) revealed that small heat shock proteins, sulfate assimilation and glutathione-S-transferase are specifically upregulated with Cd stress. Fusco et al. (2005) identified transcription factors putatively responsive to heavy metal stress indicating the complexity of the response of plants to Cd stress. It was showed that the *TaHsfA4a* gene plays a direct role in a Cd-induced transcriptional response in wheat and rice. Besides, metallothioneins are regulated by this heat-shock transcription factor under Cd exposure (Shim et al., 2009).

In this study, we analyzed genes and regulatory pathways related to the response of Cd stress in barley. Firstly, we measured the Cd concentration in both shoot and root tissue. Second, we monitored the cell cycle to examine the effect of Cd on cell progression through individual cell phases. Third, barley root and shoot tissues were subjected to transcriptome profiling. We identified several Cd responsive genes based on differential gene expression analysis between Cd-treated material and the control. Finally, we characterized the upregulated genes encoding Cd^{2+} transmembrane transporters PLANT CADMIUM RESISTANCE 2 (HvPCR2) by heterologous overexpression in yeast.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Seeds used in the experiments were kindly provided by Genebank Gatersleben of the Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Barley seeds (*Hordeum vulgare* cv. Morex) were germinated at 20°C in the dark on filter paper moistened with deionized water. After 48 h the primary root length was measured

for seeds that were then transferred to polypropylene pots containing 1L of test medium (changed every 24 h to maintain composition). Test media were aerated throughout the exposure time. Relative humidity was 50%, and day/night temperatures were 20/16°C during 16/8 h photoperiod.

Preparation of Test Solutions and Cd Accumulation Analysis

The basal nutrient solution composition was KH_2PO_4 , 0.4 mM; K_2SO_4 , 0.4 mM; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.6 mM; NH_4NO_3 , 1 mM; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 2 mM; FeNaEDTA , 75 μM ; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 7 μM ; ZnCl_2 , 3 μM ; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0.8 μM ; H_3BO_3 , 1.6 μM , and $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.83 μM . The pH was adjusted with 1 M KOH to 5.5–6.0 (Podar, 2013). Test media, except control, were prepared by adding different volumes of stock solutions of CdCl_2 to adjust the concentration.

To determine Cd accumulation in barley cv. Morex, plants were cultivated in control medium and medium supplemented with 80 μM cadmium, a previously determined effective concentration (EC_{50}) causing a 50% inhibitory effect for root growth (Kintlová et al., 2017). Samples were collected and root length measured before and after 5 days of treatment. Both root and shoot tissue samples were washed first in 0.5 M EDTA to remove unabsorbed cadmium, then washed in distilled water. They were further dried in a hot air oven (50°C, 72 h). The cadmium concentration was then measured by atomic absorption spectrometry (AAS).

Ethynyl-2'-Deoxyuridine Cell Proliferation Assay

Preparation of Plant Material

The experimental design consisted of three types of treatment to determine whether the damage of root tip cells caused by cadmium treatment is reversible or irreversible at set conditions. We examined control plants, cadmium-treated plants and washed cadmium-treated plants (designated in this study as Treatment 1–3). The experiment was repeated twice.

For all types of treatment, barley seeds were germinated (*Hordeum vulgare* cv. Morex) at 20°C in the dark on filter paper moistened with deionized water. After 48 h, 20y seeds were transferred to polypropylene pots containing 1L of test medium (changed every 24 h). Test media were aerated throughout the exposure time. Relative humidity was 50%, and day/night temperatures were 20/16°C during 16/8 h photoperiod. After 5 days, the plants in Treatment 3 were rinsed in deionized water 3 times and transferred to basal nutrition solution for 3 days, whereas Treatment 1 and 2 plants were handled immediately.

Plant Nuclei Extraction and 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine Labeling

The plant nuclei extraction protocol and EdU labeling were performed on the same day for all types of treatment. Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for the cell proliferation assay. Twenty barley plants of each treatment were rinsed 3 times in deionized water and placed into Petri dish filled with 50 ml

of fresh deionized water. 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) was added to a final concentration of 9 μ M and incubated for 2 h.

Roots with a length of about 1 cm were trimmed and incubated 20 min in 2% (v/v) formaldehyde fixative on ice. The roots were then washed in Tris buffer three times for 5 min on ice. About 70 meristem root tips per one treatment were excised and then homogenized in 1 ml LB01 lysis buffer using a Polytron PT1200 homogenizer at 15,000 rpm for 13 s. The crude homogenate was filtered through a nylon mesh filter (50 μ m pore size) into a new tube. The tubes were spun down at 400 g and 4°C for 10 min and the supernatant removed. The Click-iT reaction cocktail was prepared using 438 μ l PBS, 10 μ l CuSO₄, 2.5 μ l Fluorescent dye azide and 50 μ l Reaction Buffer Additive for each sample. 500 μ l of reaction cocktail was applied to the pellet, mixed well and incubated for 30 min in the dark at room temperature. The solution was spun down again and the pellet was resuspended in 500 μ l LB01 buffer. The suspension was filtered through a nylon mesh filter (25 μ m pore size) and stained with DAPI (2 μ g/ml final concentration).

Cell Cycle Analysis Using Flow Cytometry

All flow cytometric analyses were performed on FACSaria SORP flow cytometer (BD Biosciences, Santa Clara, USA) equipped with blue (488 nm, 100 mW) and UV (355 nm, 100 mW) lasers and optical filters for FITC (530/30 band-pass) and DAPI (450/50 band-pass) fluorescence detection. At least 10,000 nuclei were recorded for each sample. Data were displayed on Alexa Fluor 488 vs. DAPI dot plots. To make statistical evaluation of the effect of cadmium treatment on cell proliferation, the region around cycling and non-cycling populations were drawn, respectively. The ratio of cycling/non-cycling was calculated for each sample and the mean and the standard deviation were calculated from three repetitions.

Transcriptome Analysis

For transcriptome analysis we used the dataset available in NCBI SRA (sequence read archive) under accession numbers SRR5452097 to SRR5452108. These data were obtained from the barley plants grown in media supplemented with cadmium concentration that corresponds to established EC₅₀ values as well as control plants for each treatment (Kintlová et al., 2017). Sequenced Read quantification of each dataset was performed using Salmon (Patro et al., 2017) and 63,658 *H. vulgare* CDS (Mascher, 2019) and 3,349,186 repeats (IBSC, 2016). Differential expression analysis was then conducted using R and the package DESeq2 (Love et al., 2014). Gene ontologies were retrieved from the available barley gene annotation (Mascher, 2019) and were further analyzed with the DE genes. Bioinformatic analysis of RNA-seq data was carried out in the computing and storage facilities MetaCentrum infrastructure.

qRT-PCR Validation of Selected Differentially Expressed Transcripts

The mRNA levels for selected differentially expressed transcripts was validated by qRT-PCR. As representatives, most up- and down-regulated transcripts from both root and shoot tissues were selected for analysis (Supplementary Table 3). Plant material

was grown and treated as described above. The RNA from control and Cd-treated plants (80 μ M) was isolated in triplicate by NucleoSpin RNA Plant kit (Macherey-Nagel, Germany) and transcribed to cDNA by Transcriptor high fidelity cDNA synthesis kit (Roche). The qRT-PCR reactions were performed on a Light Cycler 96 real-time PCR system (Roche, USA) using the 2x SYBR Master Mix (Top-Bio, Czech Republic). Relative expression of shoot and root transcripts was assessed using CFX Manager™ Software (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

HvPCR2 Sequence Analysis

Amino acid identity for each *HvPCR2* gene and previously described *Arabidopsis* *PCR* genes (Song et al., 2004, 2010) was determined using alignment algorithm MAFFT v7.450 (Katoh and Standley, 2013). The genomic sequence of *Hordeum vulgare* (IBSC_v2), *Oryza sativa Indica* group (ASM465v1) *Zea mays* (B73_RefGen_v4) and *Musa acuminata* (ASM31385v1) were used to analyze genomic loci containing *PCR2* homologs, data were retrieved and visualized using EnsemblPlants website (Howe et al., 2020).

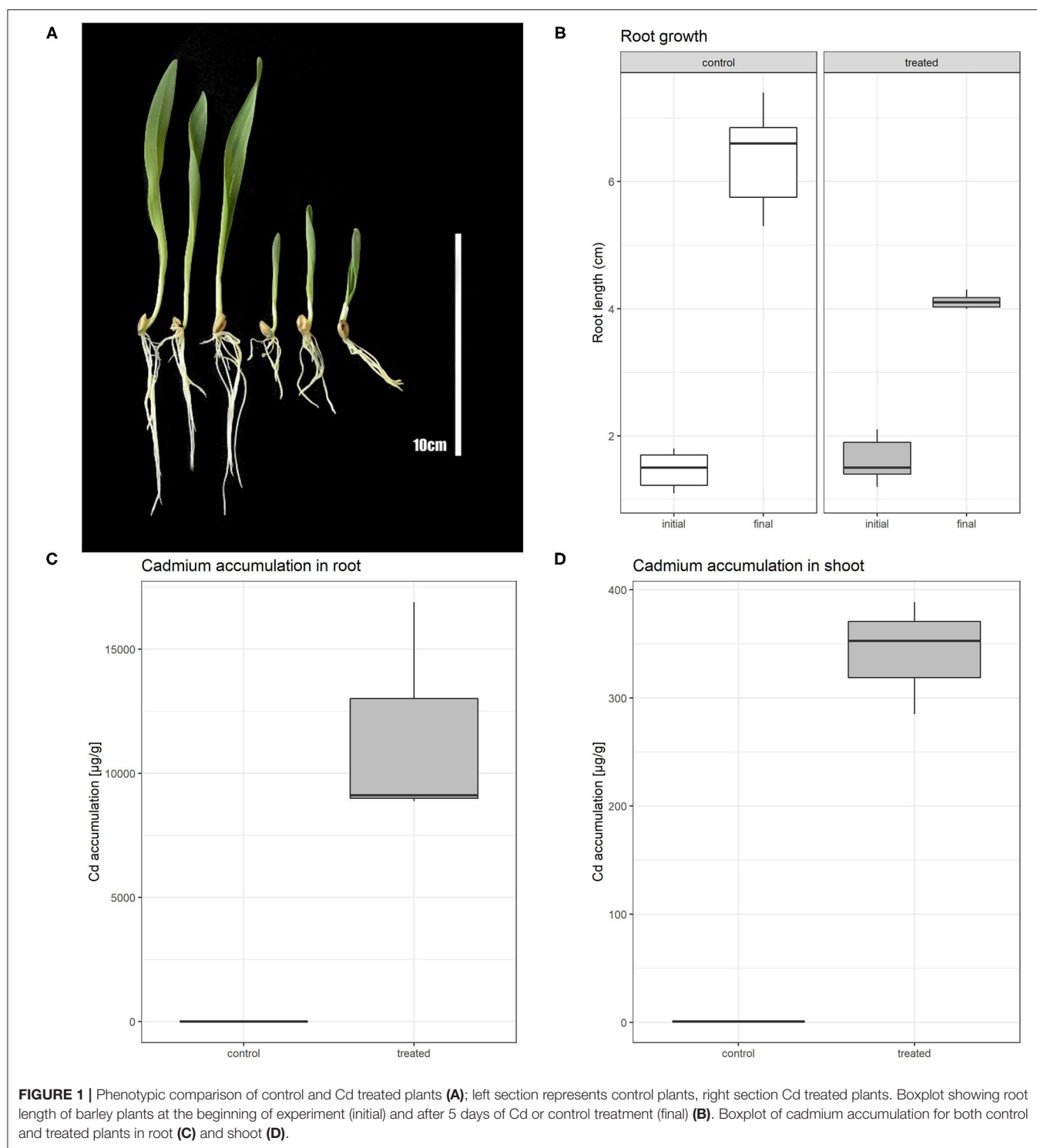
Heterologous Expression in Cd-Sensitive Yeast Mutant

To test the function of *HvPCR2* genes, all five identified copies were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* cadmium hypersensitive mutant strain DTY168 (*MAT α* , *his6*, *leu2-3-112*, *ura3-52*, *ycf1::hisG*) lacking the yeast cadmium factor 1 gene (Szczypka et al., 1994). *HvPCR2.1-5* coding sequences were amplified from Morex cDNA (Supplementary Table 4) and cloned into p426 under the control of yeast GDP (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) promoter (Mumberg et al., 1995). Vectors containing *HvPCR2* fragments and empty vector p426 were introduced into the DTY168 strain by lithium acetate. Yeast transformants were grown overnight, OD₆₀₀ was adjusted to 0.5, four 10-fold dilutions were made, and each culture was spotted on SD-Ura plates and SD-Ura plates supplemented with 50 μ M CdCl₂. Plates were incubated for 5–6 days at 28°C.

RESULTS

Barley Growth and Cell Proliferation Inhibition by Cd Stress

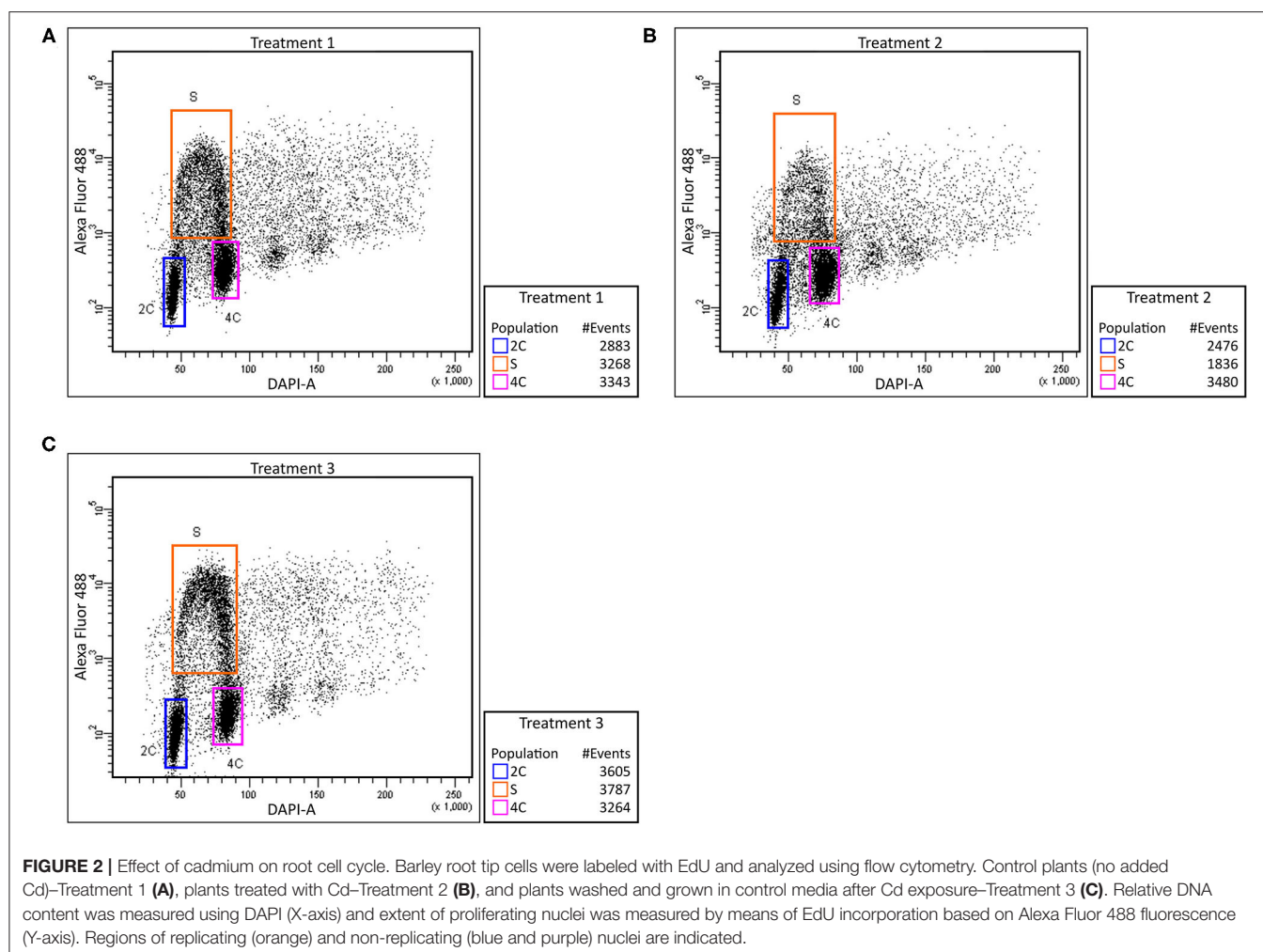
The effect of 80 μ M Cd on barley after a 5-day treatment comprised of root shortening and overall growth retardation (Figure 1A). Root growth of Cd-treated plants was inhibited by ~50% in comparison with non-treated plants (Figure 1B; Supplementary Table 1). Further, we measured the Cd content in control and treated plants in order to obtain information about the distribution of Cd in barley plants in both root and shoot tissues. The Cd content in roots was in control conditions approximately double of the Cd concentration in shoots. Cd-treated plants accumulated roughly 6,600 times more Cd in roots than non-treated plants. This result shows a strong accumulation



of Cd in the root and restriction of Cd translocation to the aerial tissues in high Cd stress (**Figures 1C,D; Supplementary Table 2**).

