

MARKING OF STRESS IN POTATO PLANTS VIA ASSESMENT OF THE CONTENT OF ABA, OSMOTIC POTENTIAL AND SLA VALUE.

MARKEROVÁNÍ STRESU U ROSTLIN BRAMBORU POMOCÍ STANOVENÍ OBSAHU ABA, OSMOTICKÉHO POTENCIÁLU, FLUORESCENCE CHLOROFYLU A HODNOTY SLA.

Filová J., Klemš M., Smutný V., Prášil I., Prokešová Z.

Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 61300

E-mail: xfilova0.node@mendelu.cz

ABSTRACT

The reaction to the osmotic stress (using 100 g.l⁻¹ of polyethylenglycol; PEG) and stress induced by deficiency of carotenoids (using 20 µmol of flurochloridone – inhibitor of carotenoid biosynthesis) were monitored in the potato plants cultivated on the Richters nutrition solution. Rapid and also long-term responses of plants to the stress were recorded via changes of the level of abscisic acid (ABA) and the level of osmotic potential in leaves, stems, roots and also chlorophyll fluorescence in leaves and values of specific leaf area (SLA). The level of ABA in an osmotically stressed batch increased the most from the second to fifth day of cultivation. Chlorophyll fluorescence and the level of osmotic potential also increased in the beginning of cultivation in plants treated by PEG. The increase of the level of SLA after the fifth day of cultivation of plants treated by flurochloridone related to the decreased level of ABA in leaves.

Key words: abscisic acid, osmotický potetial, specific leaf area, flurochloridone, fluorescence

ABSTRAKT

Na rostlinách lilku bramboru kultivovaných v Richterově živném roztoku byla sledována reakce rostlin na osmotický stres (polyethylenglykol 100 g.l⁻¹; PEG) a stres vyvolaný nedostatkem karotenoidů (flurochloridon 20 µmol - inhibitor biosyntézy karotenoidů). Prostřednictvím změny hladiny kyseliny abscisové (ABA) a hodnoty osmotického potenciálu v listech, stoncích, kořenech a dále fluorescence chlorofylu v listech a hodnoty specifické listové plochy (SLA) byly zaznamenány rychlé i dlouhodobé odpovědi rostlin na stres. Hladina ABA u varianty osmoticky stresované se zvyšovala nejvíce ve druhém až pátém dni kultivace rostlin. U rostlin ošetřených PEG byla také zvýšena fluorescence chlorofylu a hodnota osmotického potenciálu na počátku kultivace rostlin. Zvýšení hodnoty SLA po pátém dni kultivace rostlin ošetřených flurochloridonem souviselo se snížením obsahu ABA v listech.

Klíčová slova: abscisová kyselina, osmotický potenciál, specifická listová plocha, flurochloridon, fluorescence

ÚVOD

Jedním z hlavních faktorů limitující růst, vývoj a produktivitu rostlin je nízký vodní potenciál, který může být způsobený osmotickým stresem. Rostliny proto vyvinuly řadu mechanismů, s jejichž pomocí se snaží působení tohoto stresu eliminovat (BRAYOVÁ (1997). Vodní deficit může být částečně kompenzován jak prostřednictvím snížení ztrát vody (uzavření průduchů), tak zvýšením jejího příjmu (zvětšení a prodloužení kořenového systému). Kromě toho rostliny dokáží minimalizovat ztráty vody z buněk zvýšením svého osmotického potenciálu pomocí akumulace osmoprotektivních látek. Osmotický stres pak může být velmi rychle detekován v rostlinách pomocí zvýšené hladiny ABA, jejíž přítomnost ovlivňuje uzavírání průduchů a zvyšuje hydraulickou vodivost kořenů (TARDIEU et al. 1993). Další rychlou metodou detekce abiotického stresu bylo měření fluorescence chlorofylu a osmotického potenciálu rostlin.

Stres znečně snižuje produktivitu rostlin. Fotosyntéza využívá pouze část energie světelného záření, kterou zachytí molekuly chlorofylu v listech. Zbylou část energie přeměňují rostliny buď na teplo, nebo ji znovu vyzáří ve formě světla – fotonu, fluorescence chlorofylu (PRÁŠIL 2003). Jestliže dochází k působení stresových podmínek (vysoké teploty, mráz, sucho, nedostatek živin, použití herbicidů apod.), (BOLHÁR-NORDENKAMPF a ÖQUIST 1993) je využívání fotochemické energie zpomaleno nebo dokonce zastaveno. Pak může docházet ke zvyšování podílu ztrát ve formě fluorescence chlorofylu (ROHÁČEK a BARTÁK 1999).

