

ACTIVATION OF DEHYDRIN GENES OF GERMINATE PLANTS OF BARLEY TO DROUGHT AND COLD

AKTIVACE DEHYDRINOVÝCH GENŮ KLÍČNÍCH ROSTLIN JEČMENE SUCHEM A CHLADEM

Dokoupilová Z., Holková L., Chloupek O.

Ústav pěstování a šlechtění rostlin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, 613 00, Brno

E-mail: bartova@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this work was to study possible differences in activation of dehydrin genes (*Dhn*) in relation to different stress conditions, which act during barley seed germination. It was possible to suppose some relation between higher activity of these genes and higher tolerance of the plants to action of different stress conditions. Three different barley cultivars (spring *Olbram*, two-rows winter *Tiffany* and six-rows *Luran*) were germinated in different stress condition (cold, drought and cold-drought). Any unequivocal differences in activation of *Dhn* genes were not detected in germinated plants among cultivars. But some different alleles of *Dhn3* and *Dhn4* were detected in six-rows winter cultivar *Luran*, which proved higher tolerance to freezing temperatures.

Keywords: barley, dehydrin genes, cold a drought stress

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo studium možných rozdílů v aktivaci dehydrinových genů (*Dhn*) ve vztahu k různým stresovým podmínkám, které působí v průběhu klíčení semen u ječmene. Práce vycházela z předpokladu, že aktivita těchto genů při působení stresových podmínek je u tolerantnějších linií vyšší než u méně tolerantních linií. Byly vybrány tři odrůdy ječmene (jarní *Olbram*, ozimá dvouřadá *Tiffany* a šestiřadá ozimá *Luran*), které klíčily v různých stresových podmínkách (chlad, sucho a kombinovaný stres chlad-sucho). V klíčících rostlinách nebyly zjištěny jednoznačné rozdíly v aktivaci *Dhn* genů mezi odrůdami. Byla však detekována aktivace odlišných alel genů *Dhn3* a *Dhn4* u ozimé šestiřadá odrůdy *Luran*, u které se projevila vyšší tolerance k mrazovým teplotám.

Klíčová slova: ječmen, dehydrinové geny, stres chladem a suchem

ÚVOD

Ječmen, stejně jako další rostliny reagují na působení stresů změnami v expresi genů a syntézou specifických proteinů. Největší skupinou ochranných proteinů indukovaných stresovými faktory jsou proteiny LEA (angl. *late embryogenesis abundant*). Do této skupiny patří i dehydriny, které se v rostlinách akumulují jako ohlas na prostředí s dehydratačními účinky jako je sucho, nízká teplota, zasolení nebo při zrání semen. U ječmene bylo popsáno 13 genů (*Dhn*) kódující dehydriny, z nichž 12 *Dhn* genů bylo již sekvenováno (Choi et al., 1999, Choi and Close, 2000). Souhrnný přehled umístění *Dhn* genů na chromosomech a podmínek jejich aktivace je uveden v Tab.1.

Tab. 1: Umístění *Dhn* genů na chromosomech a jejich aktivace

Gen	Chromosom	Aktivace
<i>Dhn1</i>	5H	Suchem
<i>Dhn2</i>	5H	Suchem
<i>Dhn3</i>	6H	Suchem
<i>Dhn4</i>	6H	Suchem
<i>Dhn5</i>	6H	Chladem
<i>Dhn6</i>	4H	Suchem
<i>Dhn7</i>	6H	Suchem
<i>Dhn8</i>	6H	Chladem
<i>Dhn9</i>	5H	Suchem
<i>Dhn10</i>	3H	Suchem
<i>Dhn11</i>	3H	Suchem
<i>Dhn12</i>	6H	Embryo

Aktivace dehydrinových genů byla dosud u ječmene studována v polních nebo laboratorních podmínkách u rostlin ve vegetativním stádiu (Zhu et al., 2000). Tedy ve stádiu, které je rozhodující pro přezimování rostlin, zejména u ozimých odrůd. Rostliny však mohou být vystaveny dehydratačním stresům také při klíčení a proto je důležité sledovat podmínky aktivace *Dhn* genů i v tomto stádiu vývoje. Celková mrazuvzdornost odrůd může být ovlivněna těmito geny také v tomto stádiu.