The labeled thymidine analog (EdU) was used to monitor cell cycle abnormalities of Cd treated plants and to determine the Cd effect on root growth at the cellular level. In control plants, we observed an approximately equal number of cells before, during

and after the S phase (**Figure 2A**). Cd-treated roots contained a significantly lower number of S phase cells (**Figure 2B**). Such a decrease may suggest that the cells entering the S phase are the most susceptible to Cd treatment. After removing the Cd by washing the roots, the number of cells in each state went back to the level similar to the non-treated control (**Figure 2C**).



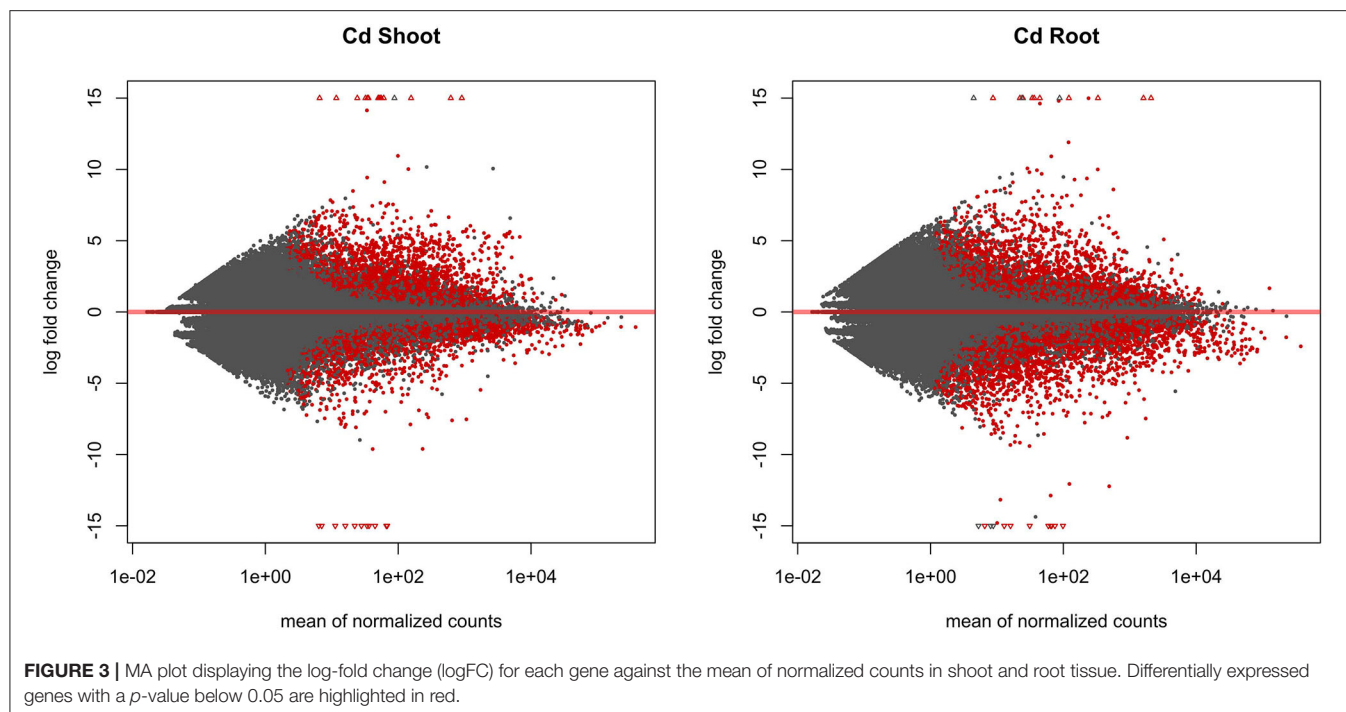
These findings indicate that the major reduction in root growth is caused by the suppression of the cell division process namely in G1/S cells.

Identification of Transcripts Deregulated by Cd

The entire dataset subjected to differential expression analysis contains 20.7 million of non-treated and 24.3 million of cadmium treated RNA reads (Kintlová et al., 2017). The analysis was performed using the DESeq2 package from Bioconductor (Love et al., 2014). We controlled the clustering of both control and cadmium replicates using multidimensional scaling for each tissue (Supplementary Figure 1). We identified 14,459 differentially expressed (DE) transcribed sequences in both root and shoot tissues using a *p*-value threshold of 0.05 (Figure 3). The overall count of DE after cadmium treatment is 14,459 (Figure 4; Supplementary Tables 6, 7) with 2,927 transcripts that have a significant change in their expression in both tissues while 7,355 were differentially expressed only in the root and 4,177 in the shoot. Separating the set of DE transcripts between up- and down-regulated reveals that most of the transcripts in the root and shoot are down-regulated (3,509

up vs. 3,846 down in root and 1,825 up vs. 2,352 down in shoot). Differentially expressed transcripts present in both tissues follow the same pattern of expression change with more down-regulated transcripts than up-regulated ones. From the 2,927 DE transcripts in both tissues, 903 are up-regulated, and 1,438 are down-regulated in roots and shoots. Nevertheless, 288 transcripts are down-regulated in roots while up-regulated in shoots, and 298 transcripts are up-regulated in roots while down-regulated in shoots (Figure 4).

Analysis of the transcripts related to repeated elements revealed that 2,285 elements (from total 14,459 DE transcribed sequences) are differentially expressed (Supplementary Figure 2). 59% are specifically differentially expressed in the root while 32% in the shoot. About 75% of the total of DE transposable elements are long terminal repeats (LTR). Transposable element related transcripts are more expressed in roots than shoots, similar to the genes-related ones, but unlike gene transcripts, they are more often up-regulated. Most of the expressed LTR belong to an unknown subfamily; otherwise, DE LTR *Gypsy* are more abundant than LTR *Copia*, followed by CACTA, nonLTR/LINE, and MITE elements (Supplementary Figure 3; Supplementary Table 6).



The 10 most abundant gene ontology (GO) annotations for both roots and shoots were assessed for DE transcripts. Comparison of the results reveals that regardless of the tissue, most of the genes influenced by cadmium are: involved in oxidation-reduction processes and phosphorylation, have mainly ATP binding or transferase activity functions and are part of the membrane. Moreover, the genes involved in protein phosphorylation and protein kinase activity are also influenced, but the majority of them are up-regulated while the genes involved in catalytic activity are mainly down-regulated (Figure 5).

qRT-PCR Validation

In order to validate RNA-seq results, we selected a total of six transcripts for which we designed qPCR primers (Supplementary Table 3). *HORVU.MOREX.r2.7HG0558200* is up-regulated in shoots, *HORVU.MOREX.r2.6HG0456470* is down-regulated in shoots and *HORVU.MOREX.r2.1HG0006620* is not differentially expressed in shoots. *HORVU.MOREX.r2.2HG0162330* is up-regulated in roots, *HORVU.MOREX.r2.7HG0538720* is down-regulated in roots and *HORVU.MOREX.r2.7HG0561140* is not differentially expressed in roots (Supplementary Figure 4). The qPCR results correspond to the mRNA level identified by differential expression analysis for each of the six candidates (Supplementary Figure 5).

HvPCR2 Genes Are Upregulated by Cd and Restore Tolerance in Cd Sensitive Yeast Mutant

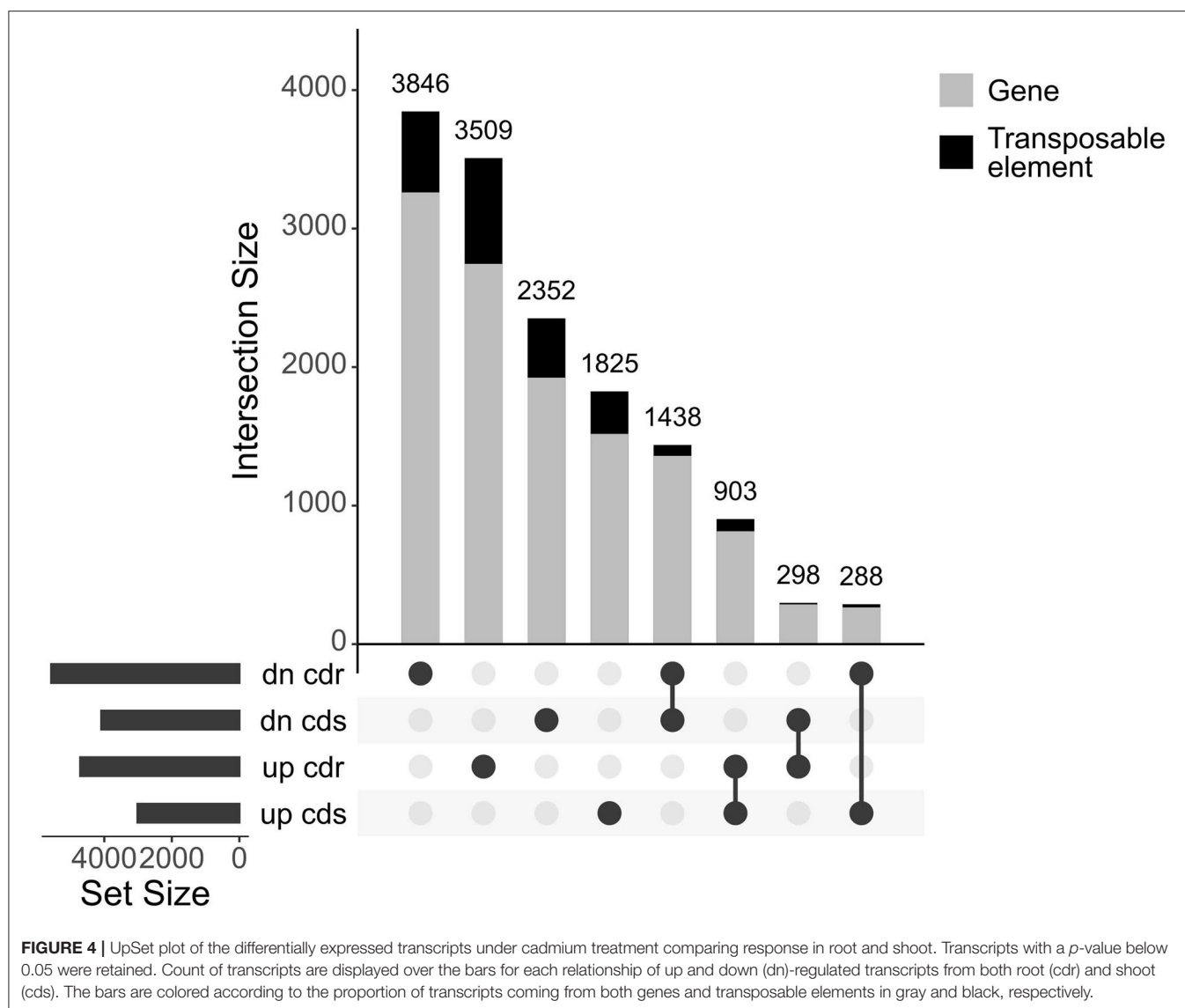
Among the most Cd upregulated transcripts, we identified homologs of *PLANT CADMIUM*

RESISTANCE 2 (PCR2) gene. Predicted protein sequences show the highest similarity with AtPCR2 protein (Supplementary Table 5), therefore we have designated these genes *HvPCR2.1* (*HORVU.MOREX.r2.1HG0071220*), *HvPCR2.2* (*HORVU.MOREX.r2.5HG0439660*), *HvPCR2.3* (*HORVU.MOREX.r2.5HG0439680*), and *HvPCR2.4* (*HORVU.MOREX.r2.5HG0439700*). While the mRNA level of *HvPCR2.1* is significantly upregulated by Cd in both root and shoot tissue, *HvPCR2.2-4* are upregulated only in the shoot (Figure 6A). Surprisingly, *HvPCR2.2-4* were found to be located in the same locus on barley chromosome 5H (Figure 6B). The fifth copy of *HvPCR2* gene (*HORVU.MOREX.r2.5HG0439690*; denominated *HvPCR2.5*) is also physically present in this ~35 kb spanning region as well (Figure 6B). However, *HvPCR2.5* does not exhibit significant upregulation upon Cd treatment. Similar tandem arrangement of *PCR2* homologs have been found in rice (~30 kb locus on chromosome 3 containing six *PCR2* homologs), corn (~90 kb locus on chromosome 5 containing three *PCR2* homologs) and banana (~30 kb locus on chromosome 3 containing three *PCR2* homologs) (Supplementary Figure 23).

To elucidate the function of *HvPCR2* genes in metal tolerance, we expressed them in the cadmium sensitive yeast strain DTY168 ($\Delta ycf1$), which showed restricted growth at increased Cd concentrations. Growth of the DTY168 harboring empty vector p426 GDP was strongly inhibited by 50 μ M CdCl₂, whereas the same yeast mutant strain expressing either of the *HvPCR2* genes was able to restore Cd tolerance (Figure 6C).

DISCUSSION

Cadmium is known to inhibit the growth of wheat (Sun et al., 2005) and other important crop relatives to barley



