

# Sledování vlivu obranné reakce rostlin vůči suchu na některé výnosotvorné prvky ječmene

## *The Effect of Plant Defense Response to Drought on Selected Yield Parameters in Barley*

LUCIE MELIŠOVÁ, LUDMILA HOLKOVÁ, MARTA BRADÁČOVÁ

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: lucie.melissova@mendelu.cz

**Melišová, L. – Holková, L. – Bradáčová, M.: Sledování vlivu obranné reakce rostlin vůči suchu na některé výnosotvorné prvky ječmene.** Kvasny Prum. 57, 2011, č. 7–8, s. 190–195.

Schopnost rostlin účinně reagovat na stresové podmínky se významně podílí na výsledné produkci. Šlechtění odrůd tolerantních vůči suchu je velmi důležité, je však třeba zároveň sledovat možnost dosažení požadovaného výnosu a kvality. V naší práci jsme se zaměřili na sledování vztahu mezi spuštěním ochranné reakce rostlin ječmene vůči suchu a výnosovým potenciálem vybraných odrůd v průběhu dvou let. Ochranná reakce byla hodnocena na úrovni exprese dehydrinového genu *Dhn4*. Vyšší aktivita genu *Dhn4* byla zaznamenána u všech testovaných genotypů v sušším roce 2009. Na vztahu obranné reakce rostlin a výnosu se výrazně podílel průběh teplot a relativní vzdušná vlhkost během pokusu.

**Melišová, L. – Holková, L. – Bradáčová, M.: The effect of plant defense response to drought on selected yield parameters in barley.** Kvasny Prum. 57, 2011, č. 7–8, s. 190–195.

Ability of plants to response to stress conditions significantly affects the final production of grain. Breeding drought tolerant varieties is very important but simultaneously possibilities how to achieve required yield and quality must be studied. This paper focused on studying the relationship between triggering a protective reaction of barley plants due to drought and yield potential of varieties during a two-year period. The protective reaction was evaluated at the level of expression of the *Dhn4* dehydrin gene. Higher activity of the *Dhn4* gene was recorded in all the tested genotypes in the drier year 2009. The temperatures and relative humidity during the experiment affected the relationship between a plant response and yield markedly.

**Melišová, L. – Holková, L. – Bradáčová, M.: Die Verfolgung der Pflanzenabwehrreaktion gegen die Trockenheit auf einige ertragsbildenden Gerstenelemente.** Kvasny Prum. 57, 2011, Nr. 7–8, S. 190–195.

Die Pflanzefähigkeit auf die Streßbedingungen zu reagieren, wird an der gesamten Produktion wesentlich beteiligt. Die Veredelung der Pflanzensorten, die gegen die Trockenheit resistent sind, ist sehr wichtig, aber man muß gleichzeitig auch sorgen, die gewünschte Erträge und Qualität zu sichern. Der Artikel befaßt sich mit der Verfolgung der Beziehung binnen zwei Jahren zwischen dem Anfang der Gerstenabwehrreaktion gegen die Trockenheit und dem Ertragspotential von ausgesuchten Sorten. Die Pflanzenabwehrreaktion wurde auf dem Niveau einer Expression des dehydrinen Gens *Dhn4* ausgewertet. Im trockeneren Jahre 2009 wurde bei allen getesteten Genotypen eine höhere Aktivität des *Dhn4* Gens festgestellt. Der Temperaturenverlauf und relative Luftfeuchtigkeit während des Versuches hatten einen wesentlichen Anteil an der Beziehung zwischen der Pflanzefähigkeit gegen die Dürre und dem Ertrag.

**Klíčová slova:** sucho, ječmen jarní, exprese genu, *Dhn4*, polymerasová řetězová reakce (PCR)

**Keywords:** drought, spring barley, gene expression, *Dhn4*, polymerase chain reaction (PCR)

## 1 ÚVOD

V posledních letech se stále více hovoří o změně klimatu. Ať již přijmeme teorii o globálním oteplování či nikoliv, nelze pominout fakt výskytu častějších a různě dlouho trvajících období sucha. Vzrůstá počet dní prováděných vysokými denními teplotami. Dešťové srážky přichází nepravidelně, mnohdy vlivem velké intenzity a krátké doby trvání z krajiny velmi rychle odtékají, aniž by ve větším množství infiltrovaly do půdy a tím kompenzovaly deficit vody v půdě [1]. Tyto a mnohé další faktory se velkou měrou podílí na snižování dostupnosti vody pro rostliny během vegetace. Právě sucho, resp. dostupnost vody pro rostliny je jedním z limitujících a nezbytných faktorů produkce kulturních plodin, majících úlohu v zabezpečení výživy obyvatelstva i hospodářských zvířat. Lidská populace se neustále rozrůstá a postupně začíná pocítovat snižování zásob nejen pitné vody, ale i vody pro průmyslové potřeby. Zmenšují se zásoby povrchové i podzemní vody. Dle odhadů se asi 80 % potenciálně dostupné vody spotřebuje na zavlažování zemědělských plodin. Produkce hospodářských plodin by teoreticky měla vzrůstat spolu s rostoucí početností populace [2]. Proto porozumění vlivu sucha na rostliny může mít zásadní význam pro zlepšení postupů v pěstební praxi a pro předcházení ztrát produkce vlivem změn klimatu. Rostliny disponují rozmanitou strategií obrany vůči stresu suchem, ať již na úrovni fyziologické [3,4,5], či molekulárně biologické [6,7,8]. Ačkoliv je tolerance rostlin vůči suchu z velké části dána geneticky [9], není hodnocení této tolerance vzhledem ke komplexnímu charakteru jednoduché. Mnoho studií, zabývajících se zkoumáním tolerance rostlin k suchu, sleduje často jen způsob, či míru obranné reakce rostlin vůči těmto nepříznivým podmínkám. Hodnocen bývá relativní obsah vody (RWC) a osmotický