MATERIÁL A METODY

Rostlinný materiál a podmínky klíčení:

Hodnotili jsme tři odrůdy ječmene (*Hordeum vulgare* L), z nichž jedna byla ozimá dvouřadá (*Tiffany* ze stanice ÚKZÚZ Žatec), jedna ozimá šestiřadá (*Luran* ze stanice ÚKZÚZ Vysoká) a jedna odrůda jarní, která pocházela ze dvou rozdílných proveniencí (*Olbram* ze stanice ÚKZÚZ Chrastava a ze stanice ÚKZÚZ Žatec). Cílem bylo ověřit odrůdové rozdíly ve výskytu a aktivaci *Dhn* genů a u jedné odrůdy i vliv provenience. Semena byla vyseta na filtrační papír na klíčovnice ve čtyřech různých podmínkách, které simulovaly stres vzniklý

chladem (10°C), suchem (PEG v osmotickém tlaku -2 bary) a kombinovaným stresem (sucho a chlad působily současně):

- 1) kontrola (voda při 20°C)
- 2) PEG při 20°C
- 3) voda při 10°C
- 4) PEG při 10°C

Izolace RNA, RT-PCR:

Odběry vzorků byly provedeny při velikosti klíčků 1 cm. Vzorky o hmotnosti 100 mg byly homogenizovány v kapalném dusíku. Pro izolaci RNA byl použit Qiagen extraction kit (Rneasy Plant Mini Kit). Kvalita RNA byla kontrolována elektroforeticky na 1,5 % denaturačním agarosovém gelu obarveném ethidium bromidem (Sambrook et al., 1989). Na elektroforézu bylo naneseno à 2,5 µg celkové RNA. Vizualizací byla zjištěna vyrovnanost a neporušenost RNA (Obr.1).



Obr. 1: Hodnocení kvality a vyrovnanosti sumární RNA v jednotlivých vzorcích. Proužky odpovídají rRNA.

RT-PCR reakce byly prováděny pomocí kitu One Step RT-PCR a využitím specifických primerů (Tab.2). Reakční směs obsahovala 100ng RNA, reakční pufr obsahující 2,5 mM MgCl₂, roztok Q, 0,4 mM dNTP Mix, 0,6 µM specifické primery, 0,5 µl Qiagen One Step RT-PCR Enzyme Mix a byla doplněna do 25 µl RNase-free vodou. Byl použit následující program:

- 1x reversní transkripce 15 min při 50°C,
- 1x počáteční denaturace 15 min při 94°C,
- 36x denaturace 1 min při 94 °C, annealing 1 min při 57-59°C a extension 1 min při 72°C,
- 1x final extension 10 min při 72°C.

PCR produkty byly rozděleny na 1,5% agarosovém gelu a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

Tab. 2: *Dhn* specifické primery

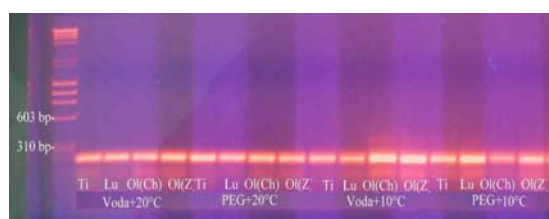
Gen	Sekvence	Gen	Sekvence
<i>Dhn1</i>	F (5') AAC CAT ATA GCT TTG CAC TT R (5') GTC CTC AGA GGA GCT GGA GCT	<i>Dhn7</i>	F (5') GGA GTA CCA GGG TCA GCA CG R (5') GTC CTC AGA GGA GCT GGA GC
<i>Dhn2</i>	F (5') GCC GCG CCA CCG ACA AGG T R (5') GTC CTC AGA CGA GCT GGA GCT	<i>Dhn8</i>	F (5') CGA GTC ATA GCT TGG GCA CCT R (5') GTC ACT AGA CGA GCT GGA GC
<i>Dhn3</i>	F (5') CAC GGC CAC GCG ACC AA R (5') GTC ATC CTC AGA CGA GCT GG	<i>Dhn9</i>	F (5') GAG TTC CAA GGG CAG CAC GA R (5') GTC CTC GGA GGA CGA GCT GG
<i>Dhn4</i>	F (5') GAG TAC CAG GGA CAG CAG R (5') CGT CCT CGG ACG AGC TGG AG	<i>Dhn10</i>	F (5') GAC CAG CAC GGC AAC CC R (5') CGT CCT CGG ACG AGC TGG AG
<i>Dhn5</i>	F (5') AGC AGA CAG GTG GCA TCT AC R (5') GCA GCT TGT CCT TGA TCT TG	<i>Dhn11</i>	F (5') GGA CTA CGG CGG AGA GTA R (5') CCT CGG ACG ACG AGC TGG AG
<i>Dhn6</i>	F (5') TAA GAA CAG CAC CAC CAC R (5') CGG AGG ATG ACG AGC TGG AG	<i>Dhn12</i>	F (5') CAG CAG GAC CAC TCC GTC R (5') CTC AGC AGA CGA GCT GGA GC

VÝSLEDKY A DISKUSE

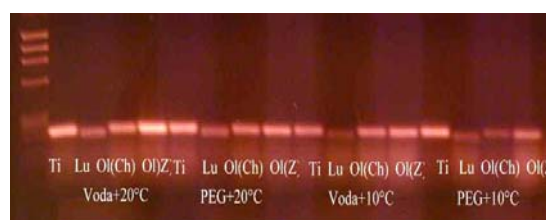
V klíčcích rostlinách byly aktivovány tyto *Dhn* geny: *Dhn2*, 3, 4, 5, 7, 8, 9 a 10.

