

# RELATIONSHIP BETWEEN ABSCISIC ACID LEVEL AND SPECIFIC LEAF AREA AS A RESULT OF POLYETHYLENE GLYCOL INDUCED OSMOTIC STRESS OF POTATO PLANTS

## VZTAH KYSELINY ABSCISOVÉ A SPECIFICKÉ LISTOVÉ PLOCHY JAKO VÝSLEDEK OSMOTICKÉHO STRESU VYVOLANÉHO POLYETHYLENGLYKOLEM NA ROSTLINÁCH LILKU BRAMBORU

**Filová J., Klemš M., Prokešová Z., Procházka S.**

Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

E-mail: xfilova0.node@mendelu.cz

---

### ABSTRACT

The relationship between changes of abscisic acid (ABA) level and specific leaf area (SLA) of potato plants cultivated in Richter nutrient solution after flurochloridone (20  $\mu$ M) and/or polyethylene glycol (100 g.l<sup>-1</sup> PEG) treatment was studied. Abscisic acid was quantified by radioimmunoassay (RIA), after separation of intact plants on to roots, stem and leaves. After fractionation of extracellular (apoplast) and intracellular ABA in leaves we used infiltration of plants in buffer under a vacuum. We also separated intracellular ABA to cytoplasmic and plastidic ABA. We observed that PEG treatment increased ABA level at first in roots and root-xylem exudate; and later two days after treatment in leaves and five days after in cytosol and apoplast of leaves. Flurochloridone treatment increased the ABA level in leaves only slightly, but not in roots. The relationship between ABA level and SLA parameter was observed after 14 days of treatment as a result of ABA action in leaf growth.

**Keywords:** ABA, RIA, osmotic stress, SLA, flurochloridone, frakcionation, exudate, chloroplasts, cytoplasm, apoplast

### ABSTRAKT

U rostlin kultivovaných v Richterově roztoku a ošetřených flurochloridonem (20  $\mu$ mol) a/nebo polyetylen glykolem (100g.l<sup>-1</sup> PEG) byl sledován vztah mezi změnami hladiny kyseliny abscisové (ABA) a specifickou listovou plochou (SLA). V listech, stoncích a kořenech intaktních rostlin byla kvantifikována kyselina abscisová pomocí radioimunoanalýzy (RIA). Nejprve byla z listů a stonků odělena intracelulární ABA od extracelulární pomocí infiltrace v pufru ve vakuu. Intracelulární ABA byla následovně rozdělena na plastidickou a cytoplasmatickou. Hladina ABA se po ošetření PEG zvyšovala nejprve v kořenech a kořenovém exudátu, dva dny po ošetření v listech a po pěti dnech také v cytosolu a apoplastu listů. Po 14 dnech od ošetření byl pozorován vztah mezi hladinou ABA a velikostí listové plochy jako následek účinku ABA na růst listů. Hladina ABA v listech se po ošetření flurichloridonem zvyšovala jen velmi pomalu a v kořenech se nezvyšovala vůbec.

**Klíčová slova:** ABA, RIA, osmotický stres, SLA, flurochloridon, frakcionace, exudát, chloroplasty, cytoplazma, apoplast