## 1 INTRODUCTION

Climate change has been largely discussed recently. No matter whether we accept the global warming theory or not, the fact that more frequent and variously long periods of drought occur cannot be denied. A number of days with high day temperatures have increased. Rainfalls come irregularly and, due to their high intensity and short duration, they often run off from the landscape very quickly and do not infiltrate largely into the soil and therefore water deficit in soil is not compensated [1]. These and many other factors contribute to the decline in water availability for plants during vegetation. Drought or water availability for plants is one of the limiting and necessary factors of cultural plant production that play a role in ensuring nutrition for population and livestock. Human population has been increasing constantly and gradually starts to feel decrease in supplies, not only potable water but also water for industrial needs. Supplies of overground and underground water are decreasing. It is estimated that ca 80 % of potentially available water is consumed for irrigation of agricultural crops. Theoretically, production of agricultural crops should rise together with growing population [2]. Therefore, understanding the effect of drought on plants could be of principal importance to improve the growing practice methods and to prevent production losses caused by climate changes. Plants possess various strategies to defence against drought stress both at the physiological [3,4,5] and molecular and biological levels [6,7,8]. Although plant drought tolerance is greatly given genetically [9], the assessment of this tolerance is not simple regarding its complex character. Many papers investigating plant drought tolerance often study only the mode or extent of the plants defense response of these unfavorable condi-

potenciál [3,4], využití vody rostlinami, difusní vodivost průduchů a míra diskriminace těžkého uhlíku ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) [10,11], či vliv velikosti kořenového systému [12]. Velmi často se také využívají metody založené na hodnocení exprese genů s ochrannou funkcí vůči dehydrataci pletiv. Mezi tyto geny řadíme tzv. dehydriny ze skupiny LEA proteinů (Late embryogenesis abundant). Jsou indukovány stresovými faktory, které vyvolávají dehydrataci rostlinných buněk [6,13,14]. U ječmene byla zjištěna souvislost mezi tolerancí rostlin k suchu a vzestupem aktivity dehydrinových genů [15]. Jedním z těchto genů je gen *Dhn4*, člen skupiny LEA 2. Nachází se na chromosomu 6H a jeho exprese vzrůstá až vlivem stresových podmínek sucha. Zvolili jsme hodnocení aktivity genu *Dhn4*, protože je považován za hlavní stresový protein aktivovaný v podmínkách sucha [13,16].

V této práci jsme se zabývali hodnocením stresové reakce rostlin ječmene s různou úrovní tolerance vůči suchu v souvislosti s výnosovým potenciálem vybraných odrůd. Zaměřili jsme se nejen na sledování úrovně této obranné reakce, ale zároveň i na schopnost rostlin vytvořit adekvátní výnos. Hodnotili jsme tedy vztah mezi mírou ochranné reakce genotypu a dosaženou úrovní výnosotvorných prvků.

## 2 MATERIÁL A METODY

Pro hodnocení citlivosti vůči suchu byly vybrány tři české odrůdy ječmene jarního (*Malz*, *Amulet* a *Bojos*) a jedna odrůda holandské provenience *Jersey* (*Hordeum vulgare* L.). Zároveň jsme do experimentu zařadili *Tadmor* (*Hordeum vulgare*, ssp. *spontaneum*), linii vyselektovanou z původních syráckých krajových odrůd, genotyp dobře adaptovaný na suchu.

Výsev byl proveden na jaře (duben) 2009 a 2010. Každá odrůda byla vyseta do 6 nádob o stejném objemu zeminy, vždy po 9 obilkách. Nádobky byly umístěny pod zahradní přístřešek. Po vzejití rostlin byla u všech nádob hmotnostně udržována zálivka na 75 % plného nasycení půdy (kontrola). Po čtyřech týdnech byl u poloviny nádob upraven režim zálivky na 30 % plného nasycení půdy (suchá varianta) a udržován až do konce vegetace. Ostatní podmínky se odvíjely od průběhu ročního období a aktuálního počasí (délka dne, teplota, vlhkost vzduchu). Odběr materiálu pro analýzy proběhl ve čtyřech termínech trvání sucha, současně byla zaznamenána příslušná růstová fáze. Z každé nádoby byly pro expresi genu odebrány tři směsné vzorky listů (druhý pravý list). Termíny odběrů a dobu trvání sucha uvádí tab. 1.

RNA byla vyextrahována z 50 mg pletiva druhého pravého listu (v případě IV. odběru se jednalo o praporcový list) dle protokolu RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) a purifikována DNázou Turbo DNA free<sup>TM</sup> (Ambion). První řetězec cDNA byl připraven z 500 ng RNA využitím QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription Kit (Qiagen). Aktivita genu *Dhn4* byla stanovena metodou qReal time PCR za pomoci kitu QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Transkripční aktivita byla hodnocena jako normalizovaná relativní exprese počítaná s ohledem na účinnost PCR reakcí podle metody Pfaffl [17]. Změny v aktivitách genů byly normalizovány vzhledem k referenčnímu genu ( $\alpha$ -tubulin) a vztaženy k expresi hodnoceného genu *Dhn4*. Hodnoty z obou let byly přepočteny na jednotný kalibrátor (*Amulet* IV. odběr). Podmínky hodnocení relativní exprese ochranného genu *Dhn4* byly nastaveny dle Mikulková et al. [18]. Podmínky pro referenční gen dle Suprunova et al. [7].