Zvýšení hladiny ABA v souvislosti s osmotickým stresem bývá vyvoláváno pomocí polyethylen glykolu (CHEN et al. 2002). Pomocí inhibitorů biosyntézy karotenoidů, které jsou hlavními prekurzory ABA, se hladina ABA snižuje. Je možné použít např. fluridon nebo flurochloridon (GAMBLE a MULLET 1986, KOWALCZYK-SCHRODER a SANDMANN 1992).

Cílem práce bylo detekovat osmotický stres u rostlin lilku bramboru v závislosti na působení nepenetrujícího osmotika (PEG 6000) různými metodami (obsah endogenní ABA, fluorescencí chlorofylu, měřením osmotického potenciálu a stanovením hodnoty SLA). Dále potom dosáhnout experimentálně snížení hladiny kyseliny abscisové v rostlinách pomocí aplikace flurichloridonu, který blokuje biosyntézu karotenoidů. Ucelený záměr práce by měl dát predikci v růstové odpovědi rostlin na základě naměřených markerů stresu.

MATERIÁL A METODY

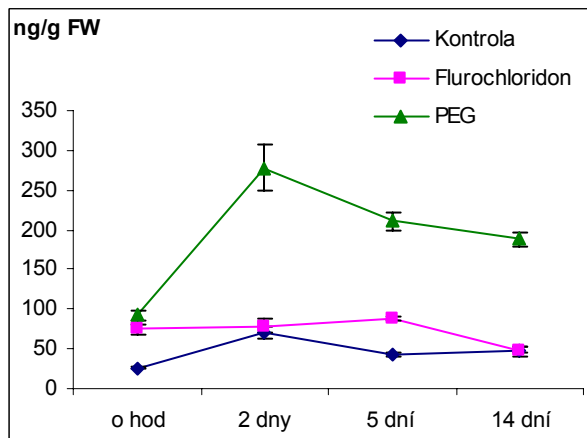
Pro pokusy byly použity zakořeněné prýty rostlin bramboru odrůdy Karin ve stádiu 4 pravých listů. Pupeny z hlíz byly nejprve zakořeněny ve vodě a následovně kultivovány v živném Richterově roztoku (RICHTER 1926). Osmotický stres byl experimentálně vyvolán přidavkem 100 g PEG do litru živného roztoku, inhibici biosyntézy karotenoidů byla vyvolána přidavkem 20 μmol flurochloridonu. Obě varianty byly srovnávány s kontrolou.

Rostlinný materiál byl odebírán a měřen v intervalu 0 hodin (výchozí stav), 2, 5 a 14 dní. Hodnota SLA byla měřena a počítána navíc po 21 denní kultivaci. Endogenní hladina ABA byla analyzována pomocí RIA metody (QUARRIE et al. 1988) a to v listech, stoncích a kořenech rostlin. Obsah ABA byl vyjádřen v $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmotnosti. Osmotický potenciál byl determinován psychrometricky pomocí psychrometru Wescor HR-33 po extrakci extracelulárních a intracelulárních tekutin (PRÁŠIL et al. 2000) po zamražení rostlin v tekutém dusíku (části - listy, kořeny a stonky. Osmotický potenciál byl následně vyjádřen v MPa. Měření intenzity fluorescence chlorofylu v jednotlivých variantách probíhala u celých intaktních rostlin, prostřednictvím fluorescenční kamery FluorCam a vyhodnocením pomocí softwaru FlourCam pro Windows 2000/XP. Tento software také přepočítal hodnotu fluorescence na kvantový výtěžek elektronového transportu (bezrozměrná veličina) ve fotosystému PSII (LICHTENTHALER et al., 2004).

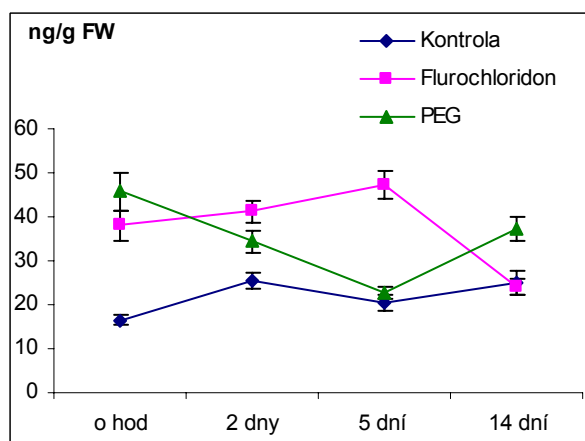
Hodnota SLA byla vypočítána jako podíl listové plochy (vyjádřená v cm^2) a sušiny listů (g). Listová plocha byla stanovena analýzou obrazu (software Image Tool) a vyjádřena v cm^2 . Pro stanovení ABA bylo provedeno vždy 6 opakování, pro stanovení osmotického potenciálu 4 opakování, měření fluorescence ve 4 opakováních a SLA v pěti opakováních. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny Studentovým t- testem.

