

Možnosti hodnocení tolerance odrůd ječmene k suchu

Possibility of evaluation of drought tolerance in barley

LUDMILA HOLKOVÁ, LUCIE MELIŠOVÁ, MARTA BRADÁČOVÁ, PAVLÍNA MIKULKOVÁ A JAROSLAVA EHRENBARGEROVÁ

Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Mendel university in Brno, Zemědělská 1, CZ – 613 00 Brno

e-mail: holkova@mendelu.cz

Holková, L. – Melišová, L. – Bradáčová, M. – Mikulková, P. – Ehrenbergerová, J.: Možnosti hodnocení tolerance odrůd ječmene k suchu. Kvasny Prum. 56, č. 3, s. 118–122.

Šlechtění odrůd tolerantních vůči suchu je stále důležitější z hlediska zlepšení výnosů a zdravotního stavu rostlin zvláště u hospodářsky významných plodin. Je založeno na hodnocení a účinné selekci tolerantních genotypů. Hodnocení citlivosti rostlin vůči suchu však není jednoduché, vzhledem ke komplexnímu charakteru této vlastnosti. Cílem této práce bylo porovnat stresové reakce pěti různých citlivých genotypů ječmene (*Tadmor*, *Malz*, *Amulet*, *Bojos* a *Jersey*) vystavených stresu suchem pomocí molekulárně biologické metody založené na hodnocení aktivity dvou dehydrinových genů (*Dhn1* a *Dhn4*) a ověřit účinnost této metody nejen v laboratorních podmínkách, ale i v nádobovém pokusu, kdy byla regulována pouze závlhka. Přesnější hodnocení bylo prováděno na rostlinách pěstovaných v kultivačním boxu hydroponicky v podmínkách fyziologického sucha (–0,3 MPa). Transkripční aktivita obou genů byla hodnocena v průběhu 14 dnů ve vzorcích z listových tkání v závislosti na citlivosti vůči stresovým podmínkám. U tolerantnějších genotypů (*Tadmor* a *Malz*) byla zaznamenána nižší ztráta vody z pletiv a vyšší exprese obou genů. Srovnatelné výsledky pro jednotlivé odrůdy byly získány i v nádobovém pokusu. Opět se projevila závislost mezi aktivitou těchto genů a citlivostí odrůd k suchu, zvláště ve fázi metání a plnění zrna. U testovaného souboru odrůd byla dále hodnocena aktivita obou genů v závislosti na působení exogenně aplikovaného fytohormonu ABA. Ukázalo se, že tímto fytohormonem byla aktivována exprese pouze genu *Dhn4* a výrazné zvýšení jeho exprese bylo pozorováno pouze u odrůdy *Malz*. Srovnáním výsledků ze všech tří experimentů jsme ověřili nejen vhodnost použití této metody jako nástroje pro stanovení tolerance ječmene vůči suchu, ale u tolerantnějších odrůd *Tadmor* a *Malz* jsme zaznamenali dva odlišné mechanismy aktivity stresových obranných reakcí, které by mohly být způsobeny rozdílnou mírou zapojení fytohormonu ABA v jejich regulaci.

Holková, L. – Melišová, L. – Bradáčová, M. – Mikulková, P. – Ehrenbergerová, J.: Possibility of evaluation of drought tolerance in barley. Kvasny Prum. 56, No. 3, p. 118–122.

Breeding of drought-tolerant varieties, which is steadily gaining in importance for improving crop yields and health condition of economically important crops, is based on evaluation and efficient selection of tolerant genotypes. The assessment of plant sensitivity to drought is not simple owing to the complex character of this trait. We compared the stress responses of five different barley genotypes with different sensitivity (*Tadmor*, *Malz*, *Amulet*, *Bojos* and *Jersey*) exposed to drought stress by using a molecular biological method based on evaluating the activity of two dehydrin genes, *Dhn1* and *Dhn4*. The efficiency of the method was verified in laboratory conditions and also in a pot experiment in which only watering was regulated. More detailed evaluation was done on plants grown hydroponically in a cultivation box under conditions of physiological drought (–0.3 MPa). Transcription activity of both genes, as dependent on stress sensitivity, was evaluated over 14 days in leaf tissue samples. The more tolerant genotypes (*Tadmor* and *Malz*) exhibited lower water losses from tissues and higher expression of both genes. Comparable results for individual varieties were obtained also in the pot experiment, which confirmed the relationship between the activity of these genes and drought sensitivity, especially in the phase of earing and grain formation. The activity of the two genes was further evaluated under the action of exogenously applied phytohormone ABA. ABA was found to activate only the expression of the *Dhn4* gene and a marked increase in expression was observed only in variety *Malz*. Comparison of results of all three experiments documented the usefulness of the method as a tool for determining drought tolerance of barley and revealed two different mechanisms of activation of stress protective responses in the two tolerant varieties *Tadmor* and *Malz*, which could reflect a different participation of the ABA phytohormone in their regulation.

Holková, L. – Melišová, L. – Bradáčová, M. – Mikulková, P. – Ehrenbergerová, J.: Die Möglichkeiten der Toleranzauswertung von Gerstensorten gegenüber Dürre. Kvasny Prum. 56, Nr. 3, S. 118–120.

