

ABSCISIC ACID CONTENT DETACHED IN THE BARLEY BYDV INOCULATED PLANTS

STANOVENÍ OBSAHU KYSELINY ABSCISOVÉ V ROSTLINÁCH JEČMENE INFIKOVANÝCH VIREM BYDV

Vlasáková E., Prášil I. T.

Katedra rostlinné výroby, Agronomická fakulta, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 957, 165 21 Praha 6 – Suchbát.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně.

E-mail: eva.vlas@seznam.cz, prasil@vurv.cz.

ABSTRACT

Changes of abscisic acid (ABA) content in plant tissue are identified as a regulation of the plant water content in consequence of abiotic stress. Also biotic factors affect on the plants. BYDV (Barley yellow dwarf virus) attacks barley, wheat and oats. BYDV is transmitted by *Rhopalosiphum padi* aphids. Because the plant tissues are injured by the aphids suck and virus infection, the plant adapts the water content regulation. We assumed increase of the ABA content. We determined the ABA content in the leaves of barley *Hordeum vulgare*. One group of the plants was BYDV resistant (gene Yd₂), in the second one were susceptible lines. Plants were inoculated by viruliferous aphids. The control was isolated. Plants were tested every third day for ABA (Asch, 2000) and for the relative BYDV content. The 27th day was the only one where the difference in ABA content between resistant and susceptible material was found. There were no other differences between levels of the ABA content.

Keywords: abscisic acid, Barley yellow dwarf virus, barley.

ABSTRAKT

Změna hladiny ABA je spojována s regulací vodního režimu rostlin. Vir žluté zakrslosti ječmene (BYDV-Barley yellow dwarf virus) patří k významným patogenům ječmene, pšenice a ovesa. Po napadení mšicemi a po infekci rostlin virem jsou poškozena rostlinná pletiva, proto musí rostlina této situaci přizpůsobit hospodaření s vodou. Sledovali jsme, zda po infekci rostlinného materiálu dojde v této souvislosti ke změnám v obsahu ABA. Obsah ABA byl stanovován v listech ječmene *Hordeum vulgare*. Byly pěstovány linie k BYDV rezistentní (nese gen rezistence Yd₂) a k infekci náchylné. Rostliny byly inokulovány přenašečem viru. Kontroly byly ponechány bez infekce. Vzorky pro analýzy ABA (Asch, 2000) a stanovení relativního obsahu viru byly odebírány v třídních intervalech. Z výsledků vyplývá, že pouze 27. den po ukončení inokulace byl zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu ABA mezi náchylnou a rezistentní variantou, ve všech ostatních případech se od sebe hladiny ABA nelišily.

Klíčová slova: kyselina abscisová, virus žluté zakrslosti ječmene, ječmen.

ÚVOD

Všechny rostliny se během různých vývojových fází potýkají s nepříznivými vlivy prostředí. Kyselina abscisová (ABA) se řadí mezi rostlinné hormony, které jsou aktivovány při obranné reakci na zasolení půdy, sucho nebo nízké teploty. Byla objevena v roce 1963, postupem času byla ABA identifikována v listech, kořenech, semenech a v dalších částech rostlin v souvislosti s abiotickými stresy, ale také s dormancí, abscisí a senescencí. Bylo zjištěno, že je syntetizována buňkami, které obsahují chloroplasty nebo amyloplasty. Amyloplasty jsou v kořenových špičkách. Chloroplasty jsou obsaženy, na rozdíl od ostatních buněk epidermis, ve svěracích buňkách průduchů. Obecně lze říci, že se ABA vyskytuje u všech fotosyntetizujících organismů (podle dosavadních znalostí existuje pouze velmi vzácná výjimka jednoho rodu epifytních rostlin) (Procházka, 1998). ABA bývá častěji analyzována z listů, neboť tento postup je technologicky jednodušší než odběr a homogenizace kořenů rostlin.

Nejpravděpodobnější cesta biosyntézy ABA se odvíjí od karotenoidů 9-cis violaxantinu nebo 9-cis neoxantinu. ABA může být inaktivována oxidací nebo konjugací v cytosolu, ve vakuolách (Teiz, 1998). ABA se může rychle pohybovat v rostlině jak v xylému tak ve floému. Obsah ABA v rostlině závisí na dynamické rovnováze mezi její biosyntézou a degradací.