VÝSLEDKY

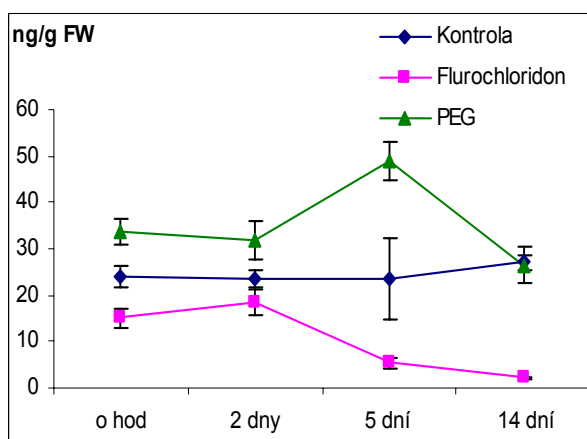
Analýzy prokázaly nejvyšší obsah ABA v listech osmoticky stresovaných rostlin (PEG), rozdíly v naměřených hodnotách byly statisticky průkazné po celou dobu měření (graf č.1). Hladina ABA se průkazně zvýšila i ve stoncích rostlin ošetřených PEG i flurochloridonem (graf č. 2). Oproti obsahu ABA v listech je obsah ABA ve stoncích a kořenech nižší (graf č. 1 a 2), v kořenech byla hladina ABA u varianty s přidavkem flurochloridonu snížena oproti kontrolní variantě. V pátém dni kultivace rostlin je stresové působení PEG staticky průkazné zvýšením obsahu ABA ve všech částech rostlin.



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

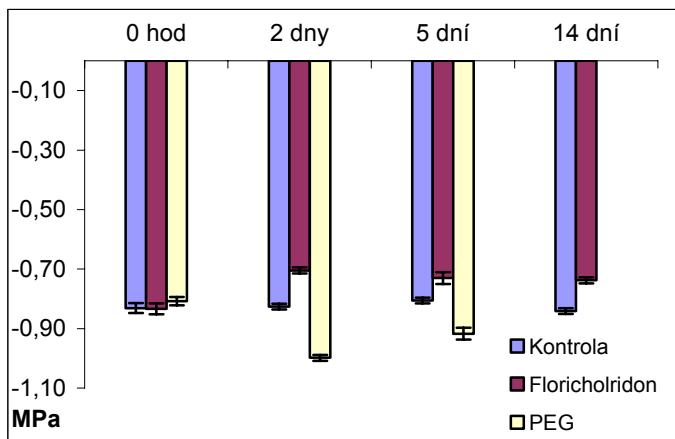


Graf č.2: Hladina endogenní ABA ve stoncích v ng.g^{-1} čerstvé hmotnosti.

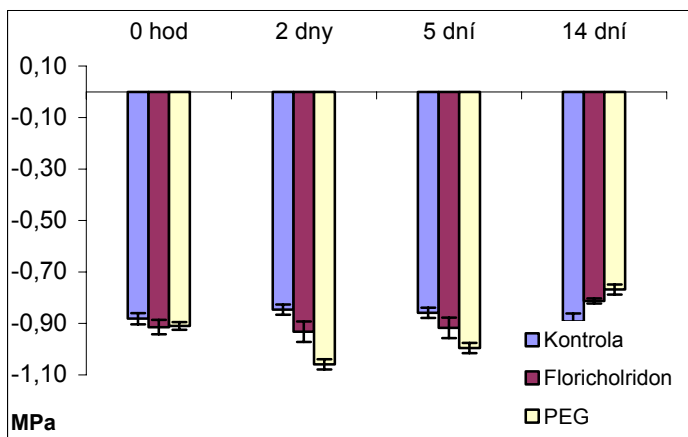


Graf č.3: Hladina endogenní ABA v kořenech v ng.g^{-1} čerstvé hmotnosti.

