

EVALUATION OF THE ACTIVITY OF BARLEY COR/LEA GENES AFTER THE APPLICATION OF THE EXOGENOUS ABSCISIC ACID

Melišová L., Ehrenbergerová J., Holková L.

Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: melisova@email.cz

ABSTRACT

The topic of this study was to evaluate the level of *Hsd4*, *Dhn4* and *Hva1* genes expression together with the leaf temperature measurement after the application of exogenous abscisic acid (ABA). It is well-known that the level of endogenous ABA increases rapidly in response to drought stress and consequently the stomatal closure is induced. ABA has two functions in plants. The first is the regulation of the transpiration and the second is a function of a signal molecule that induces expression of protective genes from the Cor/Lea group. The measurement of temperature is considered as a suitable method for the indirect assessment of the transpiration. The level of stress genes expression has been recently used for determination of abiotic stress sensitivity. In our experiment, we compare ABA induced reaction of five spring barley varieties with different level of drought tolerance. Plants were grown in hydroponic solution (MS Salt, 7h light, 20°C, night 18°C). The ABA solution ($2 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹) was added after 14 days of growth. The samples were collected 1, 3, 6, 12 and 24 hours and 3 and 7 days after ABA application. The measurement of leaf temperature was done with IR TermoCam (FLIR P 660) (Jones, 1999) 3 hours and 7 days after ABA application. To determine the genes expression we used RT PCR (Pfaffl, 2001). All varieties reduced stomatal conductivity (stomatal closure) after ABA application. The leaf temperature increased after 3 hours and was higher even 7 days after ABA application, however the difference of temperature among varieties was small. Activity of *Hva1* was unspecific and was detected also in control plants, probably due to some unspecific stress (light condition) during cultivation. At this level no differences were found among tested genotypes. The highest activity of *Dhn4* and *Hsd4* was detected in variety *Malz*. It seems, that plant hormone ABA has an important role in induction of stress-reaction in this variety. In case of the Syrian drought tolerant variety *Tadmor* the activity of both genes was only on the border of detection. Although the expression of protective genes from the Cor/Lea group is known to be more rapid in stress tolerance genotypes, the variety *Tadmor* behaved differently. Our theory is, that this variety may have an alternative ABA-independent pathway more active than other tested varieties.

Key words: abscisic acid (ABA), gene expression, barley, drought, abiotic stress

Acknowledgments: IG290071, NAZV QH91192

ÚVOD

Hodnocení exprese stresem aktivovaných genů bývá využíváno pro stanovení citlivosti studovaných genotypů vůči abiotickým stresům. U obilovin platí, že tolerantnější genotypy vykazují dřívější expresi a/nebo vyšší hladinu exprese ochranných genů ze skupiny *Cor/Lea* (Zhang et al., 2004, Park et al., 2006), u kterých jsou známy dvě hlavní aktivační dráhy. Dráha, ve které je regulace fytohormonu ABA zapojena a indukční dráha, ve které tento fytohormon zapojen není (Riera, 2005). Významnou skupinou ochranných proteinů spojených s dehydratací pletiv jsou proteiny skupiny LEA (Late embryogenesis abundant). Mezi tyto geny řadíme například *Dhn4*, *Hva1*. Gen *Dhn4* patří do skupiny dehydriny (LEA 2), které se hromadí během dozrávání semen, v semenáčcích a v rostlinách v reakci na stres vyvolaný nízkou teplotou, zasolením, suchem nebo ošetřením kyselinou abscisovou. Jeho lokalizace je na chromozomu 6H. K expresi dochází až vlivem stresových podmínek - sucha a ošetření kyselinou abscisovou (Choi et al., 1999). Na chromozomu 1H se nachází gen *Hva1* ze skupiny LEA 3. V mladých semenáčcích byla zjištěna jeho vysoká exprese za stresových podmínek vyvolaných suchem, světlem, zasolením, působením extrémních teplot nebo ošetřením kyselinou abscisovou (Hong et al., 1992, Qian et al., 2007). Ochranná funkce tohoto genu byla zjištěna také po jeho přenesení do rostlin rýže, tyto transgenní rostliny se ukázaly být tolerantnější ke krátkodobému, ale silnému působení sucha (Xu et al. 1996). Dalším z genů spojených s dehydratací pletiv je *Hsdr4*. Byl zmapován na chromozomu 3H a u *Hordeum spontaneum* je popisován v souvislosti s odolností rostlin vůči suchu (Suprunova et al., 2007). Vysoce odolná syrská odrůda ječmene *Tadmor* (*Hordeum spontaneum*), která je dobře adaptovaná na suchu, však v našich pokusech (Mikulková et al., 2009) vykazovala pozdější a v některých případech i nižší expresi genů v porovnání s naší odrůdou Malz, v jejichž aktivaci je zapojen fytohormon ABA. Cílem práce bylo stanovit vliv fytohormonu ABA na rozvinutí stresové reakce u této odrůdy v porovnání s několika dalšími odrůdami s odlišnou mírou tolerance vůči suchu. Výsledky by mohly přispět k studiu odlišného způsobu adaptace tohoto genotypu, což by ve výsledku mohlo být využito při hledání nových zdrojů odolnosti.

