

# STORAGE PROTEINS AND ABSCISIC ACID IN ZYGOTIC EMBRYOGENESIS OF PEA (PISUM SATIVUM L.)

## ZÁSOBNÍ PROTEINY A KYSELINA ABSCISOVÁ V ZYGOTICKÉ EMBRYOGENEZI HRACHU SETÉHO (PISUM SATIVUM L.)

<sup>1</sup>Solnická P., <sup>1</sup>Klemš M., <sup>2</sup>Griga M., <sup>1</sup>Havel L.

<sup>1</sup> Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Agritec Plant Research s.r.o., Zemědělská 16, 787 01 Šumperk, Czech Republic

E-mail: xsolnic0@node.mendelu.cz, klems@mendelu.cz, lhavel@mendelu.cz

---

### ABSTRACT

Our aim was to describe relationship between endogenous content of abscisic acid (ABA) and level of storage proteins in isolated embryos of pea *in vitro*. Decrease the level of ABA and the level of storage proteins through the application of 20  $\mu$ M flurochloridone in proces of dessication and evoke embryos to germinate. At the conclusion deduce correlation between ABA, storage proteins and germinating in embryos maturation from results. We isolated embryos 9, 15, 22 and 30 days after pollination (DAA) from pea controle plants and with aplication 20 $\mu$ M flurochloridone. Imature and mature embryos were cultivated *in vitro* on MS medium (MURASHIGE and SKOOG 1962) with 30 g sucrose or 80 g sucrose with or without 20  $\mu$ M flurochloridone and 10  $\mu$ M ABA. ABA were analysed by RIA (radioimunoanalytic) method (QUARRIE et al. 1988) with using monoclonal antibody MAC 262. SDS polyacrylamide electrophoresis (LAEMMLI 1970) was used for analysing storage proteins. By cultivation of isolated embryos *in vitro* were judged living and germinating of embryos (%). Statistical evaluation (t-Student's test) were used in analyses of ABA and repeated four times. By the help of flurochloridone which decreased level of ABA biosynthesis we observed morphological changes in embryos. Plants with application of flurochloridone had lower level of ABA in embryos and endosperm. For cultivated isolated embryos *in vitro* were characteristic that embryos without cotyledons did germinace more intensively already on medium with adition of flurochloridone. Rippening cotyledonary embryos from control plant had eminently representation of storage proteins with relation to upper level of ABA in maturation. Storage protein deposition were in relation to desiccation governed by the enhancement level of abscisic acid in embryo's tissue and seed.

**Key words:** pea, embryogenesis, storage protein, abscisic acid, flurochloridone

## ÚVOD

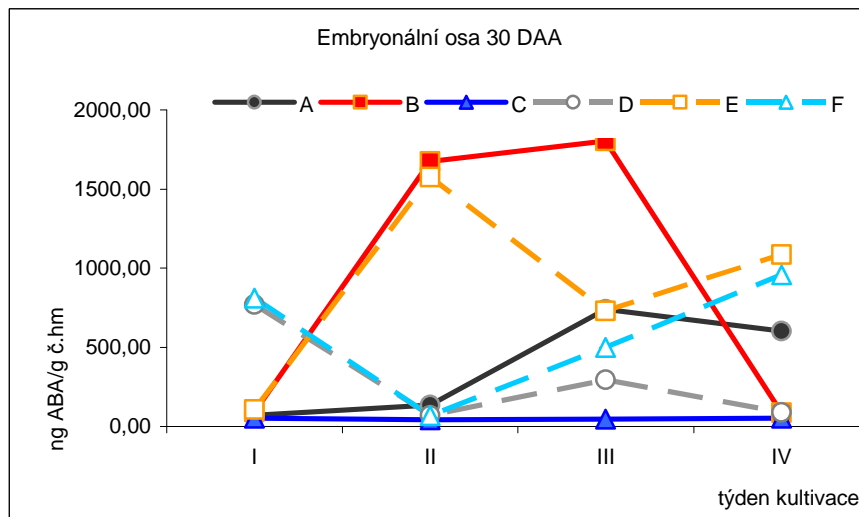
Významným procesem vývoje rostlin je zygotická embryogeneze. Regulace růstu a vývoje embrya je dána interakcemi fytohormonů a genetických dispozic. Vyvíjející se embryo resp. semeno ukládá zásobní látky, které po překonání nepříznivého období k růstu slouží pro počáteční růst klíčící rostliny. Procesy ukládání těchto zásobních látek jsou regulovány aktivitou genů a hormonů, především v období maturace embrya. Cílem bylo studovat růstu a vývoj zygotického embrya hrachu setého (*Pisum sativum* L.) ve vztahu ke změnám obsahu a distribuce kyseliny abscisové. Prostřednictvím aplikace inhibitoru biosyntézy ABA (flurochloridonu) byly modifikovány endogenní hladiny ABA (abscisová kyselina) a sledovány morfologické změny embryí. Dále byla sledována exprese zásobních proteinů v zygotických embryích (a to i po aplikaci flurochloridonu).