Jednou ze základních reakcí rostlin, na níž se ABA podílí, je ovládání velikosti průduchové štěrby. Při tomto mechanismu se uplatní kyselina abscisová, která se nachází v okolí průvodních buněk. Množství ABA může vzrůst díky její redistribuci, ABA může být importována xylémem jako signál ze stresovaných kořenů, anebo je nárůst ABA v apoplastu průvodních buněk zapříčiněn výparem vody ze stěn průvodních buněk. Koncentrace volné ABA v okolí průvodních buněk také závisí na aktivitě $\downarrow$ -glukosidasy, která uvolní ABA z fyziologicky neaktivního konjugátu (Pospíšilová, 2003). Při reakci na sucho se hladina ABA v listech může zvýšit 10-50krát během 4-8 hodin a po opětovném dodání vláhy se hladina upraví na původní hodnotu. Pokles hladiny ABA nastane snížením biosyntézy, zrychlením degradace či transportem z listu.

Jak bylo uvedeno výše, je změna hladiny ABA interpretována jako signál působení biotických faktorů. K poškození buněk rostlin dochází i při působení biotických činitelů. Proto je otázkou, zda se hladina ABA mění také v důsledku jejich působení.

Jedním z patogenů, který může ovlivnit výnosy obilovin pěstovaných v oblasti střední Evropy je virus žluté zakrslosti ječmene (BYDV - barley yellow dwarf virus). BYDV přezívající na trávách a obilním výdrolu byl na území České republiky sledován v šedesátých letech. Rozšíření choroby závisí na výskytu mšic, neboť virus je jimi perzistentně přenášen. Mšice mechanicky poškozují rostlinná pletiva při vpichu stiletu, přenášejí virózy a škodí také sáním a tedy odnímáním tekutin z rostlinných pletiv. Za suchého počasí se poškození po sání může projevit uvadáním rostlin v důsledku sníženého turgoru. **Napadení virem** BYDV je signalizováno výskytem žlutých proužků na mladých listech ječmene. Žloutnutí se dále šíří po celé rostlině. Virus napadá i pšenici a oves, u kterých se projevuje ne žlutým, ale červeným

zbarvením proužků. Obecně se napadené rostliny vyznačují výrazně zpomaleným růstem, při silném napadení jsou zakrslé, mohou být i sterilní. Pokud je po vzejití obilí ještě dostatečně teplé počasí a dojde k náletu mšic, mohou se uvedené příznaky objevit již na podzim. V takovém případě může onemocnění rostlin znamenat větší výnosové ztráty (Kazda et al., 1997). K takové situaci došlo například na přelomu let 2001 a 2002, kdy bylo lokální napadení obilovin tímto virem tak silné, že výnos jarního ječmene byl vyšší než výnos ječmene ozimého. Výskyt BYDV v porostech je kolísavý, v závislosti na podmínkách výhodných pro mšice. V roce 2004 se tento virus v porostech obilnin ve větším rozsahu nevyskytoval. Areálem rozšíření BYDV je celá Česká republika.

ABA se jednoznačně uplatňuje ve spojitosti s vodním režimem rostlin, tedy s vlivy prostředí, kterými jsou nedostatek vláhy, nízké teploty, zasolení. Vlivem těchto faktorů dochází k poškození rostlinných pletiv, což lze říci také o působení patogenů, v tomto případě po inokulaci BYDV. Protože při sání mšic dochází k mechanickému poškození pletiv, je možné očekávat, že rostlina alespoň přechodně, dokud nedojde k velkému snížení množství chlorofylu, zvýší hladinu ABA, aby snížila výpar. Cílem práce bylo v rámci studia vztahu mezi infekcí BYDV a obsahem ABA zjistit, zda se liší hladinou ABA varianta ječmene náchylná a rezistentní k BYDV, zda se liší hladina ABA infikovaných rostlin od rostlin bez infekce.