ABA je rostlinný fytohormon považovaný za důležitý faktor obrany rostlin vůči stresům. V rostlinách z hlediska tolerance k suchu plní dvě základní funkce. Reguluje transpiraci rostlin, kdy při stresu suchem dochází k jejímu navázání na vnější povrch plazmalemny a tak aktivuje uzavírání průduchů. A dále je zapojena jako signální molekula, která indukuje expresi částí ochranných genů ze skupiny *Cor/Lea* (Zhang et al., 2004).

MATERIÁL A METODIKA

K pokusu bylo použito pět odrůd jarních ječmenů. Odrůdy byly vybrány s ohledem na prokázanou nebo předpokládanou míru odolnosti vůči suchu (*Malz*, *Amulet*, *Jersey* - české odrůdy (*Hordeum vulgare* L.) a *Er/Apm*, *Tadmor* – syrské odrůdy (*Hordeum spontaneum*). Rostliny byly pěstovány v hydroponickém prostředí v živném roztoku MS solí (Murashige and Skoog, 1962) v řízených podmínkách (7 hodin světla při teplotě 20 °C, 15 hodin tmy při 18 °C, 1 hodina stmívání a 1 hodina rozednávání). Po čtrnácti dnech růstu byl ke kořenům testovaných rostlin přidán roztok kyseliny abscisové ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l).

Fyziologická reakce byla posuzována změnami ve vodivosti průduchů metodou IR termografie s použitím IR termovizní kamery (FLIR P660) (Jones, 1999). Metoda hodnotí termální energii emitovanou z povrchu listu. Při stavu otevřených průduchů odpařující se voda ochlazuje list. Indukce ABA vyvolá zavření průduchů, čímž zabrání ztrátám vody, ale zároveň způsobí zvýšení teploty listů.

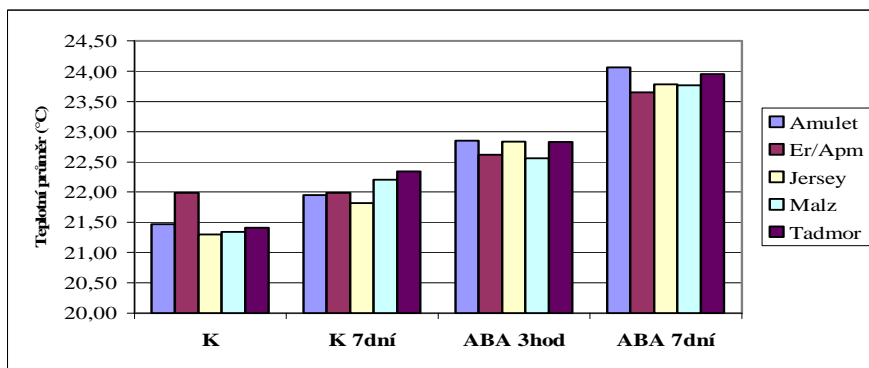
Snímání povrchu listů IR termokamerou bylo provedeno 3 hodiny a 7 dní po aplikaci ABA. Současně bylo provedeno gazometrické měření použitím přístroje Licor LI-6400. Principem měření je porovnání rozdílu koncentrace CO₂ vyprodukované listem v měřící a srovnávací komoře, za konstantní koncentrace CO₂ ve srovnávací komoře. Tímto přístrojem jsme zjišťovali vodivost průduchů pro vodní páry. Měření probíhalo 4 a 7 dní po ošetření rostlin kyselinou abscisovou.

