

# DIFFERENT REACTIONS OF DHN GENES IN PLANTS OF BARLEY EXPOSED TO SHORT/LONGTERM DROUGHT

## ROZDÍLNÉ REAKCE DHN GENŮ V ROSTLINÁCH JEČMENE VYSTAVENÝCH NÁHLÉMU A DLOUHODOBÉMU SUCHU

**Mikulková P., Holková L., Chloupek O.**

Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

E-mail: P.Mikulkova@seznam.cz, Chloupek@mendelu.cz

---

### ABSTRACT

Water deficit is one of the major factors limiting plant growth and development and crop productivity. Tolerance to abiotic stress is associated with stress-induced proteins including LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins. These proteins are coded by dehydrins (*Dhn* genes). Dehydrins are typically accumulated in plants during the late stages of embryogenesis and they protect the embryos to dehydration. Also they are produced by plants during abiotic stress (drought, low temperature, osmotic stress, seed drying, salinity). They protect the cells against water deficit. The main function of *Dhn* genes encoding dehydrins is determination of stress reactions in many species. Previously, they have been identified in barley, wheat, maize, sunflower, peas and many others. The aim of this work was to evaluate some physiological traits and transcription activity of some *Dhn* genes by Real-Time PCR in contrast barley cultivars with different level of drought tolerance in two experimental conditions. We exposed plants of barley to short-term (cut leaves of contrast cultivars) and long-term drought stress (intact plants of barley growing in solution of polyethylenglycol). The results of morpho-physiological evaluation and evaluation on the level of gene expression show that adaptation of plants to drought is based on many factors involved physiological and genetics mechanisms.

**Key words:** barley, dehydrins, drought, stress, expression

## ÚVOD

Vodní deficit je jedním z hlavních faktorů limitujících růst, vývoj rostlin a následně jejich produktivitu (Malatrasi *et al.*, 2002). Adaptační mechanismy zvyšující odolnost rostlin vůči stresovým podmínkám vyvolaných suchem jsou založeny na různých morfofyziologických vlastnostech faktorů jako jsou velikost kořenového systému, tloušťka kutikuly, velikost průduchů, které se odráží na molekulární úrovni v různé expresi stresových genů. Největší skupinou ochranných proteinů indukovaných stresem spojeným s dehydratací pletiv jsou proteiny skupiny LEA (angl. *Late Embryogenesis Abundant*). Mezi tyto geny patří i dehydriny (*Dhn*), jejichž exprese u rostlin probíhá primárně v době vysychání embrya (dozrávání semen) a sekundárně jako odezva na nedostatek vody v buňkách (Choi *et al.*, 1999, Close *et al.*, 1996, Zhu *et al.*, 2000). U ječmene bylo popsáno 13 genů (*Dhn*) kódujících dehydriny. Většina z nich (11) je aktivována suchem (Choi and Close, 2000). Ukazuje se, že intenzita a nástup exprese jsou genotypově závislé a u některých z těchto genů byla prokázána korelace mezi intenzitou exprese a mírou odolnosti daného genotypu vůči suchu (Suprunova *et al.*, 2004). Rozdílná exprese dehydrinových genů u různě odolných genotypů v podmínkách sucha by mohly ukázat jednak různou míru adaptace na sucho a zároveň na význam úlohy dehydrinů v toleranci vůči suchu.

Regulace exprese genů aktivovaných suchem může být různá v závislosti na intenzitě a délce působení stresu. Jiná bude v okamžiku náhlého či trvalého nedostatku vody. Otázkou je, jak rychle rostlina následkem ztráty vody zavadne. Odlišné reakce mohou nastat v podmínkách trvalého nebo střídavého nedostatku vody, který však není pro rostliny letální (brzdí růst, urychluje se dozrávání, menší výnosy..). Takové situace nastávají v polních podmínkách.