Na konci vegetace byly v obou letech pokusu sklizeny klasy a vyhodnoceny vybrané výnosotvorné prvky jako: počet klasů v nádobě, počet zrn v klasu a hmotnost tisíce semen (HTS) a rovněž byla hodnocena výška rostlin.

Relative water content (RWC) and osmotic potential are frequently evaluated parameters [3,4], water exploitation by plants, diffuse percolation of pores and extent of heavy carbon discrimination ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) [10,11] or the effect of the size of the root system [12]. In addition, methods based on the evaluation of expression of the genes with protective functions against tissue dehydration, e.g. so called dehydrins from the group of LEA proteins (Late Embryogenesis Abundant), are used. They are induced by stress factors causing dehydration of plant cells [6,13,14]. In barley, the association between plant tolerance to drought and increase in dehydrin gene activity has been established [15]. The *Dhn4* gene, a member of the LEA 2 group is one of these genes. It is located on chromosome 6H and its expression is only increased by the effect of drought stress conditions. Activity of the *Dhn4* gene was selected as it is considered the main stress protein activated under the conditions of drought [13,16].

This study evaluated the stress response of barley plants with different level of tolerance to drought in relation to yield potential of the selected varieties. We focused not only on the level of this protective response but at the same time plant ability to produce an adequate yield. It means that the relationship between the extent of the genotype protective response and achieved levels of yield producing parameters was evaluated.

## 2 MATERIAL AND METHODS

Sensitivity to drought was evaluated in three Czech spring barley varieties (*Malz*, *Amulet* and *Bojos*) and one variety of the Dutch provenience *Jersey* (*Hordeum vulgare* L.) and in addition, *Tadmor* (*Hordeum vulgare*, ssp. *spontaneum*), a line selected from the original Syrian landraces, genotype well adapted to drought, was included in the set.

Sowing was conducted in spring 2009 and 2010 (April). Each variety was sown to 6 containers with the same soil volume, always per 9 caryopses. The containers were placed under the garden shelter. After plant emerging, moisture in all containers was kept to 75 % of full soil saturation (control). After four weeks the regime of the half of containers was adjusted to 30 % of full soil saturation (dry variant) and kept to the end of vegetation. The other conditions resulted from course of the season and actual weather (day length, temperature, air humidity). Material for analyses was collected in four terms depending on duration of the drought period and a growing phase. From each container three mixed samples of leaves were taken for the gene expression (the second young leaf). The collection dates and duration of the drought periods are given in Tab. 1.

RNA was extracted from 50 mg of tissue of the youngest fully developed leaf (flag leaf in sampling IV) according to the protocol RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) and purified with the Turbo DNA-free<sup>TM</sup> kit (Ambion). The first chain of cDNA was prepared from 500 ng of RNA using the QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription Kit (Qiagen). Activity of the *Dhn4* gene was determined with the qReal time PCR method using the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Transcription activity was evaluated as normalized relative expression calculated with respect to the efficiency of PCR reactions after the method Pfaffl (2001). Changes in the gene activities were normalized with respect to the reference gene ( $\alpha$ -tubulin) and related to expression of the evaluated *Dhn4* gene. Values from both years were calculated to the same calibrator. Conditions of the evaluation of relative expression of the protective *Dhn4* gene were set according to Mikulková et al. [17]. Conditions for the reference gene according to Suprunova et al. [7].

Tab. 1 Termíny odběrů rostlinného materiálu pro analýzy exprese genu *Dhn4* / Tab. 1 Terms of collections of plant material for the analyses of the *Dhn4* gene expression

Odběr / Collection	2009				2010			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Datum / Date	15/5	22/5	4/6	19/6	14/5	21/5	28/5	11/6
$\bar{x}$ t (°C) den / day *	15.99	25.08	16.55	22.77	12.17	20.88	22.34	30.27
$\bar{x}$ t (°C) noc / night	8.70	11.31	6.35	12.57	8.64	10.91	9.97	16.52
Vlhkost vzduchu / Air moisture (%)	78.7	71.6	59.9	82.8	89.8	74.5	75.7	61.9
Sucho (dny) / Drought (days)	6	13	26	41	7	14	21	35
Růstová fáze DC / Growing phase DC	30	34	50	69	30	34	50	69

Vysv.: \* denní teploty pod přístřeškem byly o 3–5 °C vyšší než hodnoty v okolí zjištěné meteorologickou stanicí

Notes: \* day temperatures under a shelter were by 3–5 °C higher than temperatures found Weather Station around shelter

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

V tab. 2 jsou uvedeny hodnoty výnosotvorných prvků, které vzhledem k typu pokusu mohly být stanoveny u obou režimů závlivy (75 % a 30 % nasycení půdy). U každé odrůdy bylo stanoveno procentické snížení výnosotvorných prvků vlivem sucha. Pro každý prvek jsme působení sucha vyjádřili jako procentický rozdíl mokré a suché varianty. Pro přehledné srovnání jednotlivých odrůd je uvedena tab. 3. Zde je pořadí dle nejnižšího poškození rostlin suchem. V roce 2009 byla jako nejlepší genotyp vyhodnocena odrůda *Malz*, naproti tomu jsme v následujícím roce 2010 u odrůdy *Malz* zaznamenali nejvyšší vizuální poškození rostlin. Na tomto stavu se zřejmě podílelo celkově vlhčí počasí provázené napadením padlím travním, kterým byla tato