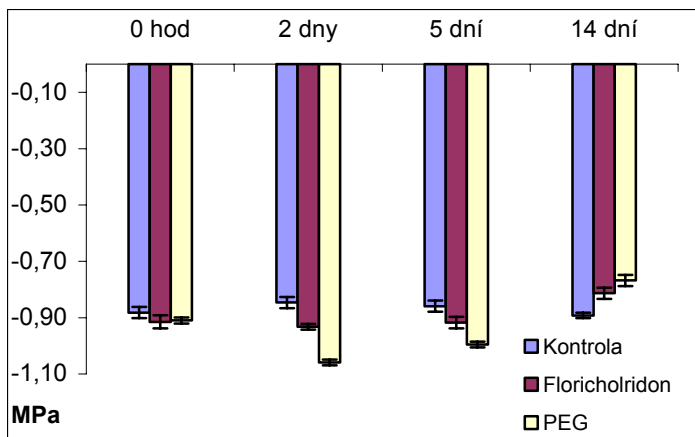
V listech, stoncích i kořenech byl na měřen nejnižší osmotický potenciál (nejvíce negativní) u osmoticky stresované varianty (PEG), jejichž rozdíl oproti kontrolní variantě (graf č. 4, 5, 6) byl vysoce průkazný. Na proti tomu největší osmotický potenciál (méně negativní) byl naměřen v listech varianty ošetřené flurochloridonem (graf č.4), rozdíl oproti kontrole byl také průkazný. Osmotický potenciál se snižoval u varianty ošetřené PEG (graf č.4,5,6) v průběhu 2 a 5 dnů, ve 14 dnech kultivace se pak zvýšil (méně negativní). U varianty ošetřené flurochloridonem se osmotický potenciál snížil v kořenech a listech (graf č. 4, 6), ve stoncích se během 2 a 5 dnů zvýšil (graf č.5).



Graf č.4: Hodnoty osmotického potenciálu listů v MPa.

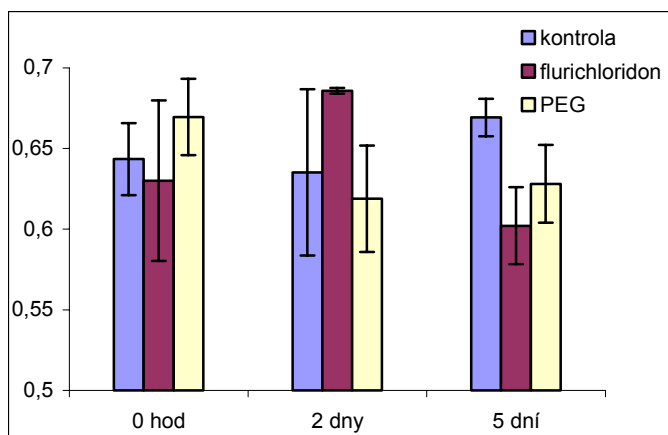


Graf č.5: Hodnoty osmotického potenciálu stonků v MPa.



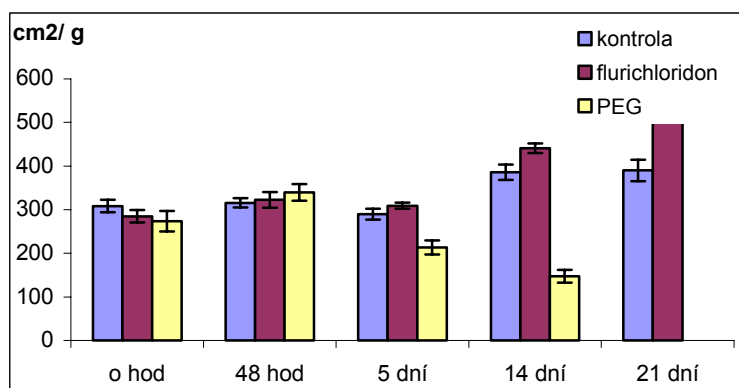
Graf č.6: Hodnoty osmotického potenciálu kořenů v MPa.

Výsledky přepočtů fluorescence ukázaly pokles kvantového výtěžku elektronového transportu v PSII ve 2 dnech u osmoticky stresované varianty a v 5 dnech byl zaznamenán statisticky průkazný pokles jak u varianty s přidavkem PEG tak u varianty, kde byla činnost fotosyntézy narušena inhibicí tvorby karotenoidů. Výsledky kvantového výtěžku resp. fluorescence chlorofylu všech variant v 14 dnech kultivace dosud nebyla z technických důvodů změřena.