Gen ***Dhn2*** byl aktivován v rostlinách klíčících i za optimálních podmínek. Zvýšená aktivita tohoto genu (větší obsah specifické mRNA) byla zaznamenána za chladu a v podmínkách kombinovaného stresu (viz. obr.2). Z tohoto obrázku jsou také zřejmé rozdíly mezi odrůdami, které jsou však neprůkazné.

Také aktivita genu ***Dhn3*** (obr.3) byla zjištěna již za optimálních podmínek klíčení. Zdá se, jakoby působením stresu aktivita genu spíše klesala, což je nejvíce patrné v podmínkách kombinace chladu a sucha. U odrůdy *Luran* byla zaznamenána jiná alela tohoto genu (rozdíl ve velikosti PCR produktu). Dvě různé alely tohoto genu *Dhn3* již popsal Lababidi et al., 2004.



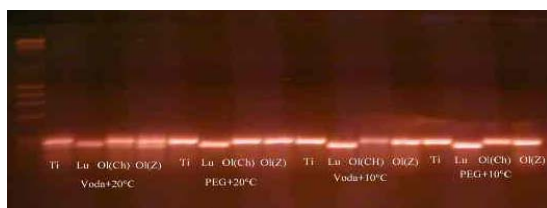
Obr. 2: Aktivace genu *Dhn2*



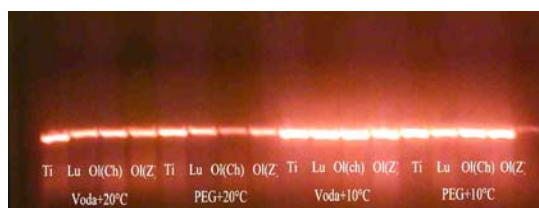
Obr. 3: Aktivace genu *Dhn3*

Gen ***Dhn4*** (obr.4) byl sice také aktivován i za optimálních podmínek, ale v tomto případě je zřejmá zvýšená aktivita ve stresových podmínkách bez ohledu na druh stresu. U šestiřadě ozimé odrůdy *Luran* byla detekována odlišná alela tohoto genu. V jiných našich experimentech (práce připravovaná do tisku) se ukazuje, že tato alela je přítomna i u jiných ozimých šestiřadých odrůd a mohla by souviset s vyšší tolerancí těchto odrůd vůči mrazu. Různé alely genu *Dhn4* jsou popisovány v práci Close et al., 2000, ale autoři je nespojují s žádnou významnou fenotypovou vlastností..

Podmínky aktivace genu ***Dhn5*** (obr.5) v klíčcích rostlinách odpovídaly přibližně těm, které byly popsány pro rostliny ve vegetativním stádiu (Zhu et al., 2000). I když byla slabá aktivita tohoto genu detekována v optimálních podmínkách i v podmínkách sucha, nejvyšší aktivita genu ***Dhn5*** byla pozorována za působení chladu. Nebyly zde zaznamenány žádné rozdíly mezi odrůdami. Výsledky odpovídají tomu, že ***Dhn5*** je považovaný za majoritní chladový protein.



Obr. 4: Aktivace genu ***Dhn4***

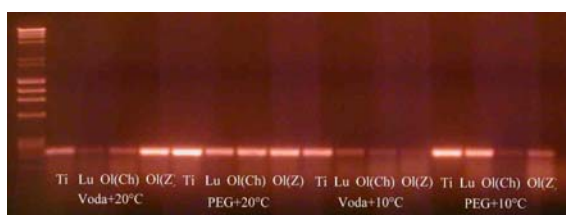


Obr. 5: Aktivace genu ***Dhn5***

Výsledky analýzy genu ***Dhn7*** (obr.6) potvrdily aktivaci za sucha. Aktivace tohoto genu za ostatních podmínek vykazovala značné rozdíly mezi odrůdami a za současného stavu experimentu je neprůkazná. Obdobná situace byla u genu ***Dhn9*** (obr.8). Pro přesnější výsledky bude nutno experimenty opakovat s více odrůdami za silnějších podmínek stresu.