Odběry rostlin pro molekulárně biologické hodnocení probíhaly v intervalech kontrola, 1, 3, 6, 12 a 24hodin a 3 a 7dní po aplikaci ABA. Stresová reakce rostlin byla hodnocena kvantifikací exprese ABAou regulovaných genů *Hval1*, *Hsdr4* a *Dhn4* (Qian et al. 2007, Mikulková et al. 2009, Suprunova et al. 2004, 2007, Rodriguez et al. 2005) metodou stanovení relativní exprese genů Real Time RT PCR počítanou dle Pfaffl 2001. Pro izolaci RNA ze vzorků byl použit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) dle standardního protokolu. Příprava cDNA pro kvantitativní analýzy byla provedena kitem Reverse Transcription (Qiagen) a geny byly analyzovány využitím QuantiTect™ SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Jako referenční gen byl použit gen pro α-tubulin. Pro gen *Hval1* byly použity primery dle Mikulková et. al. 2009, pro *Hsdr4* primery dle Suprunova et. al. 2007 a pro *Dhn4* – forward 5' AAGTGTACCGCCAAAAGAA a reverse 5' GTCCCTCATGGGCTGGTAAT. Expres vzorků byly porovnány vůči vnitřnímu kalibrátoru reakce (*Malz* 24hod), který byl jednotný pro všechny reakce. Výsledkem měření jsou hodnoty relativní exprese genů normalizované vzhledem k hodnotám relativní exprese referenčního genu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

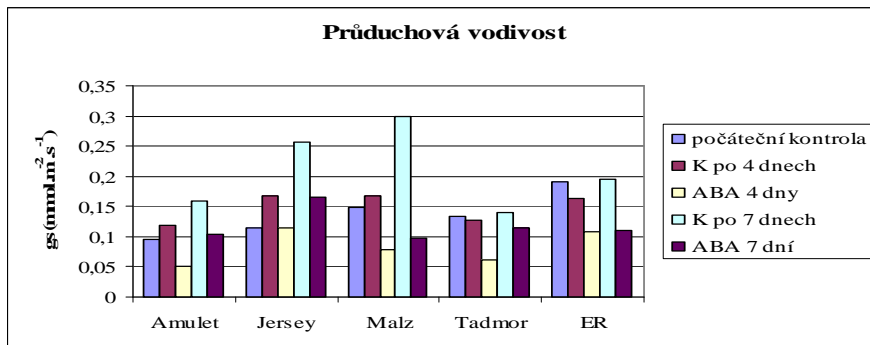
Hodnocení vodivosti průduchů:

Graf 1 Hodnocení IR Termografie



Graf 1 ukazuje hodnocení regulace vodivosti průduchů ABA ošetřených a kontrolních rostlin na základě změny teploty listů. Je patrné, že na aplikaci exogenní ABA zareagovaly všechny odrůdy snížením vodivosti průduchů, s čímž souvisí snížení transpirace rostlin. Teplota listů se zvýšila již po 3 hod od aplikace a nárůst pokračoval i 7. den od aplikace. Nicméně mezi jednotlivými odrůdami nebyl zaznamenán velký rozdíl. Z evropských odrůd na fytohormon ABA nejlépe zareagovala odrůda *Amulet*. Syrská odolná odrůda *Tadmor* nevykázala výrazných rozdílů od ostatních odrůd. Na této fyziologické úrovni nebyla prokázána odlišná reakce rostlin v rámci námi sledovaných odrůd.