Ears were harvested at the end of vegetation in both experiment years and the following selected yield parameters were evaluated: number of ears in a container, number of grains in an ear and thousand grain yield (TGW) and plant height.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

Tab. 2 gives the values of the yield parameters which, with respect to the type of the experiment, could be determined in both watering regimes (75 % and 30 % of soil saturation). Percentage reduction in yield parameters due to drought was determined in each variety. The effect of drought was expressed as a percentage difference between

Tab. 2 Hodnocení vybraných výnosotvorných prvků v obou režimech pěstování rostlin / Tab. 2 The evaluation of the selected yield parameters in both growing regimes

Odrůda / variety	Ročník / Year	Varianta / Variant	Výška rostlin / Plant height (cm)	Počet klasů na květináč / Number of ears per a container	Počet zrn na květináč / Number of grains per a container	Hmotnost zrn na květináč / Weight of grains per a container (g)	HTS / TGW (g)
Amulet	2009	suchá v. / dry v.	45	17.3	173.7	7.2	41.4
		kontrola / control	60	47	803.5	32.8	41.3
	Rozdíl / Difference %		-25.0	-63.2	-78.4	-78.0	0.2
	2010	suchá v. / dry v.	32.7 10	132.5	4.5	34.3	
		kontrola / control	56	24.3	419.3	16.7	39.7
	Rozdíl / Difference %		-41.6	-58.8	-68.4	-73.1	-13.6
Bojos	2009	suchá v. / dry v.	46.7	16	203.7	8.9	43.5
		kontrola / control	63	47.7	866.3	37.2	42.9
	Rozdíl / Difference %		-25.9	-66.5	-76.5	-76.1	1.4
	2010	suchá v. / dry v.	32.7	11	132.7	4.9	38.1
		kontrola / control	57	17.7	311.3	12.1	38.8
	Rozdíl / Difference %		-42.6	-37.9	-57.4	-59.5	-1.9
Malz	2009	suchá v. / dry v.	40	25	329.3	13.8	41.8
		kontrola / control	63	58	1080.5	45.2	41.9
	Rozdíl / Difference %		-36.5	-56.9	-69.5	-69.5	-0.2
	2010	suchá v. / dry v.	36.7	10.3	114.1	3.6	37.3
		kontrola / control	51.7	15.3	259	8	29.8
	Rozdíl / Difference %		-29.0	-32.7	-55.9	-55.0	25.0
Jersey	2009	suchá v. / dry v.	52.3	15.3	195.7	8.2	41.9
		kontrola / control	65	50.7	932	39.1	42.0
	Rozdíl / Difference %		-19.5	-69.8	-79.0	-79.0	-0.2
	2010	suchá v. / dry v.	38.3	11.3	127.1	4.7	30.8
		kontrola / control	53	15	244	8.7	36.5
	Rozdíl / Difference %		-27.7	-24.7	-47.9	-46.0	-15.7
Tadmor	2009	suchá v. / dry v.	—	—	—	—	—
		kontrola / control	—	—	—	—	—
	Rozdíl / Difference %		—	—	—	—	—
	2010	suchá v. / dry v.	32.7	10.6	64.2	2.1	31.7
		kontrola / control	47	7.3	37.7	0.7	19.1
	Rozdíl / Difference %		-30.4	45.2	70.3	200.0	66.2

Tab. 3 Pořadí genotypů ječmene podle dosažené nejvyšší hodnoty výnosotvorných parametrů v letech 2009 a 2010 v suché variantě / Tab. 3 The order of genotypes according to the highest value of yield parameters in the dry variant in 2009 and 2010

Odrůda / Variety	Výška rostlin / Plant height (cm)		Počet klasů na květináč / Number of ears per a container		Počet zrn na květináč / Number of grains per a container		Hmotnost zrn na květináč / Weight of grains per a container		HTS / TGW (g)		Σ pořadí / order	
	2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010
Amulet	2	4	2	2	3	2	3	2	2	4	3	2
Bojos	3	5	3	3	2	3	2	3	1	3	2	3
Jersey	1	1	4	4	4	4	4	4	3	5	4	4
Malz	4	2	1	5	1	5	1	5	3	2	1	5
Tadmor	—	3	—	1	—	1	—	1	—	1	—	1



odrůda značně poškozena. Jako nejlepší genotyp byla v roce 2010 na základě parametrů uvedených v tab. 2 vyhodnocena linie *Tadmor*. U tohoto genotypu však nebylo možno porovnat výnosotvorné parametry s rokem 2009, neboť *Tadmor* vlivem teplého jara nepřešel do generativní fáze růstu. Linie *Tadmor* se řadí spíše mezi ozimé genotypy, vyžaduje však jen krátkou dobu vernalizace. Tento genotyp nevykázal výnosotvorné poškození rostlin v suché variantě (30% nasycení půdy). O linii *Tadmor* máme již z dřívějších pokusů poznatek [18], že negativně snáší zamokření kořenů. Při stejné závlivce všech sledovaných genotypů u něj bývá kontrolní varianta v horším stavu. Po oba roky byla velmi výnosově poškozena vlivem sucha odrůda *Jersey*, která je uváděna jako citlivá na nedostatek vláhy. Tato odrůda je velmi intenzivní v pěstebně optimálních podmínkách, což dokumentuje výška rostlin (tab. 2), ale v podmínkách sucha dosáhla nízké úrovně výnosotvorných prvků (tab. 3).

