

Dehydriny jako stresové proteiny související s tolerancí k mrazu u ječmene

Dehydrins as stress proteins related to frost tolerance of barley

LUDMILA HOLKOVÁ¹, PAVLÍNA MIKULKOVÁ¹, PAVLÍNA HRSTKOVÁ¹, ILJA TOM PRÁŠIL², MARTA BRADÁČOVÁ¹, OLDŘICH CHLOUPEK¹

¹Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ²Výzkumný ústav rostlinné výroby, 161 06 Praha-Ruzyně, Česká republika /

¹Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ²Crop Research Institute, 161 06 Prague, Czech Republic
e-mail: ludmila.holkova@mendelu.cz

Holková, L. – Mikulková, P. – Hrstková, P. – Prášil, I. T. – Bradáčová, M. – Chloupek, O.: Dehydriny jako stresové proteiny související s tolerancí k mrazu u ječmene. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 2, s. 83–87.

Dehydriny jsou stresové proteiny související s tolerancí k mrazu a suchu. Cílem naší práce bylo studium polymorfismu dehydrinových genů (*Dhn*) v souvislosti s mrazuvzdorností u ječmene. Pro studium délkového polymorfismu u 30 odrůd jsme použili specifické primery pro sekvence genů *Dhn4* a *Dhn7*. PCR produkty vykazaly dvě odlišné matrice; první (sekvence typu *O*) byla specifická pro šestiřadě ozimé a přechodné odrůdy s vysokou tolerancí k mrazu; typickým představitelem byla odrůda *Okal*. Druhý typ (*A* sekvence) byla zjištěna jen u dvouřadých ozimých a u jarních odrůd (např. u odrůdy *Akcent*) a souvisela s nižší mrazuvzdorností. Délka hlavních polymorfních produktů odpovídala různým alelám genů *Dhn4* a *Dhn7*. Rozdíl v uvedených délkách byl způsoben současnou přítomností dvou specifických mutací, tj. insercí 6 bp v *Dhn4* a delecí 30 bp v *Dhn7* u odrůd typu *O*.

Holková, L. – Mikulková, P. – Hrstková, P. – Prášil, I. T. – Bradáčová, M. – Chloupek, O.: Dehydrins as stress proteins related to frost tolerance of barley. Kvasny Prum. 56, 2010, No. 2, p. 83–87.

Dehydrins are stress proteins related to frost and dehydration tolerance. The aim of the paper was study of the polymorphism of the dehydrin genes (*Dhn*) in relation to the frost tolerance in barley. Primers specific for *Dhn4* and *Dhn7* gene sequences were used for length polymorphism analysis in 30 varieties. PCR products showed two different matrices; the first (*O* type sequence) was specific for six-rowed winter and intermediate varieties characterised by high frost tolerance and was typical of the *Okal* variety. The second type (*A* type sequence) was found only in two-rowed winter and spring varieties (e.g. *Akcent*) and was related to a lower level of frost tolerance. The length of the main polymorphic products corresponded to different alleles of the *Dhn4* and *Dhn7* genes. This difference in length was caused by the coincident presence of two specific mutations, i.e., an insertion of 6 bp in *Dhn4* and a deletion of 30 bp in *Dhn7* in *O* type barley varieties.

Holková, L. – Mikulková, P. – Hrstková, P. – Prášil, I. T. – Bradáčová, M. – Chloupek, O.: Dehydrine als Stressproteine, die in Zusammenhang mit Toleranz der Gerste gegen den Frost stehen. Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 2, S. 83–87.

Dehydrine sind die Stressproteine, die in Zusammenhang mit Toleranz der Gerste gegen den Frost stehen. Der Zielpunkt unserer Arbeit wurde das Studium von Dehydrine gene (*Dhn*) in Zusammenhang mit der Frostbeständigkeit der Gerste. Die spezifische Primer für die Gensequenzen *Dhn4* und *Dhn7* wurden zum Studium des Längen von Polymorphismus bei 30 Sorten angewandt. Die PCR Produkte wiesen zweie abweichende Matrizen auf, die erste (Sequenz des Typs *O*) wurde typisch für sechsreihige Winter- und Übergangssorten mit einer hohen Frostbeständigkeit, der typische Repräsentant wurde *Okal* Sorte. Der zweite Typ (*A* Sequenz) wurde nur bei den zweireihigen Winter- und Sommergerstensorten ermittelt (z.B. bei der Sorte *Akcent*) und stand in Zusammenhang mit einer niedrigeren Frostbeständigkeit. Die Länge von wichtigsten polymorphen Produkten entsprach den verschiedenen Alleln von Gen *Dhn4* und *Dhn7* d.h. Insertion in 6 bp *Dhn4* und Deletion 30 bp in *Dhn7* bei der Sorten des Typs *O*. Der Unterschied in den angegebenen Längen wurde durch die gegenwärtige Anwesenheit von zweien spezifischen Mutationen d.h. Insertion in 6 bp in *Dhn4* und Deletion 30 bp in *Dhn7* verursacht.