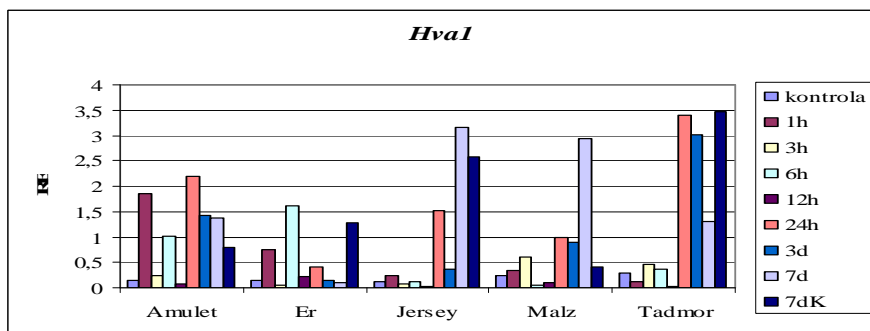
Graf 2 Hodnocení průduchové vodivosti pro vodní páru



Měření průduchové vodivosti užitím přístroje Licor LI-6400 (graf 2) ukázalo obdobnou reakci rostlin po ošetření kyselinou abscisovou jako IR kamera. Tedy, že všechny testované rostliny snížily vodivost průduchů – výdej vodní páry z rostliny do okolního prostředí. V prvním měření (ABA 4 dny) byla zjištěna ve všech případech nižší hodnota vodivosti oproti měření druhému (ABA 7 dní). U kontrolních rostlin odrůd *Amulet*, *Jersey* a *Malz* (*Hordeum vulgare* L.) došlo k postupnému zvyšování průduchové vodivosti v čase (optimální růst, tvorba biomasy), zatímco odrůda *Tadmor* (*Hordeum spontaneum*) se v kontrolách vodivosti průduchů téměř nelišila. Vysvětlením by mohlo být delší setrvávání rostliny ve vegetativní fázi oproti ostatním odrůdám v námi použitém sortimentu. Průduchová vodivost všech ošetřených rostlin také mírně narůstá, což vypovídá o přizpůsobení se rostlin přísadku ABA a pokračováním v růstu. U odrůdy *Jersey* (nejméně odolná k suchu) se ukazuje, že nedokáže zareagovat dostatečným zavřením průduchů. Jako nejplastičtější odrůda se zde jeví odrůda *Malz*.

Hodnocení relativní exprese:

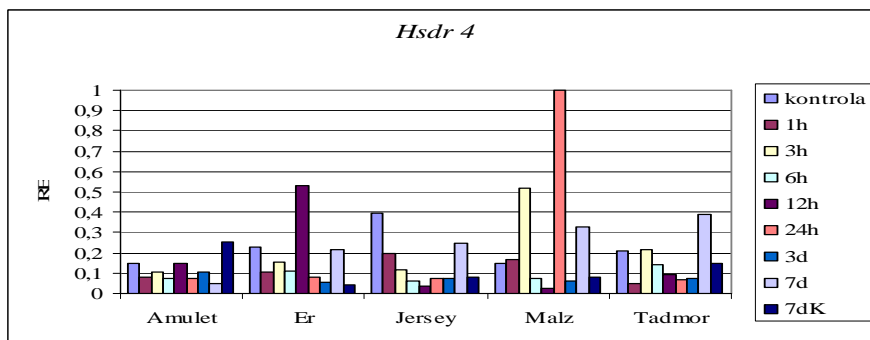
Graf 3 Hodnocení relativní exprese genu *Hva1*



Gen *Hva1* bývá uváděn jako vhodný pro hodnocení citlivosti vůči stresu (Qian et al., 2007, Xu et al., 1996, Hong et al., 1992). Nejvyšší exprese genu (graf 3) (v porovnání s kontrolami z nultého dne) bylo dosaženo u odolné odrůdy *Tadmor* (po 24 h působení ABA). Je možné, že pozdější nástup hodnot relativní exprese byl zkreslen vlivem jiného faktoru jako délka kultivace, či kultivační podmínky během růstu (stres vlivem krátkého dne). U tohoto genu jsme ale zjistili expresi i v kontrolních rostlinách,