Aus dem Gesichtspunkt der Ertragsverbesserung und des Gesundheitsstandes von Pflanzen ist die Veredelung der gegenüber Dürre toleranten wirtschaftlich wichtigen Gerstensorten immer wichtiger geworden. Die Veredelung ist auf der Basis einer Auswertung und einer wirksamen Selektion von tolerant Genotypen begründet. Die Auswertung von Pflanzenempfindlichkeit gegenüber Dürre ist auf Grund des Komplexcharakters dieser Eigenschaft jedoch nicht einfach. Das Ziel dieser Arbeit war folgendes: die Stressreaktionen von fünf unterschiedlich empfindlichen und der Dürre unterworfenen Gerstengenotypen (*Tadmor*, *Malz*, *Amulet*, *Bojos* und *Jersey*) durch die auf der Basis einer Auswertung von zwei Dehydrin Gens (*Dhn1* und *Dhn4*) gegründete molekulare – biologische Methode festzustellen und die Wirksamkeit dieser Methode nicht nur unter Laborbedingungen aber auch im einen Gefäßversuch, wann nur die Begießung reguliert wurde, überprüfen. Mit den im Züchtungsbehälter unter Bedingungen der physiologischen Trockenheit hydroponisch gezüchteten Pflanzen (–0,3 MPa) wurde eine genauere Messung durchgeführt. Im Zeitraum 14 Tagen wurde eine transkription Aktivität der zwei Gene in den Mustern des Blattgewebes in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit gegenüber Stressbedingungen. Größer Verlust des Gewebewassers und eine höhere Expression der beiden Gene wurde bei den mehr toleranten Genotypen (*Tadmor* und *Malz*) notiert. Im einen Gefäßversuch wurden für einzelne Versuche auch vergleichbare Resultate erhalten. Die Abhängigkeit zwischen der Aktivität der Gene und der Empfindlichkeit gegenüber Dürre besonders in Periode von Schossen bis zum Vollreife des Kornes wurde wieder festgestellt. Bei den getesteten Gerstensorten wurde weiterhin die Aktivität der zwei Gene in Abhängigkeit auf die Wirkung des exogen angewandten Phytohormons ABA ausgewertet. Es wurde festgestellt, dass durch dieses Phytohormon nur die Expression des Gens *Dhn4* aktiviert und eine bedeutende Erhöhung der Expression nur bei der Gerstensorte *Malz* betrachtet wurde. Durch den Vergleich von aus allen drei Experimenten wurde nicht nur die Zweckmäßigkeit dieser Methode als eines Instruments zur Feststellung der Gerstentoleranz gegenüber Dürre, aber bei den mehr toleranten Gerstensorten *Tadmor* und *Malz* sind zwei verschiedene Mechanismen der Aktivierung der Abwehrreaktionen gegen Stress erschienen worden, die durch einen unterschiedlichen Grad der Nachwirkung des Phytohormons ABA in ihrer Regulation verursacht werden konnten.

Klíčová slova: tolerance vůči suchu, *Dhn* geny, ABA, ječmen**Keywords:** drought tolerance, *Dhn* genes, ABA, barley

1 ÚVOD

Sucho je celosvětově považováno za jeden z nejzávažnějších stresových faktorů, který negativně ovlivňuje zemědělskou produkci. Přirozené adaptační mechanismy kulturních plodin nejsou vždy schopny dostatečně reagovat na zhoršující se klimatické podmínky. Výběr a pěstování tolerantních genotypů je proto často jedinou možností, jak udržet, případně zlepšit výnos a kvalitu produkce v podmínkách stále se zvyšujícího vláhového deficitu. I když je tolerance rostlin vůči abiotickému stresu z velké části geneticky založena [1], je šlechtění tolerantních genotypů obtížné, protože adaptace rostlin na stresové podmínky jsou podmíněny mnoha morfoloogickými vlastnostmi a fyziologickými a biochemickými procesy spojenými s ochranou rostlinných buněk vůči vysychání [2].

Ve vztahu ke zvýšené toleranci vůči suchu bývá hodnocena např. velikost kořenového systému [3], odnožovací schopnost, počet a velikost průduchů, tloušťka kutikuly. Na fyziologické úrovni je sledována účinnost využití vody v buňkách, procesy související s regulací transpirace a fotosyntézy a hodnocení osmotického potenciálu buněk [4]. Důležitým parametrem bývají hodnoty udávající obsah fytohormonu kyseliny abscisové (ABA). ABA hraje v adaptačních mechanismech rostlin dvě důležité role. Jednak reguluje uzavírání a otevírání průduchů, a tím ovlivňuje ztrátu vody transpirací, a dále je zapojena v indukcii aktivace mnoha genů kódujících ochranné bílkoviny v tak zvané ABA závislé transkripční dráze [5]. Mezi ochranné bílkoviny patří i dehydriny – proteiny zařazované do skupiny COR/LEA (Cold-responsive/ Late Embryogenesis Abundant). Jejich funkce není přesně známa, ale předpokládá se, že při nedostatku vody chrání buňky před vysycháním [6].

S rozvojem metod molekulární biologie jsou v posledních letech pro hodnocení citlivosti rostlin vůči abiotickému stresu stále častěji testovány metody, založené na hodnocení exprese těchto ochranných genů buď na úrovni výsledných proteinů [7], nebo je používána citlivější metoda hodnocení transkripční aktivity těchto genů pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR) [8]. Ukazuje se, že čím jsou genotypy tolerantnější, tím je během stresu vyšší exprese těchto genů a je zaznamenáván dřívější nástup této reakce. Konkrétně u ječmene bylo použito hodnocení exprese genů *Dhn1* a *Dhn6* [8], *Dhn3* a *Dhn4* [9]. Vzhledem k velké citlivosti této metody byla v uvedených publikacích hodnocena transkripční aktivita genů pouze krátkodobě a v přesně definovaných kultivačních podmínkách.