Obr. 1 zachycuje aktivitu genu *Dhn4* u vzorků z jednotlivých odběrů suché varianty (30% nasycení půdy). U kontrolní varianty (75% nasycení půdy) nebyla aktivita genu detekována. Naše zjištění potvrzuje práce Choi et al. [16], která uvádí, že *Dhn* geny kódované typem YSK<sub>2</sub> (kam řadíme gen *Dhn4*) jsou u ječmenů aktivovány suchem a za „normálních“ podmínek růstu rostlin k expresi genu nedochází. Relativní exprese testovaného genu ukázala rozdílnou reakci rostlin v rámci let 2009 a 2010. Ačkoliv tab. 1 zachycující průměrné teploty pro jednotlivé odběry nevykazuje výrazné rozdíly, celkově byl rok 2010 vlhčí (vyšší úhrn srážek a vyšší vzdušná vlhkost oproti roku 2009) a chladnější, zejména v jarním období. Tomu odpovídá i obranná reakce rostlin vůči suchu. Pro oba roky je společná tendence nástupu aktivity genu *Dhn4*. V prvních dvou odběrech vzorků ze suché varianty (I., II.) byl zaznamenán jen slabý signál na hranici detekce, aktivita genu narostla až v III. a zejména IV. odběru. Nejvyšší exprese genu byla zaznamenána v roce 2009 ve IV. odběru. Z genotypů, které byly testovány, byla nejvyšší exprese v roce 2009 detekována u odrůd *Malz* a *Bojos*. Aktivita genu u zbývajících genotypů byla nižší a rozdíly mezi nimi byly dostatečně průkazné. V roce 2010 byla exprese genu u všech odrůd asi 4x nižší. Genotypem s nejvyšší aktivitou byla odrůda *Jersey* a na srovnatelné úrovni byla exprese genu u linie *Tadmor* a odrůdy *Malz*.

Vyhodnocení experimentu jsme provedli měřením relativní exprese genu *Dhn4* a vyjádřením vztahu aktivity tohoto genu s vybranými výnosovými prvky. Vztahy mezi jednotlivými testovanými parametry pro oba roky ukazují tab. 4, 5. Rok 2009 charakterizuje vyšší průměrná výška všech genotypů v porovnání s rokem 2010 a s vyšší výškou rostliny je v negativním vztahu aktivita genu *Dhn4* (2009). Těsný korelační vztah mezi snížením jednotlivých prvků a mírou exprese genu byl zjištěn v případě exprese genu *Dhn4* z druhého odběru a počtem klasů, počtem zrn a jejich hmotností (tab. 4). V případě čtvrtého odběru byl těsný korelační vztah zjištěn mezi mírou aktivity genu *Dhn4* a počtem zrn a jejich hmotností.

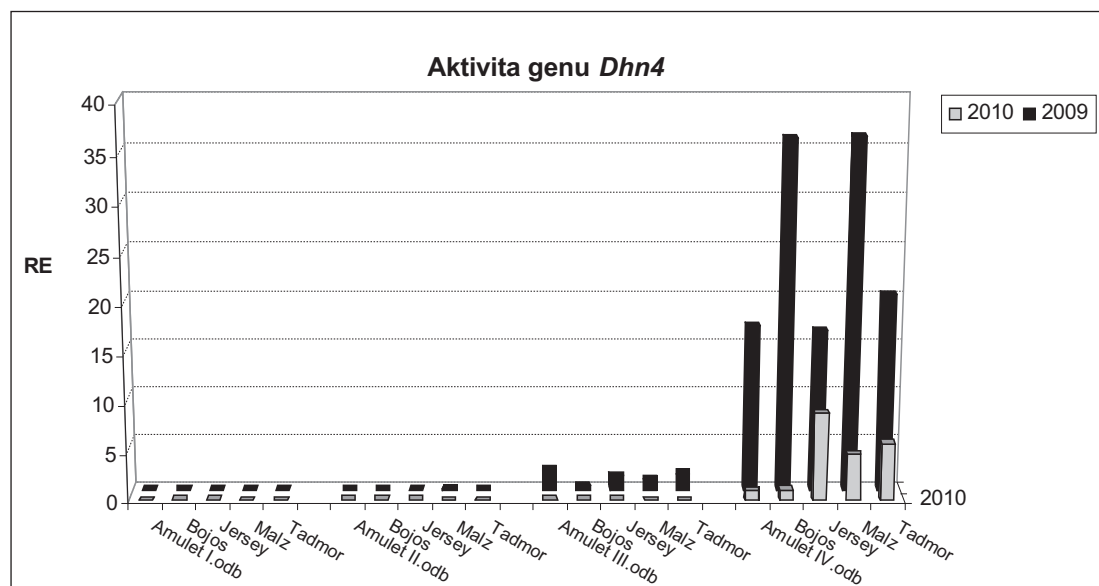
V roce 2010 byla zjištěna pozitivní a statisticky významně vyšší korelace míry exprese ochranného genu ze IV. odběru s výškou rostliny,

