

CHANGES OF ABSCISIC ACID LEVELS DURING DEVELOPMENT OF PEA ZYGOTIC EMBRYO

ZMĚNY HLADINY ABSCISOVÉ KYSELINY V PRŮBĚHU VÝVOJE ZYGOTICKÉHO EMBRYA HRACHU

Solnická P.¹, Klemš M.¹, Prokešová Z.¹, Fišerová H.¹, Vlašánková E.¹, Procházka S.¹, Klenotičová H.², Horáček J.², Griga M.²

¹Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemědělská 1, Brno 613 00, E-mail: xsolnic0@node.mendelu.cz

²AGRITEC, Ltd., Plant Biotechnology Department, Zemědělská 16, Šumperk 787 01

ABSTRACT

We studied the relationship between abscisic acid (ABA) levels and expression of storage proteins in zygotic embryo during seed development (characterized by embryo morphology), and also the distribution of ABA in immature pea seed and fruit. The changes in ABA levels induced experimentally by flurochloridone (inhibitor of ABA biosynthesis) were compared to normal embryo/seed development (control). Flowering plants were treated by flurochloridone spraying (20 μ M). The endosperm, the embryo and the pod of control plants had a higher ABA content than in plants treated by flurochloridone. The content of ABA in embryo and endosperm was higher than in testa. The highest content of ABA in seed was observed between 9 and 15 DAA in endosperm. The expression of storage proteins was observed in embryos from control plants. The growth of isolated embryos of both control and flurochloridone treated plants *in vitro* was observed in liquid media supplemented with a high sucrose concentration, ABA and glutamine. In such culture conditions only mature embryos germinated.

Keywords: pea zygotic embryo, abscisic acid, flurochloridone, storage proteins

ABSTRAKT

Byl studován vztah mezi hladinou abscisové kyseliny a expresí zásobních proteinů během vývoje semen (charakterizováno morfologií embrya), a také distribuce ABA v semeni. Pomocí 20 μ M flurochloridonu (inhibitor ABA biosyntézy) byly indukovány experimentálně změny obsahu ABA po ošetření kvetoucích rostlin. Endosperm, embryo a lusky kontrolních rostlin měly vyšší obsah ABA, než z rostlin ošetřených flurochloridonem. Obsah ABA v embryu a endospermu byl vyšší než testě. Nejvyšší obsah ABA v semenech byl pozorován mezi 9 a 15 DAA v endospermu. Expres zásobních proteinů byla zjištěna v embryích kontrolních rostlin. Růst izolovaných embryí *in vitro* kontrolních i flurochloridonem ošetřených rostlin byl pozorován v tekutém médiu s obsahem sacharózy, ABA a glutaminu, přičemž pouze zralá embrya byla schopna klíčit v těchto podmínkách.

Klíčová slova: zygotické embryo, hrách, abscisová kyselina, flurochloridon, zásobní proteiny

ÚVOD

Vývoj zygotického embrya je proces zahrnující tvorbu pletiv a orgánových primordií rostliny. Jako modelová zygotická embryogeneze je studována embryogeneze hrachu setého. Vývoj zygotického embrya hrachu je proces členěný na větší počet fází (obvykle 10) od rozdělení zygoty (MARINOS 1970, LIU et. al. 1999). První fází embryogeneze je tvorba globulárního embrya a dále srdčitého a poslední fáze je vývoj a růst děložního embrya. Růst a vývoj srdčitého embrya a ranných fází děložního embrya je provázen výživou embrya z buněk „tekutého“ endospermu (WEBER et. al. 2005), což jsou procesy provázené účastí apoplastového transportu látek za spoluúčasti výživy embrya na základě trofické aktivity testy (ROCHAT and BOUTIN 1991). Po této fázi následuje resorpce endospermu a pozdní vývoj děložního embrya se současným ukládáním zásobních látek (škrob, proteiny) do děloh (DAVIES and BEDFORD 1982). Proces ukládání těchto zásobních látek (maturace embrya) je provázen zvýšením obsahu kyseliny abscisové.

Je známo že, nezralá semena z různých druhů rostlin akumulují relativně vysoké množství kyseliny abscisové (KING 1982). Během maturace semen některých druhů rostlin byly zjištěny dva píky kyseliny abscisové, které byly v korelaci s nízkou úrovní klíčení izolovaných embryí (FINKELSTEIN 1985). Druhý pík kyseliny abscisové indukoval dormanci (KARSSSEN et. al. 1983), což souhlasí se skutečností, že ABA hraje možnou roli v prevenci proti předčasnému klíčení semen (REIKEL and QUATRANO 1985). In vitro izolace a kultivace embryí může indukovat klíčení před zráním (COOK et. al. 1988). Během posledních dvou vývojových fází embrya hrachu, tj. maturace jsou akumulovány zásobní látky (WANG and HEDLEY 1993).