MATERIÁL A METODIKA

Pro analýzy byly použity dihaploidní (DH) linie ječmene odvozené z křížení náchylné odrůdy Igri s odolnou odrůdou Atlas 68, nositelkou genu rezistence Yd_2 . Pro pokusy byla vybrána náchylná DH linie 075 (bez genu rezistence Yd_2) a odolná DH linie 08 (s genem rezistence Yd_2). Rostliny byly pěstovány v regulovaných podmínkách (den 12 hod, 19°C/noc 12 hod, 12°C). Ve fázi plně vyvinutého druhého listu byly rostliny infikovány pomocí mšic *Rhopalosiphum padi* (15-20 mšic na rostlinu), které před inokulací prodělaly po dobu 24 hodin akvizitní sání na zdrojích infekce. Rostliny byly individuálně zaizolovány skleněným válcem překrytým silonovou tkaninou. Některé rostliny byly ponechány bez infekce jako kontrola. Inokulační sání bylo po 3 dnech ukončeno postřikem insekticidu Pirimor. Rostlinný materiál byl po ukončení inokulačního sání odebírán v třídních intervalech. Rostliny byly dostatečně zalévány, listy pro analýzu ABA byly odebírány hodinu před ukončením tmavé periody. Po zvážení (0,5 g čhm) byly listy fixovány v tekutém dusíku a ABA byla následně extrahována do vody. Kvantitativní stanovení ABA bylo provedeno metodou ELISA podle Asche (2000) a z technických důvodů také metodou RIA. Obě imunochemické metody využívají protilátku MAC 252 (Quarrie et al., 1988). Kromě stanovení ABA byl stanovován i relativní obsah BYDV (kmen PAV).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Průměrné množství ABA zjištěné v listech rostlin infikovaných BYDV bylo do 21. dne po ukončení inokulace mírně vyšší nebo stejné jako u rostlin bez infekce (graf 1 a graf 2). Pouze 27. den po ukončení inokulace byl zjištěn rozdíl v obsahu ABA mezi náchylnou a

rezistentní variantou (graf 3), v ostatních případech se hladina ABA u jednotlivých variant statisticky průkazně nelišila.

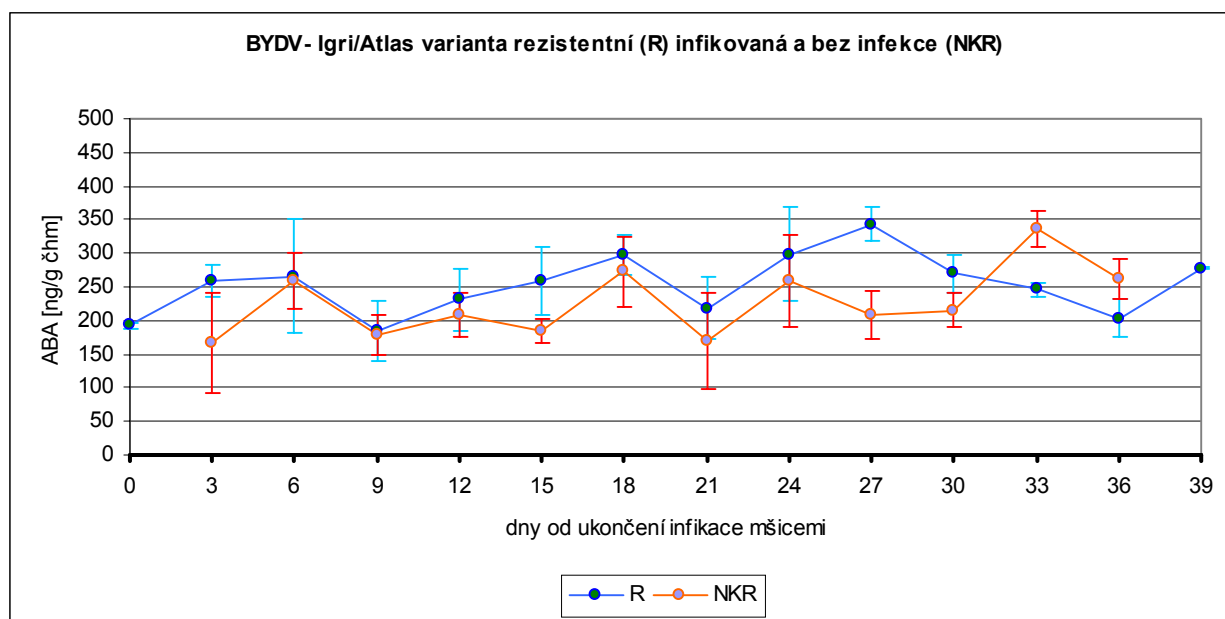
Během sledovaného období migroval vir v infikovaných rostlinách z listů do kořenů a bylo zjištěno, že v prvních dnech po inokulaci došlo k lineárnímu nárůstu relativního obsahu viru v listech, avšak největší rozdíly byly mezi náchylným a odolným materiálem v relativním obsahu viru, respektive v jeho maximálním nárůstu v kořenech a to mezi 12. a 15. dnem od ukončení inokulace. Rezistentní genotyp vykazoval jasně pomalejší pohyb viru z listů do kořenů. Po celou dobu bylo dbáno o dostatečné zásobení sledovaných rostlin vodou, aby se zamezilo nárůstu ABA v důsledku sucha. I přes toto opatření se hladina ABA dynamicky měnila.