the wet and dry variant for each parameter. The individual varieties are compared in Tab. 3, they are ordered according to the lowest damage of plants due to drought. In 2009 the variety *Malz* was evaluated as the best genotype compared to 2010 when the highest visual damage was recorded in the variety *Malz*. It was probably caused by generally wetter weather accompanying with powdery mildew which damaged this variety considerably. Based on the parameters given in Tab. 2, the best genotype in 2010 was the line *Tadm*. In this genotype, however, it was not possible to compare the yield parameters with those achieved in 2009 as *Tadmor* due to hot spring did not get into the generative growth phase. The line *Tadmor* belongs to winter genotypes but it requires only a short vernalization period. This genotype did not exhibit damage of plant yield in a dry variant (30% of soil saturation) compared to the control (75% of soil saturation). The line *Tadmor* has been found to react negatively to water-logging of roots [18]. With the same watering of all the genotypes under study, the control variant of this line was usually in a worse state. Yield of the variety *Jersey* was heavily damaged in both years; the variety is sensitive to a lack of moisture. This variety was very intensive under the optimal growing conditions as documented by the height of plants (Tab. 2) but under the dry conditions, it achieved low yield producing parameters (Tab. 3).

Fig. 1 shows activity of the *Dhn4* gene in samples from the individual collections of the dry variant (30% of soil saturation). In the control variant (75% of soil saturation) gene activity was not detected. Our finding is confirmed by study of Choi et al. [16] who present that *Dhn* genes encoding YSK<sub>2</sub>-type (including the *Dhn4* gene) are activated by drought in barley and under “normal” plant growing conditions the gene expression does not occur. Relative expression of the tested gene showed a different response of plants in the period of 2009 and 2010. Although Table 1 showing average temperatures for the individual samplings does not indicate any pronounced differences, year 2010 was wetter (higher precipitation sum and higher air humidity) compared to 2009 and colder, mainly in the spring period. It is also in compliance with the plant defense response to drought. Both years exhibited tendency to the gene activity. In the first two sample collections from the dry variant (I, II) only a low signal at the detection level was recorded, gene activity increased only in the third and especially fourth collection. The highest expression of the gene in 2009 in the fourth taking. In 2009 the highest expression was detected in the varieties *Malz* and *Bojos*. Activity of the gene in the other genotypes was comparable. In 2010 gene expression was in all varieties ca four times lower and differences between these varieties were not conclusive. The variety *Jersey* was a genotype with the highest activity and gene expression in the line *Tadmor* and the variety *Malz* was comparable.

The experiment was evaluated by relative expression of the *Dhn4* gene and relationship between this gene activity and selected yield parameters. Relationship between the individual parameters tested for both years are given in Tab. 4 and 5. Year 2009 was characterized

Obr. 1 Hodnocení relativní exprese genu *Dhn4* z I.–IV. odběru vzorků listů z let 2009 a 2010 / Fig. 1 The evaluation of relative expression of the *Dhn4* gene from I–IV leaf sampling in 2009 and 2010



by a higher average height of all genotypes compared to 2010 and higher plant height was in negative correlation with activity of the *Dhn4* gene (Tab. 4). A close correlation between the decline in the individual parameters and the extent of gene expression was found in expression of the *Dhn4* gene from the second sampling and number of ears, number of grains and their weight (Tab 4). In the fourth sampling a close correlation was found between the extent of the *Dhn4* gene activity and number of grains and their weight.

In 2010 positive and statistically significantly higher correlation between the relative expression of the protective gene from the sampling IV and the plant height was found, summarily, the

celkově vykázal vztah aktivity genu ze IV. odběru a výnosových parametrů pozitivní korelaci. Zatímco v expresi genu z druhého odběru vidíme negativní korelaci se všemi výnosovými parametry. Dle Stamp and Herzog [19] je velikost endospermu a počet zrn ovlivněna dostupností vody, světla a obsahem dusíku týden před květem a po odkvětu rostlin. Znak hmotnosti tisíce semen je určován i specifickou genotypovou reakcí. Některé genotypy tvoří za nepříznivých podmínek větší počet velmi drobných zrn, naproti tomu jiné genotypy tvoří malý počet plných obilí.

Ačkoliv bylo naším cílem se co nejvíce během pokusu přiblížit reálným podmínkám pěstování ječmene na poli, některé parametry nebylo možné ovlivnit. A je pravděpodobné, že tyto parametry mohly mít svůj podíl na aktivitě genu. Rostliny byly pěstovány v nádobách a závlhka byla udržována hmotnostně, ale vlivem chladnějšího počasí mohla rostlina odlišně vnímat signály sucha na listech a na kořenech. Zároveň pod přístřeškem byla vyšší vlhkost oproti okolí a také zde byla vyšší teplota. V roce 2009 byla ve sledovaném období 14.5. – 19.6. zjištěna průměrná maximální teplota 21,71 °C a minimální teplota 9,51 °C, úhrn srážek ve sledovaném období činil 83,75 mm a relativní vlhkost vzduchu činila 64,7 %. Zatímco v roce 2010 byla ve stejném období maximální teplota 19,91 °C, minimální 10,97 °C a srážky činily 175 mm s relativní vlhkostí vzduchu 72,55 %. Rok 2009 byl tedy teplejší a sušší (s nižší vlhkostí vzduchu), čemuž odpovídá i námi zjištěná míra ochranné reakce rostlin (relativní exprese genu *Dhn4*).