Cílem práce bylo sledovat vztah mezi změnami obsahu ABA v zygotických embryích během jejich vývoje a expresí zásobních proteinů, dále sledovat změny distribuce ABA v nezralých semenech hrachu a změny obsahu ABA při kultivaci izolovaných embryí hrachu v in vitro podmínkách. Pro ověření vlivu ABA na růst a vývoj zygotického embrya byla experimentálně ovlivněna hladina ABA prostřednictvím inhibitoru její biosyntézy (flurochloridon) s cílem narušení vývoje a růstu embrya a snížení obsahu ABA.

MATERIÁL A METODY

Byla izolována embrya z kontrolních rostlin hrachu setého (odrůda Oskar) a z rostlin, na které byl aplikován 20 μ M flurochloridon. Odběr embryí pro analýzy ABA a proteinů a pro kultivaci *in vitro* byl proveden 9, 15, 22 a 30 DAA (dny po anthezi). Pro analýzy ABA a proteinů byla semena rozdělena na embryo, endosperm a testu. Izolovaná embrya byla kultivována v tekutém mediu MS (MURASHIGE and SKOOG 1962) obsahujícím vždy 80 g sacharózy a 10 μ M ABA nebo 20 μ M flurochloridon. Jeden měsíc po kultivaci izolovaných embryí *in vitro* byla stanovována životnost (TTC barvení) a procento klíčení. ABA byla analyzována pomocí RIA metody (QUARRIE et. al. 1988), při které byla použita monoklonální protilátka MAC 262. Pro analýzu zásobních proteinů byla použita SDS polyakrylamidová elektroforéza (LAEMMLI 1970). Pro stanovení ABA bylo provedeno 6

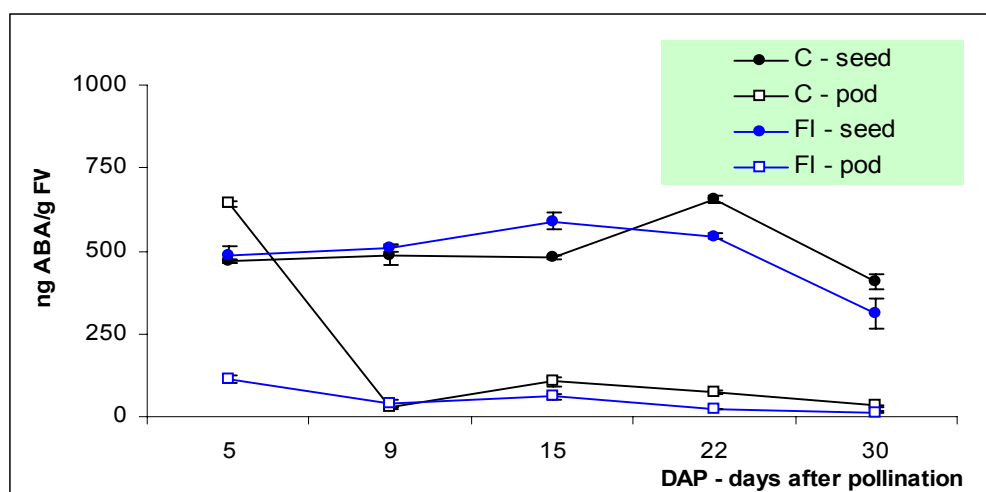
opakování a testování průkaznosti rozdílů mezi kontrolními vzorky a vzorky z rostlin ošetřených flurochloridonem bylo provedeno pomocí Studentova t-testu.

