

Vliv exprese vybraných genů zapojených v biosyntetické dráze vitamínu E na celkový obsah a složení vitamínu E v znu ječmene jarního

Impact of gene expression of chosen genes involved in the biosynthetic pathway of vitamin E on the total vitamin E content and composition in grain of spring barley

MICHAL KOSAŘ, LUDMILA HOLKOVÁ, NATÁLIE BŘEZINOVÁ BELCREDI, 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: michal.kosar@email.cz

Kosař, M. – Holková, L. – Březinová Belcredi, N. – Ehrenbergerová, J.: Vliv exprese vybraných genů zapojených v biosyntetické dráze vitamínu E na celkový obsah a složení vitamínu E v znu ječmene jarního. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 3, s. 123–126.

Vitamin E plní velmi důležitou úlohu v lidské výživě. Mezi významné zdroje vitamínu E se řadí například oleje, ořechy a také obiloviny. Nejvyšší obsah vitamínu E mezi obilovinami byl detekován v ječmeni. V biosyntetické dráze vitamínu E se na klíčových místech nacházejí tyto enzymy – 4-hydroxyphenylpyruvát dioxygenasa (HPPD) a homogentisátgeranylgeranyl transferasa (HGGT). HPPD může být považována za enzym, který by mohl, vzhledem ke své pozici v biosyntetické dráze, ovlivňovat aktivitu celé biosyntetické dráhy. HGGT je jediným enzymem, kterým se liší biosyntetická dráha tokoferolů a tokotrienolů, a mohl by proto mít vliv na zastoupení jednotlivých izomerů vitamínu E. Sedm odrůd ječmene jarního bylo pěstováno za kontrolovaných podmínek a byla měřena aktivita genů pro HPPD a HGGT v klasech odebraných čtyři, osm a dvanáct dní po opylení. Bylo zjištěno, že aktivita genu pro HPPD koresponduje s výsledným obsahem vitamínu E v znu ($r = 0,75^*$). Byl zjištěn vztah mezi aktivitou genu pro HPPD osm a dvanáct dní po opylení a obsahem vitamínu E, který je pro pěstované odrůdy typický v polních podmínkách ($r = 0,85^*$). Byla zjištěna pouze malá závislost mezi aktivitou genu pro HGGT a výsledným obsahem tokotrienolů v znu.

Kosař, M. – Holková, L. – Březinová Belcredi, N. – Ehrenbergerová, J.: Impact of gene expression of chosen genes involved in the biosynthetic pathway of vitamin E on the total vitamin E content and composition in grain of spring barley. Kvasny Prum. 56, 2010, No. 3, p. 123–126.

Vitamin E has a very important role in human nutrition. Sources of vitamin E are i.e. oils, nuts and also cereals. The highest vitamin E content among cereals was detected in barley. There are two enzymes localized in the strategic location of biosynthetic pathway of vitamin E: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase enzyme (HPPD) and homogentisategeranylgeranyl transferase (HGGT). HPPD could be considered as one of the essential factors which could control activity of the whole biosynthetic pathway due to its localization in the beginning of biosynthetic pathway. HGGT is the only enzyme which differs in the biosynthetic pathway of tocopherols and tocotrienols and that is why it could cause changes in the composition of vitamin E. Seven barley cultivars with different vitamin E level were grown under controlled conditions and activity of HPPD and HGGT in ears was measured four, eight and twelve days after pollination. It was found that activity of HPPD gene corresponded with the final vitamin E content detected in grains ($r = 0,75^*$). Relationship was found between gene activity of HPPD eight and twelve days after pollination and vitamin E content which was typical for these cultivars in the field conditions ($r = 0,85^*$). Gene for HGGT had smaller correlation to tocotrienol content.

Kosař, M. – Holková, L. – Březinová Belcredi, N. – Ehrenbergerová, J.: Einfluss der Expression von in der biosynthetischer Bahn des E Vitamins ausgewählten Genen auf den gesamten Gehalt und Zusammensetzung der E Vitamins im Korn der Sommergerste. Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 3, S. 123–126.

