

THE LEVEL OF ABSCISIC ACID AND IT'S EFFECT ON EXPRESSION OF STORAGE PROTEINS IN DESSICATION OF PEA ZYGOTIC EMBRYO IN VITRO

OBSAH KYSELINY ABSCISOVÉ A JEJÍ VLIV NA EXPRESI ZÁSOBNÍCH PROTEINŮ PŘI DESIKACI ZYGOTICKÝCH EMBRYÍ HRACHU IN VITRO

Solnická P., Klemš M., Prokešová Z., Mikušová Z., Griga M.

Ústav Biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

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

ABSTRACT

The correlation between changes of the level of abscisic acid and the expression of storage proteins during development of pea zygotic embryo has been studied. The application of 20 μ M flurochloridone decreased the content of ABA on flowering plants in endosperm and in cotyledonary embryo in the early stage of development. The expression of storage proteins in embryo of non-treated plants corresponded to the high level of ABA in a stage of ripening of cotyledonary embryo. Immature and mature cotyledonary embryos were cultivated *in vitro* on the medium supplemented by 30 g or 80 g of sucrose in the presence of flurochloridone or absence of ABA, whereas only the mature embryos were able to germinate in these conditions. The accumulation of storage proteins in the relation to desiccation is controlled by increased level of abscisic acid in the embryonic tissues and in the seed.

Key words: pea zygotic embryo, abscisic acid, flurochloridone, storage proteins, dessication

ABSTRAKT

Byly studovány změny obsahu abscisové v korelaci s expresí zásobních proteinů během vývoje zygotického embrya hrachu. Pomocí aplikace 20 μ M flurochloridonu na kvetoucí rostliny byl snížen obsah ABA v endospermu a v ranných fázích vývoje kotyledonárního embrya. Expres zásobních proteinů v embryu flurochloridonem neošetřených rostlin následovala pík vysokého obsahu ABA v období dozrávání kotyledonárního embrya. Nezralá i zralá kotyledonární embrya byla kultivována *in vitro* v MS médiu s 30 g nebo 80 g sacharózy za přítomnosti flurochloridonu či absence ABA, přičemž pouze zralá embrya byla schopna klíčit v těchto podmínkách. Ukládání zásobních proteinů je ve vztahu k desikaci řízeno zvýšením koncentrace kyseliny abscisové v pletivech embrya a semene.