## ÚVOD

Nejvýznamnější úlohou kyseliny abscisové (ABA) v dospělých rostlinách je signalizace ve stresu různého typu. Nejcharakterističtějším stresovým vlivem je nedostatek vody. Proto je ABA časným markerem stresu v rostlinách, molekulárně je mediátorem aktivujícím cyklickou adenosindifosforibosu (c-ADPR) ve velmi rychlém procesu uzavírání průduchů (CORNISH a RADIN 1990). Je známo, že ABA je syntetizována především v chloroplastech (LICHTENTHALER a BECKER 1970), kde se jí vyskytuje cca 80 – 85 % v buňce. Zvýšení obsahu ABA v reakci na stres je zajištěno prostřednictvím této složky ABA v buňce a lze její výpovědní hodnotu brát jako markerovací. Pro signalizaci stresových situací má však význam apoplastová ABA, přičemž byly identifikovány pro tento signál extracelulární receptory (GILROY a JONES 1994). I přes skutečnost znalosti translokace ABA v rostlinách z kořenů do nadzemní části rostliny (LIANG a ZHANG 1999) není kvantifikováno jakou mírou se z hlediska celkového obsahu ABA v rostlinách podílí reakcí na stres právě její apoplastová složka. ABA se podílí významnou měrou na procesech aklimace rostlin vůči stresu a navození regulační homeostáze (regulace transpirace prostřednictvím regulace činnosti průduchů).

Osmotický stres je u rostlin experimentálně nejčastěji vyvoláván pomocí polyetylen glykolu se současným zvýšením ABA v rostlinách (CHEN et al. 2002). Zvýšený obsah kyseliny abscisové v rostlinách je dáván do vztahu s inhibicemi růstu na různých úrovních (CREELMAN et al. 1990), exogenní aplikace ABA na rostliny pak redukuje reakci rostlin na stres či zvyšuje jejich odolnost (TANINO et al. 1990). Pomocí inhibitorů biosyntézy karotenoidů dochází v rostlinách ke snížení obsahu ABA, např. použití fluridonu (GAMBLE and MULLET 1986, KOWALCZYK-SCHRODER and SANDMANN 1992).

Cílem práce bylo sledovat vztah změn obsahu kyseliny abscisové v závislosti na působení nepenetrujícího osmotika (PEG 6000) v rostlinách lilku bramboru a specifické listové plochy. Dalším cílem bylo experimentální snížení obsahu ABA v rostlinách pomocí aplikace flurochloridonu. Na základě kompartmentace ABA v rostlinách byla sledována distribuce ABA a její změny v časové posloupnosti reakce rostlin na stres a jejich schopnosti růstu.

## MATERIÁL A METODY

Pro studium vztahu ABA a SLA stresu byly použity zakořeněné prýty rostlin bramboru odrůdy Karin ve stádiu 4 pravých listů. Pro přípravu pokusného materiálu byly pupeny izolované z hlíz zakořeňovány ve vodě a získané zakořeněné rostlinky následně kultivovány v živném roztoku (Richterův roztok) v klimaboxu tak, aby experimentální materiál byl velikostně a vývojově vyrovnaný. Pro vyvolání osmotického stresu byl živný

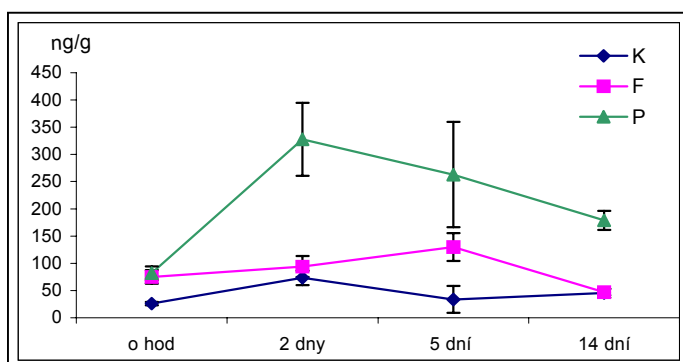
roztok obohacen o PEG 6000 (100g PEG/ l živného roztoku) a pro potřebu inhibice biosynézy ABA o fluridon (20  $\mu\text{mol}$ ). Tyto dvě varianty byly porovnávány s kontrolou.