In der menschlichen Ernährung erfüllt Vitamin E eine sehr wichtige Aufgabe. Unter bedeutenden Vitaminquellen gehören Öle, Nüsse und auch Getreide. Unter Getreide weist die Gerste den höchsten Gehalt an Vitamin E auf. Auf der Schlüsselstellung an der synthetischen Bahn des E Vitamins findet man diese Enzyme: 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und Homogentisat Geranylgeranyl Transferase (HGGT). HPPD kann als ein Enzym betrachtet werden, der durch seine Position auf der biosynthetischen Bahn die Aktivität der gesamten Bahn beeinflussen kann. HGGT gibt's als ein einziges Enzym, mit welchem die biosynthetische Bahn der Tokopherole und Tokotrienole sich unterscheidet und deswegen einen Einfluss auf die Vertretung von einzigen Isomeren des E Vitamins ausweisen könnte. Unter kontrollierten Bedingungen wurden sieben Sommergerstensorten gezüchtet, im Zeitraum 4, 6 und 12 Tage nach der Bestäubung wurde die Gen – Aktivität gemessen. Es wurde festgestellt, dass die Gen – Aktivität für HPPD mit gesamtem Gehalt an Vitamin E in Korn ($r = 0,75^*$), der unter Feldbedingungen für gezüchteten Brausorten typisch ist, korrespondierte. Es wurde auch die Beziehung zwischen der Gen – Aktivität für HPPD acht und zwölf Tage nach der Bestäubung und dem Gehalt an E Vitamin ermittelt. Für unter Feldbedingungen gezüchtete Sorten ist E Vitamin typisch ($r = 0,85^*$). Weiterhin wurde nur eine niedrige Abhängigkeit zwischen der Gen – Aktivität für HGGT und dem resultierenden Gehalt an Tokotrienole festgestellt.

Klíčová slova: vitamín E, tokoly, tokoferoly, tokotrienoly, HPPD, 4-hydroxyphenylpyruvát dioxygenasa, HGGT, homogentisátgeranylgeranyl transferasa, aktivita genů, ječmen

Keywords: vitamin E, tocols, tocopherols, tocotrienols, HPPD, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, homogentisategeranylgeranyl transferase, HGGT, gene activity, barley

1 ÚVOD

Vitamín E chrání mastné kyseliny před poškozením volnými radikály a omezuje tak možnost vzniku aterosklerózy, šedého zákalu, infarktu a některých forem rakoviny [1]. Vitamín E má pozitivní vliv na redukci obsahu cholesterolu v krvi a mohl by také zpomalovat průběh Parkinsonovy choroby [2]. V posledních několika letech vzrostla poptávka po potravinách, které přirozeně obsahují vyšší obsah vitamínů nebo minerálních látek. Kvůli pozitivnímu vlivu na lidské zdraví patří mezi tyto látky i vitamín E.

Vhodným nástrojem k uspokojení této poptávky je šlechtění nových rostlinných druhů, které budou obsahovat vyšší hladinu těchto látek. Obiloviny jsou dobrým zdrojem vitamínu E pro lidskou výživu, přičemž nejvyšší obsah vitamínu E mezi obilovinami byl detekován v ječmeni [3]. To je důvod pro šlechtění nových odrůd obilovin, zejména

1 INTRODUCTION

Vitamin E protects fatty acids against damage of free radicals and reduces the risk of arteriosclerosis, cataract, stroke, heart attack and some forms of cancer [1]. Vitamin E has a positive influence on the reduction of blood cholesterol and could slow down the progress of Parkinson disease [2]. The demand for foodstuff with higher natural content of some vitamins or minerals has grown rapidly in the last few years. Vitamin E falls into this group due to its positive effect on human health.

Suitable tool for reaching such demand is breeding of new plant cultivars which contain higher levels of these compounds. Cereals are a good source of vitamin E for a human diet. Among cereals the highest vitamin E content was detected in barley [3]. That is the reason for breeding new cereal cultivars, in the first instance of barley,

ječmene, s vyšším obsahem vitamínu E v pletivech. První bezpluché odrůdy s vysokým obsahem vitamínu E byly popsány Wangem et al. [4].