Klíčová slova: ječmen, tolerance k mrazu, zimovzdornost, dehydrinové geny, *Dhn4*, *Dhn7*

Keywords: barley, frost tolerance, winter hardiness, dehydrine genes, *Dhn4*, *Dhn7*

1 ÚVOD

Tolerance k mrazu je komplexní znak související se změnou obsahu mnoha látek v buňkách a pletivech. Tyto fyziologické charakteristiky jsou velmi citlivé na environmentální a vnitřní podmínky, zejména s těmi, které souvisejí s otužováním rostlin (obsah vody, obsah kyseliny abscisové, vodivost pletiv aj.) [1].

Genetické studie související s tolerancí k mrazu identifikovaly polygenní dědičnost. U ječmene to byly QTL (quantitative trait loci) spojené se zimovzdorností, jako je přežití zimy a obsah fruktanů v korunkách, lokalizované na chromozómu 5H. Tuberosa et al. [2] lokalizovali devět QTL pro toleranci k mrazu také na 2H, 3H a 6H.

Odlišné skupiny genů jsou rovněž často spojovány s tolerancí k abiotickým stresům, tj. geny pro proteiny ze skupiny Cor/LEA [3] a s regulačními geny [4]. Dehydrinové proteiny (DHN, rodina LEA D11) se často spojují s tolerancí k dehydrataci a s tolerancí k nízkým teplotám [5]. Několik studií je považuje za významné pro membránové interakce a pro stabilitu proteinů [5]. U ječmene bylo identifikováno 13 dehydrinových genů [6]. Jsou lokalizovány na čtyřech chromozómech (*Dhn10* a *Dhn11* na 3H; *Dhn6* a *Dhn13* na 4H; *Dhn1*, *Dhn2* a *Dhn9* na 5H a *Dhn3*, *Dhn4*, *Dhn5*, *Dhn7*, *Dhn8* a *Dhn12* na 6H, Choi et al.

1 INTRODUCTION

Frost tolerance is a complexly inherited trait that involves the changing levels of many substances in cells and tissues. These physiological characteristics are very sensitive to environmental and internal conditions, in particular those related to plant hardening (water content, endogenous level of abscisic acid, tissue conductivity, etc.) [1].

Studies of the genetic principles of frost tolerance have contributed to a better understanding of its polygenic character. In barley, QTLs (quantitative trait loci) associated with winter hardiness, such as field winter survival and fructan content in crowns, were mapped to the chromosome 5H. Tuberosa et al. [2] mapped nine QTLs for freezing tolerance located also on 2H, 3H and 6H.

Separate groups of genes were also often connected with abiotic stress tolerance, e.g. the genes for proteins from Cor/LEA group [3] and regulatory genes [4]. Dehydrins (DHNs, LEA D11 family) were among the most frequently observed stress-proteins associated with dehydration or low temperature [5]. Several studies suggested an important role for DHNs in membrane interactions and/or protein stabilisation [5]. In barley, thirteen *Dhn* genes have been identified [6]. They are located on four chromosomes (*Dhn10* and *Dhn11* on 3H;

[7]). Dehydrinové geny vytvářejí shluky (klastery) na chromozómech 5H a 6H [8].

Většina dehydrinových genů vykazuje polymorfismus, tj. výskyt různých alel stejného genu, zejména *Dhn1* a *Dhn4* [9]. Porovnání známých dehydrinových sekvencí dvou odrůd z databáze genové banky s kontrastní úrovní tolerance k mrazu (*Dicktoo* a *Morex*), prokázalo různé alely jenom pro dva geny, *Dhn4* a *Dhn7*. Žádná z těchto publikovaných alel však nesouvisela s fenotypovým projevem. U ječmene jsou rozdíly v citlivosti k abiotickým stresům spojovány spíše s dynamikou exprese dehydrinových genů (např. [10]).

Cílem naší práce byl popis polymorfismu dehydrinových genů ve vztahu k toleranci k mrazu. Polymorfismus těchto sekvencí byl použit v navazujícím sledování jako marker pro selekci genotypů tolerantních k mrazu ve štěpící populaci kříženců odrůd s různou citlivostí k mrazu [11].

2 MATERIÁL A METODY

Ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni jsme testovali u třiceti odrůd ječmene (*Hordeum vulgare* L.) rozdílných skupin (osm jarních, tři přechodného typu a 19 ozimých) tolerance k mrazu, která byla srovnávána s alelami *Dhn4* a *Dhn7*. Gen *Dhn4* byl sekvenován u odrůd *Akcent*, *Amulet*, *Monaco*, *Okal* a *Luran*, gen *Dhn7* jenom u odrůd *Akcent* a *Okal*.

Hodnocení tolerance k mrazu

Certifikované osivo třiceti odrůd bylo naklíčeno a klíčenci pěstování při 17 °C při 16-hodinové fotoperiodě 21 dní. Pak byli vystaveni otužování při 3 °C po 21 dní a vystaveni –4 °C po 3 dny. Pak následovalo pět různých mrazivých teplot po dobu 24 hodin. Tyto teploty se lišily po 2 °C a rychlost chlazení a tání činila 2 °C/h [1]. Po tání rostliny regenerovaly tři týdny ve skleníku při 20 °C a pak bylo stanoveno procento přeživších rostlin u různých mrazivých teplot. Výpočet LT₅₀ byl založen na publikaci Janáčka a Prášila [12].