Z uvedených výsledků vyplývá, že hladiny ABA v listech rostlin u variant ječmene náchylná a rezistentní k BYDV se, až na jedinou výjimku 27. dne od ukončení inokulace, nelišily. Avšak ani tento rozdíl hladin nebyl vzhledem k povaze ABA markantní. V hladině ABA se nelišily ani rostliny infikované od rostlin bez infekce.

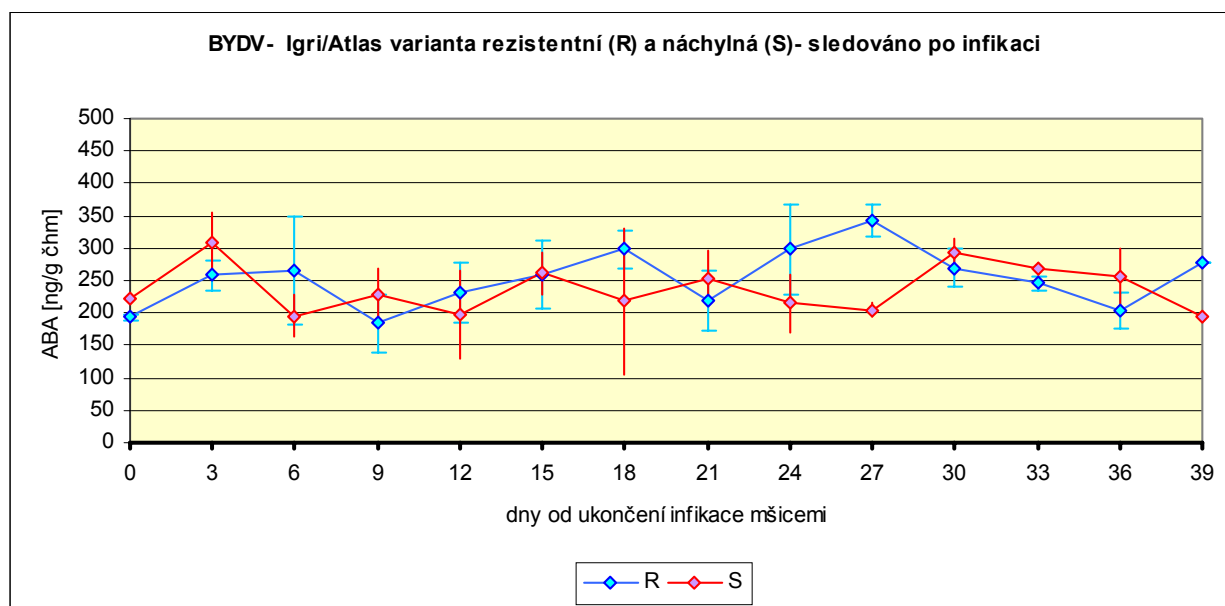
Jak bylo zmíněno v úvodní části, může se při reakci na sucho hladina ABA v listech zvýšit 10-50krát. Tyto změny sice probíhají během několika hodin a při opětovném dodání vláhy se hladina dostává do původního stavu, avšak v případě virové infekce jsou změny v rostlině nevratné. Při infekci BYDV dochází k poškození floému, tedy naruší se asimilační tok v rostlině, dojde k navýšení obsahu sušiny, postupně dochází ke snížení množství chlorofylu (Liu-Lijun, W-Junliang, 2000). Tyto změny omezují také pohyb ABA v rostlině, případně i její syntézu. Vzhledem k faktu, že během 32 dnů nedošlo u pokusných linií ani k výraznému snížení hladiny ABA, lze se domnívat, že poškození rostlinných pletiv spojených se syntézou a distribucí ABA nebylo v důsledku napadení virem BYDV natolik závažné, aby rostlina tyto ztráty nedokázala kompenzovat.