Naše práce se zabývá hodnocením stresových reakcí pěti odrůd ječmene s různou úrovní tolerance vůči suchu vystavených dvěma různě intenzivním stresovým podmínkám. Hodnocení bylo prováděno pomocí molekulárně biologické metody založené na měření relativní exprese dvou dehydrinových genů (*Dhn1* a *Dhn4*). Hlavním cílem bylo ověřit účinnost této metody nejen v laboratorních podmínkách, ale i v nádobovém pokusu s omezenou záhlvkou.

2 MATERIÁL A METODY

Pro hodnocení citlivosti vůči suchu bylo vybráno 5 odrůd ječmene: *Tadmor* (*Hordeum vulgare*, spp. *spontaneum*), syrská krajová odrůda dobře adaptovaná na sucho, české odrůdy ječmene jarního *Amulet*, *Bojos* a *Malz* a holandská odrůda jarního ječmene *Jersey* (*Hordeum vulgare* L.).

2.1 Hodnocení tolerance vůči fyziologickému suchu

Rostliny byly pěstovány hydroponicky v živném roztoku solí [10] za řízených světelných a teplotních podmínek (12hodinový den; teplota 18 °C den/16 °C noc). Po 14 dnech byl polovině semenáčků přidán do živného roztoku polyetylen glycol (PEG 6000) o koncentraci, která způsobuje fyziologické sucho –0,3 MPa. Za stejných podmínek byla pěstována kontrolní varianta bez přidání PEG. Vzorky listů pro stanovení exprese *Dhn* genů byly odebrány v intervalech 3, 6, 12 a 24 hodin a 4, 7 a 14 dnů po aplikaci PEG.

2.2 Hodnocení vlivu exogenní ABA na účinnost transpirace a expresi genu *Dhn4*

Rostliny byly pěstovány v hydroponickém prostředí v živném roztoku MS solí [10] v řízených podmínkách (7 hodin světla při teplotě 20 °C, 15 hodin tmy při 18 °C). Po čtrnácti dnech růstu byl do živného roztoku přidán roztok kyseliny abscisové (2.10⁻⁵ mol/l). Fyziologická reakce byla posuzována změnami ve vodivosti průduchů me-

1 INTRODUCTION

Drought is generally taken as one of the most serious stress factors with adverse effect on agricultural production. Since natural adaptive mechanisms of cultural crops are not always able to cope with worsening climatic conditions, selection and breeding of tolerant genotypes is therefore the only possibility for maintaining or improving the yield and quality of production under conditions of steadily increasing moisture deficit. Although the tolerance of plants against abiotic stress is for the most part genetically based [1], the breeding of tolerant genotypes is difficult because adaptations of plants to stress conditions depend on many morphological properties and physiological and biochemical processes associated with the protection against dehydration [2].

Features evaluated in connection with drought tolerance include, e.g., the size of the root system [3], tillering ability, number and size of stomata, and thickness of cuticle. Drought-tolerance associated physiological features include the efficiency of water utilization in cells, processes associated with regulation of transpiration and photosynthesis, and osmotic potential of cells [4]. An important parameter is the content of the phytohormone abscisic acid (ABA). ABA plays two important roles in the adaptive mechanisms of plants. It regulates stomatal closing and opening, modifying thereby the loss of water by transpiration, and is also engaged in inducing activation of many genes encoding protective proteins in the so-called ABA-dependent transcription pathway [5]. The protective proteins include also dehydrins, proteins belonging to the COR/LEA (Cold-responsive/Late Embryogenesis Abundant) family. Their exact function is not known but they are assumed to protect cells from drying up during water shortage [6].

Thanks to the development of molecular biological methods in recent years, the evaluation of plant sensitivity to abiotic stress is more and more frequently performed by methods based on evaluation of expression of appropriate protective genes on the level of the resulting proteins [7]. Alternatively, a more sensitive method is used entailing the evaluation of transcriptional activity of these genes by quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) [8]. The more tolerant the genotype, the higher is the expression of these genes during stress and the earlier is the onset of this reaction. The genes evaluated in this way in barley include *Dhn1* and *Dhn6* [8], *Dhn3* and *Dhn4* [9]. In view of the high sensitivity of the method these studies were used to evaluate the transcriptional activity only for a short period and in precisely defined cultivation conditions.

We performed the evaluation of stress reactions of five barley varieties with different levels of drought tolerance, exposed to two sets of stress conditions of different intensity. The evaluation was performed by a molecular biological method based on measuring the relative expression of two dehydrin genes, *Dhn1* and *Dhn4*. The main aim was to verify the efficiency of the method in laboratory conditions as well as in a pot experiment under limited watering.

2 MATERIALS AND METHODS

Five barley varieties were evaluated for their drought resistance: *Tadmor* (*Hordeum vulgare*, spp. *spontaneum*), a Syrian landrace well adapted to drought, Czech spring barley varieties *Amulet*, *Bojos* and *Malz*, and the Holland spring barley variety *Jersey* (*Hordeum vulgare* L.).

2.1 Evaluation of tolerance against physiological drought

The plants were cultivated hydroponically in a nutrient saline [10] under controlled light and temperature conditions (12-hour day; temperature 18 °C day/16 °C night). After 14 days half of the seedlings received into the nutrient saline polyethylene glycol (PEG 6000) at a concentration that causes physiological drought of –0.3 MPa. Control variant without PEG addition was cultivated under identical conditions. Leaf samples for determining the expression of *Dhn* genes were collected at intervals of 3, 6, 12 and 24 hours and 4, 7 and 14 days after PEG application.