Izolace DNA, amplifikace specifických produktů pro *Dhn4* a sekvenování genů *Dhn4* a *Dhn7*

Použili jsme amplifikaci PCR s primery specifickými pro sekvenční prvního exonu genů *Dhn4* a *Dhn7* k nalezení přítomnosti specifických mutací u všech sledovaných odrůd podle standardního protokolu. Pro PCR jsme použili Qiagen Taq PCR Core Kit. Specifické primery: *F1*: 5'-GAGTACCAGGGACAGCAG-3' a *R1*: 5'-CGAGCTGGAGCTG-GAGCTGC-3', byly komplementární ke konci prvního exonu sekvenční genu *Dhn4* u odrůdy *Dicktoo*. PCR produkty (*F1R1*) byly separovány na 7,5% akrylovém gelu a následně zbarveny AgNO₃ [13] nebo byly separovány na 1,5% agarózovém gelu a následně obarveny ethidium bromidem.

Existence alel genů *Dhn4* a *Dhn7* u *Dicktoo* a *Morex* byla dále ověřována jejich sekvenováním u několika odrůd (*Dhn4* u odrůd *Akcent*, *Okal*, *Monaco* a *Luran* a *Dhn7* u *Akcent* a *Okal*). Pro osekvenování genu *Dhn4* byly použity primery publikované v práci Choi et al. [7]. Pro osekvenování genu *Dhn7* byly použity námi navržené primery (5'-GCCAAGTGAGGAAGACAACC-3' a 5'-CCGGCACCTCT-TAACTTTC-3'). K reakci PCR jsme použili Taq PCR Core Kit (Qiagen). Identifikované sekvenční byly porovnány se sekvencemi v GenBank a v databázi EMBL na serveru BLAST. Odpovídající nukleotidová sekvence byla seřazena programem ClustalW.

3 VÝSLEDKY

Molekulární analýza genů *Dhn4* a *Dhn7* u 30 odrůd s primery *F1* a *R1* prokázala v této oblasti polymorfnní sekvence, které se projeví jako rozdílné soubory PCR produktů s různou molekulární hmotností. Stejně kombinace PCR produktů byly zjištěny u odrůd s poměrně vysokou úrovní tolerance k mrazu (tab. 1).

Tab. 1 Velikost polymorfnních PCR-produktů syntetizovaných s primery *F1* a *R1* / The size of polymorphous PCR-products synthesized with primers *F1* a *R1*

Geny / Genes	Odrůdy / Varieties			
	<i>Morex</i>	<i>Akcent</i>	<i>Okal</i>	<i>Dicktoo</i>
<i>Dhn4</i>	198 bp	198 bp	204 bp	204 bp
<i>Dhn7</i>	240 bp	240 bp	210 bp	210 bp

Dhn6 and *Dhn13* on 4H; *Dhn1*, *Dhn2* and *Dhn9* on 5H and *Dhn3*, *Dhn4*, *Dhn5*, *Dhn7*, *Dhn8* and *Dhn12* on 6H, Choi et al. [7]). Several studies proved that 5H and 6H *Dhn* genes comprise clusters on these chromosomes [8].

Most *Dhn* genes demonstrate allelic variation, mainly in *Dhn1* and *Dhn4* [9]. A comparison of the known *Dhn* sequences of two barley genotypes, *Dicktoo* and *Morex*, from the GenBank database with contrasting levels of frost tolerance showed the presence of different alleles for only two *Dhn* genes, *Dhn4* and *Dhn7*. None of these published allelic variations of *Dhn* genes were related to any phenotypic trait. In barley, differences in sensitivity to abiotic stresses have been connected with different dynamic expression of *Dhn* genes to date (e.g. [10]).

The aim of our study was to describe polymorphisms in barley *Dhn* genes related to frost tolerance. The polymorphism of these sequences as a marker for selection of frost-tolerant genotypes was tested on segregation populations developed from barley varieties with different frost sensitivities, as prepared for publication [11].

2 MATERIAL AND METHODS

Thirty varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.) with different growth habits (eight spring, three intermediate and 19 winter) were tested for frost tolerance in the Crop Research Institute in Prague and related to the allelic variation of *Dhn4* and *Dhn7*. The *Dhn4* gene was sequenced in *Akcent*, *Amulet*, *Monaco*, *Okal* and *Luran* varieties, and the *Dhn7* gene was sequenced only in the *Akcent* and *Okal* varieties.

Determination of frost tolerance

Certified seeds of all 30 varieties were germinated and seedlings grown at 17 °C in a 16-h photoperiod for 21 days. They were then exposed to cold hardening at 3 °C for 21 days and exposed to –4 °C for 3 days, followed by 5 different frost temperatures in separate freezers for the next 24 h. Frost temperatures differed by 2 °C, and the rate of cooling and thawing was 2 °C/h (1). After thawing, the plants were regenerated for 3 weeks in a greenhouse at 20 °C, and the survival percentage at the individual freezing temperatures evaluated. Calculation of the LT₅₀ was based on the formula by Janáček and Prášil [12].