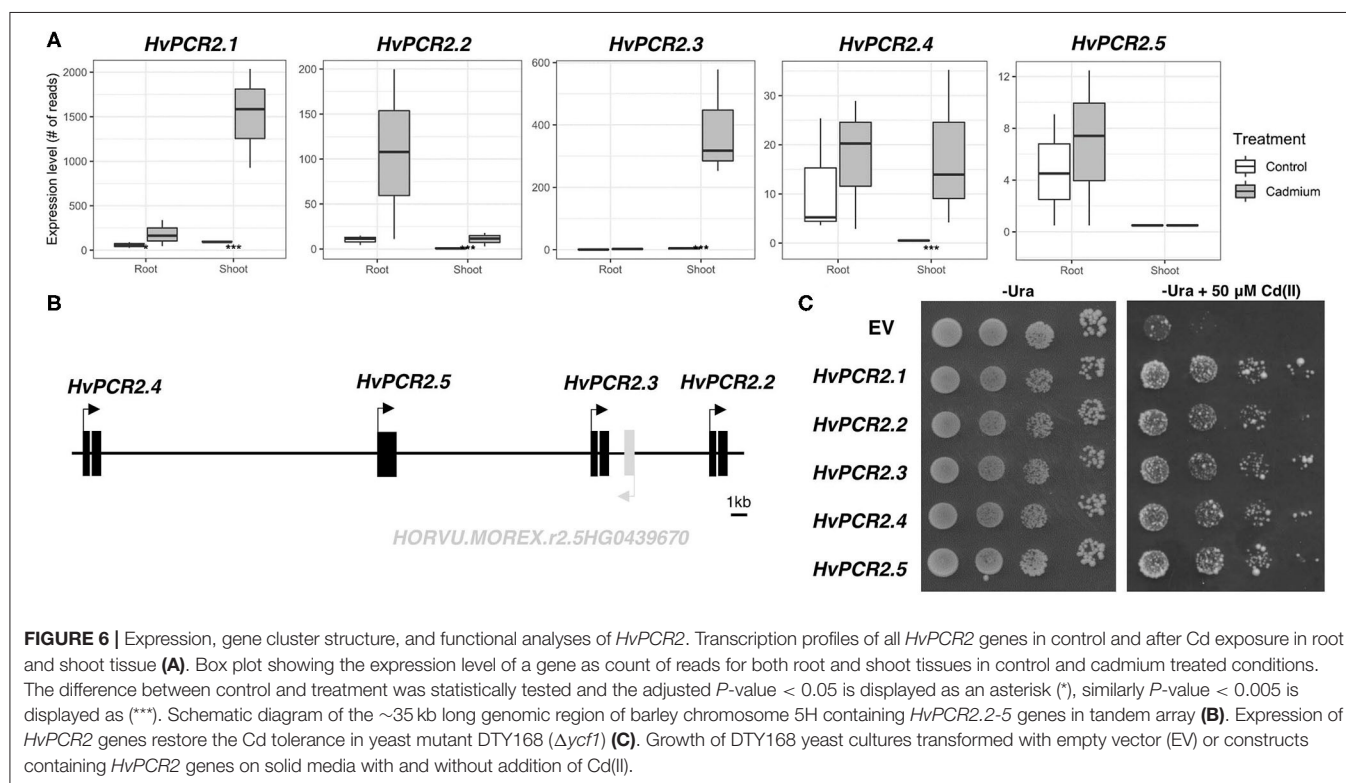
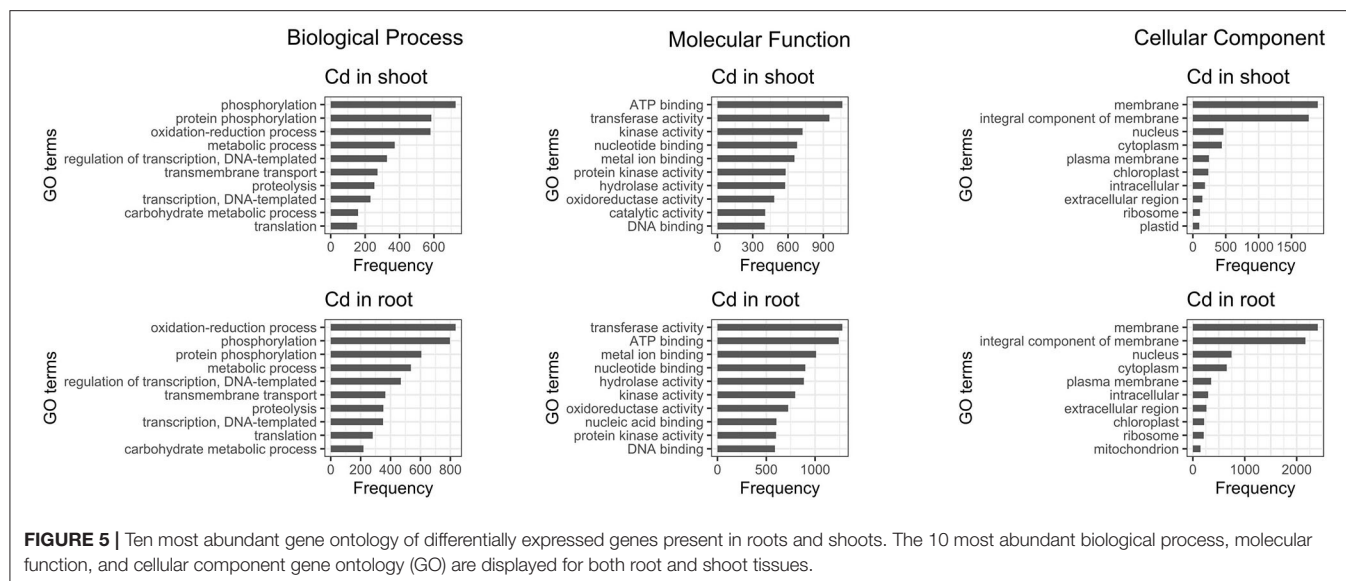
(Rizwan et al., 2016; Ling et al., 2017). RNA-seq based comparative transcriptomics have been successfully used to uncover the mechanisms of plant stress response (Tombuloglu et al., 2015; Haak et al., 2017). In this study, we analyzed the transcriptome profiles of barley plants affected by elevated cadmium concentrations. We have selected *Hordeum vulgare* cv. Morex because of the availability of its genome and reference transcriptome sequence (Mascher, 2019).

Cd Concentration in Barley Plants and Cd Effect on Cell Proliferation

To provide quantitative information about the presence of cadmium in barley plants, we measured the Cd concentration in roots and shoots separately (Figures 1C,D). We found that under cadmium treatment roots and shoots were able to accumulate a high concentration of this element. While Cd-treated shoots accumulate up to 300 times more Cd than in the non-treated condition, roots accumulated more than 6,600 times of this

element. This difference indicates the limitations in the transport of cadmium in the aerial part of the plant.

Monitoring the cell cycle by EdU labeling revealed a lower number of S phase cells in Cd-treated roots. Such a decrease may suggest that the cells before G1/S transition are the most susceptible to Cd treatment. The recovery of the number of cells after removing the Cd by washing the root indicates that the major reduction in root growth is caused by the suppression of the cell division process namely in G1 phase cells (Figure 2). While the negative influence of Cd toxicity on cell proliferation is well-known in barley and wheat (Zhang and Yang, 1994; Paradiso et al., 2008), this phenomenon is not yet fully understood. Presumably, a Cd-induced ROS accumulation may cause an oxidative posttranslational modification of cyclin D and A-type cyclin-dependent kinase, thereby reducing the functionality of essential G1/S transition regulators (Pena et al., 2012). Similar reductions in the number of S phase cells have been reported in Cd-treated *Zea mays* (Bertels et al., 2020), *Sorghum bicolor*



(Zhan et al., 2017), and *Vicia faba* (Zabka et al., 2021) as well as in Al-treated barley (Jaskowiak et al., 2018). Although Cd is also known to cause abnormal mitosis and aberrant chromosomes in barley (Shi et al., 2016), our data suggest a substantial effect of Cd toxicity at the level of G1-to-S-phase transition.

Differentially Expressed Transcripts

In our study, we identified over 14,400 transcripts differentially expressed in Cd treated plants, with about half of them being

down-regulated. The total number of DE transcripts were lower in shoots (7,104) than in roots (10,282), consistent with the Cd concentration level detected in both tissues (Figures 1C,D). Previous transcriptomic studies reporting the effect of cadmium on barley focused on Cd tolerance, rather than response to Cd excess (Cao et al., 2014; Derakhshani et al., 2020). As the general objective of our study was to describe the overall response to cadmium in barley, we identified higher number of differentially expressed transcripts.

First, we analyzed the repetitive fraction of the barley genome at the transcriptional level to quantify the impact of cadmium on the activity of individual elements. Abiotic stress is frequently accompanied by the transcriptional and transpositional activation of transposable elements (TEs) (Grandbastien, 1998). Moreover, cadmium related stress leads to the establishment of a new balance of expressed/repressed chromatin (Greco et al., 2012). We found that the vast majority of transcriptionally affected repeats represent LTR retrotransposons (*Copia*, *Gypsy* and unknown families) and CACTA, nonLTR/LINE and MITE elements (**Supplementary Figure 3**). Transcriptional response to cadmium treatment is more evident in root tissue (**Supplementary Figures 2, 3**) including both upregulation and downregulation of individual TEs (**Supplementary Table 6**).

Stress Response and ROS Metabolism

DE transcripts are mostly connected with oxidation-reduction processes, protein phosphorylation, metabolic processes, regulation of transcription and transmembrane transport (**Figure 5**). Among them, the most upregulated transcripts match genes encoding proteins involved in ROS metabolism and oxidative stress such as tau class glutathione-S-transferase (GST, **Supplementary Figures 6, 7**), purple acid phosphatase (PAP, **Supplementary Figure 8**), multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3, **Supplementary Figure 9**), and cytochrome P450 enzymes (P450, **Supplementary Figures 10, 11**). All of these are also known to play a role in the detoxification of xenobiotics or abiotic stress signaling (Bovet et al., 2003; Schenk et al., 2013; Kumar and Trivedi, 2018; Pandian et al., 2020). Cadmium is known to induce oxidative stress in plants (Grobela et al., 2019); therefore, the enhancement of ROS scavenging mechanisms represents a straightforward reaction to elevated Cd concentration. In particular, increased expression of GST and P450 enzymes in response to Cd stress has been previously described in rice (Ogawa et al., 2009) and the simultaneous overexpression of both enzymes in *Medicago truncatula* led to improved tolerance to mercury contamination (Zhang et al., 2013). In addition, four genes encoding homologs to putative chromatin remodeler OXIDATIVE STRESS 3 (OX3) were upregulated (**Supplementary Figure 12**). Although the molecular mechanism of OX3 action is not completely understood, this enzyme provides tolerance to Cd and oxidative stress in *Arabidopsis* and fission yeast (Blanvillain et al., 2009).

Cell Wall Formation and Maintenance

Other coding genes showing significant upregulation after Cd treatment, include those involved in cell wall formation and modification. Transcripts coding for lignin biosynthesis components, namely phenylalanine ammonia lyase (PAL; **Supplementary Figure 13**), shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase (HCT; **Supplementary Figure 14**), cinnamoyl-CoA reductase (CCR; **Supplementary Figure 15**), cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD; **Supplementary Figure 16**), laccase 7 (LAC7; **Supplementary Figure 17**), and peroxidase (POD;

Supplementary Figure 18) have been highly upregulated in Cd response. PAL is the key enzyme of the lignin biosynthesis acting at the beginning of this metabolic pathway. Accordingly, the *Arabidopsis pal1 pal2 pal3 pal4* quadruple mutant showed approximately four times decreased lignin content in its cell wall compared with the wild-type (Huang et al., 2010). PAL activity or expression is known to be induced by Cd stress in various plant species including pea (Głowacka et al., 2019), *Medicago sativa* (Gutsch et al., 2019), *Salix matsudana* (Yang et al., 2015), rice (Hsu and Kao, 2005), and wheat (Shakirova et al., 2016). HCT, CCR and CAD catalyze the synthesis of monolignols, which are then polymerized into lignin by LAC and POD enzymes (Liu et al., 2018). As the lignification is improving the cell wall impermeability and lignin itself binds cadmium (Parrotta et al., 2015), the enhanced expression of these enzymes is likely to result in a lower Cd uptake and a higher Cd sequestration capacity. Notably, altered lignin biosynthesis was proposed to contribute to cadmium tolerance in Zn/Cd hyperaccumulator *Noccaea caerulea* (van de Mortel et al., 2006, 2008). Other highly Cd responsive transcripts encode homologs of wound induced protein 1 (*HORVU.MOREX.r2.1HG0053620*; **Supplementary Figure 19**) and Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (*HORVU.MOREX.r2.2HG0164280*, **Supplementary Figure 19**), both of which have been reported to function in cell wall integrity sensing and responding to biotic and abiotic stress (Logemann and Schell, 1989; Van der Does et al., 2017).

Metal Transport

Metal ion transporters play significant role in heavy metal homeostasis and detoxification (Jain et al., 2018). In our dataset, five deregulated transcripts have been identified to encode the members of the ZRT/IRT-like protein (ZIP) family (**Supplementary Figure 20**). ZIP transmembrane proteins are known to mediate cellular uptake, intracellular trafficking and detoxification of heavy metal cations such as Zn, Fe, Cd, Cu, Mn, Co, and Ni (Ajeesh Krishna et al., 2020). The role of selected ZIP transporters has been studied extensively in monocots (Li et al., 2013; Evens et al., 2017; Zheng et al., 2018) including barley (Pedas et al., 2009; Tiong et al., 2015). Interestingly, QTL mapping in barley identified two ZIP transcripts among the candidate genes for Cd tolerance (Derakhshani et al., 2020). In our dataset, we identified three previously studied ZIP transporters—*HvZIP1* (*HORVU.MOREX.r2.3HG0273580*), *HvZIP3* (*HORVU.MOREX.r2.2HG0158440*), and *HvZIP6* (*HORVU.MOREX.r2.1HG0020460*). *HvZIP1* was found to be upregulated by Cd in both tissues, but the effect is much stronger in roots (**Supplementary Figure 20**). An identical expression pattern has been found for *OsZIP1*, a rice ortholog for *HvZIP1*, that functions as a heavy metal efflux transporter maintaining detoxification of Zn, Cu and Cd in rice (Liu et al., 2019). Upon cadmium exposure, the *HvZIP3* shows upregulation in roots but downregulation in shoots (**Supplementary Figure 20**). The transgenic barley plants with reduced *HvZIP3* expression showed a significant increase in grain Cd accumulation (Sun et al., 2015). Further, a co-expression of rice *HvZIP3* homolog (*OsZIP3*) with rice

heavy metal transporter genes *HEAVY METAL ATPASE 2* (*OsHMA2*) and *LOW-AFFINITY CATION TRANSPORTER1* (*OsLCT1*) resulted in a decrease in Cd accumulation and enhanced Cd tolerance (Tian et al., 2019). *HvZIP6* shows strong upregulation in shoots only (**Supplementary Figure 20**). So far, *HvZIP6* was studied only in relation to Zn homeostasis (Tiong et al., 2015) but *OsZIP6* is known to transport Cd^{2+} cations (Kavitha et al., 2015), therefore *HvZIP6* may take part in shoot Cd detoxification. Two previously unknown barley ZIP transporters encoded by *HORVU.MOREX.r2.2HG0098160* and *HORVU.MOREX.r2.7HG0603680*, show downregulation after Cd treatment (**Supplementary Figure 20**), which may suggest these could mediate Cd uptake.

Another group of deregulated genes encoding cation transmembrane transporters are members of the *NATURAL RESISTANCE ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN* (*NRAMP*) family. In Cd-treated roots, *HvNRAMP5* (*HORVU.MOREX.r2.4HG0337880*) exhibited several-fold downregulation (**Supplementary Figure 21**), which is consistent with the role of *HvNRAMP5* as a Cd uptake transporter (Astolfi et al., 2014; Wu et al., 2016). Conversely, the *HvNRAMP5* mRNA level slightly increased after Cd excess in shoot, which may imply involvement of this gene in shoot Cd distribution in stress condition. The *HvNRAMP2* (*HORVU.MOREX.r2.4HG0331160*) were downregulated in shoots (**Supplementary Figure 21**). As the genome-wide association mapping study has proposed *OsNRAMP2* to be responsible for Cd accumulation (Zhao et al., 2018), the downregulation of this transcript in barley might serve as a defense against accumulation of high Cd concentrations in shoot. The two remainder transcriptionally deregulated transporters from the *NRAMP* family were *HvNRAMP1* (*HORVU.MOREX.r2.7HG0610240*; upregulated in roots) and *HvNRAMP6* (*HORVU.MOREX.r2.3HG0215920*; upregulated in shoots) (**Supplementary Figure 21**).

Two transcripts encoding *HEAVY METAL ATPASE* (*HMA*), a P-type ATPase cation transporter family, were identified as being responsive to Cd. *HvHMA1* (*HORVU.MOREX.r2.5HG0401460*) is expressed only in shoot tissue and no transcripts are detected after Cd treatment (**Supplementary Figure 22**). This pattern is similar to results published previously (Mikkelsen et al., 2012) and suggests that Cd induced downregulation of protoplast- and aleurone layer-localized *HvHMA1* helps to prevent the cadmium transport into grains and protoplasts. The mRNA level of *HvHMA3* gene (*HORVU.MOREX.r2.7HG0603650*) was decreased by Cd treatment (**Supplementary Figure 22**). Unfortunately, the function of this *HMA3* copy has not been studied yet, so it is hard to clarify the effect of its downregulation. On the other hand, different *HvHMA3* gene (*HORVU5Hr1G094430*) has been proposed to play a crucial role in grain Cd accumulation (Wu et al., 2015; Lei et al., 2020).

Remarkably, four homologs of *PLANT CADMIUM RESISTANCE 2* (*PCR2*), encoding a Cys-rich domain containing membrane Cd/Zn efflux transporter (Song et al., 2010), have

been identified among the Cd upregulated transcripts in shoot (**Figure 6A**). *PCR1* and *PCR2* genes were previously studied in *Arabidopsis* and it was proposed that they play a role in Zn/Cd detoxification and distribution (Song et al., 2004, 2010). The *Arabidopsis pcr2* loss-of-function mutant is sensitive to Cd (Song et al., 2010). In rice, overexpression of *OsPCR1* and *OsPCR3* mediated Cd tolerance and lowered Cd accumulation (Wang et al., 2019). As there are no data regarding the function of *PCR2* genes in monocots, we expressed barley *HvPCR2* genes in a Cd sensitive yeast mutant. All five *HvPCR2* genes restored the Cd tolerance in yeast (**Figure 6C**), hence it is probable that they retain a similar function as *Arabidopsis* homologs. Moreover, we have found out that four *HvPCR2* genes are located on barley chromosome 5H in tandem arrangement (**Figure 6B**), probably due to local gene duplication events. A similar arrangement of multiple *PCR2* copies was found in genomic regions of rice, corn and banana (**Supplementary Figure 23**), suggesting that *PCR2* multiplication might be common in monocots. Duplication of heavy metal transporter genes is known to contribute to Cd tolerance in metal hyperaccumulators *Arabidopsis halleri* and *Nocca caerulea* (Hanikenne et al., 2008; Ó Lochlainn et al., 2011). Beside increasing gene dosage, the duplication may also allow functional divergence. It is therefore possible that the increased copy number of *PCR2* genes originated as an adaptive response to Cd toxicity and/or Zn homeostasis requirements.