Naše výsledky jednoznačně neodpovídají představě o rychlejší a vyšší expresi genu *Dhn4* u ječmenů tolerantních k suchu [13, 18]. Ačkoliv odrůda *Malz*, která je považována za méně citlivou k suchu, v roce 2009 vykázala rychlé spuštění obranné reakce vůči stresu za dosažení nejlepších výnosových parametrů. Zařazená tolerantní odrůda *Tadmor* po oba roky vykázala pozdější nástup exprese dehydrinového genu na úrovni méně tolerantních odrůd. Vzhledem k zajímavým hodnotám výnosových prvků v roce 2010 je možné, že má tato odrůda odlišnou citlivost vnímání stresu (stresový impuls nebyl dostatečný).

Sledování korelace mezi relativní mírou exprese ochranného dehydrinového genu *Dhn4* a vybraných výnosových parametrů ukázalo na vliv ročníku. Do daných pěstebních podmínek je potřeba zvolit odpovídající odrůdu a hodnocení vztahu míry ochranné reakce rostlin a dosaženého výnosu by mohlo být využito jako nástroj k volbě adaptabilní odrůdy. A relativní exprese ochranného genu *Dhn4* by bylo možné využít jako míru odolnosti odrůd vůči suchu.

#### Poděkování

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

relationship between the activity of the gene from the sampling IV and yield parameters showed positive correlation while expression of the gene from the second sampling showed negative correlation with all yield parameters. According to Stamp and Herzog [19], endosperm size and the number of grains was affected by water availability, light and nitrogen content before flowering and after plant ceased blooming. The parameter thousand grain weight is also determined by a specific genotype response. Under unfavorable conditions, some genotypes form a higher number of very petty grains while others form a small number of full caryopses.

Although we tried to imitate real field conditions of barley growing in this experiment, it was not possible to affect some parameters. And presumably, these parameters could contribute to the gene activity. Plants were grown in containers and watering was maintained by weight but due to colder weather plants could perceive signals of drought on leaves and roots differently. At the same time under the shelter there was a higher humidity and temperature compared to the environment. In 2009, in the period studied (May 14 – June 19), the average maximal temperature of 21.71 °C and minimal 9.51 °C were determined, precipitation sum in the followed period was 83.75 mm and relative air humidity 64.7 %. While in 2010 in the same period maximal temperature was 19.91 °C, minimal 10.97 °C and precipitations were 175 mm with relative air humidity of 72.55 %. It means that year 2009 was warmer and drier (with lower air humidity) and the extent of the plant protective defense response determined by us corresponded to it (relative expression of the *Dhn4* gene).

Our results do not ambiguously correspond to the concept about a faster and higher *Dhn4* gene expression in barleys tolerant to drought [13, 18]). The variety *Malz*, although considered less sensitive to drought, showed fast triggering of the defense response to stress while achieving the best yield parameters in 2009. The tolerant variety *Tadmor* showed in both years a later onset of the expression of the dehydrin gene, at the level of less tolerant varieties. Considering the interesting values of the yield parameters achieved by this variety in 2010 it is possible that it had a different sensitivity to stress perception (stress impulse was not sufficient).

The correlation between the relative expression of protective gene *Dhn4* and selected yield parameters showed the effect of year. A suitable variety must be selected for the given growing conditions and the evaluation of the relationship of the extent of the extent of the plant defense response and achieved yield could be used as tools for the selection of an adaptable variety. And the relative expression of protective gene *Dhn4* could be used as a measure of resistance of varieties to drought.

#### Acknowledgements

This study was funded by the grant of the NAZV QH91192 of the MA and project 1M0570 – 70 (Research Centre for Study of Extract Compounds of Barley and Hop) of the MEYS.

Tab. 4 Korelace relativní (*r*) exprese genu *Dhn4* z odběrů vzorků I.–IV. (suchá varianta) v roce 2009 u odrůd *Amulet*, *Bojos*, *Jersey*, *Malz*, *Tadmor* ve vztahu k poškození výnosu / Tab. 4 Correlation of relative (*r*) expression of the *Dhn4* gene from sample collections I–IV (dry variant) in the varieties *Amulet*, *Bojos*, *Jersey*, *Malz*, *Tadmor* in relation to damage of yield in 2009

	RE <i>Dhn4</i> I.	RE <i>Dhn4</i> II.	RE <i>Dhn4</i> III.	RE <i>Dhn4</i> IV.
Výška rostlin / Plant height	0.13	-0.90*	0.24	-0.73
Počet klasů / Number of ears	0.14	0.97*	0.05	0.52
Počet zrn / Number of grains	-0.36	0.85*	-0.35	0.76*
Hmotnost zrn	-0.34	0.85*	-0.36	0.78*
HTS / TGW	-0.06	-0.51	-0.61	0.43

(\* statisticky významné pro  $p = 0,95$ , \*\* statisticky významné pro  $p = 0,99$  / \*statistically significant for  $p = 0.95$  \*\*statistically significant for  $p = 0.99$ )

Tab. 5 Korelace relativní (*r*) exprese genu *Dhn4* z odběrů vzorků I.–IV. (suchá varianta) v roce 2010 u odrůd *Amulet*, *Bojos*, *Jersey*, *Malz*, *Tadmor* ve vztahu k poškození výnosu / Tab. 5 Correlation of relative (*r*) expression of the *Dhn4* gene from sample collections I–IV (dry variant) in the varieties *Amulet*, *Bojos*, *Jersey*, *Malz*, *Tadmor* in relation to damage of yield in 2010