Genomic DNA isolation, amplification of *Dhn4*-specific products and sequencing of the *Dhn4* and *Dhn7* genes

We used PCR amplification with primers specific for sequences in the first exon of the *Dhn4* and *Dhn7* genes to detect the presence of specific mutations in all tested varieties using the standard protocol. PCR was then performed using the Qiagen Taq PCR Core Kit. The specific primers, *F1*: 5'-GAGTACCAGGGACAGCAG-3' and *R1*: 5'-CGAGCTGGAGCTGGAGCTGC-3', were complementary to the terminus of the first exon of the *Dhn4* gene sequence in the *Dicktoo* variety. PCR products (*F1R1*) were separated on 7.5% acrylamide gels and subsequently stained with AgNO₃ [13] or were separated on 1.5 % agarose gels followed by staining with ethidium bromide.

The existence of the *Dicktoo* and *Morex* alleles of the *Dhn4* and *Dhn7* genes was further verified by sequencing in several tested varieties (*Dhn4* in *Akcent*, *Okal*, *Monaco* and *Luran* varieties and *Dhn7* in *Akcent* and *Okal* varieties), using primers suggested by Choi et al. [7] and sequencing of the full-length *Dhn4* gene. The full-length *Dhn7* gene was sequenced using newly designed primers (5'-GCCAAGTGAGGAAGACAACC-3' and 5'-CCGGCACCTCTTAACTTTC-3'). The Taq PCR Core Kit (Qiagen) was used for the PCR reaction, which resulted in a 763-bp product. Identified sequences were compared with sequences in the GenBank and EMBL databases using the BLAST server. The corresponding nucleotide sequences were aligned with the ClustalW program.

3 RESULTS

The molecular analysis of *Dhn4* and *Dhn7* in 30 barley varieties with primers *F1* and *R1* revealed polymorphic sequences in this region expressed as different sets of PCR products with divergent molecular weights. The same combinations of the PCR products were detected in varieties with a relatively high level of frost tolerance (Tab. 1).

Two different combinations of specific products were detected from PCR reactions with *F1* and *R1*. Several products with distinct molec-

Výsledkem PCR reakcí s primery F1 a R1 byly dvě různé kombinace specifických produktů. Kombinace A byla charakteristická pro všechny jarní odrůdy a pro některé ozimé s poměrně nízkou úrovní tolerance k mrazu (LT_{50} od $-13,0$ do $-14,5$ °C). Naopak O kombinace byla specifická pro ozimé a přechodné odrůdy s poměrně vysokou úrovní tolerance k mrazu (LT_{50} od $-14,2$ do $-15,6$ °C).

Identifikace hlavních produktů PCR reakce kombinací primerů F1R1

Zjištěné kombinace PCR produktů obou typů (A a O) sestávají nejen ze specifických produktů genů *Dhn4* a *Dhn7* očekávané velikosti, ale také z několika nespecifických produktů. Proto byla přítomnost individuálních mutací ověřena sekvenční analýzou prvního exonu obou těchto genů u odrůd typu A a O.

Geny *Dhn4* ze čtyř odrůd byly izolovány a sekvenovány s primery publikovanými Choi et al. (7) (obr. 1), geny *Dhn7* ze dvou odrůd s kontrastní úrovní tolerance k mrazu s námi navrženými novými primery (obr. 2).

Srovnání čtyř sekvencí *Dhn4* (obr. 1) s publikovanými sekvencemi odrůd *Dicktoo* (AF043090) a *Morex* (AF181454) ukázalo inserci 6 bp lokalizovanou 18 bp v protisměru ATG kodonu charakteristického pro *Dicktoo* obdobně jako pro šestiřadě ozimé odrůdy *Luran* a *Okal*. *Dicktoo*, *Luran* a *Okal* tedy mají pravděpodobně stejné alely *Dhn4*. Ač-

ular weights were found in both variants. The A combination was characteristic for all tested spring varieties and for some winter varieties with a relatively low level of frost tolerance (LT_{50} from $-13,0$ to $-14,5$ °C). The O combination was specific for winter and intermediate varieties with a relatively high level of frost tolerance (LT_{50} from $-14,2$ to $-15,6$ °C).

Identification of the main products of the PCR reaction with the primer combination F1R1

The combinations of PCR products of both types (A and O) are composed not only of *Dhn4* and *Dhn7* specific products of the expected sizes, but also of several unspecific products. Therefore, the presence of individual mutations was verified by sequence analysis of the first exon of each of the two genes in some varieties of the A and O types. Sequences of *Dhn4* from four varieties and *Dhn7* from two varieties were isolated and sequenced. The genes are polymorphous and mutually linked on the 6H chromosome. Identified sequences were compared with the appropriate known sequences of *Dicktoo* and *Morex* listed in the GenBank database.