CONCLUSION

In summary, we investigated the impact of cadmium excess at the transcriptional level in barley. Among Cd-induced transcripts, we have identified the *HvPCR2* gene as one of the most cadmium responsive. Surprisingly, further analysis suggested local multiplication of the gene on barley chromosome 5H as well as in other monocot species. Using gene complementation in yeast mutants we confirmed the functionality of individual *HvPCR2* copies. This study may provide a valuable resource for the potential exploitation of the role of the *HvPCR2* gene complex in cadmium tolerance in plants.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: Sequenced reads are available in NCBI SRA (sequence read archive) under accession SRR5452097 to SRR5452108 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA382490>).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MK and VH conducted the research in the laboratory. Computational analysis done by NB. All authors were involved in planning the experiments and contributed to the manuscript writing.

FUNDING

The financial support of the Technology Agency of the Czech Republic (project no. TN01000048) was gratefully acknowledged.

ACKNOWLEDGMENTS

Computational resources were supplied by the project e-Infrastruktura CZ (e-INFRA LM2018140) provided

REFERENCES

- Ajeesh Krishna, T. P., Maharajan, T., Victor Roch, G., Ignacimuthu, S., and Antony Ceasar, S. (2020). Structure, function, regulation and phylogenetic relationship of ZIP family transporters of plants. *Front. Plant Sci.* 11:662. doi: 10.3389/fpls.2020.00662
- Astolfi, S., Ortolani, M. R., Catarcione, G., Paolacci, A. R., Cesco, S., Pinton, R., et al. (2014). Cadmium exposure affects iron acquisition in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *Physiol. Plant* 152, 646–659. doi: 10.1111/ppl.12207
- Atkinson, N. J., and Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J. Exp. Bot.* 63, 3523–3544. doi: 10.1093/jxb/ers100
- Bertels, J., Huybrechts, M., Hendrix, S., Bervoets, L., Cuypers, A., and Beemster, G. T. S. (2020). Cadmium inhibits cell cycle progression and specifically accumulates in the maize leaf meristem. *J. Exp. Bot.* 71, 6418–6428. doi: 10.1093/jxb/eraa385
- Blanvillain, R., Kim, J. H., Wu, S., Lima, A., and Ow, D. W. (2009). OXIDATIVE STRESS 3 is a chromatin-associated factor involved in tolerance to heavy metals and oxidative stress. *Plant J.* 57, 654–665. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2008.03717.x
- Bovet, L., Eggmann, T., Meylan-Bettex, M., Polier, J., Kammer, P., Marin, E., et al. (2003). Transcript levels of AtMRPs after cadmium treatment: induction of AtMRP3. *Plant. Cell Environ.* 26, 371–381. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.00968.x
- Cao, F., Chen, F., Sun, H., Zhang, G., Chen, Z.-H., and Wu, F. (2014). Genome-wide transcriptome and functional analysis of two contrasting genotypes reveals key genes for cadmium tolerance in barley. *BMC Genomics* 15:611. doi: 10.1186/1471-2164-15-611
- Clarkson, D. T., and Lüttge, U. (1989). Mineral nutrition: divalent cations, transport, and compartmentalization. *Prog. Bot.* 51, 93–112. doi: 10.1007/978-3-642-75154-7_7
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., and Furini, A. (2008). How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 1268–1280. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00737.x
- Delhaize, E., and Ryan, P. R. (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107, 315–321. doi: 10.1104/pp.107.2.315
- Derakhshani, B., Jafary, H., Zanjani, B. M., Hasanpur, K., Mishina, K., Tanaka, T., et al. (2020). Combined QTL mapping and RNA-Seq profiling reveals candidate genes associated with cadmium tolerance in barley. *PLoS ONE* 15, 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0230820
- Evens, N. P., Buchner, P., Williams, L. E., and Hawkesford, M. J. (2017). The role of ZIP transporters and group F bZIP transcription factors in the Zn-deficiency response of wheat (*Triticum aestivum*). *Plant J.* 92, 291–304. doi: 10.1111/tpj.13655
- Fusco, N., Micheletto, L., Dal Corso, G., Borgato, L., and Furini, A. (2005). Identification of cadmium-regulated genes by cDNA-AFLP in the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L. *J. Exp. Bot.* 56, 3017–3027. doi: 10.1093/jxb/eri299
- Głowacka, K., Zróbek-Sokolnik, A., Okorski, A., and Najdzion, J. (2019). The Effect of cadmium on the activity of stress-related enzymes and the ultrastructure of pea roots. *Plants* (Basel, Switzerland) 8:413. doi: 10.3390/plants8100413
- Grandbastien, M.-A. (1998). Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci.* 3, 181–187. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01232-1
- within the program Projects of Large Research, Development and Innovations Infrastructures. We would like to thank Václav Bačovský for critically evaluating our manuscript.
- ## SUPPLEMENTARY MATERIAL
- The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.629089/full#supplementary-material>
- Greco, M., Chiappetta, A., Bruno, L., and Bitonti, M. B. (2012). In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *J. Exp. Bot.* 63, 695–709. doi: 10.1093/jxb/err313
- Grobelak, A., Swiatek, J., Murtaś, A., and Jaskulak, M. (2019). “Chapter 9—cadmium-induced oxidative stress in plants, cadmium toxicity, and tolerance in plants: from physiology to remediation,” in eds M. Hasanuzzaman, M. N. V. Prasad, and P. Fujita (Cambridge, MA: Academic Press), 213–231.
- Gutsch, A., Sergeant, K., Keunen, E., Prinsen, E., Guerriero, G., Renaut, J., et al. (2019). Does long-term cadmium exposure influence the composition of pectic polysaccharides in the cell wall of *Medicago sativa* stems? *BMC Plant Biol.* 19:271. doi: 10.1186/s12870-019-1859-y
- Haak, D. C., Fukao, T., Grene, R., Hua, Z., Ivanov, R., Perrella, G., et al. (2017). Multilevel regulation of abiotic stress responses in plants. *Front. Plant Sci.* 8:1564. doi: 10.3389/fpls.2017.01564
- Hanikenne, M., Talke, I. N., Haydon, M. J., Lanz, C., Nolte, A., and Motte, P. (2008). Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature* 453, 391–395. doi: 10.1038/nature06877
- Howe, K. L., Contreras-Moreira, B., De Silva, N., Maslen, G., Akanni, W., Allen, J., et al. (2020). Ensembl genomes 2020—enabling non-vertebrate genomic research. *Nucleic Acids Res.* 48, D689–D695. doi: 10.1093/nar/gkz890
- Hsu, Y. T., and Kao, C. H. (2005). Abscisic acid accumulation and cadmium tolerance in rice seedlings. *Physiol. Plant.* 124, 71–80. doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00490.x
- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y.-H., et al. (2010). Functional analysis of the arabidopsis andlt;emandgt;palandlt;emandgt; gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiol.* 153, 1526 LP–1538 LP. doi: 10.1104/pp.110.157370
- IBSC (2016). *Positions and Classifications of Repetitive Elements in the Genome of Barley cv. Morex*. Gatersleben: e!DAL-Plant Genomics and Phenomics Research Data Repository (PGP), IPK Gatersleben.
- Jain, S., Muneer, S., Guerriero, G., Liu, S., Vishwakarma, K., Chauhan, D. K., et al. (2018). Tracing the role of plant proteins in the response to metal toxicity: a comprehensive review. *Plant Signal. Behav.* 13:e1507401. doi: 10.1080/15592324.2018.1507401
- Jaskowiak, J., Tkaczyk, O., Slota, M., Kwasniewska, J., and Szarejko, I. (2018). Analysis of aluminum toxicity in *Hordeum vulgare* roots with an emphasis on DNA integrity and cell cycle. *PLoS ONE* 13:e0193156. doi: 10.1371/journal.pone.0193156
- Katoh, K., and Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010
- Kavitha, P. G., Kuruvilla, S., and Mathew, M. K. (2015). Functional characterization of a transition metal ion transporter, OsZIP6 from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 97, 165–174. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.10.005
- Kintlová, M., Blavet, N., Cegan, R., and Hobza, R. (2017). Transcriptome of barley under three different heavy metal stress reaction. *Genomics Data* 13, 15–17. doi: 10.1016/j.gdata.2017.05.016
- Kumar, S., and Trivedi, P. K. (2018). Glutathione S-transferases: role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in Plants. *Front. Plant Sci.* 9:751. doi: 10.3389/fpls.2018.00751
- Lei, G. J., Fujii-Kashino, M., Wu, D. Z., Hisano, H., Saisho, D., Deng, F., et al. (2020). Breeding for low cadmium barley by introgression of a Sukkula-like transposable element. *Nat. Food* 1, 489–499. doi: 10.1038/s43016-020-0130-x

- Li, S., Zhou, X., Huang, Y., Zhu, L., Zhang, S., Zhao, Y., et al. (2013). Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC Plant Biol.* 13:114. doi: 10.1186/1471-2229-13-114
- Lin, C. Y., Trinh, N. N., Fu, S. F., Hsiung, Y. C., Chia, L. C., Lin, C. W., et al. (2013). Comparison of early transcriptome responses to copper and cadmium in rice roots. *Plant Mol. Biol.* 81, 507–522. doi: 10.1007/s11103-013-0020-9
- Ling, T., Gao, Q., Du, H., Zhao, Q., and Ren, J. (2017). Growing, physiological responses and Cd uptake of Corn (*Zea mays* L.) under different Cd supply. *Chem. Speciat. Bioavailab.* 29, 216–221. doi: 10.1080/09542299.2017.1400924
- Liu, Q., Luo, L., and Zheng, L. (2018). Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 19:335. doi: 10.3390/ijms19020335
- Liu, T., Liu, S., Guan, H., Ma, L., Chen, Z., Gu, H., et al. (2009). Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Environ. Exp. Bot.* 67, 377–386. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.03.016
- Liu, X. S., Feng, S. J., Zhang, B. Q., Wang, M. Q., Cao, H. W., Rono, J. K., et al. (2019). OsZIP1 functions as a metal efflux transporter limiting excess zinc, copper, and cadmium accumulation in rice. *BMC Plant Biol.* 19:283. doi: 10.1186/s12870-019-1899-3
- Logemann, J., and Schell, J. (1989). Nucleotide sequence and regulated expression of a wound-inducible potato gene (*wun1*). *Mol. Gen. Genet.* 219, 81–88. doi: 10.1007/BF00261161
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Mascher, M. (2019). *Pseudomolecules and Annotation of the Second Version of the Reference Genome Sequence Assembly of Barley cv. Morex [Morex V2]*. Gatersleben: eDAL-Plant Genomics and Phenomics Research Data Repository (PGP).
- Mikkelsen, M. D., Pendas, P., Schiller, M., Vincze, E., Mills, R. F., Borg, S., et al. (2012). Barley HvHMA1 is a heavy metal pump involved in mobilizing organellar Zn and Cu and plays a role in metal loading into grains. *PLoS ONE* 7:e49027. doi: 10.1371/journal.pone.0049027
- Mumberg, D., Müller, R., and Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119–122. doi: 10.1016/0378-1119(95)00037-7
- Nriagu, J. O., and Pacyna, J. M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals. *Nature* 333, 134–139. doi: 10.1038/333134a0
- Ó Lochlainn, S., Bowen, H. C., Fray, R. G., Hammond, J. P., King, G. J., White, P. J., et al. (2011). Tandem quadruplication of HMA4 in the zinc (Zn) and cadmium (Cd) hyperaccumulator *Nocca caerulescens*. *PLoS ONE* 6:e17814. doi: 10.1371/journal.pone.0017814
- Ogawa, I., Nakanishi, H., Mori, S., and Nishizawa, N. K. (2009). Time course analysis of gene regulation under cadmium stress in rice. *Plant Soil* 325:97. doi: 10.1007/s11104-009-0116-9
- Pandian, B. A., Sathishraj, R., Djanaguiraman, M., Prasad, P. V. V., and Jugulam, M. (2020). Role of cytochrome P450 enzymes in plant stress response. *Antioxidants* 9, 1–15. doi: 10.3390/antiox9050454
- Paradiso, A., Berardino, R., de Pinto, M. C., Sanità di Toppi, L., Storelli, M. M., Tommasi, F., et al. (2008). Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant Cell Physiol.* 49, 362–374. doi: 10.1093/pcp/pcn013
- Parrotta, L., Guerriero, G., Sergeant, K., Cai, G., and Hausman, J.-F. (2015). Target or barrier? the cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Front. Plant Sci.* 6:133. doi: 10.3389/fpls.2015.00133
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., and Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods* 14, 417–419. doi: 10.1038/nmeth.4197
- Pendas, P., Schjoerring, J. K., and Husted, S. (2009). Identification and characterization of zinc-starvation-induced ZIP transporters from barley roots. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 377–383. doi: 10.1016/j.plaphy.2009.01.006
- Pendas, P., Ytting, C. K., Fuglsang, A. T., Jahn, T. P., Schjoerring, J. K., and Husted, S. (2008). Manganese efficiency in barley: identification and characterization of the metal ion transporter HvIRT1. *Plant Physiol.* 148, 455–466. doi: 10.1104/pp.108.118851
- Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Méndez, A. A. E., and Gallego, S. M. (2012). Oxidative post translational modifications of proteins related to cell cycle are involved in cadmium toxicity in wheat seedlings. *Plant Sci.* 196, 1–7. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.07.008
- Podar, D. (2013). “Plant growth and cultivation,” in *Plant Mineral Nutrients. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Vol. 953, ed F. J. M. Maathuis (Totowa, NJ: Humana Press), 23–45. doi: 10.1007/978-1-62703-152-3_2
- Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Rizvi, H., Zia-ur-Rehman, M., Hannan, F., et al. (2016). Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms, and management: a critical review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 17859–17879. doi: 10.1007/s11356-016-6436-4
- Salt, D. E., and Rauser, W. E. (1995). MgATP-Dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.* 107, 1293–1301. doi: 10.1104/pp.107.4.1293
- Sanità Di Toppi, L., and Gabbriellini, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41, 105–130. doi: 10.1016/S0098-8472(98)00058-6
- Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K., and Ma, J. F. (2012). Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *Plant Cell* 24, 2155–2167. doi: 10.1105/tpc.112.096925
- Schenk, G., Mitić, N., Hanson, G. R., and Comba, P. (2013). Purple acid phosphatase: a journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. *Coord. Chem. Rev.* 257, 473–482. doi: 10.1016/j.ccr.2012.03.020
- Shakirova, F. M., Allagulova, C. R., Maslennikova, D. R., Klyuchnikova, E. O., Avalbaev, A. M., and Bezrukova, M. V. (2016). Salicylic acid-induced protection against cadmium toxicity in wheat plants. *Environ. Exp. Bot.* 122, 19–28. doi: 10.1016/j.envexpbot.2015.08.002
- Shi, Q., Wang, J., Zou, J., Jiang, Z., Wu, H., Wang, J., et al. (2016). Cadmium localization and its toxic effects on root tips of barley. *Zemdirbyste-Agriculture* 103, 151–158. doi: 10.13080/z-a.2016.103.020
- Shim, D., Hwang, J.-U., Lee, J., Lee, S., Choi, Y., An, G., et al. (2009). Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor HsfA4a confer cadmium tolerance in wheat and rice. *Plant Cell* 21, 4031–4043. doi: 10.1105/tpc.109.066902
- Song, W. Y., Choi, K. S., Kim, D. Y., Geisler, M., Park, J., Vincenzetti, V., et al. (2010). Arabidopsis PCR2 is a zinc exporter involved in both zinc extrusion and long-distance zinc transport. *Plant Cell* 22, 2237–2252. doi: 10.1105/tpc.109.070185
- Song, W. Y., Martinoia, E., Lee, J., Kim, D., Kim, D. Y., Vogt, E., et al. (2004). A novel family of Cys-rich membrane proteins mediates cadmium resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 135, 1027–1039. doi: 10.1104/pp.103.037739
- Sun, H., Chen, Z. H., Chen, F., Xie, L., Zhang, G., Vincze, E., et al. (2015). DNA microarray revealed and RNAi plants confirmed key genes conferring low Cd accumulation in barley grains. *BMC Plant Biol.* 15:259. doi: 10.1186/s12870-015-0648-5
- Sun, Q., Wang, X. R., Ding, S. M., and Yuan, X. F. (2005). Effects of exogenous organic chelators on phytochelatin production and its relationship with cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) under cadmium stress. *Chemosphere* 60, 22–31. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.10.068
- Szczyńska, M. S., Wemmie, J. A., Moye-Rowley, W. S., and Thiele, D. J. (1994). A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* 269, 22853–22857. doi: 10.1016/S0021-9258(17)31723-4
- Thurman, D. A., and Collins, J. C. L. (1983). “Metal tolerance mechanism in higher plants review,” in *Proceedings of International Conference on Heavy Metals in the Environment* (Heidelberg), 298–300.
- Tian, S., Liang, S., Qiao, K., Wang, F., Zhang, Y., and Chai, T. (2019). Co-expression of multiple heavy metal transporters changes the translocation, accumulation, and potential oxidative stress of Cd and Zn in rice (*Oryza sativa*). *J. Hazard. Mater.* 380:120853. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.120853
- Tiong, J., McDonald, G., Genc, Y., Shirley, N., Langridge, P., and Huang, C. Y. (2015). Increased expression of six ZIP family genes by zinc (Zn) deficiency is associated with enhanced uptake and root-to-shoot translocation of Zn in barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytol.* 207, 1097–1109. doi: 10.1111/nph.13413
- Tombuloglu, G., Tombuloglu, H., Sakcali, M. S., and Unver, T. (2015). High-throughput transcriptome analysis of barley (*Hordeum vulgare*) exposed to excessive boron. *Gene* 557, 71–81. doi: 10.1016/j.gene.2014.12.012
- van de Mortel, J. E., Almar Villanueva, L., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P. D., et al. (2006). Large Expression differences in genes for

- iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 142, 1127 LP–1147 LP. doi: 10.1104/pp.106.082073
- van de Mortel, J. E., Schat, H., Moerland, P. D., van Themaat, E. V. E. R. L., van der Ent, S., Blankstijn, H., et al. (2008). Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant. Cell Environ.* 31, 301–324. doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01764.x
- Van der Does, D., Boutrot, F., Engelsdorf, T., Rhodes, J., McKenna, J. F., Vernhettes, S., et al. (2017). The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase MIK2/LRR-KISS connects cell wall integrity sensing, root growth and response to abiotic and biotic stresses. *PLoS Genet.* 13:e1006832. doi: 10.1371/journal.pgen.1006832
- Wang, F., Tan, H., Han, J., Zhang, Y., He, X., Ding, Y., et al. (2019). A novel family of PLAC8 motif-containing/PCR genes mediates Cd tolerance and Cd accumulation in rice. *Environ. Sci. Eur.* 31:82. doi: 10.1186/s12302-019-0259-0
- Wu, D., Sato, K., and Ma, J. F. (2015). Genome-wide association mapping of cadmium accumulation in different organs of barley. *New Phytol.* 208, 817–829. doi: 10.1111/nph.13512
- Wu, D., Yamaji, N., Yamane, M., Kashino-Fujii, M., Sato, K., and Ma, J. F. (2016). The HvNramp5 transporter mediates uptake of cadmium and manganese, but not iron. *Plant Physiol.* 172, 1899–1910. doi: 10.1104/pp.16.01189
- Yang, J., Li, K., Zheng, W., Zhang, H., Cao, X., Lan, Y., et al. (2015). Characterization of early transcriptional responses to cadmium in the root and leaf of Cd-resistant *Salix matsudana* Koidz. *BMC Genomics* 16:705. doi: 10.1186/s12864-015-1923-4
- Yang, M., Lin, X., and Yang, X. (1998). Impact of Cd on growth and nutrient accumulation in different plant species. *Chinese J. Appl. Ecol.* 9, 89–94.
- Zabka, A., Winnicki, K., Polit, J. T., Wróblewski, M., and Maszewski, J. (2021). Cadmium (II)-induced oxidative stress results in replication stress and epigenetic modifications in root meristem cell nuclei of vicia faba. *Cells* 10:640. doi: 10.3390/cells10030640
- Zhan, Y., Zhang, C., Zheng, Q., Huang, Z., and Yu, C. (2017). Cadmium stress inhibits the growth of primary roots by interfering auxin homeostasis in *Sorghum bicolor* seedlings. *J. Plant Biol.* 60, 593–603. doi: 10.1007/s12374-017-0024-0
- Zhang, Y., Liu, J., Zhou, Y., Gong, T., Wang, J., and Ge, Y. (2013). Enhanced phytoremediation of mixed heavy metal (mercury)-organic pollutants (trichloroethylene) with transgenic alfalfa co-expressing glutathione S-transferase and human P450 2E1. *J. Hazard. Mater.* 260, 1100–1107. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.06.065
- Zhang, Y., and Yang, X. (1994). The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. *Mutat. Res.* 312, 121–126. doi: 10.1016/0165-1161(94)90016-7
- Zhao, J., Yang, W., Zhang, S., Yang, T., Liu, Q., Dong, J., et al. (2018). Genome-wide association study and candidate gene analysis of rice cadmium accumulation in grain in a diverse rice collection. *Rice (N. Y.)* 11:61. doi: 10.1186/s12284-018-0254-x
- Zheng, X., Chen, L., and Li, X. (2018). *Arabidopsis* and rice showed a distinct pattern in ZIPs genes expression profile in response to Cd stress. *Bot. Stud.* 59:22. doi: 10.1186/s40529-018-0238-6

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Kintlová, Vrána, Hobza, Blavet and Hudzieczek. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

PŘÍLOHA II

Transcriptome of barley under three different heavy metal stress reaction

Kintlová M, Blavet N, Čegan R, Hobza R

Genomics data (2017)

DOI: 10.1016/j.gdata.2017.05.016

IF: 1,18



Data in Brief

Transcriptome of barley under three different heavy metal stress reaction

Martina Kintlová^a, Nicolas Blavet^{a,*}, Radim Cegan^b, Roman Hobza^{a,b}^a Institute of Experimental Botany AS CR, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Slechtitelu 31, CZ 78371 Olomouc, Holice, Czech Republic^b Department of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics of the CAS, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ 61200 Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Barley
RNA-Seq
Transcriptome
Heavy metal
Copper
Zinc
Cadmium

ABSTRACT

In the present study, we used Illumina sequencing technology (HiSeq 2000) to sequence the transcriptome of barley (*Hordeum vulgare* L., cv. Morex) under three different heavy metal stress conditions: copper, zinc and cadmium. For each of those metals, the concentration causing a 50% inhibitory effect for root growth (EC₅₀) was determined. We sequenced the total RNA of both roots and shoots from barley with and without heavy metal treatments in three replicates. Raw reads of the transcriptome project have been deposited in NCBI's BioProject accession number PRJNA382490. The obtained transcriptomic data will be useful for further studies focusing on heavy metal tolerance and comparative transcriptome analysis in barley.

Specifications	
Organism/cell line/tissue	<i>Hordeum vulgare</i> L., cv. Morex/roots and shoots
Sex	N/A
Sequencer or array type	Illumina HiSeq 2000
Data format	Raw data: FASTQ file
Experimental factors	Copper, zinc and cadmium treatment
Experimental features	Roots and shoots from <i>Hordeum vulgare</i> treated with copper, zinc and cadmium were collected for RNA isolation and sequencing.
Consent	N/A
Sample source location	Seeds of <i>H. vulgare</i> L., cv. Morex (Accession number: BCC 906) originating from the United States of America were provided by the Genebank IPK Gatersleben of the Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Germany.

1. Direct link to deposited data

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA382490>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRP104085>.

2. Introduction

Metals are naturally occurring elements present in soil, rock, air, water and living organisms. Some of them are required by plants in trace amounts. Heavy metals such as copper or zinc are important micronutrients and they are necessary for normal plant growth and development. Copper (Cu) plays a role in electron-transfer reactions because of its ability to cycle between an oxidized state Cu(II) and reduced state Cu(I) [1]. Zinc (Zn) is the second most abundant metal in plants. Due to its physico-chemical properties, zinc is a cofactor for many enzymes applied in metabolism of nucleic acids, proteins, carbohydrates and lipids [2]. On the other hand, there are heavy metals like cadmium (Cd), mercury (Hg) or lead (Pb) which have no known function as nutrients. However, essential as well as nonessential metals can be toxic to plants in elevated concentrations. Toxic effect of heavy metals lies in their chemical similarity with other elements. Displacing essential elements in proteins and enzymes disrupts proper function of these biomolecules. Heavy metal excess in cell causes oxidative stress due to formation of free radicals and reactive oxygen species [3,4].

Heavy metals are important environmental pollutants. They enter the environment through natural geochemical cycles, microbial activity and human activities like mining, energy production or agriculture. Heavy metals are dispersed in soils and sediments, dissolved in groundwater and surface water and also diffused in the air and their accumulation are detrimental for humans [5]. There is an urgent need for transcriptome datasets of heavy metal affected plants to screen for relevant genes regulating toxic effect of metal excess [6].

* Corresponding author.

E-mail addresses: kintlova@ueb.cas.cz (M. Kintlová), blavet@ueb.cas.cz (N. Blavet), cegan@ibp.cz (R. Cegan), hobza@ibp.cz (R. Hobza).

Table 1

Half maximal effective concentration of cadmium, copper and zinc on barley root growth. Root elongation was calculated from the average of ten treated plants and ten non-treated plants. EC₅₀ of cadmium, copper and zinc were determined as 80 µM, 50 µM and 570 µM respectively.

Cadmium concentration (µM)	Root elongation (%)	Copper concentration (µM)	Root elongation (%)	Zinc concentration (µM)	Root elongation (%)
0.01	127	0.01	110	200	136
0.1	112	0.1	105	300	148
1	100	1	106	400	104
10	83	10	119	500	79
50	64	20	120	510	78
60	61	30	76	530	75
70	56	40	55	550	79
80	51	50	52	570	50
90	37	60	29	590	41
100	34	70	2	600	39
1000	4	100	2	700	29
		1000	1		

Here we report the transcriptome sequencing of barley (*Hordeum vulgare*) that was growing under heavy metal stress condition, as well as the establishment of the concentration of copper, zinc and cadmium that causes a decrease in root elongation of 50% compare to non-treated plants.

3. Experimental design, materials and methods

3.1. Plant material

Barley seeds (*Hordeum vulgare* L., cv. Morex; Accession number: BCC 906) were obtained from the genebank IPK Gatersleben of the Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Germany.

3.2. Toxicity assay

In order to determine the half maximal effective concentration (EC₅₀) on the growth of the roots for each of the heavy metal: copper, zinc and cadmium, an assay was conducted. The seeds were grown on a series of media in which only the amount of tested heavy metal varied (Table 1).

The pH of the basal nutrient solution (see Table 2 for composition) was adjusted with 1 M of potassium hydroxide (KOH) to 5.5–6.0 (Podar, 2013). Barley seeds were germinated at 20 °C in the dark on filter paper moistened with deionized water. After 48 h the primary root length was measured for ten seeds which were then transferred to polypropylene pots containing 1 L of test medium, which was changed every 24 h to maintain the composition. Test media were aerated throughout the exposure time. Relative humidity was 50%, and day/night temperatures were 20 °C/16 °C during 16 h/8 h photoperiod.

Table 2

Basal nutrient solution composition.

Compound	Formula	Amount
Monopotassium phosphate	KH ₂ PO ₄	0.4 mM
Potassium sulfate	K ₂ SO ₄	0.4 mM
Heptahydrate magnesium sulfate	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.6 mM
Ammonium nitrate	NH ₄ NO ₃	1 mM
Tetrahydrate calcium nitrate	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	2 mM
Ferric sodium ethylenediaminetetraacetic acid	FeNaEDTA	75 µM
Tetrahydrate manganese(II) chloride	MnCl ₂ · 4H ₂ O	7 µM
Zinc chloride	ZnCl ₂	3 µM
Pentahydrate copper(II) sulfate	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.8 µM
Boric acid	H ₃ BO ₃	1.6 µM
Dihydrate sodium molybdate	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.83 µM

The length of the primary roots was measured after five days of exposure and root elongation (RE) was calculated as follow:

$$RE = \frac{REt}{REc} \times 100$$

where REt is the elongation of root length in the test medium and REc is the elongation of root length in the control. EC₅₀ of cadmium, copper and zinc were determined as 80 µM, 50 µM and 570 µM respectively. Roots from non-treated plants and roots under EC₅₀ concentration were rinsed once in 0.5 M EDTA (pH 8.0) and twice in deionized water. Further they were immediately frozen in liquid nitrogen and stored in – 80 °C until RNA extraction.

3.3. RNA isolation, library preparation and RNA sequencing

Three plants grown in heavy metals concentrations that correspond to established EC₅₀ values and three control plants were used for each of the three treatments. Total RNA was extracted separately from roots and shoots of each plant using NucleoSpin RNA Plant kit (Macherey-Nagel) after their storage in liquid nitrogen. The amount and integrity of the extracted RNA was determined by NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and visually after electrophoresis on a 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. In total 36 RNA samples (2 µg each) were provided to Genomics Core Facility Center (EMBL Heidelberg) for construction of cDNA libraries with poly(A) + selection and sequencing. Sequencing libraries were prepared using a TruSeq RNA Sample preparation Kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA), according to manufacturer's protocol. Sequencing libraries were

Table 3

Sequencing results for cadmium, copper and zinc experiments. Number of reads is the sum of three replicates of sequencing.

Experiment	Treatment	Tissue	Number of reads
Copper	Control	Shoots	21,539,100
Copper	Control	Roots	15,779,712
Copper	Treated	Shoots	10,739,460
Copper	Treated	Roots	12,812,092
Zinc	Control	Shoots	10,939,912
Zinc	Control	Roots	11,651,650
Zinc	Treated	Shoots	12,624,212
Zinc	Treated	Roots	12,631,846
Cadmium	Control	Shoots	10,483,926
Cadmium	Control	Roots	10,245,240
Cadmium	Treated	Shoots	12,137,818
Cadmium	Treated	Roots	13,186,234

pooled in equimolar concentration and sequenced on an Illumina HiSeq 2000, producing 2×50 -nucleotide paired-end reads. In total about 155 million reads were sequenced (Table 3). All RNA-Seq generated for this project have been deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the BioProject accession number PRJNA382490.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Czech Science Foundation (grant no. P501/12/G090). We thank The Sequencing Service GeneCore Sequencing Facility (EMBL, <http://www.genecore.embl.de>) for RNA sequencing.

Access to computing and storage facilities owned by parties and projects contributing to the National Grid Infrastructure MetaCentrum provided under the programme “Projects of Large Research, Development,

and Innovations Infrastructures” (CESNET LM2015042), is greatly appreciated.

References

- [1] R. Hänsch, R.R. Mendel, Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl), *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (2009) 259–266, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.006>.
- [2] M.R. Broadley, P.J. White, J.P. Hammond, I. Zelko, A. Lux, Zinc in plants, *New Phytol.* 173 (2007) 677–702, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x>.
- [3] K.-J. Dietz, M. Baier, U. Krämer, Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants, *Heavy Metal Stress in Plants*, Springer, Berlin Heidelberg, 1999, pp. 73–97, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-07745-0_4.
- [4] F. Van Assche, H. Clijsters, Effects of metals on enzyme activity in plants, *Plant Cell Environ.* 13 (1990) 195–206, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01304.x>.
- [5] D.A. John, J.S. Leventhal, Chapter 2 — bioavailability of metals, in: Edward A. du Bray (Ed.), *Preliminary Compilation of Descriptive Geoenvironmental Mineral Deposit Models*, U.S. Geological Survey Open-File Book, Denver, 1996, pp. 10–18.
- [6] R. Cegan, V. Hudzieczek, R. Hobza, De novo transcriptome assembly of heavy metal tolerant *Silene dioica*, *Genomics Data* 11 (2017) 118–119, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gdata.2017.01.004>.

PŘÍLOHA III

Nové poznatky v genetice rostlin VI.

Tolerance rostlin k těžkým kovům

[Hudzieczek](#) V, [Kintlová](#) M, [Hobza](#) R, [Čegan](#) R

Živa (2017)

Nové poznatky v genetice rostlin

VI. Tolerance rostlin k těžkým kovům

Moderní metody genomiky jsou uplatnitelné nejen při komplexních studiích typu sekvenování jednotlivých chromozomů a genomů, ale i při odhalování genů, které hrají roli v důležitých životních procesech. Jedním z takových procesů je schopnost rostlin tolerovat zvýšené koncentrace těžkých kovů. Rostliny, stejně jako ostatní organismy, si vyvinuly mechanismy pro udržení optimálních koncentrací těžkých kovů v buňkách a pletivech. Rovnováha příjmu a výdeje těchto prvků v organismu má zásadní význam nejen pro regulaci důležitých enzymatických reakcí, jichž jsou těžké kovy součástí, ale hlavně pro omezení škodlivých dopadů na buněčný metabolismus při jejich zvýšené koncentraci. Jak vzniká tolerance ke zvýšenému obsahu těžkých kovů v půdě? Jaké evoluční procesy takové adaptace provázejí? A jaké geny jsou za uvedenou toleranci zodpovědné?

Jako těžké kovy se nejčastěji označují prvky s hustotou vyšší než 5 g/cm^3 . Do této skupiny patří měď, zinek, kadmium, rtuť, olovo, chrom, nikl, mangan, železo atd.