Biosyntetická dráha vitamínu E je značně komplikovaná (review např. [5]). Jedním z důležitých enzymů zapojených v této dráze je 4-hydroxyphenylpyruvát dioxygenáza (HPPD). HPPD byla sledována jako enzym, který by mohl díky své strategické pozici regulovat aktivitu celé biosyntetické dráhy. Vyšší exprese tohoto genu vedla k vyššímu obsahu vitamínu E v listech a semenech některých druhů rostlin, např. *Arabidopsis*, tabáku nebo sóji [6].

Northern blot analýza homogentisátgeranylgeranyl transferasy (HGGT) ukázala, že mRNA tohoto genu je hojně zastoupena v semenech, ale v listech a kořenech se prakticky nevyskytuje. Dynamika exprese tohoto genu korelovala s výskytem tokotrienolů v zrna ječmene [7].

Šlechtění nových odrůd ječmene by bylo usnadněno, pokud by existoval molekulární marker, pomocí kterého by bylo možné rozdělit odrůdy na odrůdy s nízkým a vysokým obsahem vitamínu E. Ani v jednom z těchto genů však nebyla nalezena žádná specifická mutace, která by mohla být považována za marker obsahu vitamínu E (dosud nepublikováno).

Cílem této práce bylo nalézt možný rozdíl mezi odrůdami v regulaci genové exprese genů pro HPPD a HGGT během plnění zrna a najít vztah mezi expresí těchto genů a výsledným obsahem vitamínu E a jeho složením v zrna.

2 MATERIÁL A METODY

Odrůdy ječmene jarního byly vybrány na základě obsahu a složení vitamínu E v zrna [8]. Rostliny byly pěstovány v květináčích za kontrolovaných podmínek; během prvních dvou měsíců pokusu byly rostliny pěstovány za následujících podmínek: 10 °C v „noci“ (12 hodin), 14 °C během „dne“ (12 hodin). Třetí měsíc byla délka světelné fáze prodloužena na 15 hodin a teplota byla zvýšena na 18 °C, teplota během noci byla zvýšena na 14 °C. Po opylení byla délka dne prodloužena na 20 hodin (20 °C) a teplota v noci byla zvýšena na 16 °C. Rostliny byly pravidelně zalévány a byly třikrát přihnojeny 1 M roztokem MS. Tři vyvíjející se klásky pro hodnocení genové exprese byly odebrány v den opylení (negativní kontrola) a poté čtvrtý, osmý a dvanáctý den po opylení.

Celková RNA byla izolována z 50 mg pletiva za použití Ambion RNAqueous kitu. DNA byla rozštěpena pomocí Turbo DNA free (Ambion). Jednořetězcová cDNA byla připravena z 500 ng celkové RNA za použití QuantiTec Reverse Transcription kitu (Qiagen). Všechny reakce byly prováděny dle standardních protokolů. Genová kvalifikace proběhla za použití Real time PCR (Biorad).

Pár specifických primerů pro HPPD byl navržen na základě publikované sekvence v databázi Gene Bank (HVAJ693) za použití Primer 3 softwaru (F_1 : 5'CGGAGCCAGATACAGACGTT³, R_1 : 5'GGTCGGCCTGTCCCCTACTGGC³). Reverzní primer byl navržen do místa sestřihu [9]. Pár specifických primerů pro HGGT byl navržen na základě publikované sekvence v databázi Gene Bank (AY222860) opět za pomoci Primer 3 softwaru (F_1 : 5'CGGAGCCA-GATACAGACGTT³, R_1 : 5'GGTCGGCCTGTCCCCTACTGGC³).

Každá reakce byla provedena v 5 µl zředěné cDNA 1:10 (to odpovídá 25 ng izolované celkové RNA) v celkovém reakčním objemu 20 µl

with higher vitamin E content in tissues. The first hulls cultivars with high content of vitamin E were used by Wang et al. [4].