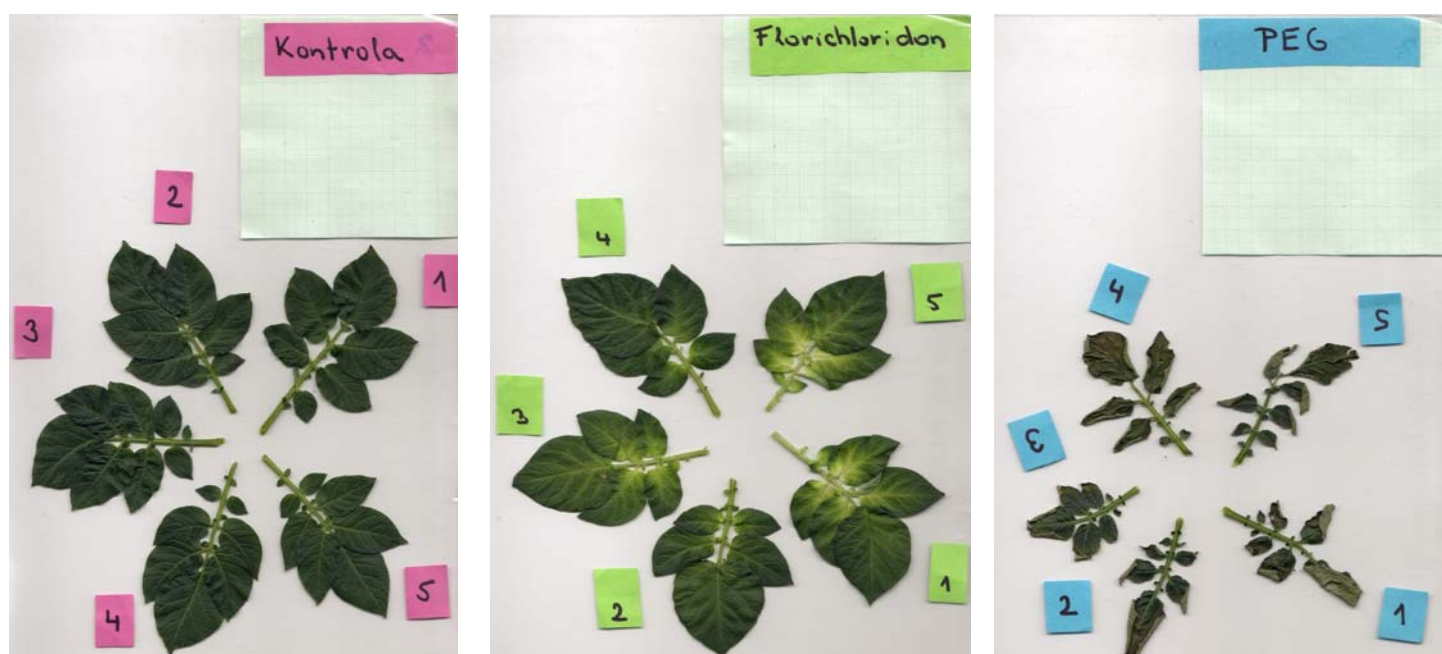


Graf č.7: Hodnoty fluorescence u intaktních rostlin.

Hodnoty specifické listové plochy byly u jednotlivých variant v čase rozdílné. Po 5 dnech kultivace došlo k výraznému snížení hodnoty SLA u varianty ošetřené PEG. Rostliny ošetřené flurochloridonem začaly 5 den po ošetření hodnotu SLA zvyšovat a ve 14 dnech byla hodnota SLA již statisticky průkazná vůči kontrole i variantě ošetřené PEG. V 21 dnech se rozdíl mezi variantou kontrolní a s přidavkem flurochloridonu ještě prohluboval. Hodnota SLA u varianty osmoticky stresované (PEG) již nemohla být počítána, protože rostliny zahynuly.



Graf č.8: Hodnota SLA rostlin v $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ v průběhu 21 denní kultivace.



Obrázek: Listová plocha listů brambor skenovaná ve 14 dnech kultivace u varianty kontrolní, s přidávkem flurochloridonu a PEG.