Vzhledem k tomu, že stále není objasněna přesná funkce jednotlivých dehydrinů, výzkum se v této oblasti zaměřuje na hledání podmínek, za kterých by bylo možno využít znalostí o regulaci těchto genů při předpovídání citlivosti genotypů k abiotickým stresům (Kosová *et al.*, *in press*). Co se týká odolnosti vůči suchu, byla většina hodnocení exprese *Dhn* genů prováděna v podmínkách tzv. náhlého sucha ve tkáních ustřižených listů nebo u intaktních rostlin, u kterých byla vynechána závlivka. Stanovení jsou prováděna v relativně krátkém čase za jednoduchých experimentálních podmínek, které ale nemusí odpovídat reakcím rostlin v polních podmínkách.

V našem experimentu jsme se zaměřili na porovnání regulace exprese dehydrinových genů u různě citlivých genotypů ječmenů v podmínkách tzv. náhlého sucha (ustřižené listy) a dlouhodobě působícího přesně definovaného fyziologického sucha, které více simuluje polní podmínky. Pro hodnocení exprese byly zvoleny geny *Dhn1* a *Dhn6* (Suprunova *et al.*, 2004).

## MATERIÁL A METODIKA

Expresa (transkripční aktivita) dehydrinových genů byla hodnocena u 5 odrůd, které se alespoň částečně liší odolností vůči suchu. Vzhledem k původu se zejména u odrůdy *Tadmor* předpokládá rozdílný nástup exprese při mechanismu adaptace vůči podmínkám sucha.

Použité odrůdy pro obě experimentální podmínky:

*Tadmor* – odrůda k suchu tolerantní, druh *Hordeum spontaneum*, původ Sýrie

*Amulet* – šlechtiteli doporučována pro pěstování v suchých oblastech, CZ

*Bojos* – univerzální pro všechny zemědělské oblasti, CZ

*Malz* – ve všech zemědělských oblastech výnos předního zrna středně vysoký, CZ

*Jersey* – nízký výnos předního zrna v kukuřičné a řepařské oblasti, NL

Expresa genů byla hodnocena ve dvou variantách experimentálních podmínek:

1) V listových tkáních v průběhu usychání odstřižených listů. Rostliny byly pěstovány hydroponicky v živném roztoku solí (MS medium), ve vývojové fázi 5-ti pravých listů byly nejmladší listy odstřiženy a ponechány volně schnout na filtračním papíře po dobu: **1, 3, 6, 12 a 24 hodin**.

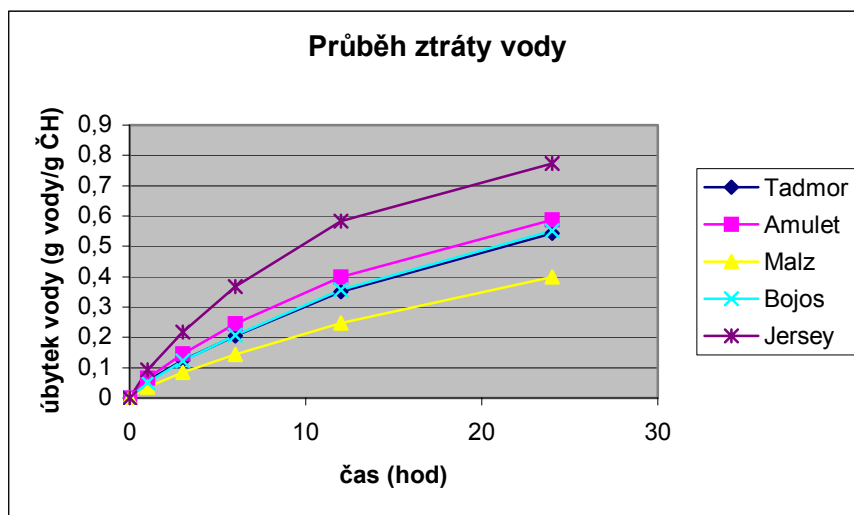
2) v listech intaktních rostlin rostoucích v živném roztoku s obsahem polyetylglykolu (PEG, -3 bary), pro simulaci podmínek sucha v půdě. Rostliny byly ve stáří dvou týdnů přemístěny do růstového média s přídavkem PEG 2000. Kontrolní rostliny byly dále pěstovány v živném roztoku. Listy pro izolaci RNA jsme odebírali po **3, 6, 12 a 24 hodinách** a pak po **4, 7, a 14 dnech** růstu v roztoku PEG.