Biosynthetic pathway of vitamin E is very complicated (for review see e.g. [5]). One of the important enzymes in the biosynthetic pathway is 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD). HPPD is considered as one of the essential factors which could control activity of the whole biosynthetic pathway due to its strategic location. Higher expression of this gene leads to a higher vitamin E content in leaves and fruits of some experimental plants, e.g. *Arabidopsis*, tobacco or soy [6].

Northern blot analysis of homogentisategeranylgeranyl transferase (HGGT) showed that mRNA of this gene occurred in grains but was not detected in leaves and roots of barley. Gene expression profile of HGGT correlated with the final content of tocotrienols in barley grain [7].

Breeding of new barley cultivars could be facilitated by a molecular marker which would be able to differentiate cultivars with high vitamin E content and cultivars with low vitamin E content. In these genes any specific mutation was not found which could be considered as a marker of vitamin E content (not published yet).

The aim of this work was to found out a possible difference in regulation of gene expression of HPPD and HGGT gene during grain filling among cultivars and to set a relationship between expression of these genes and vitamin E content and composition in grain.

2 MATERIALS AND METHODS

Barley cultivars were chosen on the basis on their known tocopherol contents and compositions [8]. Plants were grown in pots under regulated conditions; during the first two months plants were under following conditions: 10 °C at night (12 hours), 14 °C during the day (12 hours). In the third month the daylight was prolonged to 15 hours and the temperature was increased to 18 °C and the temperature during the night went up to 14 °C. After the pollination the daylight was prolonged to 20 hours (20 °C) and the temperature at night was increased to 16 °C. Plants were watered regularly and were fertilized three times with 1 M of MS salt. The samples of developing ears for evaluation of gene expression were collected in the day of pollination (as a negative control) and the fourth, the eighth and the twelfth day after pollination.

Total RNA was extracted from 50 mg of tissue using Ambion RNAqueous Kit. DNA was cleaved by Turbo DNA free (Ambion). The first-strand of cDNA was prepared from 500 ng of total RNA using QuantiTec Reverse Transcription Kit (Qiagen). All reactions were done according to the standard protocols. Gene quantification was performed using Real time PCR (Biorad).

Specific primer pair of HPPD gene was designed based on the sequence presented in the Gene Bank database (HVAJ693) using Primer 3 software (F_1 : 5'CGGAGCCAGATACAGACGTT³, R_1 : 5'GGTCGGCCTGTCCCCTACTGGC³). The reverse primer was designed in the intron splicing site [9]. Specific primer pair of HGGT gene was designed based on the sequence presented in the Gene Bank database (AY222860) using Primer 3 software (F_2 : 5'CAGGTCTTCCATTGGCATCT³, R_2 : 5'TCCGGAACGTATTCC-TATGC³).

Each reaction was performed in 5 µl of 1:10 (v/v) dilution of the first strand of cDNA (corresponded to 25 ng isolated total RNA) in the to-

Tab. 1 Reakční podmínky pro hodnocené geny / Reaction conditions for evaluated genes

| Gen Gene | Reakce Reaction | Délka produktu v pb Length of produkt in bp | Podmínky reakce Reaction conditions |
|-------------------|--------------------|--|--|
| HPPD | F_1R_1 | 299 | 95 °C 15:00 94 °C 0:30 59 °C 0:30 72 °C 0:30 } 40x |
| HGGT | F_2R_2 | 100 | 95 °C 15:00 94 °C 0:30 55 °C 0:30 72 °C 0:30 } 40x |
| α -tubulin | Rjatt/Rjatr | 72 | 95 °C 15:00 94 °C 0:30 59 °C 0:30 72 °C 0:30 } 40x |