Aktivita genu ***Dhn8*** (obr.9) byla ve všech případech velmi slabá. Je zřejmé, že tento gen je aktivován teplotami nižšími než je 10°C a suchem není aktivován skoro vůbec. Podmínky aktivace tohoto genu v klíčcích rostlinách budou zřejmě podobné těm, které byly publikovány v pracích (Zhu et al., 2000, Holková et al., dosud nepublikováno) a které se týkají mladých rostlin ve vegetativním stádiu.

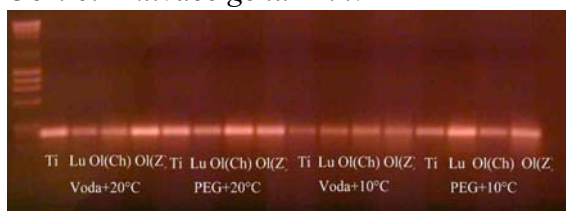
U genu ***Dhn10*** (obr.9) byla slabá nespecifická aktivita stejná ve všech podmínkách.



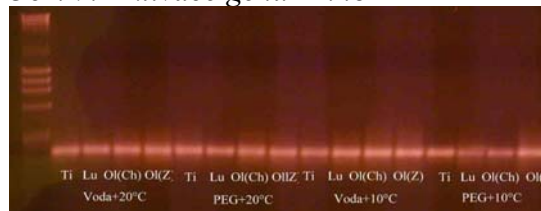
Obr. 6: Aktivace genu ***Dhn7***



Obr. 7: Aktivace genu ***Dhn8***



Obr. 8: Aktivace genu ***Dhn9***



Obr. 9: Aktivace genu ***Dhn10***

Aktivaci zbývajících *Dhn* genů se v tomto stádiu rostlin nepodařilo prokázat. Je možné, že naše experimentální stresové podmínky nebyly pro aktivace těchto genů dostatečné.

V klíčcích rostlinách nebyly zjištěny jednoznačné rozdíly mezi odrůdami. Byla však detekována aktivace odlišných alel genů *Dhn3* a *Dhn4* u ozimé šestiřadě odrůdy *Luran*, které již byly pozorovány v našich dřívějších experimentech při analýzách aktivace *Dhn* genů v listech.

Srovnáním výsledků obou vzorků odrůdy *Olbram*, který pocházel ze dvou různých lokalit, nebyly zjištěny jednoznačné rozdíly v aktivace *Dhn* genů. Aktivita se v jednotlivých případech sice lišila (viz obr.2,3,6), avšak rozdíly byly malé a mohly být způsobeny nedostatečnou kvantifikací.

ZÁVĚR

- 1) Byla detekována aktivita některých dehydrinových genů i v klíčcích rostlinách (*Dhn2*, 3, 4, 5, 7, 8, 9 a 10) a jejich aktivace probíhá za podmínek jako u větších rostlin
- 2) U genu *Dhn3* a *Dhn4* byly detekovány odrůdové rozdíly ve velikosti produktu odpovídající aktivované alely.
- 3) Při klíčení za sucha byl nejvíce aktivován gen *Dhn4*, ale neprojevy se rozdíly mezi jarní a ozimými odrůdami.
- 4) Při klíčení v podmínkách chladu byl nejvíce aktivován gen *Dhn5* a i zde se neprojevy odrůdové rozdíly v jeho aktivaci.

LITERATURA

- Choi D. W., Yhu B., Close T. J., (1999): The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv. Dicktoo. Theor. Appl. Genet. 98: 1234-1247
- Choi D. W. and Close T. J. (2000): A newly identified barley gene, Dhn 12, encoding a YSK₂DHM, is isolated on chromosome 6H and has embryo-specific expression. Theor. Appl. Genet. 100: 274-1278
- Close T. J., Choi D. W., Venegas M., Salvi S., Tuberosa R., Ryabushkina N., Turespekov Y., Nevo E. (2000): Allelic variation in wild and cultivated barley at the Dhn 4 locus,

which encodes a major drought-induced and seed protein, DHN4. Barley Genetics VIII: 249-250

Holková L., Dokoupilová Z., Prášil I., Hrstková P., Chloupek O. (dosud nepublikováno): Activation of dehydrin genes in conditions of cold hardening in barley cultivars with different level of freezing tolerance

Lababidi S., Choumane W., Cecarelli S., Grando S., Al-Said W., Baum M (2004): Allelic variation of dehydrin genes in barley, 9th International Barley Genetics Symposium, Brno, Czech Republic, 20-26 June 2004

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual (2nd end). Cold spring harbor laboratory press. New York

Zhu B., Choi D. W., Fenton R., Close T. J. (2000): Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. Mol Gen Genet 264: 145-153

Poděkování

Výzkum byl podporován grantovou agenturou NAZV (projekt č. QF 3191)