Izolace RNA ze vzorků byla provedena kitem RNAqueous<sup>TM</sup> (Ambion) dle standardního protokolu. Příprava cDNA pro kvantitativní analýzy byla provedena kitem Reverse Transcription kit (Qiagen). Geny *Dhn1* a *Dhn6* byly analyzovány metodou RealTime PCR (kit SYBR Green PCR, Qiagen), jako referenční gen byl použit gen pro  *$\alpha$ -tubulin*. Primery a podmínky reakcí byly použity dle Suprunové *et al.* (2004). Kvantitativní hodnocení transkripční aktivity bylo počítáno dle metodiky Pfaffl (2001). Výsledkem jsou hodnoty relativní exprese těchto genů normalizované vzhledem k hodnotám relativní exprese referenčního genu ( $\alpha$ -tubulin). Nehodnotí se absolutní množství mRNA, ale nárůst oproti klidovému stavu.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

### 1) Vizualní a fyziologické hodnocení

Z grafu na obrázku č.1 je zřejmé, že nejmenší rychlost ztráty vody odpařováním z ustřižených listů vykazují odrůdy *Malz*, *Tadmor* a *Bojos*. Na fotografii stavu ustřižených listů po 24 hodinách (obr.2) i tyto odrůdy mají nejméně seschlé listy. Středně rychle ztrácí vodu odrůda *Amulet* a nejrychleji odrůda *Jersey*, což je vidět i na vizuálním hodnocení seschnutím listů (obr.2).



Obr.1 Průběh ztráty vody v ustřižených listech

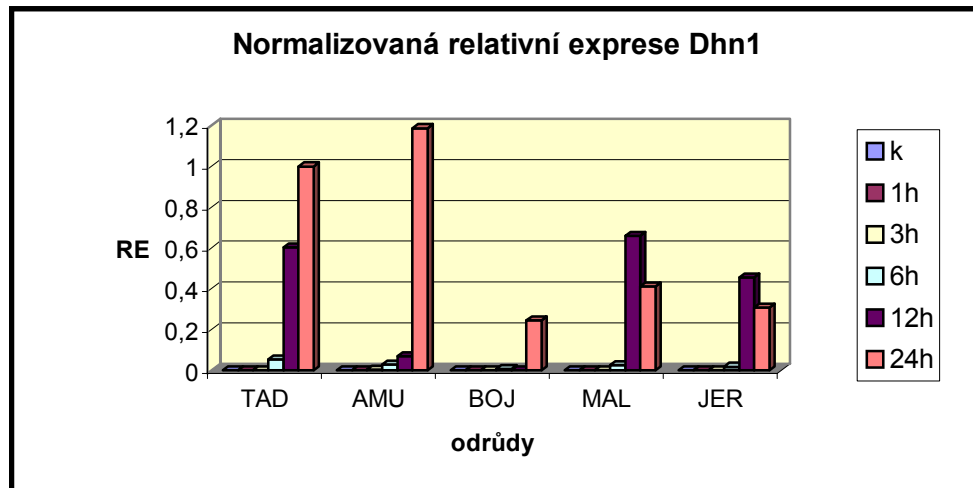


Obr.2 Stav ustřižených listů po 24 hod usychání

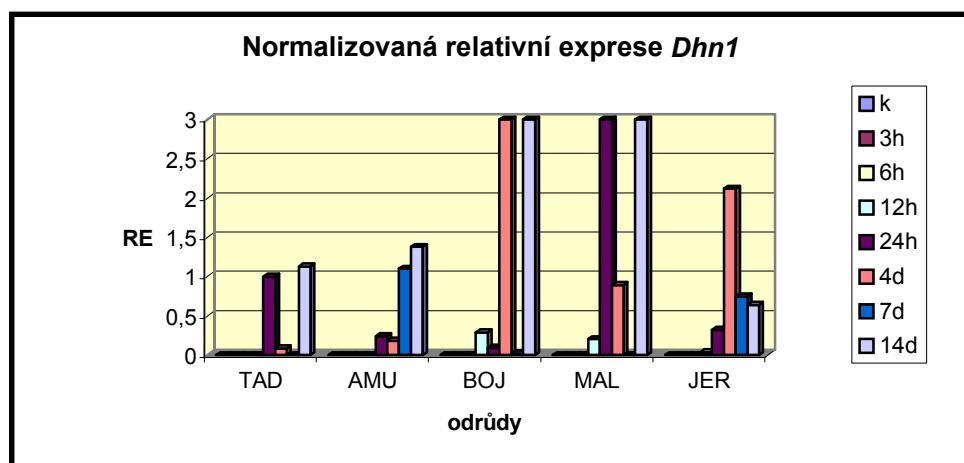
Výsledky rychlostí ztrát vody v porovnání s hodnocením exprese dehydrinů (viz. dále) svědčí o tom, že adaptace rostlin na sucho může být založena na různých mechanismech, nejspíše na kombinaci různých mechanismů. Bylo by zajímavé pozorovat reakce průduchů na ustřižených listech, jejich počet na listové ploše, průběh kutikulární