## MATERIÁL A METODIKA

V experimentu byl použit hrách setý odrůda Oskar, z jehož semen byla izolována embrya v 9, 15, 22 a 30 dnech po rozkvetu (DAA) a embryonální osy (embrya po odstranění děloh) 22 a 30 DAA a použita pro stanovení ABA a zásobních proteinů. Embrya byla kultivována na médiu MS (MURASHIGE and SKOOG 1962) s obsahem 30 g nebo 80 g sacharosu a přídatkem buď 20  $\mu$ M flurochloridonu, nebo 10  $\mu$ M ABA. ABA byla analyzována pomocí RIA metody (QUARRIE et. al. 1988) pomocí monoklonální protilátky MAC 262 a zásobní proteiny byly analyzovány pomocí SDS polyakrylamidové elektroforézy (LAEMMLI 1970). Při kultivaci izolovaných embryí *in vitro* bylo hodnoceno přežívání embryí a klíčení (%). Ke statistickému hodnocení byl použit t-Studentův test. Statistické hodnocení bylo provedeno v analýzách obsahu ABA ve čtyřech opakováních.

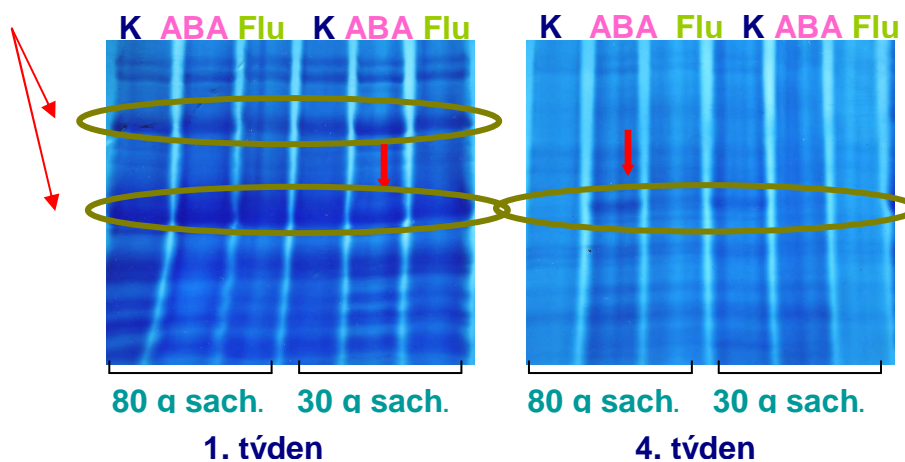
## VÝSLEDKY A DISKUZE

Během kultivace izolovaných embryí *in vitro* se dynamicky měnil obsah ABA. Největších změn bylo dosaženo u embryí 9 DAA, která byla nejcitlivější na izolaci. Na médiu s přídatkem flurochloridonu měly vyšší obsah ABA, na rozdíl od embryí 15 DAA, kde se obsah ABA dle předpokladu snížil při kultivaci na médiích s flurochloridonom a zvýšil při kultivaci na médiu s přídatkem ABA navíc vyšší koncentrace sacharosu ještě toto podpořila ve všech třech typech médií s 80 g sacharosu. Kultivace izolovaných embryonálních os 22 DAA vykazovala obdobné rozdíly. Embryonální osy 30 DAA (graf 1) kultivované na médiu s přídatkem flurochloridonu vykazovaly oproti předpokladu zvýšení obsahu ABA. Toto bylo způsobeno prorůstáním osy v klíčící rostlinu.