	RE <i>Dhn4</i> I.	RE <i>Dhn4</i> II.	RE <i>Dhn4</i> III.	RE <i>Dhn4</i> IV.
Výška rostlin / Plant height	-0.21	-0.37	-0.66	0.92*
Počet klasů / Number of ears	-0.34	-0.62	-0.44	0.48
Počet zrn / Number of grains	-0.41	-0.59	-0.46	0.35
Hmotnost zrn	-0.43	-0.59	-0.47	0.32
HTS / TGW	-0.72*	-0.89*	-0.62	0.19

(\* statisticky významné pro  $p = 0,95$ , \*\* statisticky významné pro  $p = 0,99$  / \*statistically significant for  $p = 0.95$  \*\*statistically significant for  $p = 0.99$ )

## LITERATURA / REFERENCES

1. ČHMÚ home page [http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/hydro/ohp/sucho\\_2008.pdf](http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/hydro/ohp/sucho_2008.pdf) (8. 8. 2008): Informace o stavu sucha na území ČR.
2. Morison, J. I. L., Baker, N. R., Mullineaux P. M., Davies W. J.: Improving water use in crop production. Philosophical Transactions of the Royal Society B. **363**, 2009, 639–685.
3. Teulat, B., Monneveux, P., Wery, J., Borries, C., Souyriss, I., Charrier, A., This, D.: Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study, New Phytol. **137**, 1997, 99–107.
4. Teulat, B., Rekika, D., Nachit, M. M., Monneveux, P.: Comparative osmotic adjustment in barley and tetraploid wheats. Plant Breeding **116**, 1997, 519–523.
5. Szira, F., Balint, A. F., Borner, A. and Galiba, G.: Evaluation of Drought-Related Trait and Screening Methods at Different Developmental Stages in Spring Barley. J. Agronomy & Crop Science **194**, 2008, 334–342.
6. Close, T. J.: Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. Plant Physiol. **97**, 1996, 795–803.
7. Suprunova, T., Krugman, T., Fahima, T., Chen, G., Shams, I., Korol, A., Nevo, E.: Differential expression of dehydrin genes in wild barley, (*Hordeum spontaneum*), associated with resistance to water deficit. Plant Cell Environ. **27**, 2004, 1297–1308.
8. Rorat, T.: Plant dehydrins – tissue, location, structure and function. Cellular & Molecular Biology Letters **11**, 2006, 536–556.
9. Teulat, B., Merah, O., Sirault, X., Borries, C., Waugh, R. and This, D.: QTL s for grain carbon isotope discrimination in field-grown barley. Theor Appl Genet **106**, 2002, 118–126, 2002.
10. Codon, A. G., Richards, R. A., Rebetzke, G. J., Farquhar, G.D.: Breeding for high water-use efficiency. Journal of Experimental Botany **55** (407), 2004, 2447–2460.
11. Xu, X., Yuan, H., Li, S., Trethowan, R., Monneveux, P.: Relationship between Carbon Isotope Discrimination and Grain Yield in Spring Wheat Cultivated under Different Water Regimes. Journal of Integrative Plant Biology **49**, 2007, 1497–1507.
12. Chloupek, O., Foerster, B. P., 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.
13. Park, S. Y., Noh, K. J., Yoo, J. H., Yu, J. W., Lee, B. W., Kim, J. G., Seo, H. S., Peak, J. G.: Rapid Upregulation of *Dehydrin3* and *Dehydrin4* in response to Dehydration Is s Characteristic of Drought-Tolerant Genotypes in Barley. Journal of Plant Biology **49**, 2006, 455–462.
14. Tommasini, L., Svensson, J. T., Rodriguez, M., Wahid, A., Malat-rasi, M., Kato, K., Wanamaker, S., Resnik, J., Close, T. J.: Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare* L.). Funct Integr Genomics **8**, 2008, 387–405.
15. Zhu, B., Choi, D. W., Fenton, R. & Close, T. J.: Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. Molecular and General Genetics **246**, 2000, 145–153.
16. Choi, D.-W., Zhu, B., Close, T. J.: The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allelic types, chromosome assignments, and expression characteristic of 11 *Dhn* genes of cv Dicktoo. Theor Appl Genet **98**, 1999, 1234–1247.
17. Pfaffl, M. W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT PCR. Nucl. Acid Res. **29**, 2001, E45–E45.
18. Mikulková, P., Holková, L., Hronková, M., Klemš, M., Bradáčová, M.: Efficiency of differential laboratory methods for selection od drought tolerance barley genotypes. Cereal Res. Commun. **37**, Suppl., 2009, 277–280.
19. Stamp, P., Herzog, H.: Einfüsse auf Wachstum und Entwicklung des Weizenkorns. Kalu-Briefe **17**, 1984, 261–277.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 25. 5. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 14. 6. 2011

# Zde mixuje nápojová branže obchod se zážitky!

Norimberk, Německo

9. – 11.11.2011

## Brau Beviale 2011

Raw Materials – Technologies – Logistics – Marketing

## Na viděnou v Norimberku!

Organizátor veletrhu

NürnbergMesse GmbH

visitorservice@nuernbergmesse.de

Informace

PROveletrhy s.r.o.

Tel +4 20.2 20 51 19 74

Fax +4 20.2 20 51 19 75

cesko@nuernbergmesse.com

[www.brau-beviale.de](http://www.brau-beviale.de)

NÜRNBERG MESSE