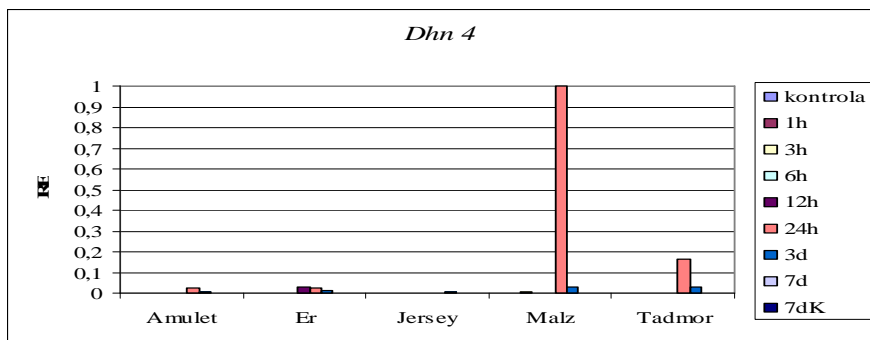
zejména v kontrolních rostlinách ze sedmého dne po ošetření kyselinou abscisovou. Zřejmě se zde projevil nějaký stresový faktor spouštějící expresi tohoto genu. Dle Hong et al. 1992 je vysoká exprese *Hva1* u rostlin i vlivem nedostatku světla. Qian et al. 2007 zjistili, že úroveň relativní exprese genu *Hva1* u jejich sledovaného souboru genotypů bezpluchých ječmenů byla významně vyšší u tolerantních genotypů v dřívější fázi působení sucha, zatímco u citlivých genotypů až v pozdější fázi, což se v našem pokusu s pluchatými odrůdami nepodařilo prokázat. Je pravděpodobné, že hodnocení míry tolerance genotypů vůči suchu na základě genu *Hva1* v rámci dlouhodobého sucha bude složitější. Tento gen bude asi ovlivňován více faktory a nebude vhodným nástrojem pro hodnocení citlivosti vůči stresu suchem.

Graf 4 Hodnocení relativní exprese genu *Hsdr 4*



V rámci našeho pokusu byl gen *Hsdr4* (graf 4) slabě aktivní i u kontrol. Nad úroveň kontrol se v expresi genu dostala pouze odrůda *Malz* a v pozdějším odběru (7 dní) i odrůda *Tadmor*. Nicméně experiment prokázal vliv ABA na expresi tohoto genu, což dokazuje odrůda *Malz* (24 hodin působení ABA). Je tedy pravděpodobné, že u odrůdy *Malz* hraje fytohormon ABA důležitou roli v indukcii stresové reakce. Tento gen popisuje Suprunova et al. 2007 jako nadějný kandidátní gen v souvislosti s tolerancí ječmenů vůči suchu. Ačkoli v jejich práci gen *Hsdr4* není popsán v souvislosti s ABA, naše výsledky ukazují, že je fytohormonem ABA regulován.

Graf 5 Hodnocení relativní exprese genu *Dhn 4*



Mimo odrůdu *Malz* byla zjištěna u všech odrůd exprese genu *Dhn4* (graf 5) na úrovni detekce. Přestože v prvních odběrech odrůda *Malz* vykazovala expresi genu také na hranici detekce, později došlo k nárůstu. Pro tuto odrůdu se potvrzuje pozdější, ale vyšší nástup aktivity (Mikulková et al. 2009). Odolná odrůda *Tadmor* i u genu *Dhn4* zopakovala mírnou expresi a to až v pozdějším odběru. Aktivaci tohoto genu potvrzuje práce Choi et al. 1999, která uvádí, že *Dhn* geny kódované typem YSK₂ (kam řadíme i *Dhn4*) jsou u ječmenů aktivovány suchem a ošetřením kyselinou abscisovou, za „normálních“ podmínek růstu rostlin k expresi genu nedochází. U genu *Dhn4* jsme nezaznamenali aktivaci u kontrolních rostlin, jak tomu bylo v předchozím případě. Můžeme tedy říci, že zvýšení exprese bylo zapříčiněno pouze působením ABA. Pozorované rozdíly mezi odrůdami *Amulet*, *Er/Apm*, *Jersey* a *Malz* odrážejí různou toleranci těchto genotypů vůči abiotickému stresu obecně. Naopak odlišnost mezi odrůdami *Malz* a *Tadmor* ukazuje na odlišnou reakci odrůdy *Tadmor* na ABA. Zjištěné rozdíly v expresi genu jsou pravděpodobně způsobeny odlišným mechanismem v ABA indukční dráze.