Tab. 2 Obsah vitamínu E u odrůd a linií pěstovaných v lokalitě Žabčice v roce 2005 a ve fytotronu v roce 2007 / Vitamin E content of cultivars and lines grown in Žabčice 2005 and in control conditions 2007

| Odrůda Cultivar | Obsah vitamínu E / Vitamin E content | | | |
|--------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| | Žabčice 2005 | | Fytotron 2007 | |
| | suma tokolů sum of tocots (mg/kg) | suma tokotrienolů sum of tocotrienols (mg/kg) | suma tokolů sum of tocots (mg/kg) | suma tokotrienolů sum of tocotrienols (mg/kg) |
| Krona | 49.96 | 38.52 | 44.76 | 32.99 |
| Kompakt | 51.70 | 37.80 | 44.07 | 30.76 |
| KM 1771 | 46.76 | 37.48 | 20.12 | 14.39 |
| Carina | 47.51 | 32.12 | 53.60 | 39.45 |
| Wabet | 60.45 | 47.85 | 52.25 | 38.84 |
| Wanubet | 60.36 | 49.25 | 54.40 | 42.09 |
| Washonubet | 67.19 | 56.57 | 40.26 | 28.63 |

za použití SybrGreen PCR kitu (Qiagen). Reakční podmínky pro Real time PCR jsou uvedeny v tab. 1.

Jako referenční gen byl použit fragment α -tubulinu [10]. Transkripční aktivita byla hodnocena jako normalizovaná relativní exprese (RE), která byla vypočítána dle metodiky popsané Pfafflem [11]. Každý vzorek byl proměřen třikrát.

Obsah vitamínu E byl hodnocen podle metodiky popsané McLaughlinem a Weihrauchem [12]. Obsah vitamínu E pro odrůdy a linie pěstované v lokalitě Žabčice, Česká republika a pro materiál pěstovaný v roce 2007 ve fytotronu je uveden v tab. 2.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Aktivita genu pro HGGT byla čtyři dny po opylení velmi nízká, ale v dalších odběrech postupně rostla. U všech sledovaných odrůd byla detekována maximální aktivita tohoto genu dvanáctý den po opylení (obr. 1).

Výsledky ukazují, že tokotrienoly jsou syntetizovány až v pozdější fázi plnění zrna. Nebyl nalezen žádný vztah mezi aktivitou genu pro HGGT a výsledným obsahem tokotrienolů v zrna. Tyto výsledky jsou v rozporu s tvrzením Cahoon et al. [7], kteří uvádějí, že expresní profil genu pro HGGT koresponduje s obsahem tokotrienolů v zrna ječmene.

U většiny sledovaných odrůd byla nejvyšší aktivita genu pro HPPD pozorována čtvrtý den po opylení (obr. 2). Relativní exprese u vzorů odebraných čtyři dny po opylení korespondovala s obsahem vitamínu E v zrna (korelační koeficient tohoto vztahu byl 0,7). V dalších fázích vývoje zrna exprese tohoto genu u odrůd s nízkým obsahem vitamínu E klesala, zatímco u odrůd s vysokým obsahem vitamínu E zůstávala stejná nebo klesala jen pozvolna.

Byl nalezen vztah mezi aktivitou tohoto genu osmý a dvanáctý den po opylení a obsahem vitamínu E, který je pro sledované odrůdy typický v polních podmínkách [8]. Vyšší exprese genu pro HPPD byla častěji pozorována u odrůd s vysokým obsahem vitamínu E, než u odrůd s nízkým obsahem vitamínu E. Tento vztah byl statisticky průkazný a síla tohoto vztahu vyjádřená korelačním koeficientem nabý-

tal reaction volume of 20 μ l using SybrGreen PCR Kit (Qiagen). Reaction conditions for Real time PCR are shown in Tab. 1.

A fragment of barley α -tubulin was used as a reference gene [10]. Transcription activity was evaluated as normalized relative expression (RE) calculated with real-time PCR efficiency correlation according to method of Pfaffl [11]. Each sample was examined in triplicate.