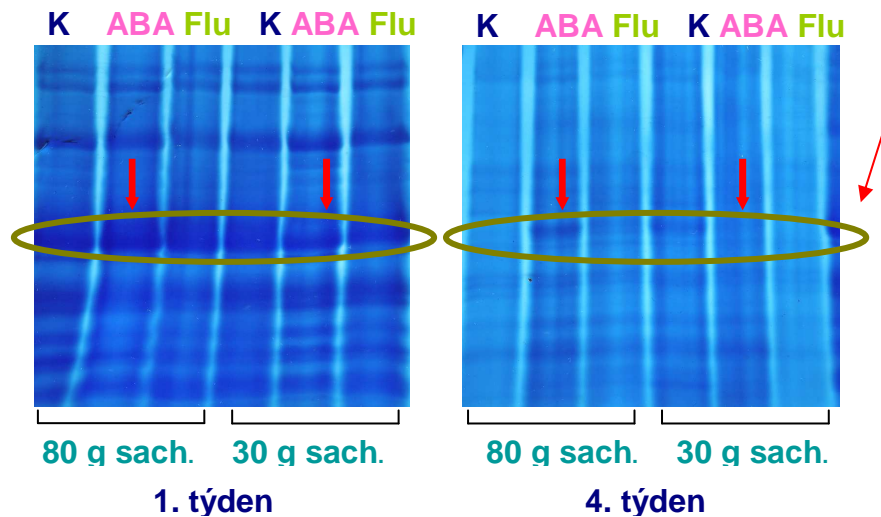
Graf 1 Obsah endogenní ABA v embryonální ose 30 DAA

(Legenda ke grafům 4 a – f: **A** – 80 g sacharosu, **B** – 80 g sacharosu + 10 μM ABA, **C** – 80 g sacharosu + 20 μM flurochloridonu, **D** – 30 g sacharosu, **E** – 30 g sacharosu + 10 μM ABA, **F** – 30 g sacharosu + 20 μM flurochloridonu)



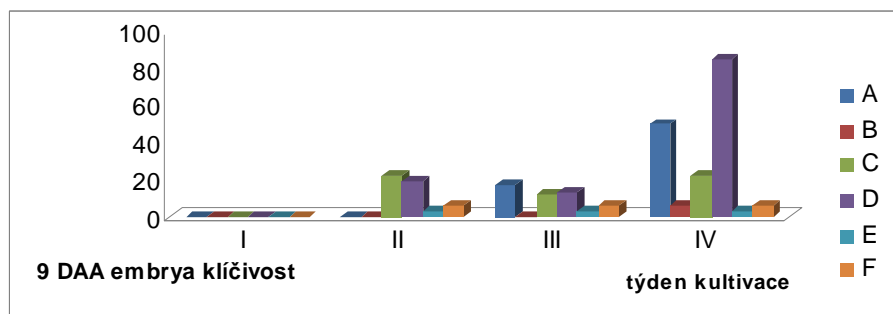
Obr.1 Výřez elektroforeogramu zásobních proteinů embryí 22 DAA

Výsledky elektroforeogramů 150 vzorků embryí (obr. 1) i embryonálních os (obr. 2) kultivovaných v *in vitro* podmínkách ukázaly závislost zastoupení, syntézy a akumulace jednotlivých zásobních proteinů na zvýšení endogenní hladiny ABA. Nezralá embrya 9 a 15 DAA měla menší schopnost klíčit, než embrya 22 DAA a 30 DAA. Zvýšené množství celkových proteinů a exprese zásobních proteinů po expozici na médiích s ABA souhlasí s výsledky SODERMANA et al (2000). Ti uvádějí zvýšení exprese LEA proteinů po exogenní aplikaci ABA při zrání semen *Arabidopsis thaliana*. Ukládání zásobních proteinů bylo ve vztahu k desikaci řízeno zvýšením koncentrace kyseliny abscisové v pletivech embrya a semene, což odpovídá obdobným zjištěním XU a BEWLEY (1995) na embryích vojtěšky.