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

ÚVOD

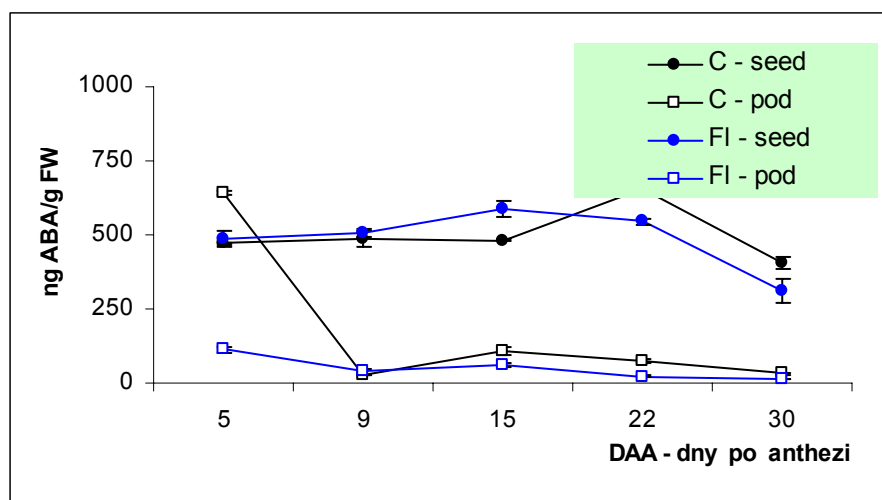
Zygotická embryogeneze je řízena nejenom aktivitou genů, ale také hormonální homeostází, přičemž na této regulaci se podílejí všechny skupiny fytohormonů (LIU et al. 1995). Pro optimální růst a vývoj embrya až do fáze maturace je nejvýznamější kyselina abscisová. WANG et al. (1987) popisali akumulaci ABA během embryogeneze a vývoje semen *Pisum sativum*. Dynamika obsahu ABA v čase byla charakteristická dvěma píky. První maximum ABA odpovídá maximálnímu růstu testy, druhé intenzivnímu růstu embrya. Význam kyseliny abscisové v regulaci embryogeneze dokládá experimentální práce PRÉVOST a Le PAGE-DEGIVRY (1985) s embryi *Phaseolus vulgaris*. Studovali změny obsahu ABA v embryonální ose a dělohách. V čase 29 DAA bylo zjištěno zvýšení obsahu ABA jak v dělohách tak v embryonální ose, přičemž v dělohách byl obsah ABA vyšší. Do období zralosti pak obsah ABA klesal. V *in vitro* kultuře prokázali, že kultivace embryonální osy bez děloh zkracuje fázi maturace před klíčením. To potvrdili přidávkem ABA do média, která klíčení oddálila. Přítomnost děloh však stimulovala růst klíčnicích rostlin. Usoudili, že oddálení klíčení souvisí s přítomností ABA v dělohách. Během poslední vývojové fáze embrya, která odpovídá maturaci, jsou akumulovány zásobní proteiny (WANG a HEDLEY 1993). Syntézu a kládání zásobních proteinů v procesu desikace v semenech hrachu detailně popsali REISDORPH a KOSTER (1999). Tento proces postupné dehydratace živého obsahu buněk a pletiv připravuje životaschopná embrya a semena na překonání nepříznivého období v životním cyklu a zabraňuje předčasnému klíčení.

MATERIÁL A METODY

Byla izolována embrya z kontrolních rostlin hrachu setého (odrůda oskar) a z rostlin, na které byl aplikován 20 μM flurochloridon. Odběr byl prováděn v 9, 15, 22 a 30 dnech po rozkvětu (DAA). Smeno bylo rozděleno na embryo, endosperm a testu. V 9 dnech po rozkvětu bylo embryo v srdčité fázi embryogeneze, po 15 dnech bylo v děložní fázi, po 22 dnech bylo téměř vyvinuté embryo s minimálním obsahem endospermu a po 30 dnech po rozkvětu bylo již embryo plně vyvinuto. Nezralá i zralá kotyledonární embrya byla kultivována *in vitro* na MS médiu (MURASHIGE a SKOOG 1962) s 30 g nebo 80 g sacharózy za přítomnosti flurochloridonu (20 μM) či ABA (10 μM). Pro analýzy ABA a zásobních proteinů byla semena rozdělena na embryo, endosperm a testu. 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). Při kultivaci izolovaných embryí *in vitro* bylo hodnoceno přežívání embryí a klíčení (%). Ke statistickému hodnocení byl použit t-studentův test pro testování průkaznosti rozdílu dvou průměrů na sobě nezávislých o stejném rozsahu výběrového souboru. Statistické hodnocení bylo provedeno v analýzách obsahu ABA ve čtyřech opakováních.