Analýzy dalších čtyř linií byly provedeny pouze do 15. dne od ukončení inokulace. Důvodem byla náročnost pokusu a fakt, že do 15. dne byl realizován maximální přesun viru z listů do kořenů. Výsledky potvrdily předchozí závěry. V literatuře tato problematika není zmiňována. Vzhledem k vazbě kyseliny abscisové na vodní režim rostlin bude dalším krokem sledování těchto dihaploidních linií v podmínkách nízké teploty a sucha. Zjištěné poznatky budou využitelné v procesu šlechtění.

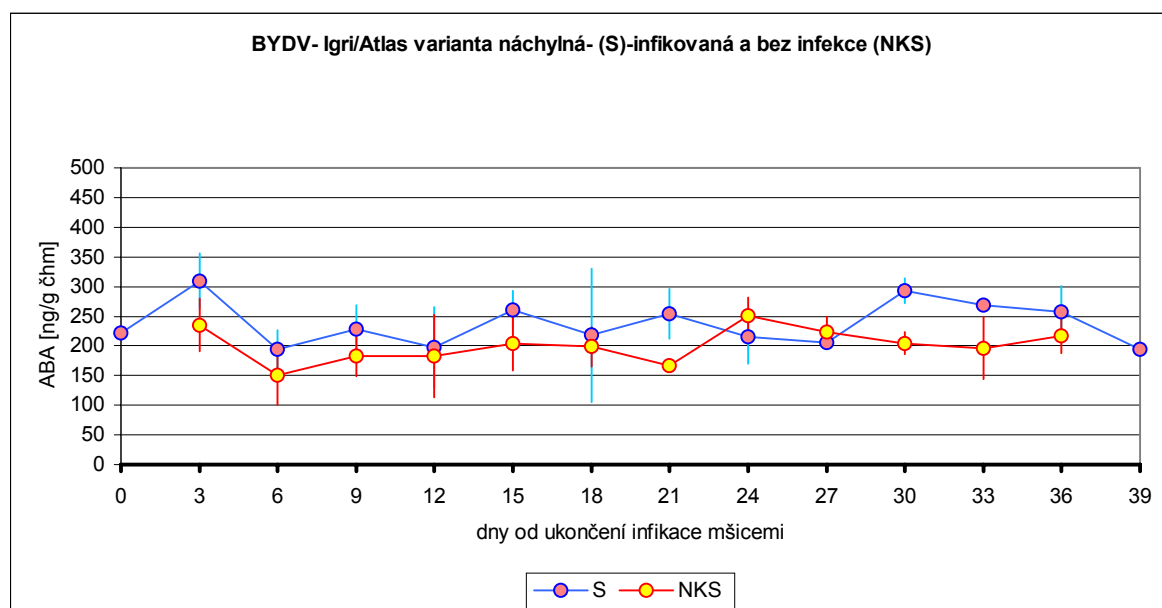
Graf 1.



Graf 2.



Graf 3.



ZÁVĚR

Hladina ABA byla stanovována v tří denních intervalech po ukončení inokulace virem BYDV. Pouze 27. den po ukončení inokulace byl zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu ABA mezi náchylnou a rezistentní variantou, ve všech ostatních případech se od sebe hladiny kyseliny abscisové v listech ječmenů testovaných linií nelišily. Materiál bude dále sledován v podmínkách sucha a nízkých teplot.

Práce byla realizována za podpory grantu GAČR 521/03/0137.

LITERATURA

Asch F. (2000): Determination of AbsciscicAcid by indirect Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). The Royal Veterinary and Agricultural University Denmark.

Liu-Lijun, W-Junliang (2000): Effect of SMV infection on soybean endhormone. Soybean Science 19,4: 326-329.

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J.(ed.)(1998): Fyziologie rostlin. Academia.

Quarrie S. A., Whitford P. N., Appleford N. E. J., Wang T. L. et al. (1988): A monoclonal antibody to (S)-Absciscic acid: its characterisation and use in radioimmunoassay for measuring absciscic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. Planta 173: 330-339.

Teiz L., Zieger E. (1998): Plant Physiology. Sinauer Associates Massachusetts.

Kazda J., Jindra Z., Kabíček J. et al. (1997): Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny, 17-21. Redakce časopisu Farmář a Zemědělské listy.