Rostlinný materiál byl odebírán v intervalech 0 hodin (výchozí stav), 2, 5 a 14 dní. Obsah ABA byl analyzován metodou RIA (QUARRIE et al. 1988) v listech, stoncích, a kořenech; v apoplastické tekutině listů a stonků; v chloroplastech, cytosolu a kořenovém exudátu. Apoplastická ABA byla získána z listů a stonků infiltrací v pufru ve vakuu. Homogenizace rostlinného materiálu, filtrace a následná centrifugace oddělila plastidovou a cytoplasmatickou frakci ABA. Obsah ABA byl vyjádřen v  $\text{ng.g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti nebo  $\text{ng.ml}^{-1}$  vzorku. Hodnota SLA byla vypočítána jako podíl listové plochy (vyjádřená v  $\text{cm}^2$ ) a sušiny listů (g). Listová plocha byla stanovena analýzou obrazu (software Image Tool) a vyjádřena v  $\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny Studentovým t-testem (pro stanovení obsahu ABA bylo provedeno vždy 6 opakování).

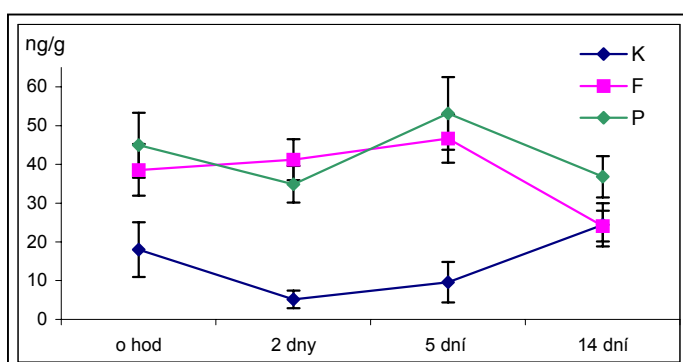
## VÝSLEDKY

Z výsledků analýz obsahu ABA bylo zřejmé, že nejvyšší obsah ABA byl v listech (stovky nanogramů na gram čerstvé hmotnosti) a to u varianty ošetřené PEG, přičemž rozdíly oproti kontrole byly statisticky průkazné po celou dobu sledování (graf č. 1). Obsahy ABA ve stoncích a kořenech byly podstatně nižší (grafy č. 2 a 3), přičemž v kořenech aplikace flurichloridonu snížila obsah ABA oproti obsahu ABA v kořenech kontrolní varianty. Hladina ABA se prokazatelně zvýšila jak ve stoncích rostlin ošetřených PEG tak i fluridonem (graf č. 2). V pátém dni kultivace rostlin je tedy stresové působení PEG statisticky průkazné zvýšením obsahu ABA ve všech částech rostlin.

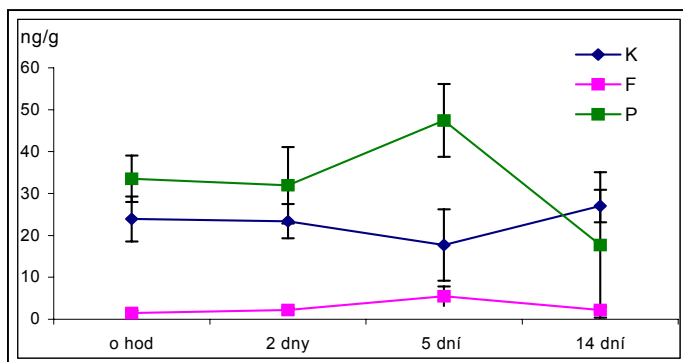
Graf č. 1 Hladina endogenní ABA v listech v  $\text{ng.g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti.



Graf č. 2 Hladina endogenní ABA ve stoncích v  $\text{ng.g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti.