ZÁVĚR

Stanovení obsahu ABA ukázalo, že nejvyšší hodnoty obsahu ABA byly nalezeny v listech, ve kterých vniká ABA především v chloroplastech (HIRAI et al. 2000). Z výsledků obsahu ABA v listech a hodnoty SLA mezi jednotlivými variantami vyplývá, že ABA se účastní regulace odpovědi na stres a můžeme ji proto zařadit mezi markery detekující osmotický stres. To potvrzuje i ošetření flurochloridonem, které vedlo po čtrnácti dnech

kultivace ke snížení obsahu ABA a zvýšení hodnoty SLA. To souhlasí s výsledky ALVESE and SETTERA (2000) .

Výsledky měření osmotického potenciálu ukázaly, že jeho nejmenší hodnoty jsou v kořenech a nejvyšší hodnoty v listech. U osmoticky stresované varianty (PEG) je osmotický potenciál nejnižší (nejvíce negativní), čímž se rostlina snaží zvýšit příjem vody z prostředí. V kořenech a listech varianty ošetřené flurochloridonem je osmotický potenciál vyšší, může to být způsobeno nižší koncentrací osmotických látek. Tvorba těchto látek může být narušena díky snížené funkci fotosynézy (nedostatek fotosyntetických pigmentů – karotenoidů) oproti kontrolní variantě.

Použitím fluorescenční kamery FluorCam byla změřena fluorescence chlorofylu a ta byla přepočítána na kvantový výtěžek elektronového transportu v PSII. Osmotický stres působí na inhibici fotosyntézy a tím zvyšuje fluorescenci, taktéž inhibice tvorby karotenoidů měla za následek snížení kvantového výtěžku elektronového transportu v PSII (zvýšení fluorescence a snížení účinnosti fotosyntézy).

Z naměřených výsledků obsahu ABA, osmotického potenciálu a fluorescence chlorofylu, lze usuzovat na míru stresu na počátku pozorování a odpověď rostlin v následujícím růstu, což korespondovalo s naměřenými hodnotami SLA.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALVES A. A. C., SETTER T. L. (2000): Response of cassava to water deficit: Leaf area growth and abscisic acid. *Crop Sci.*, 40: 131-137.

BOLHÁR-NORDENKAMPF, H.R., ÖQUIST, G. (1993): Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: D.O. Hall., J.M.O. Scurlock, H.R. Bolhár-Nordenkampf, R.C. Leegood et S.P. Long (Eds.), *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual*. Chapman & Hall, London, UK, 193-206.

BRAY E. A. (1997): Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.*, 2: 48-54.

CHEN, S., LI J., WANG, T., WANG, S., POLLE, A. and HUTTETMANN, 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.

- GAMBLE, P.E., MULLET, J.E. (1986): Inhibition of carotenoid accumulation and abscisic acid biosynthesis in fluridone - treated dark - grown barley. *Europ. J. of Biochem.*, 160: 117-121.
- HIRAI N., YOSHIDA R., TODOROKI Y., OHIGASHI H. (2000): Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Bios. Biotech. Biochem.*, 64: 1448-1471.
- KOWALCZYK-SHRÖDER, S., SANDMANN, G. (1992): Interaction of fluridone with phytoene desaturation of *Aphanocapsa*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 42: 7-12.
- LICHTENTHALER, H., BUSCHMANN, C., KNAPP, M., (2004): Measurement of chlorophyll fluorescence kinetics (kautsky effect) and the chlorophyll fluorescence decrease ratio (R_{FD} - values) with the PAM- Fluorometer, in *Analytical methods in plant stress biology* - Eds. Filek M., Biesaga-Kościelniak J., Marcińska I., Polish Academy of Sciences, 93-111.
- PRÁŠIL, I., KADLECOVÁ, Z., FALTUS, M., PRÁŠILOVÁ, P., (2000): Water content, osmotic potential and abscisic acid level as indices of freezing tolerance in barleys, *Plant Prod.* 46: 193-197.
- PRÁŠIL, O. (2003): Fluorescence chlorofylu jako metoda studia fotosyntézy a diagnostiky porostu. *Živa*, 6: 249-252.
- 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.
- RICHTER, O. (1926): Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Kulturgräser. 203-242.
- ROHÁČEK, K., BARTÁK, M. (1999): Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters and some applications. *Photosynthetica*, 37 (3): pp. 339-363.
- TARDIEU F., ZHANG J., GOWING D. J. G. (1993): Stomatal control by both [ABA] in the xylem sap and leaf water status: A test of a model for droughted or ABA-fed field-grown maize. *Plant Cell Environment*, 16: 413-420.

Poděkování

Tento výzkum byl podporován výzkumným projektem Grantové agentury MZLU Brno IGA 33/2006.