transkripce, atd. Dalo by se předpokládat, že odolné rostliny s většími průduchy pravděpodobně kompenzují tento „nedostatek“ rychlým zavíráním průduchů.

## 2) Hodnocení exprese dehydrinových genů



Obr.3 Hodnocení relativní exprese genu *Dhn1* ve vysychajících tkáních listů



Obr.4 Hodnocení relativní exprese genu *Dhn1* u rostlin pěstovaných v PEG

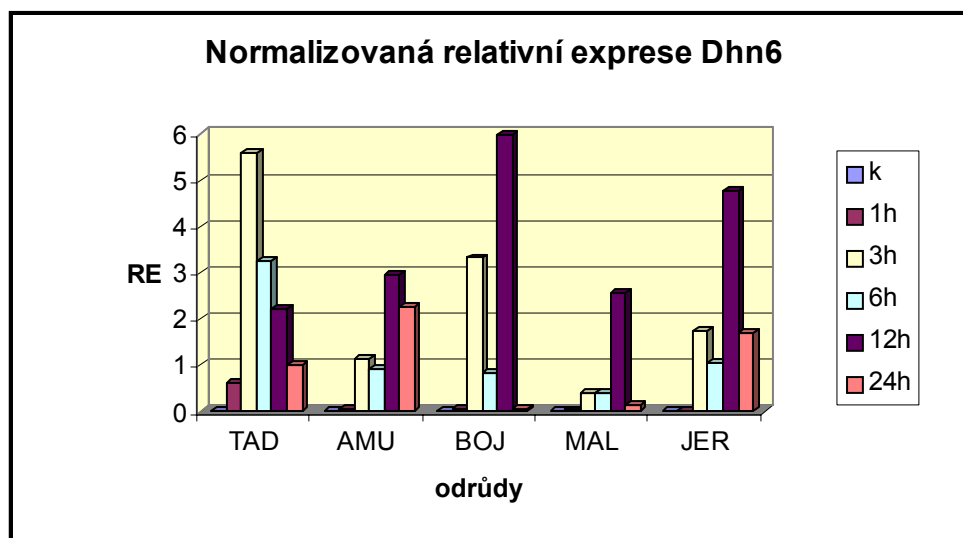
Srovnání regulace exprese genu *Dhn1* za obou podmínek přineslo zajímavé výsledky. Na první pohled je zřejmé, že se testované genotypy rozdělily do dvou skupin (obr. 3). Dalo by se usuzovat, že v rámci skupiny se může jednat o podobný typ adaptace na dané stresové podmínky. Odolnější odrůdy jako *Tadmor* a *Amulet* v podmínkách náhlého sucha vykazovaly po 24 hod dvojnásobnou úroveň exprese tohoto genu. Průkazný dřívější nástup aktivace stresem indukovaných genů u odolnějších genotypů (Suprunova *et al.*, 2004) nebyl prokázán. Nárůst exprese byl zaznamenán po 6 hod od ustřížení listů a v případě odrůdy *Amulet* byl spíše pomalý. Nejvyšší exprese byla u těchto odrůd detekována po 24 hodinách. Z obr.3 je zajímavé, že i když tyto dvě odrůdy (*Tadmor* a *Amulet*) vykazovaly v tomto odběru nejvyšší expresi genu *Dhn1* (což je v souladu s jejich známou relativní odolností vůči suchu), stav listů v tomto stádiu (obr.2) byl u obou odrůd jiný – zřetelné rozdíly v zavadnutí (*Tadmor* méně,