2.2 Evaluation of effect of exogenous ABA on transpiration efficiency and expression of *Dhn4* gene

The plants were cultivated hydroponically in a nutrient saline [10] under controlled light and temperature conditions (7 hours of light at

todou IR termografie s použitím IR termovizní kamery (FLIR P660) [11]. Metoda hodnotí termální energii emitovanou z povrchu listu. Při stavu otevřených průduchů odpařující se voda ochlazuje list. ABA vyvolá zavření průduchů, čímž způsobí zvýšení teploty listů. Snímání povrchu listů IR termokamerou bylo provedeno 3 hodiny a 7 dní po aplikaci ABA. Expres *Dhn4* byla hodnocena 6, 12 a 24 hodin, 3 a 7 dnů ve směsných vzorcích z druhého pravého listu.

2.3 Hodnocení vlivu omezené závlivky v průběhu vegetace (nádobový pokus)

Každá odrůda byla vyseta do 6 nádob o objemu 8 l (po 9 rostlinách). Nádoby byly umístěny pod zahradní přístřešek, který umožnil regulovat závlivku. Po výsevu byla v celém experimentu udržována vlhkost na 75 % plné vodní kapacity. Po čtyřech týdnech byl u poloviny nádob zaveden režim omezené závlivky (30 % vodní kapacity) a udržován až do konce vegetace. Ostatní podmínky zůstaly závislé na ročním období a aktuálním počasí (délka dne, teplota, vlhkost vzduchu). V pěti termínech v závislosti na době trvání omezené závlivky a růstové fázi rostlin byly z každého květináče odebrány směsné vzorky listů (asi 0,2 g) na izolaci RNA. Odběry byly prováděny v následujících termínech: I. Odběr – fáze konec odnožování (3 dny omezená závlivka), II. Odběr – fáze sloupkování (6 dnů omezená závlivka), III. Odběr – fáze počátek metání (14 dnů omezená závlivka), IV. Odběr – fáze metání (26 dnů omezená závlivka) a V. Odběr, vzorky odebrány z praporcového listu (6 týdnů růstu při omezené závlivce).

2.4 Izolace RNA a qRT PCR

RNA byla extrahována z 50 mg pletiva nejmladšího plně vyvinutého listu pomocí kitu Ambion RNAqueous™ Kit a purifikována DNázou Turbo DNA free free™ (Ambion). První řetězec cDNA byl připraven z 500 ng RNA za pomoci kitu QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen). Kvantifikace exprese genů byla provedena metodou Real time PCR za pomoci kitu QuantiTect (SYBR Green PCR Kit, Qiagen). Podmínky reakcí pro gen *Dhn1* byly nastaveny dle [7] a pro gen *Dhn4 dle* [14]. Transkripční aktivita byla hodnocena jako normalizovaná relativní exprese počítaná s ohledem na účinnost qPCR reakcí podle metody [12]. Změny v aktivitách obou genů byly normalizovány vzhledem k referenčnímu genu (α -tubulin) a vztaženy k expresi hodnocených genů za optimálních podmínek.

Všechny hodnoty uvedené v grafech (kromě obr. 1) představují průměrné hodnoty ze 3–7 měření a jsou doplněny směrodatnými odchylkami (\pm SD).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Po přidání PEG do živného roztoku je možno sledovat vývoj stresové odpovědi v čase od přesně stanoveného počátku, proto je tento způsob navození fyziologického stresu často využíván pro přesné stanovení dynamiky stresové odpovědi a hodnocení míry poškození rostlin. Po 14 dnech pěstování v roztoku PEG korespondoval celkový vzhled rostlin s úbytkem vody z listových pletiv (obr. 1). Nejmenší ztráty vody a tedy nejvyšší toleranci vůči experimentálním podmínkám vykázaly odrůdy *Tadmor* a *Malz*, které ztratily 4x až 8x méně vody než citlivější odrůdy, započítáme-li mezi ně *Amulet*, *Bojos* a *Jersey*.

V průběhu experimentu byla obranná stresová reakce rostlin hodnocena na molekulární úrovni pomocí sledování exprese dvou dehydrinových genů *Dhn4* a *Dhn1* (obr. 2).

Vysoká relativní exprese obou genů byla detekována u obou tolerantních odrůd (*Tadmor* i *Malz*). Mezi oběma odrůdami však byly pozorovány rozdíly z hlediska doby, kdy byla zaznamenána nejvyšší exprese těchto stresových genů. U odrůdy *Malz* byly nejvyšší hodnoty exprese obou genů naměřeny po 7 dnech trvání stresu, zatímco u tolerantnější odrůdy *Tadmor* až o týden později. Tento výsledek neodpovídá obecně předstávě, protože tolerantnější genotypy vykazují nejen vyšší hladinu exprese stresových genů, ale i dřívější nástup aktivace těchto genů a reakce na nižší hladinu stresu [7, 13]. U odrůdy *Tadmor* zaznamenáváme opakovaně pozdější nástup exprese stresových genů oproti jiným méně tolerantním odrůdám. K vysvětlení tohoto stavu by mohly přispět hodnoty koncentrace stresového fytohormonu ABA [14]. Genotypově závislé rozdíly v obsahu ABA u stresovaných rostlin odpovídaly (až na *Tadmor*) úrovni poškození rostlin suchem, přičemž nejvyšší hladina ABA byla zjištěna u odrůdy *Malz* a nejnižší u nejvíce poškozené odrůdy *Jersey*. U vysoce tolerantní odrůdy *Tadmor* se hladina fytohormonu ABA vlivem sucha zvyšovala později, než u jiných odrůd a pouze na úroveň citlivých genotypů.