(Poznámka: ve výsledcích jsou uvedeny grafy s legendou a popisy os v angličtině)

VÝSLEDKY

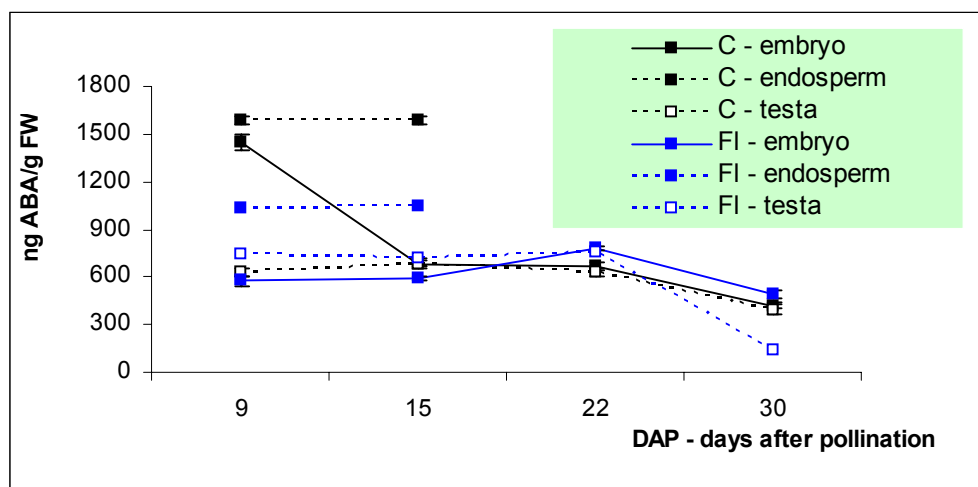
Analýzy obsahu ABA prokázaly, že největší obsah ABA byl nalezen v endospermu. Menší obsah ABA byl zjištěn v embryu a nejmenší v testě semene. Lusky měly ještě nižší obsah ABA než semena. Ošetření flurochloridonem snížilo obsah ABA jak v endospermu tak v semenech v pozdějších fázích vývoje a růstu embrya. Pět dní po anthezi byl zjištěn nižší obsah ABA v semenech rostlin ošetřených flurochloridonem oproti rostlinám kontrolním (graf č. 1). Během dalšího růstu se snížil obsah ABA kontrolních rostlin, avšak 15 dnů po anthezi už se obsah ABA v kontrolních rostlinách nesnižoval, zatímco v rostlinách ošetřených flurochloridonem ještě do 30 dnů po anthezi obsah ABA klesl. Obsah ABA v luscích byl nevýrazný a v průběhu sledování už se neměnil v obou variantách.

Graf č.1 Endogenní hladina ABA (ng/g čerstvé hmotnosti) v semenech a luscích rostlin hrachu setého ošetřeného 20 μ M flurochloridonem



Obsah ABA byl v endospermu rostlin ošetřených flurochloridonem nižší než u kontroly, tento stav zůstal zachován až do období resorpce endospermu. V testě byl obsah ABA nižší než v endospermu, 15 dnů po anthezi obsah ABA se v testě snížil po ošetření flurochloridonem později zvýšil a v období dozrávání se zase snížil. Aplikace flurochloridonu významně zasáhla obsah ABA v embryích, 15 dní po anthezi byl obsah ABA v embryích oproti kontrole nižší a také 30 dní po anthezi byl tento obsah nižší oproti embryím kontrolních rostlin (graf č. 2).

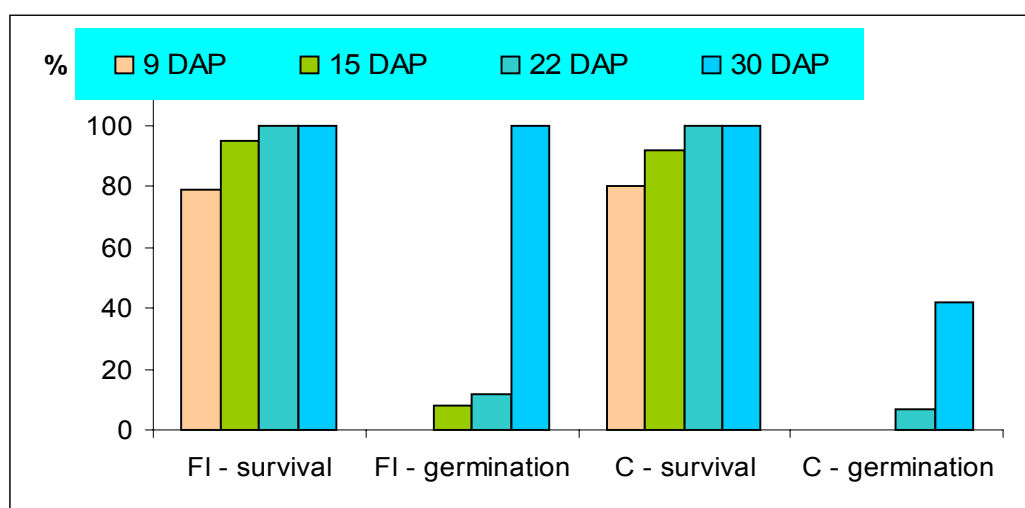
Graf č. 2 Endogenní hladina ABA (ng/g čerstvé hmotnosti) v semenech a luscích rostlin hrachu setého ošetřeného 20 μ M flurochloridonem



V přepočtu obsahu ABA na jedno semeno bylo zjištěno, že největší podíl obsahu ABA během vývoje semene a embrya je zpočátku (9-15 DAA) jeho růstu v testě, později (po resorpci endospermu) je maximum obsahu ABA v embryu.