Mnoho těžkých kovů je pro fungování rostlin (resp. všech živých organismů) nezbytných. Např. měď jako kofaktor některých proteinů hraje důležitou roli v přenosu elektronů během fotosyntézy a buněčného dýchání. Zinek se podílí na aktivaci řady enzymatických reakcí. Ovšem i tyto biologicky významné mikroelementy jsou

pro většinu rostlin ve vysokých koncentracích toxické. Toxicita těžkých kovů spočívá často v chemické podobnosti s jinými prvky – při záměně určitých mikroelementů za toxický prvek v proteinech (především v enzymech) dochází k narušení správné funkce těchto biomolekul. Nadbytek těžkých kovů v buňce může vést ke vzniku volných kyslíkových radikálů, a to buď přímo účastí v redoxních reakcích (zejména v případě mědi a železa), či nepřímo způsobením stresu. Tyto radikály

poškozuji buněčné membrány, DNA, proteiny, lipidy i sacharidy, ale mohou hrát rovněž pozitivní roli při signalizaci stresu v rostlině.

Zdrojem těžkých kovů v životním prostředí jsou přirozené geochemické procesy, antropogenní činnost a mikrobiální aktivita. Bývají rozptýleny v půdě a sedimentech, rozpuštěny v podzemních a povrchových vodách, ale vyskytují se také v ovzduší. Tyto rizikové prvky v přírodě přetrvávají tisíce let a negativně ovlivňují biologické a fyzikálně-chemické procesy v půdě, vstupují do potravinového řetězce a ohrožují zdraví člověka. Do půdy se dostávají většinou v důsledku imisí z průmyslové činnosti a dopravy, také z odpadů průmyslové výroby, při zaplavení půdy znečištěnou vodou, používáním pesticidů





1 Mezi první objevitele fenoménu tolerance rostlin k těžkým kovům patří rodák z moravských Hrotovic a významný rostlinný fyziolog Silvestr Prát – na snímku se svou manželkou, slavnou českou numizmatičkou Emanuelou Nohejlovou-Prátovou. Narodil se do učitelské rodiny a v těchto šlépějích pokračoval, v r. 1934 se stal profesorem kryptogamologie a fyziologie rostlin na tehdejší Karlově univerzitě. Jeho zájem o výživu rostlin přinesl některá pozorování, jež sice patřila k okrajovým ohledně jeho vlastního vědeckého směřování, ale dodnes jsou považována za klíčová. V tomto ohledu jednoznačně dominuje právě objev tolerance rostlin k těžkým kovům. Prátův popis populací silenky dvoudomé (*Silene dioica*) tolerantních k mědi pozorovaný v okolí obce Špania Dolina poblíž Banské Bystrice na Slovensku a publikovaný v r. 1934 zůstal 20 let v podstatě nepochopen a bez reakce vědecké veřejnosti. Vlastní práce není jen pozorováním rostlin a jejich schopnosti růst v různých koncentracích mědi, Prát pomocí křížení ukázal i genetickou podstatu studovaného fenoménu. V současné době jsou tyto práce hojně citovány a pokládány za revoluční. Foto z archivu Z. Opatrného

2 Zájem o rostliny tolerující těžké kovy zažívá renesanci (oproti r. 2000 došlo v r. 2016 k téměř 10násobnému nárůstu počtu vědeckých publikací). Např. v rámci spolupráce Oddělení vývojové genetiky rostlin Biofyzikálního ústavu Akademie věd ČR v Brně a Centra strukturní a funkční genomiky rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci se věnujeme výzkumu genetické podmíněnosti tohoto typu tolerance. Rostlinné vzorky odebíráme v katastru obce Špania Dolina na haldě, která vznikla po těžbě mědi v této již tradiční lokalitě. Těžba probíhala téměř čtyři staletí a byla zastavena až v r. 1888. Na základě tohoto studia bylo v posledních letech publikováno několik prací o mechanismech tolerance k těžkým kovům u silenky nadmuté (*S. vulgaris*) a silenky dvoudomé. Foto R. Hobza

3 Povrch haldy u obce Špania Dolina. Modré a zelené zbarvení kamenů je způsobeno minerály mědi. Foto R. Hobza

4 Test tolerance k mědi – nahoře kontrolní půda, dole půda se zvýšenou koncentrací tohoto prvku. Rostliny silenky dvoudomé z populace Tišnov



(oba květináče vlevo), populace Špania Dolina (uprostřed) a laboratorní linie silenky široklíse (*S. latifolia*) U15 byly pěstovány pět týdnů ve skleníku. Je patrné, že tolerantní k mědi jsou pouze rostliny z populace rostoucí na haldě v obci Špania Dolina. Foto V. Hudzieczek

nebo hnojením půdy minerálními průmyslovými hnojivy a komposty obsahujícími kontaminanty, dále haváriemi, ale i přírodními jevy, např. vulkanickou činností nebo sesuvy půdy.

Přestože se může zdát, že díky novým předpisům a normám a současně útlumu (lokálnímu) průmyslové a zemědělské výroby klesá koncentrace těžkých kovů v prostředí, není vše tak jednoduché a jednoznačné, jak to může na první pohled vypadat. Oceány v podstatě tvoří cílovou destinaci koloběhu většiny škodlivých látek v prostředí. Jak se postupně snižuje pH oceánů, dochází v nich i k dramatickému nárůstu koncentrace nevázaných těžkých kovů, což bylo dokumentováno na příkladu kadmia. Dlouhodobý efekt tohoto procesu je těžké předpovědět. Další výzvou je era lithium-iontových baterií. Tato stále se rozšiřující forma uchování energie, která vstupuje nejen do automobilového průmyslu, s sebou přináší i problémy s recyklací těžkých kovů, které tvoří součást baterií, jako je nikl, kobalt a měď.

Obecná charakteristika tolerance rostlin k těžkým kovům

Rostliny nemají možnost pohybu, proto jediný způsob, jak se vyrovnat se stresovými podmínkami, představuje adaptace. Toleranci rostlin k těžkým kovům poprvé popsal nestor české rostlinné fyziologie Silvestr Prát (1895–1990, obr. 1), který pozoroval geneticky podmíněnou toleranci silenky dvoudomé (*Silene dioica*, obr. na 2. str. obálky) k vysokým koncentracím mědi v půdě. Toto české prvenství nezůstalo zapomenuto a původní Prátova práce z r. 1934 bývá dodnes citována v prestižních vědeckých časopisech.

Od slavného Prátova objevu uplynulo již více než 80 let a tolerance k těžkým kovům byla dodnes popsána u několika stovek druhů vyskytujících se napříč celou rostlinnou říší. Rostliny, které přirozeně kolonizují půdy s vysokým obsahem těžkých kovů, nazýváme metalofyty. Podle způsobu nakládání s ionty těžkých kovů rozeznáváme dvě základní strategie tolerance –

vyloučení (exclusion) a akumulaci (accumulation). Vyloučení znamená, že rostlina těžký kov do svých pletiv vůbec nepřijímá nebo ho urychleně vrací zpět do půdy, případně kov zůstává v kořeni a jeho transport do nadzemní části je velmi omezený. Naopak akumulaci charakterizuje zesílený transport kovu do nadzemní části, což vede k několikanásobně vyšší koncentraci kovu v listech než v kořenech. Hromadění kovů v listech rostliny může způsobit snížení její oblíbenosti u fytofágních organismů (býložravců), a tudíž tato strategie znamená i možnost zvýšené obrany proti (zejména hmyzím) herbivorům.

Tolerance k těžkým kovům jako fenomén v evoluční biologii

Drtivou většinu druhů, u nichž byla tolerance k těžkým kovům pozorována, označujeme jako fakultativní metalofyty. Takové rostliny snášejí vysoké koncentrace kovů v půdě, ale nejsou na tyto půdy vázané (na rozdíl od metalofytů obligátních, které jinde než v kontaminovaném prostředí nerostou). Důvodem je vznik lokálně přizpůsobených jedinců/populací/ekotypů se zvýšenou odolností. Z hlediska evoluční biologie jde o velmi zajímavou skutečnost, zejména proto, že velké množství lokalit kontaminovaných těžkými kovy vzniklo teprve nedávno působením člověka a můžeme tedy sledovat vznik adaptací na tyto podmínky takřka v reálném čase. Fenomén tolerance rostlin k těžkým kovům se tak pro evoluční a populační biologie stal jakýmsi botanickým ekvivalentem průmyslového melanismu (tento jev byl popsán během nástupu průmyslové revoluce v Anglii – jde o výskyt tmavě zbarvených, tedy melanických forem motýlů, které byly v prostředí znečištěném emisemi méně nápadné než původně rozšířené světlé formy téhož druhu).

V okolí těžce kontaminovaných substrátů (např. hald vytvořených těžbou – obr. 2 a 3) se nachází velké množství rostlinných druhů, nicméně kolonizovat tyto znečištěné lokality dokážou pouze některé z nich. Proč tedy metalofytní populace existují jen u určitých druhů? Vysvětlení zřejmě spočívá v rozdílné základní toleranci mezi jednotlivými druhy. U druhů s vyšší tolerancí se mohou odolní jedinci vyskytovat s větší pravděpodobností. Rovněž vlastnosti některých druhů (např. růst v kamenitěm terénu haldy nebo malé nároky na půdní živiny) mohou zvyšovat jejich šanci pro vznik

tolerantních populací. Genetické analýzy však naznačují, že lokální populace metalofytů se vyvinuly nezávisle na sobě a za toleranci k těžkým kovům u různých populací jednoho druhu zodpovídají různé geny.

Tolerance (obr. 4) se objeví zpravidla u jednoho či několika jedinců v populaci přilehlé kontaminované lokalitě (např. haldě). Tito jedinci ale dokážou kontaminované prostředí rychle kolonizovat, protože se v něm nevyskytují jejich běžní konkurenti. Tvrdá selekce na toleranci spolu s absencí kompetice má za následek postupné odlišení se od populace původní. U tolerantních populací byl navíc pozorován vznik reprodukčních bariér, které jsou charakteristické pro vznik nových druhů (termínem reprodukční bariéra, jejíž vytvoření je důležité kritérium pro speciaci, označujeme vlivy znemožňující křížení – genový tok – dvou jedinců různých populací nebo druhů). Jmenujme např. zvýšení podílu samosprašení, mezipopulační rozdíly v délce anebo době kvetení či hybridní sterilitu (kdy potomci křížení rodičů z různých populací jsou neplodní – jde o specifickou formu postzygotické reprodukční bariéry, která se často vyskytuje mezi dvěma divergujícími populacemi). Přestože ke vzniku nového druhu v důsledku odštěpení tolerantní populace dojít nemusí, prostá přítomnost environmentální bariéry (kterou jedinci původní populace nejsou schopni překonat), umožňuje studium raných jevů spojených se speciací.

Molekulární mechanismy tolerance

Z fyziologického hlediska rostliny bojují proti negativním účinkům těžkých kovů zejména aktivním vyloučením kovů z organismu, snížením příjmu pomocí regulace membránových transportérů, tvorbou chelátů nebo např. uložením kovů do organel či orgánů, kde nepůsobí škody. Existuje mnoho dalších pomocných mechanismů detoxifikace, tvořících součást komplexní reakce na vysokou koncentraci těžkých kovů v organismu. Metalofyty jsou typické zesílením alespoň jedné z těchto drah, nicméně o molekulární podstatě vzniku a fungování tolerance k těžkým kovům toho donedávna nebylo příliš známo.

Moderní metody molekulární a buněčné biologie přispěly k objasnění, jaký je osud těžkých kovů v rostlinných tkáních a čím se odlišují metalofyty od svých netolerantních příbuzných. Nápomocny byly především dva druhy z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) – penízek modravý (*Noccaea caerulescens*, dříve *Thlaspi caerulescens*, obr. 5) a řeřišník Hallerův (*Arabidopsis halleri*, dříve *Cardaminopsis halleri*), oba blízce příbuzné huseníčku rolnímu (*A. thaliana*), pro který vytvořila vědecká komunita nespočetné množství nástrojů potřebných k detailnímu studiu. Oba druhy snášejí přítomnost kadmia a zinku, přičemž akumulují velmi vysoké koncentrace těchto prvků v nadzemních orgánech (např. řeřišník Hallerův hromadí v listech až 10 mg/g zinku v sušině, tedy přibližně 100× více, než je běžné).

Analýza genové exprese u řeřišníčníku Hallerova odhalila výrazně vyšší hladinu transkriptu pro gen *Heavy Metal ATPase 4*



5 Penízek modravý (*Noccaea caerulescens*, dříve *Thlaspi caerulescens*). Foto P. Symon

6 Mezi hlavními objekty zájmu studia tolerance k těžkým kovům patří silenka nadmutá. Na snímku rostlina na haldě poblíž lokality Piesky u obce Špania Dolina na Slovensku. Foto R. Hobza

(*HMA4*), který umožňuje rostlinám transportovat ionty kadmia a zinku do vodičových a zpevňovacích (vaskulárních) pletiv kořene. Následně bylo zjištěno, že *HMA4* je v genomu tohoto druhu přítomna ve třech kopiích (běžně se u rostlin vyskytuje jen jedna kopie genu *HMA4*), což zaručuje stabilní a vysokou expresi proteinového transportéru. Podobná situace se ukázala také u penízku modravého, kde tento gen najdeme v genomu dokonce čtyřikrát. (Pozn.: v genomech eukaryotních organismů, rostliny nevyjímaje, je velké množství genů duplikováno. Drtivou většinu těchto případů charakterizuje zvýšená hladina mediátorové RNA, mRNA, duplikovaného genu – jde o tzv. efekt dávky genů.) Další součástí navazující na pro-



tein *HMA4* je neesenciální aminokyselinou nikotianamin, působící jako chelatační činidlo – váže ionty kovů, které mohou být vaskulárním pletivem (xylémem) transportovány do nadzemní části. Syntézu nikotianaminu katalyzují enzymy z rodiny NAS (Nicotianamine Synthase), jejichž exprese je v řeřišníčníku Hallerově rovněž mnohem vyšší než u netolerantního huseníčku rolního. K dalším potenciálním kandidátům řadíme proteinové transportéry, přenášející zinek a kadmium z cytosolu do vakuoly. Právě přenos kovů do vakuoly může být logickým finálním krokem, jenž završí detoxikaci v nadzemních orgánech rostliny. Nicméně stále není úplně jasné, jak velkou měrou tyto transportéry k toleranci přispívají.

Jiným případem je ale silenka nadmutá (*S. vulgaris*, obr. 6), mimo jiné blízce příbuzná výše zmíněné silenke dvoudomé, u které vznikly populace s tolerancí vůči jednomu nebo i více kovům (měď, zinek, kadmium, nikl a kobalt). U populací tolerantních k mědi byla pozorována zvýšená exprese genu kódujícího tzv. metalothionein. Metalothioneiny jsou krátké proteiny s četným zastoupením aminokyseliny cysteinu, který váže ionty těžkých kovů. Větší množství metalothioneinů tak umožňuje ochránit rostlinné buňky. Naše laboratoř se v současné době zabývá popisem regulačních mechanismů zodpovědných za toleranci k těžkým kovům, a to jak u silenky nadmuté, tak u silenky dvoudomé. Vytvořili jsme první transkripční databáze těchto rostlin rostoucích v různých koncentracích vybraných těžkých kovů. Naším cílem je identifikovat geny hrající klíčovou úlohu v metabolismu těžkých kovů u rodu *Silene*. Do jaké míry budou výsledky uplatnitelné v širších souvislostech, ukážou vytvořené transgenní rostliny vzdálených druhů obsahující geny tolerance izolované ze silenek.

Výzkum řeřišníčníku Hallerova, penízku modravého a silenky nadmuté ukazuje, jak mechanisticky funguje tolerance k těžkým kovům a jejich akumulace u těchto druhů, ale zároveň dává nahlédnout, jakými evolučními procesy mohou v přírodě vznikat adaptace k extrémním podmínkám. Výsledky získané studiem těchto modelových organismů naznačují, že za toleranci k těžkým kovům stojí odlišná regulace genů, které se běžně v rostlinách vyskytují, a to i u netolerantních druhů. Např. zvýšenou produkci proteinu *HMA4* u řeřišníčníku Hallerova způsobují nejen změny v sekvenci promotoru genu *HMA4*, nýbrž i znásobení počtu kopií tohoto genu v genomu. Jaké další evoluční důsledky může takové zvýšení počtu genových kopií přinést, je předmětem právě probíhajících výzkumných programů.

Výzkum studia tolerance k těžkým kovům u silenky dvoudomé je finančně podpořen projektem Grantové agentury České republiky 13-34962P.