20 °C; 15 hours of darkness at 18 °C). After 14 days half of the seedlings received into the nutrient saline a solution of abscisic acid ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Physiological response was assessed from changes in stomatal conductivity by IR thermography with the use of an IR thermovision camera (FLIR P660) [11]. The method assays the thermal energy emitted from leaf surface. When the stomata are open, water evaporation cools down the leaf. ABA brings about stomatal closure, causing thereby increase in leaf temperature. Leaf surface was recorded by IR thermo camera 3 hours and 7 days after ABA application. Expression of *Dhn4* was evaluated after 6, 12 and 24 hours, 3 and 7 days in mixed samples of the second proper leaf.

2.3 Evaluation of the effect of limited watering during vegetation (pot experiment)

Each variety was sown into 6 pots of 8 l volume (9 plants each). The pots were placed under a garden shed that allowed for watering regulation. After sowing the whole experiment was kept at a moisture level of 75 % full water capacity. The regime of limited watering (30% water capacity) was introduced in half the plants after four weeks and was maintained until the end of vegetation. Other conditions depended on the season and current weather (duration of daylight, temperature, air moisture). At five time points depending on the duration of the limited watering and the plant growth phase, mixed leaf samples (about 0.2 g) were taken from each pot for RNA isolation. The sampling was done at the following time points: Sampling I – end of bolting phase (3 days of limited watering), sampling II – stem elongation phase (6 days of limited watering), sampling III – phase of beginning of ear formation (14 days of limited watering), sampling IV – earing phase (26 days of limited watering) and sampling V – samples taken from a flag leaf (6 weeks of growth at limited watering).

2.4 Isolation of RNA and qRT PCR

RNA was extracted from 50 mg tissue of the youngest fully developed leaf by Ambion RNAqueous™ Kit and purified by Turbo DNA free™ DNase (Ambion). The first cDNA strand was prepared from 500 ng RNA using the QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen). Quantification of gene expression was carried out by Real time PCR using the QuantiTect (SYBR Green PCR Kit, Qiagen). Reaction conditions for the *Dhn1* gene were adjusted according to [7] (*Dhn1*) and [14] (*Dhn4*). Transcriptional activity was evaluated as a normalized relative expression calculated with regard to the efficiency of qPCR reactions according to the method [12]. Changes in the activities of the two genes were normalized relative to a reference gene (α -tubulin) and referred to the expression of evaluated genes under optimum conditions.

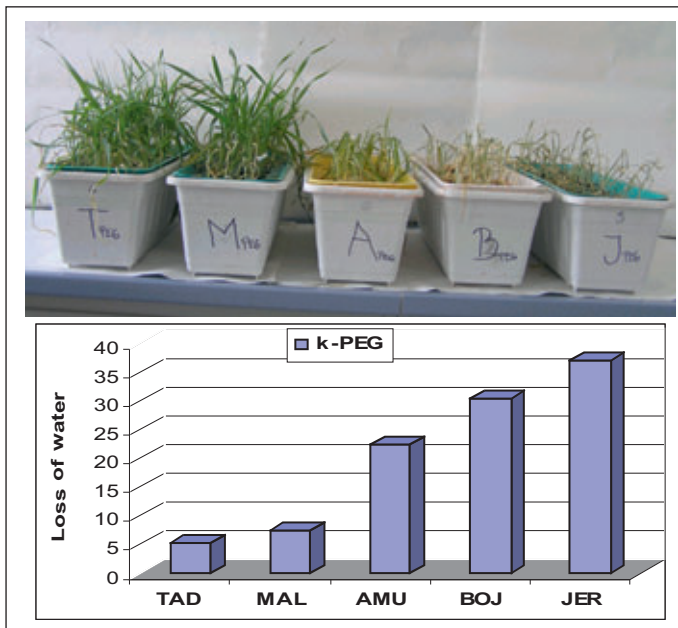
All values given in graphs (except Fig. 1) are mean values from 3 – 7 measurements with standard deviations (\pm SD).

3 RESULTS AND DISCUSSION

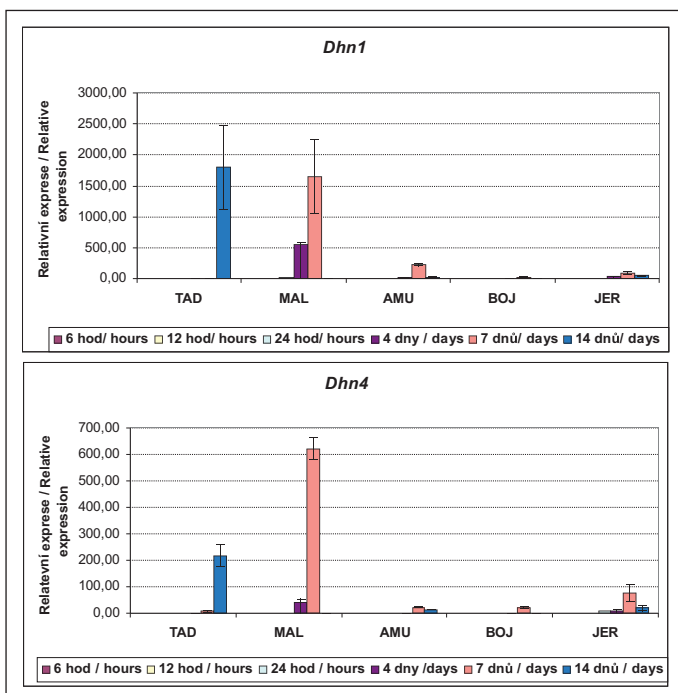
After the addition of PEG to the nutrient saline the time evolution of the stress response can be followed from an exactly defined beginning. This method of induction of physiological stress is therefore used for exact determination of the dynamics of the stress response and evaluation of the extent of plant damage. After 14 days of cultivation in PEG solution the overall appearance of the plants corresponded to the loss of water from leaf tissues (Fig. 1). The least water losses and thus the highest tolerance to the experimental conditions was displayed by *Tadmor* and *Malz*, which lost 4x to 8x less water than the more sensitive varieties *Amulet*, *Bojos* and *Jersey*.