Při kultivaci izolovaných zygotických embryí bylo zjištěno, že jejich vývoj a růst pokračuje v případě izolace embryí 15 dní po anthezi v přítomnosti sacharózy v kultivačním médiu. Přežití těchto izolovaných embryí bylo vyšší než 70 %, klíčení bylo častější při kultivaci embryí v médiu s flurochloridonem (především zralá embrya, klíčivost až 100 %, ostatní klíčivost do 40 %, graf č. 3).

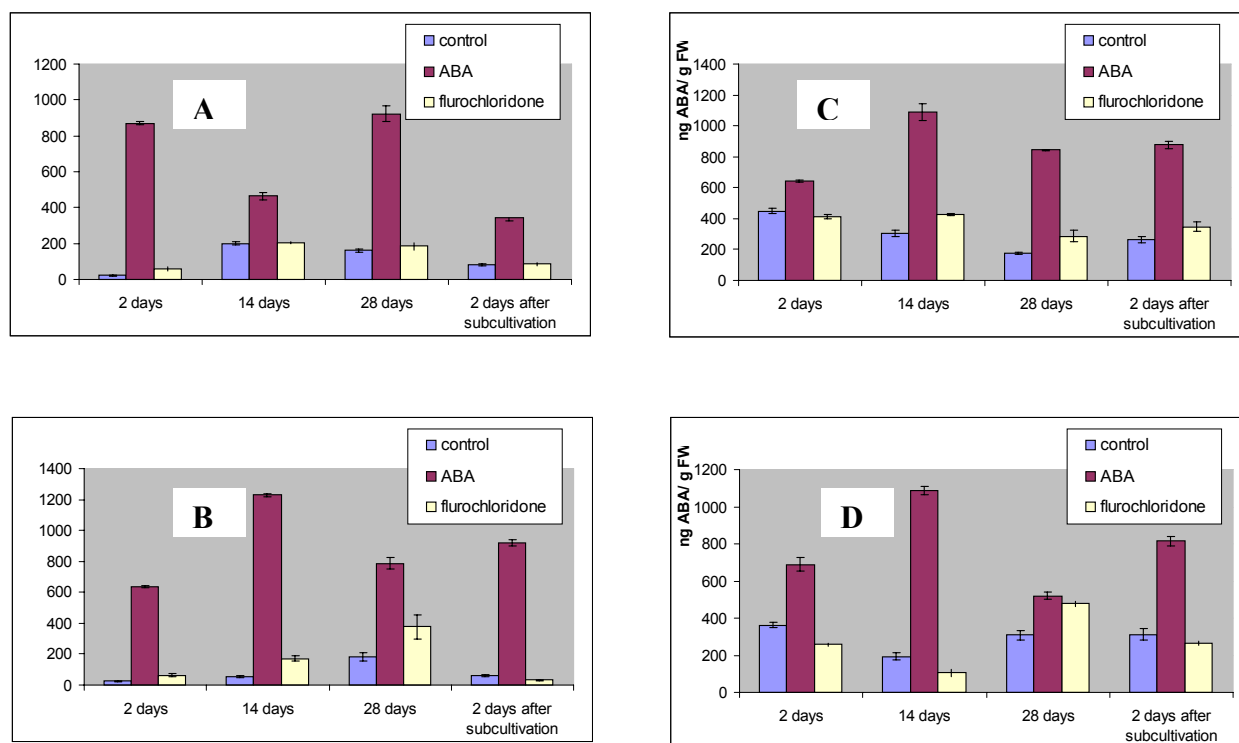
Graf č. 3 Přežití (%) a klíčení (%) izolovaných embryí z kontrolních rostlin a rostlin ošetřených flurochloridonem při kultivaci in vitro