Dhn4 genes from four barley varieties were isolated and sequenced with primers published by Choi et al. [7] (Fig. 1), and *Dhn7* genes from two varieties with contrasting levels of frost tolerance were isolated and sequenced with our newly designed primers (Fig. 2).

A comparison of the four *Dhn4* sequences (Fig. 1) with the known sequences of *Dicktoo* (AF043090) and *Morex* (AF181454) showed that the insertion of 6 bp located 18 bp upstream of the ATG codon was characteristic for *Dicktoo* as well as for the six-rowed winter varieties *Luran* and *Okal*. *Dicktoo*, *Luran* and *Okal* likely possess the same allele of *Dhn4*. Although the *Dhn4* alleles of *Morex*, *Akcent* and *Monaco* differ in the number of ϕ -segment repetitions, the absence of this 6-bp insertion was a common feature of all four tested genotypes.

Several mutations were identified in the sequenced region of the *Dhn7* alleles in four varieties. We sequenced the *Dhn7* alleles from *Akcent* and *Okal* and compared them with *Dicktoo* and *Morex* alleles from the GenBank database (AF043092 and AF181457). In addition to the principle deletion of 30 bp in *Dicktoo* and *Okal* sequences, three other point mutations (see Fig. 2) were detected, distinguishing the frost-tolerant winter varieties *Dicktoo* and *Okal* from the frost-sensitive spring varieties *Morex* and *Akcent*; only one of these point mutants (position 82) resulted in a change of amino acids. Furthermore, three other point mutations typical only of *Morex* were observed in the sequenced region of the *Dhn7* gene (Fig. 2). Complementary primer sequences were detected in all tested alleles of both *Dhn4* and *Dhn7* (Fig. 1 and 2). The sequence analyses of both tested *Dhn* genes in a group of varieties with a contrasting level of frost tol-

DICKTOO GB	-CGGCAGCGCAAGATGGAGTACCAGGGACAGCAGCAGCAGCAGCGCCGCGTCGACGAGTAC	60
OKAL	-CGGCAGCGCAAGATGGAGTACCAGGGACAGCAGCAGCAGCAGCGCCGCGTCGACGAGTAC	
LURAN	-CGGCAGCGCAAGATGGAGTACCAGGGACAGCAGCAGCAGCAGCGCCGCGTCGACGAGTAC	
MONACO	-CGGCAGCGCAAGATGGAGTACCAGGGACAGCAGCAGCAGCAGCGCCGCGTCGACGAGTAC	
AKCENT	-CGGCAGCGCAAGATGGAGTACCAGGGACAGCAGCAGCAGCAGCGCCGCGTCGACGAGTAC	
MOREX GB	-CGGCAGCGCAAGATGGAGTACCAGGGACAGCAGCAGCAGCAGCGCCGCGTCGACGAGTAC	

DICKTOO GB	GGCAACCTGTGGCCGGACATGGCGTCGGCACCAGCATGGGAACGCACGGCGGCGTCGGA	120
LURAN	GGCAACCTGTGGCCGGACATGGCGTCGGCACCAGCATGGGAACGCACGGCGGCGTCGGA	
OKAL	GGCAACCTGTGGCCGGACATGGCGTCGGCACCAGCATGGGAACGCACGGCGGCGTCGGA	
MONACO	GGCAACCTGTGGCCGGACATGGCGTCGGCACCAGCATGGGAACGCACGGCGGCGTCGGA	
AKCENT	GGCAACCTGTGGCCGGACATGGCGTCGGCACCAGCATGGGAACGCACGGCGGCGTCGGA	
MOREX GB	GGCAACCTGTGGCCGGACATGGCGTCGGCACCAGCATGGGAACGCACGGCGGCGTCGGA	

DICKTOO GB	ACTGGCGCGCCGCCGGTGGGCATTACCAGCCCATGAGGGACGAGCACCAGACTGGCCGT	180
OKAL	ACTGGCGCGCCGCCGGTGGGCATTACCAGCCCATGAGGGACGAGCACCAGACTGGCCGT	
LURAN	ACTGGCGCGCCGCCGGTGGGCATTACCAGCCCATGAGGGACGAGCACCAGACTGGCCGT	
MONACO	ACCAGCGCGCCGCCGGTGGGCATTACCAGCCCATGAGGGACGAGCACCAGACTGGCCGT	
AKCENT	ACTGGCGCGCCGCCGGTGGGCATTACCAGCCCATGAGGGACGAGCACCAGACTGGCCGT	
MOREX GB	ACTGGCGCGCCGCCGGTGGGCATTACCAGCCCATGAGGGACGAGCACCAGACTGGCCGT	
	** *****	
DICKTOO GB	GGGATCTGCACCGCTCCGGCAGCTCCAGTCCAGTCCGTCGCTATATACTGTCTTGC	240
OKAL	GGGATCTGCACCGCTCCGGCAGCTCCAGTCCAGTCCGTCGCTATATACTGTCTTGC	
LURAN	GGGATCTGCACCGCTCCGGCAGCTCCAGTCCAGTCCGTCGCTATATACTGTCTTGC	
MONACO	GGGATCTGCACCGCTCCGGCAGCTCCAGTCCAGTCCGTCGCTATATACTGTCTTGC	
AKCENT	GGGATCTGCACCGCTCCGGCAGCTCCAGTCCAGTCCGTCGCTATATACTGTCTTGC	
MOREX GB	GGGATCTGCACCGCTCCGGCAGCTCCAGTCCAGTCCGTCGCTATATACTGTCTTGC	