The protective stress response on molecular level was examined in the course of the experiment by determining the expression of the two dehydrin genes *Dhn4* and *Dhn1* (Fig. 2.)

A high relative expression of both genes was detected in both tolerant varieties *Tadmor* and *Malz*. However, the two varieties differed in the time period of the highest expression of these stress genes. *Malz* showed the highest expression of both genes after 7 days of stress while in the more tolerant *Tadmor* it was observed a week later. This finding does not correspond to the generally held notion since more tolerant genotypes exhibit not only a higher expression of stress genes but also an earlier onset of activation of these genes and a response to lower stress levels [7, 13]. *Tadmor* was repeatedly found to exhibit a later onset of expression of stress genes than other less tolerant varieties. The explanation could invoke the concentrations of the phytohormone ABA [14]. With the exception of *Tadmor* the genotype-dependent differences in the content of ABA in stressed plants



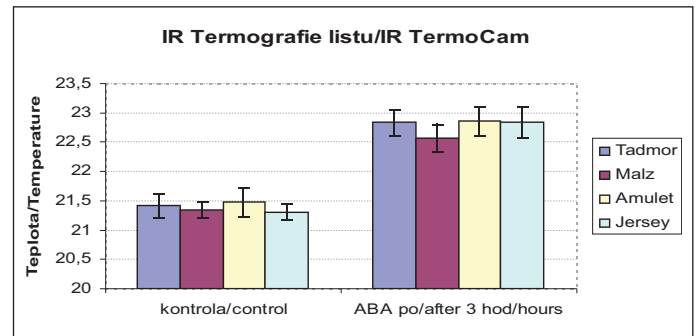
Obr. 1 Genotypově závislé rozdíly v poškození rostlin po 14 dnech působení osmotického stresu (-0,3 MPa), celkový vzhled a ztráta vody z listových pletiv (%) / Fig. 1 Genotype dependent differences in plant damage after two weeks osmotic stress (-0.3 MPa). Plant dehydration is expressed as a percentage of water loss from the leaf tissues.



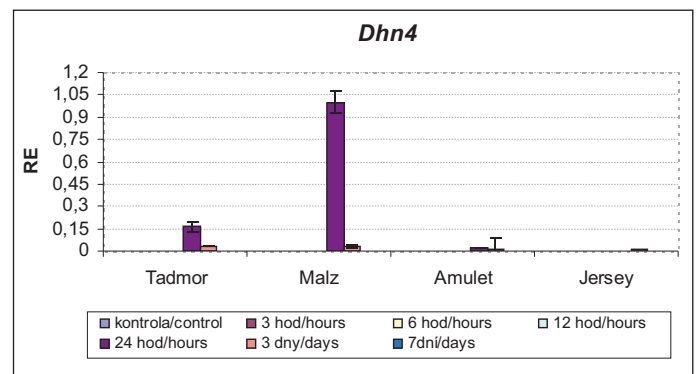
Obr. 2 Hodnocení relativní exprese genů *Dhn1* a *Dhn4* v podmínkách fyziologického sucha -0,3 MPa u odrůd *Tadmor* (TAD), *Malz* (MAL), *Amulet* (AMU), *Bojos* (BOJ) a *Jersey* (JER) / Fig. 2 Relative expression of *Dhn1* and *Dhn4* genes under drought (PEG -0.3 MPa). The level of the expression was evaluated in cultivars *Tadmor* (TAD), *Malz* (MAL), *Amulet* (AMU), *Bojos* (BOJ) and *Jersey* (JER).

Vliv fytohormonu ABA na vyvolání stresové odpovědi byl proto u těchto odrůd hodnocen samostatně přidáním exogenní kyseliny abscisové ke kořenům hydroponicky rostoucích rostlin.

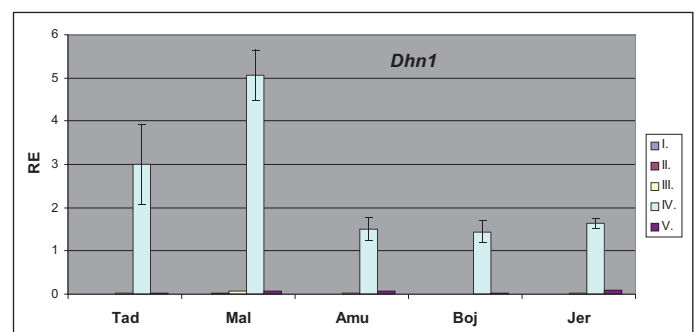
Následné nepřímé hodnocení fyziologické odpovědi rostlin na tento zásah pomocí termokamery (obr. 3) ukázalo, že rostliny všech testovaných odrůd reagovaly na ABA zvýšením teploty listů, tedy přivřením průduchů a následným snížením transpirace. Rozdíly mezi odrůdami v rámci odběrů však nebyly průkazné. Je tedy pravděpodobné, že regulace transpirace u odrůdy *Tadmor* nebyla významně odlišná od ostatních odrůd, bez ohledu na jejich citlivost vůči suchu.