Kolektiv spoluautorů: Martina Kintlová, Roman Hobza a Radim Čegan

Seznam doporučené literatury najdete na webové stránce Živý.

PŘÍLOHA IV

Characterisation of important residues for transport ability and substrate specificity of the metal ion transporter *HvIRT1*

Horníková M, Pedaš P

Poster na konferenci Plant Biotechnology: Green for Good III, 15 – 18 června 2015,
Olomouc

Characterisation of important residues for transport ability and substrate specificity of the metal ion transporter HvIRT1

Martina Horníková¹ and Pai Pedas²

¹ Institute of Experimental Botany, Centre of Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 31, 783 71 Olomouc, Czech Republic
² Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg C, Denmark

E-mail: hornikova@ueb.cas.cz

Introduction

Plants require essential mineral nutrients for their growth and development of which some are defined as heavy metals. Metal ion transporters belonging to different families are involved in metal ion uptake as well as in intercellular and intracellular transport. Barley *HvIRT1* (*IRON-REGULATED TRANSPORTER1*), a member of ZIP family, is the first identified barley gene encoding a plasma membrane-localized metal ion transport protein (**Fig. 1**) able to transport Mn²⁺. In addition to Mn²⁺, Fe²⁺/Fe³⁺, Zn²⁺ and Cd²⁺ transport ability was confirmed by heterologous expression systems [1]. Here we present the characterization of important residues for transport ability and substrate specificity of the HvIRT1 transporter.

Methods

Based on amino sequence differences between rice *OsIRT1* and barley *HvIRT1* residues (**Fig. 2**) that could potentially affect the transport ability and substrate specificity of the HvIRT1 transporter were chosen. Using site-directed mutagenesis (**Fig. 3**) mutant forms of the transporter were generated, inserted into the pYES2.1 vector and expressed under the control of the *GAL1* promoter in metal uptake defective yeast strains.

To validate importance of the selected transporter residues for Mn²⁺, Fe²⁺/Fe³⁺ and Zn²⁺ transport, complementation assays were employed; the $\Delta smf1$ yeast strain for high-affinity Mn²⁺ uptake. The $\Delta fet3$ and the $\Delta zrt1/\Delta zrt2$ yeast mutants were used for Fe²⁺/Fe³⁺ and for Zn²⁺ uptake study, respectively.

Table 1 | The validation of the selected residues importance for manganese, iron and zinc transport performed by complementation assay in yeast.

Importance of residues for				
Residue	Substitution	Fe transport	Mn transport	Zn transport
H188	H188A	-	-	-
H190	H190A	-	+	+
H192	H192A	-	-	-
H194	H194A	-	+	+
A76	A76S	-	-	-
S112	S112A	-	-	-
K157	K157S	-	-	-
H161	H161A	-	-	-
M223	M223A	++	+	+

* mutant variant increased the iron transport ability

Results

By heterologous expression in yeast, we showed that the replacement of selected histidine residues between III and IV transmembrane domains of HvIRT1 with alanine does not affect Fe²⁺/Fe³⁺ uptake. In contrast, H190 and H194 were essential for transport of Zn²⁺ and Mn²⁺. In addition, the M223A substitution resulted in complete loss of transport ability for Mn²⁺ and Zn²⁺ whereas this substitution increased the Fe²⁺/Fe³⁺ transport ability (**Tab. 1**).

Conclusion

This study identified some of the residues important for substrate specificity and transport ability of HvIRT1, increasing our understanding on how to engineer barley lines with improved nutritional value.

This work was supported by grant LO1204 from the National Program of Sustainability I

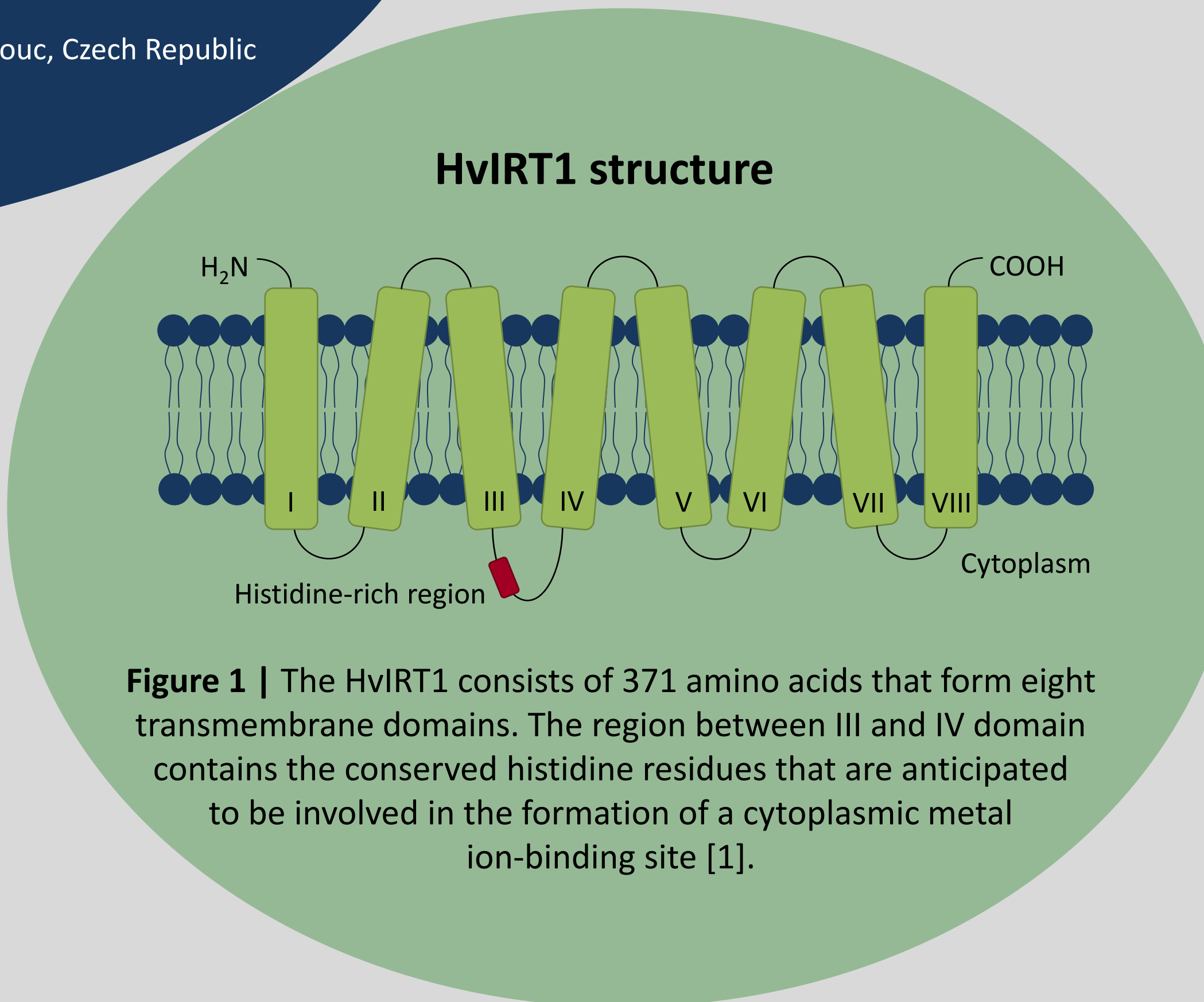
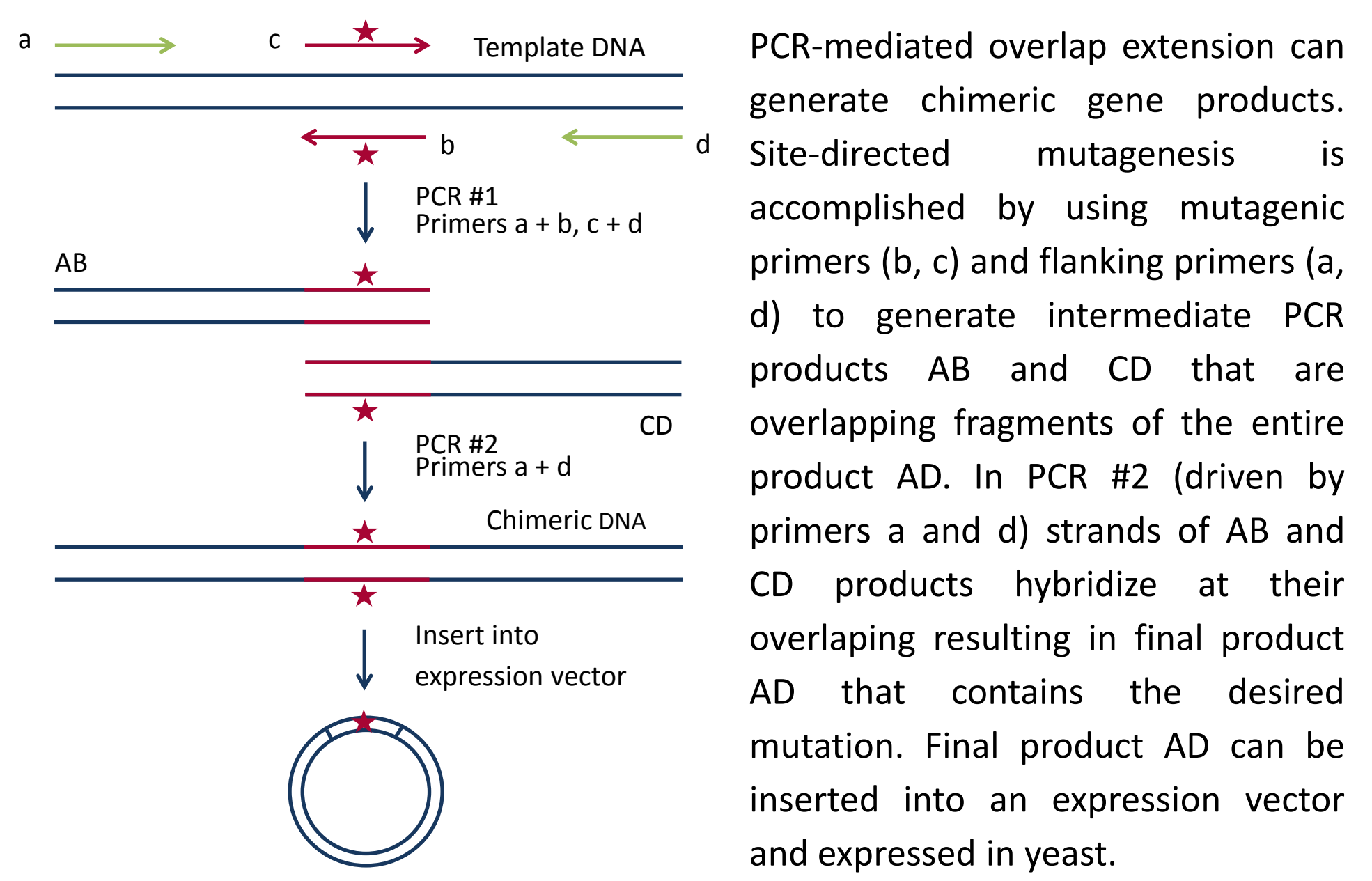


Figure 1 | The HvIRT1 consists of 371 amino acids that form eight transmembrane domains. The region between III and IV domain contains the conserved histidine residues that are anticipated to be involved in the formation of a cytoplasmic metal ion-binding site [1].

Figure 2 | Comparison of putative sequences of HvIRT1 and OsIRT1 proteins [1]. Transmembrane domains (TM) are shown as lines under the sequences. The residues selected for the study are highlighted in yellow.

OsIRT1	1	MATPRTLVP ILPPVAALLLLVAASSIPILAAQPADACGGAP--DQAAADGACHDVPRLRLK	62
HvIRT1	1	MSSSSSR-----ALALVSLALLVVS-----PFLAHQTPAADDVCAGLATDDACHNVPKALRLK	55
OsIRT1	63	LIAIPTILVSSVGVCLPLLSRSVPALRPDGLFAVVKAFASGVILATGYMHVLPDAFNNLTSP	126
HvIRT1	56	LIGIPTILVASVIGVCLPLLAKSVLPALQPDRLNFYVVKAFASGVILSTGYMHVLPDSFNNLTSP	119
		TM I TM II	
OsIRT1	127	CLPRKPWSEFPFAAFVAMLAADVSTLMADSLMLTYNRSKP---RPSSGG---DVAADVADHGES	183
HvIRT1	120	CLPETPWQEPFTTFVAMLAADVSTLMVDSLMLTFYNRKKKGHDAGAPVPTTSSSAVANLE-S	182
		TM III	
OsIRT1	184	PDQGRHRHGHGHGHGMVAKPDDVEATQVQLRRNRVVVQVLEIGIVVHVSVIGLGMGASQNV	247
HvIRT1	183	PEP-EAHHHGHGHGTALGRP-G-DTEAGQMQLRRNRVVVQVLEIGIVVHVSVIGLGMGASQSV	243
		TM IV	
OsIRT1	248	TIRPLVAAMCFHQMFEGLGCGCILQAEYGRMRSVLVFFFTSTTTFEGIALGLALTRVYRDNSP	311
HvIRT1	244	TIRPLVAAMCFHQMFEGLGCGCILQAEYGTMRKAGLVFFFTSTTTFEGIALGLALTKVYKDN	307
		TM V TM VI	
OsIRT1	312	TALIVVGLLNAASAGLLHYMALVELLAADFMPGPKLQGNVRLQLAAFLAVLLGAGGMSVMAKWA	375
HvIRT1	308	TALIVVGLLNAASAGLLHYMALVELLAADFMPGPKLQSSVRLQLICLTAVLLGAGGMSVMAKWA	371
		TM VII TM VIII	

Figure 3 | Generation of HvIRT1 transporter mutants by site-directed mutagenesis [2].



References:

[1] Pedas P *et al.* (2008) Plant Physiology, 148, 455-466
[2] Heckman KL *et* Pease LR (2007) Nature Protocols, 4, 924-932

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky

a

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Centrum strukturní a funkční genomiky rostlin



Mgr. Martina Kintlová

Genetické aspekty příjmu těžkých kovů u ječmene

Autoreferát disertační práce

P1527 – Biologie

Olomouc 2022

Disertační práce byla vypracována na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v letech 2012 – 2022.

Kandidát: **Mgr. Martina Kintlová**

Školitel: **RNDr. Roman Hobza, Ph.D.**

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Centrum strukturní a funkční genomiky rostlin, Olomouc

Oponenti: **prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.**

Univerzita Palackého v Olomouci

Ing. Dalibor Húska, Ph.D.

Mendelova univerzita v Brně

Autoreferát disertační práce byl předán k distribuci.....

Ústní obhajoba disertační práce proběhne na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci dne.....

Disertační práce je k dispozici v Knihovně Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, Olomouc.

Obsah

1 Souhrn.....	4
2 Úvod	5
3 Cíle práce.....	8
4 Souhrn výsledků	9
5 Seznam publikací.....	11
6 Literatura	12

1 Souhrn

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) je jednoděložná rostlina z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), která je ve srovnání osevních ploch čtvrtou nejrozšířenější zemědělskou plodinou na světě. Za těžké kovy můžeme označit kovy s hustotou větší než 5 g/cm³, řada z nich je pro fungování rostlin nezbytná. Ovšem i tyto mikronutrienty jsou ve vyšších koncentracích pro rostliny toxické obdobně jako těžké kovy, u nichž nebyl biologický význam zjištěn. Kovy jsou rostlinami přijímány především kořenovým systémem a v menší míře také skrze listy z atmosféry. Množství kovů v buňkách je striktně regulováno podle aktuálních potřeb rostliny. Tato regulace probíhá na transkripční úrovni, zejména transkripcí membránových transportérů. Za účelem ochrany rostliny vůči nadbytku kovů se v buňkách uplatňují detoxifikační mechanismy.

Předkládaná práce je zaměřena na hledání nových kandidátních genů zapojených do metabolismu těžkých kovů, a to pomocí analýzy transkripčních profilů rostlin ječmene pěstovaných v podmínkách zvýšené koncentrace vybraných kovů, mědi, zinku, respektive kadmia. Porovnáním kontrolních rostlin a rostlin pěstovaných ve zvýšené koncentraci kovů byl stanoven specifický expresní profil ječmene ve vybraných stresových podmínkách. Nejvíce „upregulovaným“ genem v důsledku působení kadmia byl gen *HvPCR2* vyskytující se u ječmene v celkem pěti kopiích. Funkční analýza v kvasinkách zhodnotila roli jednotlivých kopií v detoxifikaci kadmia.

Dále byl studován vliv působení těžkých kovů na buněčný cyklus buněk kořenového meristému s využitím fluorescenční barvy EdU (5-ethynyl-2-deoxyuridin) a následného třídění značených jader pomocí průtokové cytometrie. Bylo sledováno, k jakému poškození buněk pod vlivem těžkých kovů dochází a zda se míra tohoto poškození pro jednotlivé kovy liší.