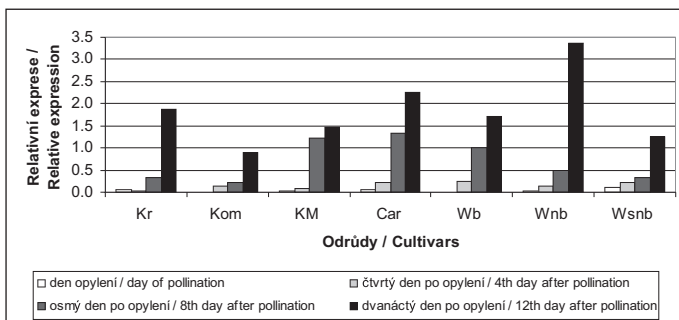
Vitamin E content was measured by the methodology by McLaughlin and Weihrauch [12]. Vitamin E content of cultivars and lines grown in locality Žabčice, Czech Republic and samples grown in controlled conditions are shown in Tab. 2.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The activity of HGGT gene was very low four days after pollination and gradually rose in the next phases of grain development. By all evaluated cultivars the highest activity of HGGT gene was detected twelve days after pollination (Fig. 1). These results indicate that tocotrienols are synthesized in the late stages of grain development. Any relationship was not found between the activity of HGGT gene and the final tocotrienol content in barley grain. These results do not correspond with findings of Cahoon et al. [7] who claim that the expression profile of HGGT gene correspond with the tocotrienol content of barley grain.

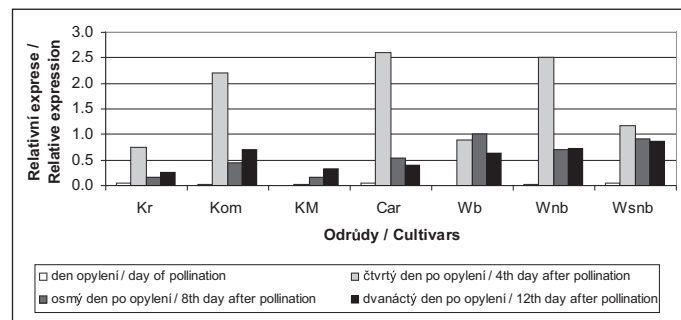
By the majority of cultivars the highest activity of HPPD gene was detected four days after pollination (Fig. 2). Relative expression, detected by this sampling, confirmed relationship with vitamin E content in grain (correlation coefficient of this relation was around 0.7). The expression of HPPD gene in cultivars with the low content of vitamin E was descending during sampling whereas the expression of this gene in cultivars with the high level of vitamin E was identical or descending very slowly.

A relationship was found between the activity of the gene on the eighth and the twelfth day after pollination and content of vitamin E, typical for the cultivars in the field conditions [8]. Higher gene expression was found in the cultivars with higher level of vitamin E than



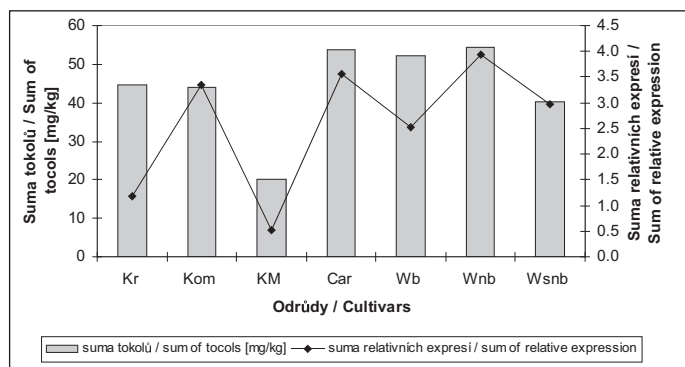
Obr. 1 Normalizovaná relativní exprese genu pro HGGT v zrna ječmene jarního [11]. Jsou znázorněny aritmetické průměry založené na hodnotách Ct (threshold cycle), které byly normalizovány vzhledem k hodnotám Ct referenčního genu pro α -tubulin. / Fig. 1 Normalized relative expression (RE) of HGGT gene in spring barley grain [11]. Expressed of means is based on Ct (threshold cycle) values that were normalized using the Ct value corresponding to a barley housekeeping gene for α -tubulin.