Obr. 3 Hodnocení povrchové teploty listů po aplikaci exogenní ABA ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l) pomocí IR termografie / Fig. 3 Evaluation of the leaf surface temperature by IR thermography.



Obr. 4 Vliv exogenní ABA ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l) na relativní expresi (RE) genu *Dhn4* / Fig. 4 Effect of exogenous ABA ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l) on relative expression level (RE) of *Dhn4* gene.



Obr. 5 Hodnocení relativní exprese (RE) genu *Dhn1* v listech ječmene pěstovaného v půdě při omezené závlivce / Fig. 5 Evaluation of a relative expression (RE) level of *Dhn1* gene in barley plants grown in soil under limited watering.

corresponded to the level of plant drought damage; the highest level of ABA was found in *Malz*, the lowest in the variety *Jersey* displaying the greatest damage. In the highly tolerant variety *Tadmor* the drought-induced increase in the level of ABA set in later than in other varieties and reached only the level found in more sensitive genotypes.

For this reason the effect of ABA on induction of stress response in these variants was assessed separately by adding exogenous abscisic acid to the roots of hydroponically growing plants.

The indirect evaluation of the physiological response of plants to this treatment by thermo camera (Fig. 3) showed an ABA-occasioned increase in leaf temperature of all tested varieties, i.e. stomatal closure followed by a drop in transpiration. Differences among varieties in individual samplings were not significant. The regulation of transpiration in *Tadmor* is therefore probably not significantly different from that in other varieties irrespective of their drought sensitivity.

By contrast, the response of *Tadmor* plants on molecular level (Fig. 4) is seen to differ from that of the other tolerant variety *Malz*. Increased expression of gene *Dhn4* was recorded 24 hours after ABA

Naopak na molekulární úrovni (obr. 4) je zřejmé, že reakce rostlin odrůdy *Tadmor* se odlišuje od reakce další tolerantní odrůdy *Malz*. Zvýšenou expresi genu *Dhn4* jsme zaznamenali 24 hodin po přidání ABA pouze u obou těchto tolerantních odrůd, avšak u odrůdy *Tadmor* jsme pozorovali pouze 15% nárůst exprese oproti odrůdě *Malz*, tedy nižší úroveň a pravděpodobně i opožděnější reakci. Expese druhého testovaného dehydrinového genu *Dhn1* nebyla za daných experimentálních podmínek pozorována. Úloha fytohormonu ABA v aktivaci genu *Dhn1* je zřejmě malá nebo se ABA na aktivaci tohoto genu nepodílí. To by vysvětlovalo menší rozdíly v expresi tohoto genu mezi oběma odrůdami (obr. 2).

Naše výsledky naznačují, že nepřesnosti v hodnocení citlivosti odrůdy *Tadmor* vůči suchu na základě stanovení relativní exprese *Dhn* genů mohou být způsobeny omezenou nebo odlišnou funkcí fytohormonu ABA nebo odlišnou citlivostí tohoto genotypu vůči tomuto fytohormonu. Přesnější závěry komplikuje fakt, že odrůda *Tadmor* nemá jednoznačně jarní habitus. Pro přechod do generativního stavu potřebuje v našich podmínkách krátkou dobu vernalizace. Vzhledem k tomu, že v našich experimentech nebyly zařazeny jiné ozimé linie, nemůžeme vyloučit, že reakce odrůdy *Tadmor* nesouvisí s jeho vyššími nároky na vernalizaci.

Na úrovni exprese genu *Dhn1* byla u stejného souboru odrůd dále hodnocena stresová reakce vyvolaná omezenou závlivkou (30% celkového nasycení půdy). Režim omezené závlivky byl udržován kontinuálně od 4. týdne po výsevu až do sklizně. Průměrné hodnoty relativní exprese genu *Dhn1* v jednotlivých fázích růstu (odběry I. – V.) jsou uvedeny na obr. 5.

Vzhledem k náročnosti měření byly hodnoceny směsné vzorky ze tří nádob od každé varianty a odběru. Nástup aktivity genu *Dhn1* byl zaznamenán až ve třetím odběru v době sloupkování až počátku metání, maximální hodnoty byly dosaženy ve IV. odběru (metání), kdežto v období vývoje praporového listu (V. odběr) již aktivita genu opět klesala. V prvních dvou odběrech nebyla zaznamenána žádná aktivita ani u jedné odrůdy. Bylo to zřejmě způsobeno postupným vysycháním zeminy v nádobách. I když hodnoty relativní exprese v grafech na obr. 2 a 5 nelze vzájemně porovnat (jsou to relativní hodnoty srovnatelné pouze v rámci jednoho pokusu), byly výsledky hodnocení odrůd v obou pokusech obdobné. Testované odrůdy bylo možno podle úrovně relativní exprese genu *Dhn1* ve IV. odběru opět rozdělit do dvou skupin, jako u předcházejícího pokusu (obr. 2 a obr. 5), na tolerantní nebo méně citlivé odrůdy *Tadmor* a *Malz* a citlivější odrůdy *Amulet*, *Bojos* a *Jersey*. Problémem této metody se ukazuje velké kolísání naměřených hodnot, které je zřejmé z grafu na obr. 5. Tento problém se však dá řešit zvýšením počtu hodnocených vzorků v rámci jednoho odběru.