Obr. 1 Srovnání sekvencí prvního exonu genu *Dhn4* u šesti odrůd polymorfních podle specifických PCR produktů. Sekvence *Dicktoo* a *Morex* pocházejí z databáze GenBank a jsou uvedeny kurzívou. Sekvence ostatních odrůd byly získány sekvenováním PCR produktů se specifickými primery pro *Dhn4* (Choi et al. 1999). Lokalizace F primeru podle Choi et al. (1999) je podtržena a lokalizace primerů F1 a R1 zvýrazněna šedě. / Fig. 1 A comparison of sequences from the first exon of *Dhn4* in six barley varieties polymorphous for specific PCR products. Sequences of *Dicktoo* and *Morex* from the GenBank database are in italics. Sequences from other varieties were obtained by sequencing PCR products with *Dhn4* specific primers (Choi et al. 1999). Location of the F primer from Choi et al. (1999) is underlined and locations of the F1 and R1 primers are highlighted in grey.

koliv se alely *Dhn4* u *Morex*, *Akcent* a *Monaco* liší počtem repetičí ϕ -segmentů, výše uvedená absence 6 bp inserce byla společným rysem všech čtyř testovaných odrůd.

Několik mutací bylo identifikováno v sekvenované oblasti alel *Dhn7* u hodnocených odrůd. Sekvenovali jsme alely *Dhn7* z odrůd *Akcent* a *Okal* a srovnali je s alelami *Dicktoo* a *Morex* z databáze GenBank (AF043092 a AF181457). Vedle základní delece 30 bp u sekvencí *Dicktoo* a *Okal* jsme zjistili i bodové mutace (obr. 2), odlišující odrůdy tolerantní k mrazu *Dicktoo* a *Okal* od citlivých jarních odrůd *Morex* a *Akcent*; avšak jen jedna z těchto bodových mutací na pozici 82 se projevila změnou aminokyseliny. Zjistili jsme i jiné tři bodové mutace typické pouze pro *Morex* lokalizované v oblasti genu *Dhn7* (obr. 2). Komplementární primerové sekvence byly zjištěny u všech testovaných alel obou genů *Dhn4* a *Dhn7* (obr. 1 a 2). Sekvenční analýza obou *Dhn* genů ve skupině odrůd s kontrastní úrovní tolerance k mrazu prokázala inserci 6 bp blízko *Dhn4*, což bylo typické pro odrůdy s vyšším stupněm tolerance k mrazu.

Skupiny odrůd s podobnou úrovní tolerance k mrazu vykazaly stejnou kombinaci těchto alel. Kombinace *O* byla specifická pro šestiřadá ozimé a přechodné odrůdy vyznačující se poměrně vysokou tolerancí k mrazu. Tato kombinace *Dhn* alel nebyla prokázána u žádné hodnocené jarní odrůdy. Kombinace *A* byla zjištěna u všech jarních odrůd a dvouřadých ozimých odrůd. Úroveň tolerance ozimých odrůd s alelou *O* byla průkazně vyšší než u ozimých odrůd s alelou *A*. Průměrná hodnota LT_{50} odrůd typu *O* (–14,8 °C) byla o více než 1 °C nižší než u odrůd typu *A* (–13,6 °C). Jenom jedna z hodnocených odrůd, *Tiffany*, s kombinací *A* měla LT_{50} nižší než –14 °C. Použitelnost markéru *O* pro odhad tolerance k mrazu byla publikována [11].

4 DISKUSE

Odrůda *Zambaka* byla k suchu citlivější než *Tadmor*, přítomnost alel s určitou sekvencí může tedy indikovat toleranci k suchu (14). Delece 30 bp v genu *Dhn7* popsaná výše byla lokalizována u tohoto genu v podobné pozici (tolerance k suchu a mrazu je principiálně stejná, jde o odolnost k vysychání). Může být spojena v mechanismu tolerance ke stresům v důsledku exprese různých aminokyselin, které mohou ovlivňovat funkci odpovídajících dehydrinů.

Polymorfismus sekvencí genů *Dhn* na chromozómu 6H, zejména *Dhn4* a *Dhn7*, byl zjištěn u několika populací planého ječmene z různých lokalit [15], což koresponduje s našimi výsledky. Genetická vazba mezi geny *Dhn7*, *Dhn5*, *Dhn4* a *Dhn3* byla publikována [16], proto ani nepřekvapuje vazba mutací u *Dhn4* a *Dhn7*. Uvedená 6 bp inserce již byla identifikována u *H. spontaneum* [17].