Odrůdy / Cultivars: Kr – Krona, Ko – Kompakt, Car – Carina, Wb – Wabet, Wnb – Wanubet, Wsnb – Washonubet.



Obr. 2 Normalizovaná relativní exprese genu pro HPPD v zrna ječmene jarního [11]. Jsou znázorněny aritmetické průměry založené na hodnotách Ct (threshold cycle), které byly normalizovány vzhledem k hodnotám Ct referenčního genu pro α -tubulin. / Fig. 2 Normalized relative expression (RE) of HPPD gene in spring barley grain [11]. Expressed of means is based on Ct (threshold cycle) values that were normalized using the Ct value corresponding to a barley housekeeping gene for α -tubulin.

Odrůdy / Cultivars: Kr – Krona, Ko – Kompakt, Car – Carina, Wb – Wabet, Wnb – Wanubet, Wsnb – Washonubet.



Obr. 3 Závislost celkového obsahu tokolů na sumě relativních expresí genu pro HPPD. / Fig. 3 Dependence of total amount of tocopherols on the sum of relative expressions of HPPD gene.

Odrůdy / Cultivars: Kr – Krona, Ko – Kompakt, Car – Carina, Wb – Wabet, Wnb – Wanubet, Wsnb – Washonubet.

vala hodnoty $r = 0,85^*$. Suma relativních expresí od čtvrtého do dvanáctého dne po opylení byla ve vztahu s výsledným obsahem vitamínu E v zrna ($r = 0,77^*$) (obr. 3).

Nejnižší obsah vitamínu E byl nalezen u linie KM 1771 (20,12 mg/kg), zatímco u odrůdy Wanubet byl zjištěn téměř třikrát vyšší obsah vitamínu E (54,40 mg/kg). Odrůda Wanubet měla ale osmkrát vyšší sumu relativních expresí genu pro HPPD než linie KM 1771. Tyto výsledky potvrzují závěry Tsegaye et al. [6], že gen pro HPPD hraje významnou roli v biosyntetické dráze vitamínu E a mohl by regulovat aktivitu celé této dráhy.

Je také zřejmé, že některé další kroky z biosyntetické dráhy limitují obsah vitamínu E v rostlinách [6, 13, 14]. Zjištěný průběh relativní exprese genu pro HPPD potvrzuje závěry Falka et al. [15], že nejvyšší obsah vitamínu E u obilnin je pozorován v časném stadiu mléčné zralosti.

Z expresního profilu genu pro HPPD během plnění zrna je možné odhadnout výsledný obsah vitamínu E v zrna. Ukazuje se také, že pro výsledný obsah vitamínu E je klíčové období metání a krátce po něm. Možné ovlivnění aktivity genu pro HPPD v této fázi by mohlo změnit výsledný obsah vitamínu E v zrna.

I když je možné pomocí této metody předpovědět výsledný obsah vitamínu E v zrna, nelze ji v současné době pro její komplikovanost jednoznačně doporučit jako selekční marker. Z hlediska výzkumu mechanismu syntézy vitamínu E jsou však tyto výsledky přínosné.

Zkratky:

HPPD: 4-hydroxyphenylpyruvát dioxygenasa
HGGT: Homogentisátgeranylgeranyl transferasa
MS: Murashige a Skoog medium
RE: normalizovaná relativní exprese

Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky 1M0570 „Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele“.

LITERATURA / REFERENCES

1. DellaPenna, D.: Nutritional genomics: manipulating plant micro-nutrients to improve human health. *Science* **285**, 1999, 375–379.
2. Eitenmiller, R. R., Lee, J.: Vitamin E: Food chemistry, composition, and analysis. CRC, New York, 2004.
3. Holasová, M., Velíšek, J., Dáviděk, J.: Tocopherol and tocotrienol contents in cereal grains. *Potravinářské Vědy* **13**, 1995, 409–417.
4. Wang, L. J., Newman, R. K., Newman, C. W., Jackson, L. L., Hofer P. J.: Tocotrienol and fatty acid composition of barley oil and effects on lipid metabolism. *Plant Foods for Human Nutrition*. **43**, 1993, 9–17.
5. Collakova, E., DellaPenna, D.: Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**, 2003, 632–642.
6. Tsegaye, Y., Shintani, D. K., DellaPenna, D.: Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in Arabidopsis and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 2002, 913–920.
7. Cahoon, E. B., Hall, S. E., Ripp, K. G., Ganzke, T. S., Hitz, W. D., Coughlan, S. J.: Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in