*Amulet* více). Ale dynamika ztráty vody u obou odrůd je také podobná (obr. 1), což opět svědčí o podobných adaptačních mechanismech na fyziologické úrovni. Expresce genu *Dhn1* u druhé skupiny „citlivějších“ genotypů byla po 24 hod usychání tkání v porovnání s první skupinou nízká, max. asi 40% exprese pozorované u odrůdy *Tadmor*. Vykazovala také jiný časový průběh. V odběru po 12 hod byly hodnoty relativní exprese u odrůd *Malz*, *Jersey* a *Tadmor* podobné, ale v průběhu dalších 12 hod došlo u citlivějších odrůd k poklesu, zatímco u odolnějších odrůd k nárůstu exprese tohoto genu. Nejnižší exprese genu *Dhn1* v podmínkách krátkodobého, ale velmi silného sucha byla pozorována u odrůdy *Bojos*.

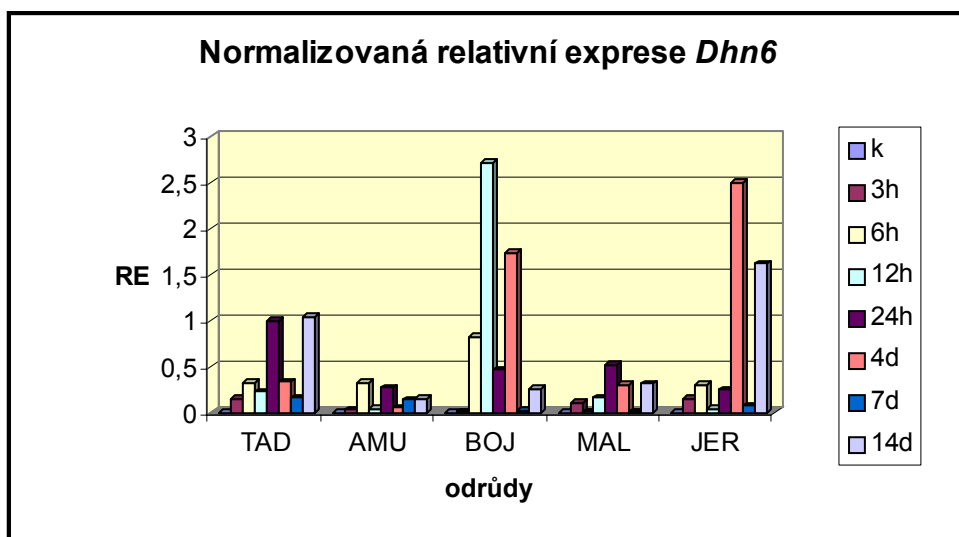
V podmínkách dlouhodobého sucha (obr.4) byla situace do určité míry opačná. I když u všech genotypů bylo zpočátku pozorováno kolísání nižších hodnot u citlivějších odrůd, byl pozorován dřívější nástup (4. den) silné exprese. Maximalní hladiny bylo dosaženo téměř u všech odrůd ( s výjimkou odrůdy *Jersey*) po 14 dnech růstu v podmínkách fyziologického sucha. Hladina exprese byla v tomto odběru u citlivějších odrůd dvou až trojnásobná.

U pravděpodobně nejcitlivější odrůdy byl i v těchto podmínkách zaznamenán postupný pokles aktivity od 4. dne. Nebylo pozorováno opakované zvyšování a snižování exprese, což má několik možných důvodů , např. chyba měření, reakce rostlin na světelný režim, pomalejší dynamika sinusových křivek či vůbec nedochází k dalšímu zvýšení exprese.

Hodnocení exprese genu *Dhn6* (obr. 5, 6) je složitější. K nástupu exprese dochází podstatně dříve než u *Dhn1* – již 1 hod po ustřížení listu a 3 hod po přenesení rostlin do roztoku PEG. Podmínkách krátkodobého sucha pak dochází u některých genotypů k prudkému (*Tadmor*, *Bojos*), u jiných k postupnému (*Amulet*, *Jersey*) nárůstu s max. mezi 3 – 12 hod v závislosti na genotypu a následnému poklesu. Ve všech odběrech byly pozorovány značné genotypové rozdíly a lze jen těžko usuzovat na vztah k odolnosti vůči stresovým podmínkám.