V našich pokusech byla zjištěna průkazná souvislost mezi tolerancí různých odrůd k mrazu a typickou kombinací alel genů *Dhn4* a *Dhn7*. Sekvenční analýza těchto genů prokázala přítomnost mutací detekovaných u *Morex* a *Dicktoo* také u jiných odrůd. Analýza ověřila, že hlavní PCR produkty naší navržené „markerovací“ sekvence sestávají ze sekvencí těchto alel. Jiné PCR produkty patrné na matici těchto dvou typů (*A* a *O*) by mohly být produkty nekompletní hybridizace.

DICKTOO GB	–ATGGAGTACCAGGGACAGCAGCAGCAGCGCCAGGCGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGT	60
OKAL	–ATGGAGTACCAGGGACAGCAGCAGCAGCGCCAGGCGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGT	
AKCENT	–ATGGAGTACCAGGGACAGCAGCAGCAGCGCCAGGCGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGT	
MOREX GB	–ATGGAGTACCAGGGACAGCAGCAGCAGCGCCAGGCGACCAACCGCGTCGATGAGTACGGT	

DICKTOO GB	AACCCGGTTGCCGGACACGGCGGTGGCACC GG CATGGGC-----	120
OKAL	AACCCGGTTGCCGGACACGGCGGTGGCACC GG CATGGGC-----	
AKCENT	AACCCGGTTGCCGGACACGGCGTCGGCACC GG CATGGGCACGGCGGCGTCGGCACC	
MOREX GB	AACCCGGTTGCCGGACACGGCGTAGGCACC GG CATGGGCAGCACGGCGGCGTCGGCACC	

DICKTOO GB	-----GCGCACGGCGGCGTCGGCACC GG TCGGGCCGCTGGTGGTCATTTCAGCCG	180
OKAL	-----GCGCACGGCGGCGTCGGCACC GG TCGGGCCGCTGGTGGTCATTTCAGCCG	
AKCENT	GGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTCGGCACC GG TCGGGCCGCTGGTGGTCATTTCAGCCG	
MOREX GB	GGGATGGGCGCGCACGGCGGCGTCGGCACC GG TCGGGCCGCTGGTGGTCATTTCAGCCG	

DICKTOO GB	ACGAGGAAGGAACACAAGGCCGCGGGATCCTGCAGCGCTCCGGCAGCTCAAGCTCCAGC	240
OKAL	ACGAGGAAGGAACACAAGGCCGCGGGATCCTGCAGCGCTCCGGCAGCTCAAGCTCCAGC	
AKCENT	ACGAGGAAGGAGCACAAGGCCGCGGGATCCTGCAGCGCTCCGGCAGCTCAAGCTCCAGC	
MOREX GB	ACGAGGAAGGAGCACAAGGCCGCGGGATCCTGCAGCGCTCCGGCAGCTCAAGCTCCAGC	

DICKTOO GB	TCG	243
OKAL	TCG	
AKCENT	TCG	
MOREX GB	TCG	

Obr. 2 Srovnání sekvencí prvního exonu *Dhn7* u čtyř odrůd s různou úrovní tolerance k mrazu. Sekvence *Dicktoo* a *Morex* z genové banky jsou uvedeny kurzívou. Lokalizace *F1* a *R1* primerů je zvýrazněna šedě. Tučná písmena značí lokalizaci několika bodových mutací / Fig. 2 A comparison of sequences from the first exon of *Dhn7* in four varieties with different levels of frost tolerance. Sequences of *Dicktoo* and *Morex* from the GenBank database are in italics. The locations of the *F1* and *R1* primers are highlighted. Bold letters mark the location of several point mutations

erance showed that 6-bp insertions close to *Dhn4* were characteristic for varieties with a higher level of frost tolerance.

The groups of genotypes with similar levels of frost tolerance demonstrated the same combinations of the alleles. The *O* combination was specific for six-rowed winter and intermediate varieties distinguished by a relatively high frost tolerance. This combination of *Dhn* alleles was not detected in any tested spring variety. The *A* combination was found in all spring varieties and two-rowed winter varieties. The level of frost tolerance of *O* type winter genotypes was significantly higher in comparison with *A* type winter genotypes. The average LT_{50} of the *O* type genotypes (–14,8 °C) was more than 1 °C lower than the average LT_{50} of the *A* type genotypes (–13,6 °C). Only one of the tested varieties, *Tiffany*, with the *A* combination reached a LT_{50} lower than –14 °C. Applicability of the *O* type marker for prediction of winter hardy genotypes was published by Holková et al. [11].

4 DISCUSSION

Variety *Zambaka* was more susceptible to drought than *Tadmor*, the presence of alleles lacking this sequence may indicate drought tolerance [14]. The 30-bp deletion in the *Dhn7* gene described above was located in a similar gene position (tolerance to drought and frost is principally similar, i.e. tolerance to drying out). It may be involved in the stress defence mechanism due to the expression of different amino acids, which can subsequently affect the functions of the corresponding DHNs.

zace primerů použitých pro identifikaci *Dhn* sekvencí, poněvadž podobné sekvenční v rodině *Dhn* genů existují.