Poděkování

Práce byla podpořena projektem MŠMT 1M0570 – Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele a granty MZe NAZV QH91192 a IG290071.

LITERATURA / REFERENCES

1. Teulat, B., Merah, O., Sirault, X., Borries, C., Waugh, R. and This, D.: QTLs for grain carbon isotope discrimination in field-grown barley. *Theor Appl Genet* **106**, 2002, 118–126.
2. Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F.W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Francia, E., Mare, C., Tondelli, A. and Stanca, A. M.: Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research* **105**, 2008, 1–14.
3. Chloupek, O., Foerster, B. P. and Thomas, W. T.: The effect of semi-dwarf genes on root system size in field-grown barley. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 2006, 779–786.
4. Szira, F., Balint, A. F., Borner, A. and Galiba, G.: Evaluation of Drought-Related Traits and Screening Methods at Different Developmental Stages in Spring Barley. *J. Agronomy & Crop Science* **194**, 2008, 334–342.
5. Nakashima, K., Ito, Y., and Yamaguchi-Shinozaki, K.: Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in Arabidopsis and Grasses. *Plant Physiology* **149**, 2009, 88–95.
6. Campbell, S. A. and Close, T. J.: Dehydrins: genes, proteins and associations with phenotypic traits. *New Phytologist* **137**, 1997, 61–74.
7. Kosová, K., Holková, L., Prášil, I. T., Prášilová, P., Bradáčová, M., Vítámvás, P. and Čapková, V.: Expression of dehydrin 5 during the development of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare*) *Journal of Plant Physiology* **165**, 2008, 1142–1151.
8. Surprunova, T., Krugman, T., Fahima, T., Chen, G., Shams, I., Korol, A. and Nevo, E.: Differential expression of dehydrin genes in

addition only in these two tolerant varieties; however, *Tadmor* evinced only a 15% increase of expression, i.e. a lower and probably more delayed response as compared to *Malz*. An expression of the other dehydrin gene *Dhn1* was not observed under these conditions. The role of ABA in the activation of gene *Dhn1* is apparently low or absent. This could explain the small differences in the expression of this gene between the two varieties (Fig. 2).

Our results show that the inaccuracies in the evaluation of *Tadmor* drought sensitivity, as determined by the relative expression of *Dhn* genes, can stem from a limited or different function of ABA or from different sensitivity of this genotype to this phytohormone. More exact conclusions are complicated by the fact that *Tadmor* is not an unambiguously spring variety and requires, under our conditions, a short vernalization period for transition to the generative condition. Our experiments did not involve any other winter varieties and we thus cannot exclude that the response of *Tadmor* is related to its higher vernalization requirements.

Stress response to limited watering (30% total water capacity) in terms of expression of gene *Dhn1* was evaluated in the same set of varieties. The regime of limited watering was kept continuously from week 4 after sowing until harvest. The mean values of relative expression of gene *Dhn1* in individual growth phases (samplings I to V) are given in Fig. 5.

In view of the labor-intensive measurements, mixed samples from three pots of each variant and sampling were evaluated. The onset of gene *Dhn1* activity was recorded only in sampling III in the period of stem elongation until the beginning of heading, maximum values being attained in sampling IV (heading). In the phase of development of flag leaf (sampling V) the activity of the gene decreased again. No activity of the gene was observed in the first two samplings in any variety, obviously due to the gradual drying up of the soil in the pots. Although the values of relative expression in Figs. 2 and 5 can be mutually compared (they represent relative values comparable only within a single experiment), the results of evaluations of the variants in both experiments were similar. In terms of the level of relative expression of gene *Dhn1* in sampling IV, the variants could again be classed into two groups as in the preceding experiment (Fig. 2 and Fig. 5), i.e. the tolerant varieties *Tadmor* a *Malz* and the more sensitive *Amulet*, *Bojos* and *Jersey*. The problem with this method, viz. the large scatter of measured values evident in Fig. 5, can be eliminated by increasing the number of evaluated samples in one sampling.

Acknowledgements

This work was supported by a grant of the Czech Ministry of Education, Youth and Sports, (RC 1M0570), by the Czech Ministry of Agriculture (NAZV QH91192) and IG290071.

- wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. *Plant, Cell and Environment* **27**, 2004, 1297–1308.
9. Park, S. Y., Noh, K. J., Yoo, J. H., Yu, J. W., Lee, B. W., Kim, J. G., Seo, H. S. and Peak, J. G.: Rapid Upregulation of Dehydrin3 and Dehydrin4 in response to Dehydration is a Characteristic of Drought-Tolerant Genotypes in Barley. *Journal of Plant Biology* **49**, 2006, 455–462.
10. Murashige, T., Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**, 1962, 473–497.
11. Jones, H. G.: Use of thermography for quantitative studies of spatial and temporal variation of stomatal conductance over leaf surfaces. *Plant, Cell and Environment* **22**, 1999, 1043–1055.
12. Pfaffl, M.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2001, 166–222.
13. Holková, L., Prášil, I. T., Bradáčová, M., Vítámvás, P., and Chloupek, O.: Screening for frost tolerance in wheat using the expression of dehydrin genes *Wcs120* and *Wdhn13* at 17 °C. *Plant Breeding* **128**, 2009, 420–422.
14. Mikulková, P., Holková, L., Hronková, M., Klemš, M. and Bradáčová, M.: Efficiency of differential laboratory methods for selection of drought tolerant barley genotypes. *Suppl Cereal Research Communications* **37**, 2009, 277–280.