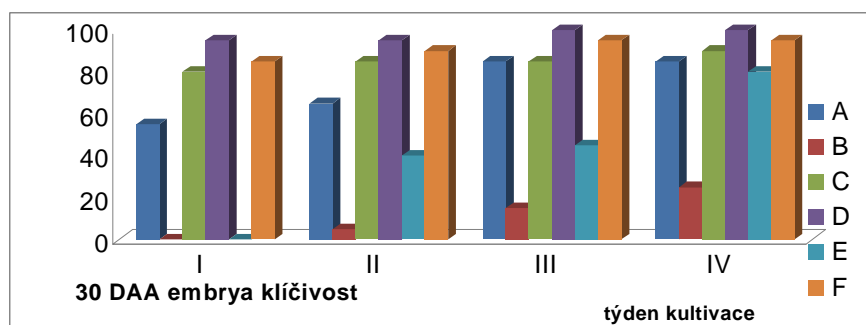
Obr.2 Výřez elektroforeogramu zásobních proteinů embryonálních os 22 DAA

Přídavek ABA nebo flurochloridonu do média klíčivost snížil. Embrya na médiu s 30 g sacharosy měla klíčivost vyšší než na 80 g sacharosy. Izolovaná embrya vykazovala velmi dobré přežívání v podmínkách *in vitro*. Embrya 15, 22 a 30 DAA měla 100% životnost, respektive nulovou mortalitu.



Graf 2 Klíčivost izolovaných embryí 9 DAA *in vitro*

(Legenda ke grafům 4 a – f: **A** – 80 g sacharosy, **B** – 80 g sacharosy + 10  $\mu$ M ABA, **C** – 80 g sacharosy + 20  $\mu$ M flurochloridon , **D** – 30 g sacharosy, **E** – 30 g sacharosy + 10  $\mu$ M ABA, **F** - 30 g sacharosy + 20  $\mu$ M flurochloridonu)



Graf 3 Klíčivost izolovaných embryí 30 DAA *in vitro*

(Legenda ke grafům 4 a – f: **A** – 80 g sacharosy, **B** – 80 g sacharosy + 10  $\mu$ M ABA, **C** – 80 g sacharosy + 20  $\mu$ M flurochloridon , **D** – 30 g sacharosy, **E** – 30 g sacharosy + 10  $\mu$ M ABA, **F** - 30 g sacharosy + 20  $\mu$ M flurochloridon)

## ZÁVĚR

Bylo potvrzeno, že obsah kyseliny abscisové koreluje s obsahem zásobních proteinů obzvláště v pozdějších fázích embryogeneze. Snížení obsahu kyseliny abscisové podpořilo rychlejší klíčení i nezralých embryí v *in vitro* kultivaci. Intaktní embrya i jejich embryonální osy (embrya po amputaci děloh) měly expresi zásobních proteinů kompletní v případě kontrolní varianty, tak i po ošetření ABA. Takováto exprese zásobních proteinů byla typická pro kultivaci na médiích obsahujících 80 g sacharosu i 30 g sacharosu. Po čtyřech týdnech kultivace embryí *in vitro* exprese proteinů neustávala i přesto, že někdy prorostly v klíčící rostliny (embryonální osy – kontrola).

## LITERATURA

LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-97.

QUARRIE, S.A., WHITFORD, P.N., APPLEFORD, N.E.J., WANG, T.L., COOK, S. K., HENSON, L.E. and LOVEYS, B.R. (1988): A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupine leaves. *Planta* 183: 330-339.

SODERMAN, E.M., BROCARD, I.M., LYNCH, T.J. and FILKENSTEIN, R.R. (2000): Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive 4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant. Physiol.* 124:1752-1756.

XU, N. and BEWLEY, J.D. (1995): The role of abscisic acid in germination, storage protein synthesis and desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds, as shown by inhibition of its synthesis by fluridone during development. *J. Exp. Bot.* 46(287): 687-694.