V neposlední řadě jsme se zabývali studiem jednotlivých reziduí transportéru *HvIRT1* z hlediska určení jejich role v transportu těžkých kovů a substrátové specifity. Vybrané mutantní varianty transportéru *HvIRT1* byly exprimovány v kmenech *Saccharomyces cerevisiae* citlivých na konkrétní těžké kovy. Na základě výsledků komplementačních testů byla rozšířeno povědomí o důležitosti jednotlivých aminokyselinových reziduí transportéru *HvIRT1*.

Tato doktorská práce se věnovala pochopení reakce ječmene na přítomnost vybraných těžkých kovů v prostředí s využitím metod molekulární biologie, bioinformatiky a pokročilé cytometrie.

2 Úvod

Ječmen setý, *Hordeum vulgare* L., je oblíbeným modelovým organismem pro studium genomu obilovin. Jeho genom má velikost 5 100 Mb/1C a obsahuje více než 80 % repetitivních sekvencí (Dolezel *et al.*, 1998; Wicker *et al.*, 2009). V roce 2012 byl genom ječmene osekvenován, pro rozluštění genetické informace byl použit kultivar Morex (Mayer *et al.*, 2012). Z hlediska praktického využití patří ječmen setý k hospodářsky nejvýznamnějším plodinám používaným především ke krmným účelům a k výrobě sladu.

Definice těžkých kovů není v literatuře jednotná. Nejčastěji jsou termínem těžké kovy označovány prvky s hustotou větší než 5 g/cm³. Některé těžké kovy (např. měď a zinek) jsou pro rostliny esenciální. Ovšem i tyto mikronutrienty se ve vyšších koncentracích stávají pro rostlinu toxickými stejně jako těžké kovy, u nichž nebyl biologický význam zjištěn (např. kadmium). Toxicita těžkých kovů často spočívá v jejich chemické podobnosti s jinými prvky. Při záměně mikronutrientu za toxický prvek v proteinech nebo enzymech dochází k narušení funkce těchto biomolekul. Při nadbytku těžkých kovů může také docházet k oxidativnímu poškození buňky (Dietz *et al.*, 1999; Van Assche *et al.*, 1990).

Těžké kovy se do životního prostředí dostávají přirozenými geochemickými cykly, ale hlavně v důsledku antropogenní činnosti. Akumulace kovů v povrchových vodách, rostlinách a živočiších má nepříznivé dopady i na člověka (John *et al.*, 1995). Z toxikologického hlediska mezi nejvýznamnější těžké kovy v půdě patří zinek, kadmium, měď, rtuť, olovo, nikl a arsen. Příjem těžkých kovů rostlinami není lineárně závislý na množství kovů v půdě, ale na jeho dostupnosti (John *et al.*, 1995). Rostliny si kvůli svému přisedlému způsobu života vyvinuly mechanismy pro příjem látek nezbytných pro jejich život. Ty však musí být v rovnováze s potřebami rostliny, aby nedocházelo k nadbytečné akumulaci prvků v rostlinách, a tím k jejich toxickému působení. Rostliny ve svých genomech kódují celou řadu transportérů, které se liší z hlediska substrátové specifity a lokalizace v buňkách a pletivech. Porozumění transportním mechanismům rostlin umožňuje využívat rostliny pro dekontaminaci půd procesem fytoremediace nebo využít tyto poznatky pro zlepšení výživy člověka (Salt *et al.*, 1998).

Rostliny si vyvinuly mechanismy k udržení homeostázy, které jim pomáhají čelit zvýšenému množství těžkých kovů. Jedná se o mechanismy zaměřené spíše na prevenci výskytu zvýšeného množství kovů v citlivých oblastech buňky, než na tvorbu proteinů kompenzujících toxické působení kovu (Dietz *et al.*, 1999). Jen část přijatého množství kovových iontů se dostává do cytosolu, většina z nich je imobilizována v buněčných stěnách kořenových buněk. Tím je omezen transport do nadzemní části rostliny. Nadbytečné množství kovů může být navázáno do komplexů a uloženo ve vakuolách. Nezbytná je rovněž regulace transportu kovů přes membránu, ať už snížením jejich příjmu buňkami nebo stimulací exportu z cytosolu. Ionty kovů, které se dostanou do cytosolu jsou chelatovány pomocí chelátorů, z nichž nejdůležitější jsou glutathion, fytochelatiny, metalothioneiny, histidin, nikotianamin a kyselina jablečná a citronová (Hall, 2002).

Jednou z možností, jak sledovat odezvu rostlin na působení těžkých kovů, je studium genové exprese. Vlivem prostředí může docházet k urychlení, zpomalení nebo zastavení genové exprese. Původní metody studia exprese genů byly zaměřené na sledování přítomnosti určité RNA molekuly či proteinu v buňce. Nyní existuje celá řada metod, které jsou schopny detekovat expresi obrovského množství genů najednou. Exprese může být studována na úrovni RNA nebo proteinů.

Nejstarší metody studia exprese genů jsou založené na schopnosti mRNA hybridizovat se značenými sondami. Aby byla reakce viditelná, jsou sondy značené, a to radioaktivně, fluorescenčně nebo nepřímo pomocí haptenu. K první miniaturizaci hybridizačních metod došlo v roce 1995, kdy byla připravena první cDNA „microarray“, která umožnila kvantifikovat expresi tisíců genů najednou (Schena *et al.*, 1996).

Další možností jsou metody založené na PCR. V roce 1991 byla poprvé provedena kinetická PCR za použití ethidium bromidu, čímž došlo k vizualizaci amplifikovaných molekul (Higuchi *et al.*, 1992). Později bylo prokázáno, že lze pro tuto aplikaci využít 3'→5' exonukleázovou aktivitu DNA polymerázy, díky čemuž vznikla metoda real-time PCR umožňující amplifikaci templátu a kvantifikaci amplikonů v reálném čase.

Sekvenování RNA umožňuje analyzovat expresi kódující i nekódující RNA v genomu s využitím sekvenačních metod nové generace. Původně bylo sekvenování RNA (RNA-seq) alternativou k cDNA „mikroarrayím“, ale ukázalo se, že vykazuje mnohem nižší úroveň falešné positivity u nízko exprimovaných transkriptů, má vyšší

rozlišení, vysoký dynamický rozsah detekce úrovně exprese a v konečném měřítku je i levnější (Nookaew *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2009). RNA-seq umožňuje detekovat a kvantifikovat nekódující sekvence, analyzovat transkripční izoformy, studovat neznámé transkripty nebo místa interakcí RNA a proteinů a v neposlední řadě sledovat změny genové exprese na úrovni mRNA. Díky RNA-seq lze analyzovat celý transkriptom s použitím pouze malého množství vstupního materiálu. Jako každá metoda má i tato své limity. Výzvou je rovněž tvorba statistických programů, které musí zpracovat, ověřit a uchovat obrovská množství získaných dat produkovaných sekvenováním RNA (Howald *et al.*, 2012; Tarazona *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009).

Po velkém rozmachu sekvenování máme k dispozici značné množství dat a nyní je snahou objasnit biologický význam jednotlivých genomových produktů. V tomto nám jsou významně nápomocny kvasinky, především *Saccharomyces cerevisiae*. Tato kvasinka byla prvním eukaryotem, jehož genom byl sekvenován. Genom *Saccharomyces cerevisiae* tvoří 16 chromozomů a obsahuje jen malé množství nekódující DNA (Goffeau *et al.*, 1996). Tato kvasinka má krátkou generační dobu, snadno se kultivuje a díky homologní rekombinaci je dobře geneticky manipulovatelná. Její haploidní podoba usnadňuje tvorbu delečních kmenů. Existuje kompletní sbírka mutantních kmenů *Saccharomyces cerevisiae*, z nichž každý nese definovanou delecí v jednom z 5998 kódujících genů (Winzeler *et al.*, 1999). Pomocí těchto delečních mutantů lze na základě komplementačních testů provádět funkční analýzu jednotlivých genů.

Jednou ze základních metod pro hodnocení reakce buněk na působení abiotického stresu je detekce replikace DNA. Za tímto účelem se využívá 5-ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU), analog thymidinu, který je do DNA inkorporován v průběhu replikace. K jeho detekci se používá „klik“ reakce. Signál inkorporovaného EdU je měřen průtokovou cytometrií. Při průchodu jednotlivých buněk kapilárou průtokového cytometru a ozáření paprskem světla o definované vlnové délce dochází k excitaci fluorochromu a emisi záření, které stechiometricky odpovídá množství DNA. Takto je možno určit zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu v heterogenní populaci buněk (Skarstad *et al.*, 1995).

3 Cíle práce

- I. Hledání nových kandidátních genů zapojených do metabolismu těžkých kovů pomocí analýzy transkripčních profilů rostlin ječmene (cv. Morex) pěstovaných v podmínkách zvýšené koncentrace vybraných kovů a funkční analýza získaných kandidátních genů.
- II. Sledování vlivu působení těžkých kovů na buněčný cyklus buněk kořenového meristému metodou třídění fluorescenčně značených jader pomocí průtokové cytometrie.

4 Souhrn výsledků

S využitím hydroponního systému byla definována střední efektivní koncentrace mědi, zinku a kadmia, tzv. EC50, pro kultivar ječmene Morex. U kontrolních i ovlivněných rostlin byl stanoven obsah studovaných kovů v kořenech a výhoncích. Z biologických triplicátů kontrolních a ovlivněných rostlin byla izolována RNA. Kořeny a výhonky rostlin byly analyzovány zvlášť. Analýza diferenciální genové exprese u rostlin ovlivněných kadmii odhalila 10 282 deregulovaných transkriptů v podzemní části rostlin a 7 104 ve výhoncích. Mezi nimi byly identifikovány geny související s metabolismem reaktivních forem kyslíku, s membránovým transportem, geny podílející se na utváření a udržování buněčné stěny a geny spojené s reakcí na stresové podmínky. Získaná data byla potvrzena pomocí real-time PCR.

Nejvíce „upregulovaným“ genem byl gen *PCR2* (*PLANT CADMIUM RESISTANCE 2*), který je známý svou účastí v detoxifikaci těžkých kovů v rostlinách. Na základě transkripční analýzy bylo nalezeno celkem pět kopií genu *HvPCR2*. Kopie *HvPCR2.1* vykazovala zvýšenou expresi při působení kadmia v kořenech i výhoncích ječmene. U dalších tří kopií, *HvPCR2.2-4*, byla exprese zvýšena pouze v nadzemní části. Bylo zjištěno, že kopie *HvPCR2.2-4* se nachází v tandemovém uspořádání na chromozomu 5H ječmene. V této chromozomové oblasti se fyzicky nachází i poslední kopie, *HvPCR2.5*, nicméně tato kopie nevykazovala při působení kadmia signifikantní zvýšení transkripce. Pro objasnění role kopií genu *HvPCR2* v toleranci vůči kadmii byla provedena funkční analýza v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Pro analýzu byl použit kmen DTY168 ($\Delta ycf1$), který je hypersensitivní vůči kadmii. Růst kvasinek obsahujících prázdný vektor byl silně inhibován 50 μ M CdCl₂, zatímco kvasinky obsahující ve vektoru jakoukoli variantu genu *HvPCR2* byly vůči kadmii rezistentní.

Vliv těžkých kovů na buněčný cyklus byl sledován na meristematických buňkách kořenů ze tří typů rostlin. Kromě kontrolních a kovem ovlivněných rostlin byly analyzovány i kořenové špičky semenáčků pěstovaných ve zvýšené koncentraci kovu, které byly ale následně přeneseny do základního živného média. Tím bylo možno detekovat, zda působení těžkých kovů vede v buňkách k reverzibilním či ireverzibilním změnám. Jádra meristematických buněk izolovaných z kořenových špiček byla označena pomocí EdU a následně tříděna průtokovým cytometrem. Výsledky analýzy naznačují, že hlavním důvodem redukce růstu kořenů v důsledku působení kadmia je inhibice buněčného dělení.

Součástí doktorského studia byla i pracovní stáž na Københavns Universitet, jejíž náplní byla příprava mutantních variant transportéru *HvIRT1* a jejich charakterizace. Na základě rozdílů v aminokyselinové sekvenci transportéru *IRT1* z rýže a ječmene byla vytipována místa s potenciálem ovlivnit jeho transportní schopnosti a substrátovou specifitu. Mutantní varianty transportéru *HvIRT1* byly exprimovány ve vybraných kmenech *Saccharomyces cerevisiae*. Na základě výsledků komplementačních testů bylo rozšířeno povědomí o důležitosti jednotlivých aminokyselinových reziduí transportéru *HvIRT1*.

Disertační práce se věnovala pochopení reakce ječmene na přítomnost těžkých kovů v prostředí. Přestože zahrnovala kombinaci mnoha sofistikovaných metod molekulární biologie, bioinformatiky a pokročilé cytometrie, je jasné, že se jedná jen o částečný vhled do studované problematiky. V každém případě lze říci, že reakce ječmene na přítomnost těžkých kovů v prostředí je silně komplexní. Tato práce jasně ukazuje, že adaptace na abiotický stres může vést přes multiplikaci efektorových genů v genomu.

5 Seznam publikací

Autorské publikace:

Kintlová, M., Vrána, J., Hobza, R., Blavet, N., Hudzieczek, V. (2021). Transcriptome Response to Cadmium Exposure in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Front Plant Science* 12, 629089
doi: 10.3389/fpls.2021.629089

Kintlová, M., Blavet, N., Cegan, R., Hobza, R. (2017). Transcriptome of barley under three different heavy metal stress reaction. *Genomic Data* 13, 15-17.
doi: 10.1016/j.gdata.2017.05.016

Hudzieczek, V., Kintlová, M., Hobza, R., Čegan, R. (2017). Nové poznatky v genetice rostlin VI. Tolerance rostlin k těžkým kovům. *Živa* 4/2017, 156 – 158.

Prezentace na konferenci – poster:

Horníková, M., Pedas, P. (2015). Characterisation of important residues for transport ability and substrate specificity of the metal ion transporter *HvIRT1*. *Plant Biotechnology: Green for Good III*. Olomouc.

6 Literatura

- Dietz, K.-J., Baier, M. *et* Krämer, U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. Dans *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer Berlin Heidelberg.
- Dolezel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysak, M., Nardi, L. *et* Obermayer, R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82, 17-26.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. *et* Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), 546-567.
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1-11.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. *et* Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10(4), 413-417.
- Howald, C., Tanzer, A., Chrast, J., Kokocinski, F., Derrien, T., Walters, N., Gonzalez, J. M., Frankish, A., Aken, B. L., Hourlier, T., Vogel, J.-H., White, S., Searle, S., Harrow, J., Hubbard, T. J., Guigó, R. *et* Reymond, A. (2012). Combining RT-PCR-seq and RNA-seq to catalog all genic elements encoded in the human genome. *Genome Research*, 22(9), 1698-1710.
- John, D. A. *et* Leventhal, J. S. (1995). Bioavailability of metals. Dans E. A. Du Bray, *Preliminary compilation of descriptive geoenviromental mineral deposit models* USGS Open-File Report.
- Mayer, K. F. X., Waugh, R., Langridge, P., Close, T. J., Wise, R. P., Graner, A., Matsumoto, T., Sato, K., Schulman, A., Muehlbauer, G. J., Stein, N., Ariyadasa, R., Schulte, D., Poursarebani, N., Zhou, R., Steuernagel, B., Mascher, M., Scholz, U., Shi, B., ... Stein, N. (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491(7426), 711-716.
- Nookaew, I., Papini, M., Pornputtapong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlén, M. *et* Nielsen, J. (2012). A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 40(20), 10084-10097.
- Salt, D. E., Smith, R. D. *et* Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 643-668.

- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. O. *et* Davis, R. W. (1996). Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), 10614-10619.
- Skarstad, K., Bernander, R. *et* Boye, E. (1995). Analysis of DNA replication *in vivo* by flow cytometry. *Methods in Enzymology*, 262, 604-613.
- Tarazona, S., García-Alcalde, F., Dopazo, J., Ferrer, A. *et* Conesa, A. (2011). Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Research*, 21(12), 2213-2223.
- Van Assche, F. *et* Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell and Environment*, 13(3), 195-206.
- Wang, Z., Gerstein, M. *et* Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63.
- Wicker, T., Taudien, S., Houben, A., Keller, B., Graner, A., Platzer, M. *et* Stein, N. (2009). A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley. *Plant Journal*, 59(5), 712-722.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K.,..., Johnston, M. *et* Davis, R. W. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285(5429), 901-906.