Obr.5 Hodnocení relativní exprese genu *Dhn6* ve vysychajících tkáních listů



Obr.6 Hodnocení relativní exprese genu *Dhn6* u rostlin pěstovaných v PEG

I v podmínkách dlouhodobého sucha je možno pozorovat kolísání hodnot exprese v průběhu 14-ti denní kultivace. Přičemž u některých odrůd (*Tadmor*, *Bojos* a *Jersey*) může být dosahovaná hladina exprese značně vysoká. U jiných odrůd (*Amulet*, *Malz.*) je aktivita tohoto genu v porovnání s ostatními genotypy nízká (max. 50% při srovnání s odrůdou *Tadmor*).

## ZÁVĚR

Naše výsledky potvrzují předpoklad, odrůda *Amulet* alespoň na úrovni exprese stresových genů je adaptována na suchu. U obou odrůd odolnějších vůči suchu (*Tadmor* a *Amulet*), začala exprese *Dhn* genů ve tkáních ušřížených listů později, ale její intenzita stále stoupala a celkově dosáhla vyšších hodnot (obr. 3), což ukazuje na účinnější obranné mechanismy na molekulární úrovni. Odolnější odrůdy rychlou ztrátu vody (náhlé sucho) nejspíš jsou schopny kompenzovat aktivnější expresí dehydrinů. Dlouhodobější stres suchem (PEG) pak pro tyto odrůdy není natolik stresující, aby se musely bránit vyšší aktivací dehydrinových genů, a tudíž se mírnému nedostatku vody dokáží „přizpůsobit“. Důsledkem pravděpodobně pomalejšího zavírání průduchů a vyšší kutikulární transkripce v raných fázích sucha působil na citlivější odrůdy *H. vulgare* „silnější stres“, což vedlo k vyšší aktivitě *Dhn* genů u těchto citlivějších odrůd (obr.4). Z hlediska hodnocení míry tolerance vůči suchu se ukazuje jako vhodnější kvantitativně hodnotit úroveň exprese genu *Dhn1*. Exprese genu *Dhn6* v průběhu experimentu nespecificky kolísala.

Z výsledků morfo-fyziologického hodnocení i hodnocení na úrovni genové exprese vyplývá, že adaptace rostlin vůči suchu je založena na více faktorech. Byly zapojeny jednak mechanismy fyziologické (silnější kutikula, rychlost uzavírání průduchů, které mohlo souviset s množstvím rostlinného hormonu ABA) a také mechanismy genetické, jež se projevily silnou aktivací některých stresových proteinů, mezi které patří dehydriny.

## LITERATURA:

- Close T.J. (1996): Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant* 97: 795-803
- Choi, D.W., Zhu B., Close, T.J. (1999): The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments and expression characteristic of 11 Dhn genes of cv.Dicktoo. *Theor. Appl. Genet* 98: 1234-1247
- Choi, D.W., Close, T.J.(2000): A newly identified barley gene, Dhn12, encoding a YSK<sub>2</sub> DHN, is located on chromosome 6H and has embryo-specific expression. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1274-1278
- Kosová Klára<sup>1,2</sup>, Ludmila Holková<sup>3</sup>, Ilja Tom Prášil<sup>1</sup>, Pavla Prášilová<sup>1</sup>, Marta Bradáčová<sup>3</sup>, Pavel Vítámvás<sup>1</sup>, Věra Čapková . The expression of dehydrin 5 during the development of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare*). *J. of Plant Physiology, in press*
- Malatrasi, M., Close, T.J., Marmioli, N. (2002) Identification and mapping of a putative stress response regulator gene in barley. *Plant Molecular Biology* 50: 143-152.
- Pfaffl M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): E45-E45
- Suprunova T., Krugman T., Fahima T., Chen G., Shams I., Korol A. and Nevo E. (2004) Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. *Plant, Cell and Environment* 27: 1297 - 1308
- 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

Tato práce byla financována z grantu OF 3191 a VC 1M0570.