in the cultivars with lower vitamin E content. This relationship was statistically significant and the correlation coefficient of this relation was $r = 0,85^*$. The sum of relative expressions from the fourth to the twelfth day after pollination corresponded with the final content of vitamin E in grains ($r = 0,77^*$) (Fig. 3).

The lowest vitamin E content was detected by line KM 1771 (20.12 mg/kg) whereas in cultivar Wanubet there was detected three times higher vitamin E content (54.40 mg/kg). Cultivar Wanubet had eight time higher sum of relative activity than line KM 1771. These results confirmed conclusion of Tsegaye et al. [6] that the HPPD gene has an important role in the biosynthetic pathway of vitamin E and it is possible that regulate activity of the whole biosynthetic pathway.

It is also clear that some further steps in the biosynthetic pathway limit the vitamin E content in plants [6,13,14]. Found relative activities of HPPD gene proved results of Falk et al. [15] that the highest vitamin E content in cereals could be detected in early stage of milk ripeness.

From the expression profile of this gene during grain filling it is possible to estimate the final content of vitamin E in grain. It emerged that for the final vitamin E content the phase of flowering was very important and a possible influence of HPPD gene activity in this phase could change the final content of vitamin E in grain.

Despite it is possible to predict with this method the final vitamin E content in grain due to its complicatedness it is not possible to recommend it as a selection marker for breeders. From the point of view of found mechanisms of vitamin E synthesis these results are beneficial.

Abbreviations:

HPPD: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
HGGT: Homogentisategeranylgeranyl transferase
MS salt: Murashige and Skoog medium
RE: normalized relative expression

Acknowledgements

This contribution has been supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic within the Research Centre 1M0570 “Research Centre for studies on component parts of barley and hop”.

plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotech.* **21**, 2003, 1082–1087.

8. Ehrenbergerová, J., Belcrediová, N., Pryma, J., Vaculová, K., Newman, C. W.: Effect of cultivar, year grown, and cropping system on the content of tocopherols and tocotrienols in grains of hulled and hullless barley. *Plant Foods for Human Nutrition* **61**, 2006, 145–150.
9. Kosař, M., Holková, L., Bradáčová, M., Ehrenbergerová, J.: Sekvenční analýza a ověření aktivity genu pro 4-hydroxyphenylpyruvát dioxygenázu v ječmeni. In: *Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin a Fyziologické sekce Slovenské botanické společnosti* **2**, 2006, 74.
10. Suprunova, T., Krugman, T., Fahima, T., Chen, G., Shams, I., Korol, A. and Nevo, E.: Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. *Plant, Cell and Environment* **27**, 2004, 1297–1308.
11. Pfaffl, M. W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, 2001, e-45.
12. McLaughlin, P. J. and Weihrauch, J. L.: Vitamin E content of foods. *Journal of the American Dietetic Association* **75**, 1979, 647–651.
13. Falk, J., Andersen, G., Kernebeck, B., Krupinska, K.: Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS letters* **540**, 2003, 35–40.
14. Falk, J., Brosch, M., Schäfer, A., Braun, S., Krupinska, K.: Characterization of transplastomic tobacco plants with a plastid localized barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant physiology* **162**, 2005, 738–742.
15. Falk, J., Krahnstöver, A., van der Kooij, T. A. W., Schlensog, M. and Krupinska, K.: Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Phytochemistry* **65**, 2004, 2977–2985.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received 2. 12. 2009

Přijato k publikování / Accepted for publication: 3. 2. 2010