Zjistili jsme vztah mezi dvěma specifickými mutacemi genů *Dhn4* a *Dhn7* a poměrně vysokou úrovní tolerance k mrazu u šestiřadých odrůd. Tato vazba může naznačovat úzkou spolupráci nejméně dvou genetických mechanismů této tolerance. Šestiřadost je řízena hlavně jednoduchou alelou *vsr1* na chromozómu 2H. Vztah mezi tvarem klasu a náchylností k mrazu lze vysvětlit blízkostí genu *vsr1* s geny spojenými s citlivostí k mrazu (*cor14b* a *blt14*). Tyto geny totiž byly lokalizovány na delším raménku chromozomu 2H [18].

Naše výsledky naznačují, že sekvenční *O* může indikovat vyšší toleranci k mrazu, zejména tehdy, pokud je šestiřadý klas nežádoucí (např. pro sladové odrůdy). Tento poznatek by měl být ověřen u většího počtu odrůd spolu s přesnějším hodnocením jejich tolerance k mrazu. Další studium by se tedy mělo zabývat skríníngem dvouřadých odrůd na sekvenci *O*, nebo vývojem takových genotypů křížovým a testováním jejich tolerance k mrazu.

Poděkování

Výzkum byl podpořen projektem Ministerstva zemědělství (NAZV QF3191) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (VC 1M0570).

LITERATURA / REFERENCES

1. Prášil, I. T., Prášilová, P., Mařík, P.: Comparative study of direct and indirect evaluations of frost tolerance in barley. *Field Crops Res.* **102**, 2007, 1–8.
2. Tuberosa, R., Galiba, G., Sanguineti, M. C., Noli, E., Sutka, J.: Identification of QTL influencing freezing tolerance in barley. *Acta Agron Hung* **45**, 1997, 413–417.
3. Cattivelli, L., Bartels, D.: Molecular cloning and characterization of cold regulated genes in barley. *Plant Physiol.* **93**, 1990, 1504–1510.
4. Yang, T., Zhang, L., Zhang, T., Zhang, H., Xu, S., An, L.: Transcriptional regulation network of cold-responsive genes in higher plants *Plant Sci* **169**, 2005, 987–995.
5. Close, T. J.: Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant* **97**, 1996, 795–803.
6. Rodriguez, E. M., Svenson, J. T., Malatrasi, M., Choi, D.-W., Close, T. J.: Barley *Dhn13* encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theor Appl Genet.* **110**, 2005, 852–858.
7. Choi, D. W., Koag, M. C., Close, T. J.: Map locations of barley *dhn* genes determined by gene-specific PCR. *Theor Appl Genet* **101**, 2000, 350–354.
8. Campbell, S. A., Close, T. J.: Dehydrins: genes, proteins and associations with phenotypic traits. *New Phytol.* **137**, 1997, 61–74.
9. Close, T. J., Choi, D. W., Venegas, M., Salvi, S., Tuberosa, R., Ryabushkina, N., Turespekova, Nevo, E.: 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*, 2000, 249–250.
10. Kosová, K., Holková, L., Prášil, I. T., Prášilová, P., Bradáčová, M., Vítámvás, P., Čapková, V.: The expression of dehydrin 5 during the development of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare*). *J. Plant Physiol.* **165**, 2008, 1142–1151.
11. Holková, L., Mikulková, P., Hrstková, P., Prášil, I. T., Bradáčová, M., Prášilová, P., Chloupek, O.: Polymorphism in the cluster of *Dhn4* and *Dhn7* barley genes related to frost tolerance. *Molecular Breeding* (v tisku).
12. Janáček, J., Prášil, I.: Quantification of plant frost injury by non-linear fitting of an s-shaped function. *Cryo-Letters* **12**, 1991, 47–52.
13. Blum, H., Beier, H., Gross, H. J.: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyakrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 1987, 93–99.
14. Morrell, P. L., Toleno, D. T., Lundy, K. E., Clegg, M. T.: Low levels of linkage disequilibrium in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) despite high rates of self-fertilisation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 2005, 2442–2447.
15. Morrell, P. L., Clegg, M. T.: Genetic evidence for a second domestication of barley (*Hordeum vulgare*) east of Fertile Crescent. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 2007, 3289–3294.
16. Pan, A., Hayes, P. M., Chen, F., Chen, T. H. H., Blake, T., Wright, S., Karsai, I., Badö, Z.: Genetic analysis of the components of winterhardiness in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Theor Appl Genet.* **89**, 1994, 900–910.
17. Morrell, P. L., Toleno, D. T., Lundy, K. E., Clegg, M. T.: Low levels of linkage disequilibrium in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) despite high rates of self-fertilisation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 2005, 2442–2447.
18. Komatsuda, T., Pourkheirandish, M., He C., Azhaguvel, P., Kanamori, H., Perovic, D., Stein, N., Graner, A., Wicker, T., Tagiri, A., Lundquist, U., Fujimura, T., Matsuoka, M., Matsumoto, T., Yano, M.: Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 2007, 1424–1429.

Recenzovaný článek
Do redakce došlo: 21. 9. 2009
Přijato k publikování: 3. 11. 2009