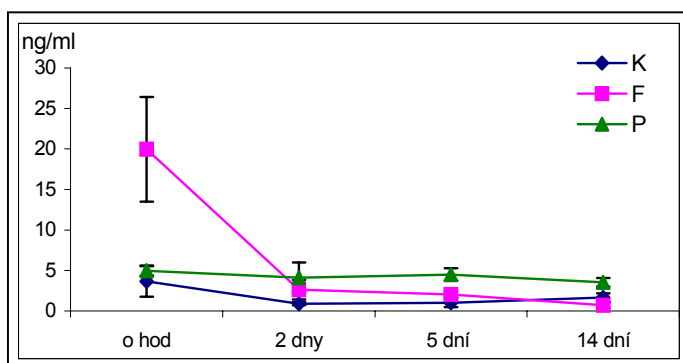


Graf č. 3 Hladina endogenní ABA v kořenech v  $\text{ng.g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti.

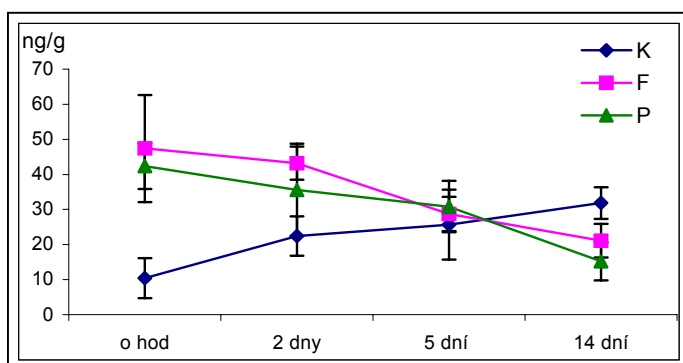


Při frakcionaci ABA byl zaznamenán nejvyšší obsah ABA v chloroplastech, menší v apoplastu listů a v cytosolu. PEG zvýšil obsah ABA v apoplastu průkazně (graf č. 4) a tento stav se udržel po celou dobu působení osmotického stresu. Rozdíly obsahu ABA v chloroplastech mezi pokusnými variantami nebyly průkazné (graf č. 5), pouze v rostlinách kontrolní varianty (nestresované) docházelo k nárůstu obsahu ABA v chloroplastech v průběhu kultivace. Podíl cytosolické ABA cytosolu byl opět vyšší v listech z rostlin ošetřených PEG oproti kontrole (graf č. 6).

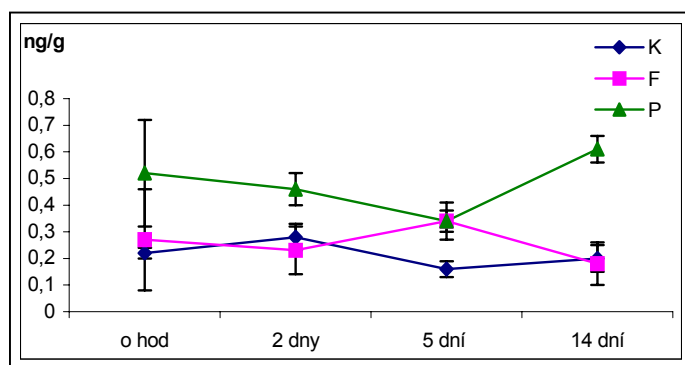
Graf č. 4 Obsah ABA v apoplastu listů  $\text{ng.ml}^{-1}$  vzorku (apoplastické tekutiny).



Graf č. 5 Obsah ABA v chloroplastech v  $\text{ng.g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti

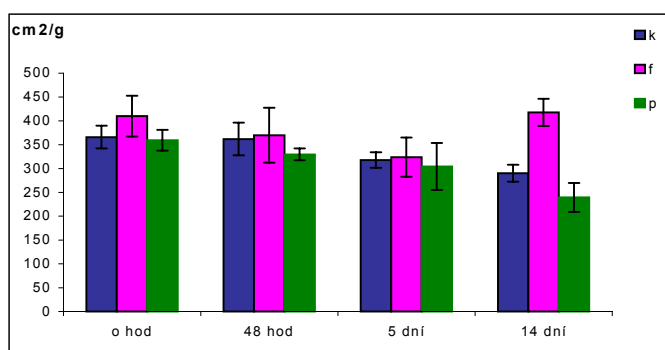


Graf č. 6 Obsah ABA v cytosolu buněk mezofylu listů v  $\text{ng.g}^{-1}$  čerstvé hmotnosti.