Endogenní hladina ABA během kultivace izolovaných zygotických embryí byla nejvyšší v případě, že v médiu byla ABA (10 μ M). V případě, že v médiu nebyla ABA, měla

embrya izolovaná 9 a 15 dní po anthezi obsah ABA po celou dobu kultivace nízký, zatímco embrya izolovaná 22 a 30 dní po anthezi byla schopna syntetizovat kyselinu abscisovou i při kultivaci s flurochloridonem. V tomto případě nebyl průkazný rozdíl mezi kontrolní kultivací a kultivací s flurochloridonem (graf č. 4). V embryích kontrolní varianty byla charakteristická exprese zásobních proteinů odpovídající hmotnostním markerům pro proteiny vicilin a convicilin právě u zralých embryí (30 dnů po anthezi). Ošetření flurochloridonem tuto expresi v pozdních fázích vývoje embrya nenarušilo, pouze oddálilo.

Graf č. 4 Obsah ABA (ng/g čerstvé hmotnosti) izolovaných embryí při kultivaci in vitro (**A** – 9 DAA, **B** – 15 DAA, **C** – 22 DAA, **D** – 30 DAA, symboly v grafu)



ZÁVĚR

Na základě výsledků analýz ABA, morfologie embryí a klíčení izolovaných embryí je možné konstatovat, že endogenní ABA se podílí na regulaci vývoje embrya. Pomocí aplikace flurochloridonu byla snížena endogenní ABA jak v období růstu embrya, tak v období jeho maturace. Rovněž při kultivaci izolovaných embryí bylo prokázáno, že vývojově mladší stádia embryí nejsou schopna syntézy ABA, neboť jsou patrně závislá na obsahu ABA z endospermu, naopak při kultivaci vyvinutých embryí v přítomnosti flurochloridonu docházelo k syntéze ABA. K obdobným výsledkům dospěli BARRATT et. al. (1989), kteří použili fluridon, látku obdobnou svým účinkem flurochloridonu. Také XU and BEWLEY (1995) popisují úlohu ABA v desikační toleranci maturujících embryí vojtěšky. V jejich práci

pomocí fluridonu inhibovali syntézu zásobních proteinů obdobně, jako došlo ke zpoždění exprese zásobních proteinů v embryích v našem experimentu při použití flurochloridonu.

POUŽITÁ LITERATURA

Barratt DHP, Whitford PN, Cook SK, Butcher G, Wang TL (1989): Analysis of seed development in *Pisum sativum* L. VIII. Does abscisic acid prevent precocious germination and control storage protein synthesis J. Exp. Bot. 40:1009-1014.

Bewley JD (1995): Physiological – aspects of desiccation tolerance –a retrospect. Int.J. Plant Sci. 156 (4): 393-403.

Cook SK, Adams H, Headley CL, Ambrose MJ, Wang TL (1988): Analysis of seed development in *Pisum sativum* L. VII. Embryo development and precocious germination *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 14:89-101.

Davies DR, Bedford ID (1982): Abscicic acid and storage protein accumulation in *Pisum sativum* embryos grown *in vitro* Plant. Sci. Letters 27:337-343.

Finkelstein RR, Srinivas SL, Gampala, Rock ChD (1985): Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. The Plant Cell, Suppl. S15-S45.

Karssen C, Swan B, Breekland A, Koornneef M (1983): Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: Studies of abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* Heynh. Planta 157:157-165.

King RW (1982): Absciscic acid in seed development. In: Khan A, ed. The physiology and biochemistry of seed development to germination. Elsevier Biomedical Press 157-84.

Liu ChM, Johnson S, Gregorio S, Wang TL (1999): Single cotyledons (sic) - Mutants of pea and their significance in understanding plant embryo development Develop. Genet. 25:11-22.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Marinos MG (1970): Embryogenesis of the pea (*Pisum sativum* L.) The cytological environment of the developing embryo Protoplasma 70:261-29.

Murashige T, 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., 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.

Rochat C, Boutin JP (1991): Metabolism of phloem-borne amino acids in maternal tissue of fruit of nodulated or nitrated-fed pea plants J. Exp. Bot. 42:207-14

Wang TL, Hedley CL (1993): Genetic and developmental analysis of the seed. In: CaseyR, Davies DR, editors. Peas. Genetic, molecular biology and biotechnology CAB International 83-120.

Weber H, Borisjuk L, Wobus U (2005): Molecular physiology of legume seed development Annu. Rev. Plant. Biol.56:253-279.

Xu N, Bewley JD (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 Journal of Ex.Bot. 46:687-694.

Poděkování

Tento výzkum byl podporován výzkumným záměrem Ministerstva školství a mládeže číslo MSM 2678424601.