ZÁVĚR

Námi zjištěné dosavadní výsledky ukazují, že fyziologická funkce fytohormonu ABA na transpiraci u odrůdy *Tadmor* nebyla odlišná od ostatních námi testovaných odrůd. Tyto odrůdy se tedy výrazně nelišily v regulaci vodivosti průduchů. Dále se na základě našich výsledků ukazuje, že funkce fytohormonu ABA jako signální aktivační molekuly zapojené v aktivaci ochranných genů by mohla být u odrůdy *Tadmor* zřejmě omezena a/nebo nahrazena silnější aktivací alternativní dráhy. Naproti tomu se zdá, že odrůda *Malz* více využívá aktivační dráhu, kde je fytohormon ABA zapojen jako signální aktivační molekula.

LITERATURA

- Choi D-W., Zhu B., Close T. J. (1999): The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allelic types, chromosome assignments, and expression characteristic of 11 *Dhn* genes of cv Dicktoo, Theor Appl Genet 98: 1234-1247.
- Hong B., Barg R., Ho T. H. D. (1992): Developmental and organ-specific expression of an ABA- and stress-induced protein in barley. Plant Mol Biol 18:663-674.
- Jones H.G. (1999): Use of thermography for quantitative studie sof spatial and tempoval variation of stomatal conductance over leaf surfaces. Plant, Cell and Enviroment 22, 1043-1055.
- Mikulková P., Holková L., Hronková M., Klemš M., Bradáčová M. (2009): Efficiency of differential laboratory methods for selection of drought tolerant barley genotypes, Suppl Cereal Research Communications Vol. 37.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures, Physiol Plant 15: 473-497.
- Park S., Y., Noh K. J., Yoo J. H., Yu J. W., Lee B. W., Kim J. G., Seo H. S., Peak J. G. (2006): Rapid Upregulation of *Dehydrin3* and *Dehydrin4* in response to Dehydration Is s Characteristic of Drought-Tolerant Genotypes in Barley, Journal of Plant Biology, 49(6) : 455-462.
- Pfaffl M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR, Nucleic Acids Res. 29 (9): E45-E45.

Portable photosynthesis systém – Book 1, <http://www.dmp.ch>

Qian G., Han Z., Zhao T., Deng G., Pan Z., Yu M. (2007): Genotypic variability in sequence and expression of *HVA1* gene in Tibetan hulless barley, *Hordeum vulgare* ssp. *Vulgare*, associated with resistance to water deficit, Australian Journal of Agricultural Research, 58, 425-431.

Riera M., Valon Ch., Fenzi F., Giraudat J., Leung J. (2005): the genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signalling components, Physiologia Plantarum 123: 111- 119.

Rodriguez E. M., Svensson J.T., Malatrasi C. M., Choi D. W., Close J. T. (2005): Barley Dhn13 encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression, Theor Appl Genet 110: 852–858.

Suprunova T., Krugman T., Fahima T., Chen G., Shams I., Korol A., Nevo E. (2004): Differential expression of dehydrin genes in wild barley, (*Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. Plant Cell Environ, 27:1297-1308.

Suprunova T., Krugman T., Distelfeld, Fahima T., Nevo E., Korol A. (2007): Identification of a novel gene (Hsdr4) involved in water-stress tolerance in wild barley, Plant Molecular Biology, Volume 64, Issue 1-2, 17-34.

Xu D., Duan X., Wang B., Ho T. H. D., Wu R. (1996): Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice, Plant Physiology 110, 249-257.

Zhang J. Z., Creelman R. A., Zhu J. A. (2004): From Laboratory to Field. Using Information from Arabidopsis to Engineer Salt, Cold, and Drought Tolerance in Crops, Plant Physiology, Vol. 135, pp. 615–621.