Hodnoty specifické listové plochy byly u jednotlivých variant v čase rozdílné. Po 14 dnech kultivace došlo k výraznému snížení hodnoty SLA u varianty ošetřené PEG, u kontrolních rostlin došlo jen k nepatrnému snížení SLA. Rostliny ošetřené flurochloridonem však hodnotu SLA zvýšily. Po 14 dnech kultivace tak byl statisticky průkazný rozdíl hodnot SLA především mezi rostlinami ošetřenými PEG a flurochloridonem (graf č. 7).

Graf č. 7 Hodnoty SLA rostlin v  $\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$  v průběhu 14-ti denní kultivace



## ZÁVĚR

Vzhledem k tomu, že hladina ABA se po ošetření PEG zvyšovala nejprve v kořenech a kořenovém exudátu, dva dny po tomto ošetření v listech a po pěti dnech také v cytosolu a apoplastu listů, je možné konstatovat, že posloupnost zvyšování jejího obsahu odpovídá citlivosti jednotlivých částí rostliny na osmotický stres. Po čtrnácti dnech od ošetření PEG byla pozorována akumulace ABA a snížení velikosti listové plochy. Z výsledků obsahu ABA v listech a hodnoty SLA mezi jednotlivými variantami a z výsledků změn v kompartmentaci ABA vyplývá, že kyselina abscisová se účastní regulace odpovědi na osmotický stres. To potvrzuje i ošetření flurochloridonem, které vedlo po čtrnácti dnech kultivace ke snížení obsahu ABA a zvýšení hodnoty SLA.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

CORNISH, K., RADIN, J.W. (1990): In: Katterman (ed) Environmental Injury to Plants Accademic press, Inc. pp. 89-112.

GILROY, S., JONES, R. (1994): Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. Plant Physiol. 104:1185-1192.

TANINO, K.C. et al. (1990): Plant Physiol. 93:460-464.

CREELMAN, R.A, MASON, H.S., BENSEN RJ, et al. (1990) Water deficit and abscisic-acid cause differential inhibition of shoot versus root-growth in soybean seedlings - analysis of growth, sugar accumulation, and gene-expression, Plant Physiol. 92 (1): 205-214.

LIANG, J., ZHANG, J. (1999): The relations of stomatal closure and reopening to xylem ABA concentration and leaf water potential during soil drying and rewatering. Plant Growth Regul., 29: 77-86.

LICHTENTHALER, H. K., BECKER, K. (1970): Inhibition of the light – induced vitamin K<sub>1</sub> and pigment synthesis by abscisic acid. Phytochemistry, 9:2109-2113.

GAMBLE, P.E., MULLET, J.E. (1986): Inhibition of carotenoid accumulation and abscisic acid biosynthesis in fluridone - treated dark - grown barley. European Journal of Biochemistry, 160: 117-121.

KOWALCZYK-SHRÖDER, S., SANDMANN, G. (1992): Interaction of fluridone with phytoene desaturation of *Aphanocapsa*. Pesticide Biochem. Physiol., 42: 7-12.

CHEN, S., LI J., WANG, T., WANG, S., POLLE, A. and HÜTTETMANN, A. (2002): Osmotic stress and ion-specific effect on xylem abscisic acid and the relevance to salinity tolerance in poplar. J Plant Growth Regul., 21:224-233.

QUARRIE, S. A., WHITFORD, P. N., APPLEFORD, N. E. J., WANG, T. L., COOK, S. K., HENSON, L. E., 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 lupin leaves. Planta, 183: 330-339.

### Poděkování

Tento výzkum byl podporován výzkumným záměrem Ministerstva školství a mládeže číslo MSM 6215648901.