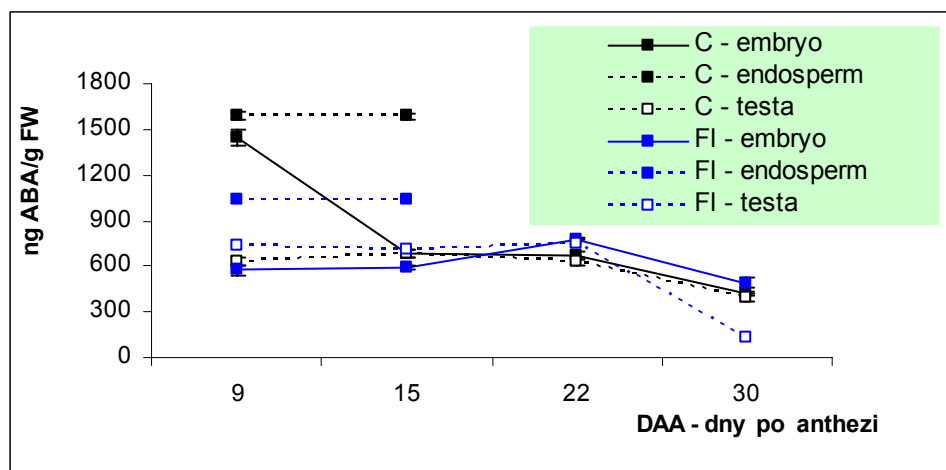
VÝSLEDKY A DISKUZE

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).



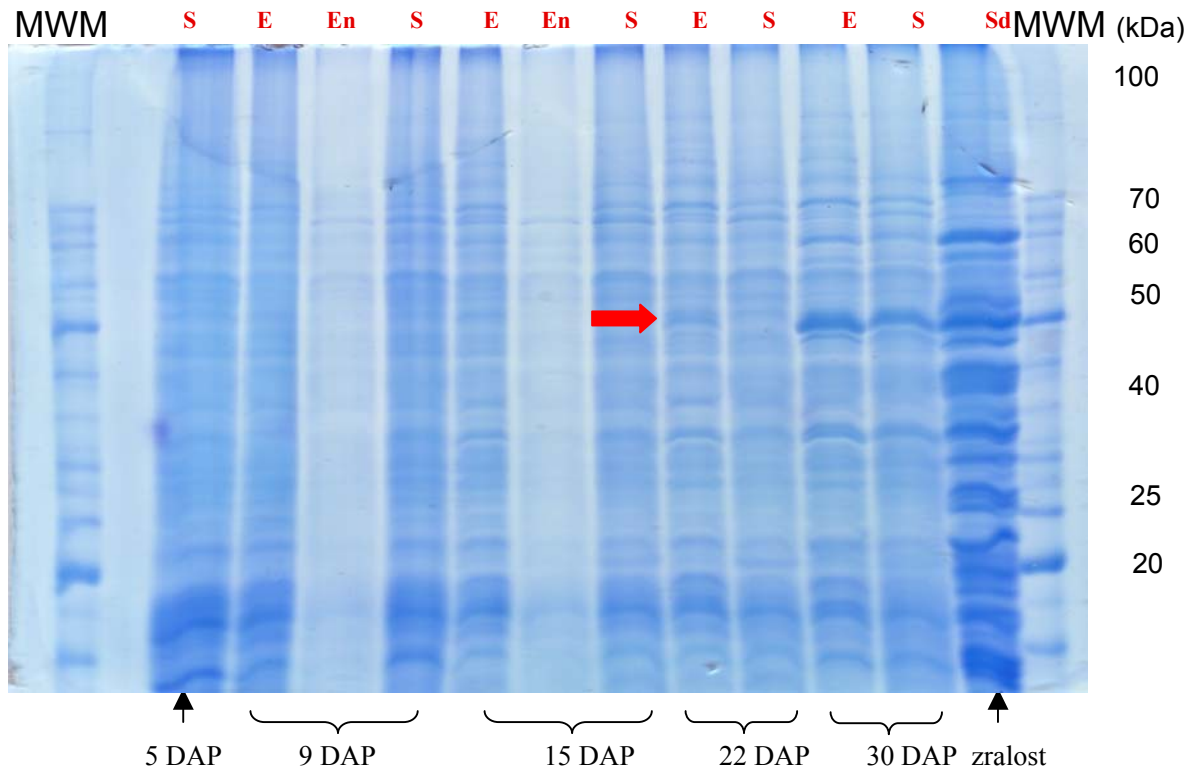
Graf č.1 - Endogenní hladina ABA (ng/g čerstvé hmotnosti) v semenech a luscích rostlin hrachu setého ošetřeného 20 μ M flurochloridonem

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).



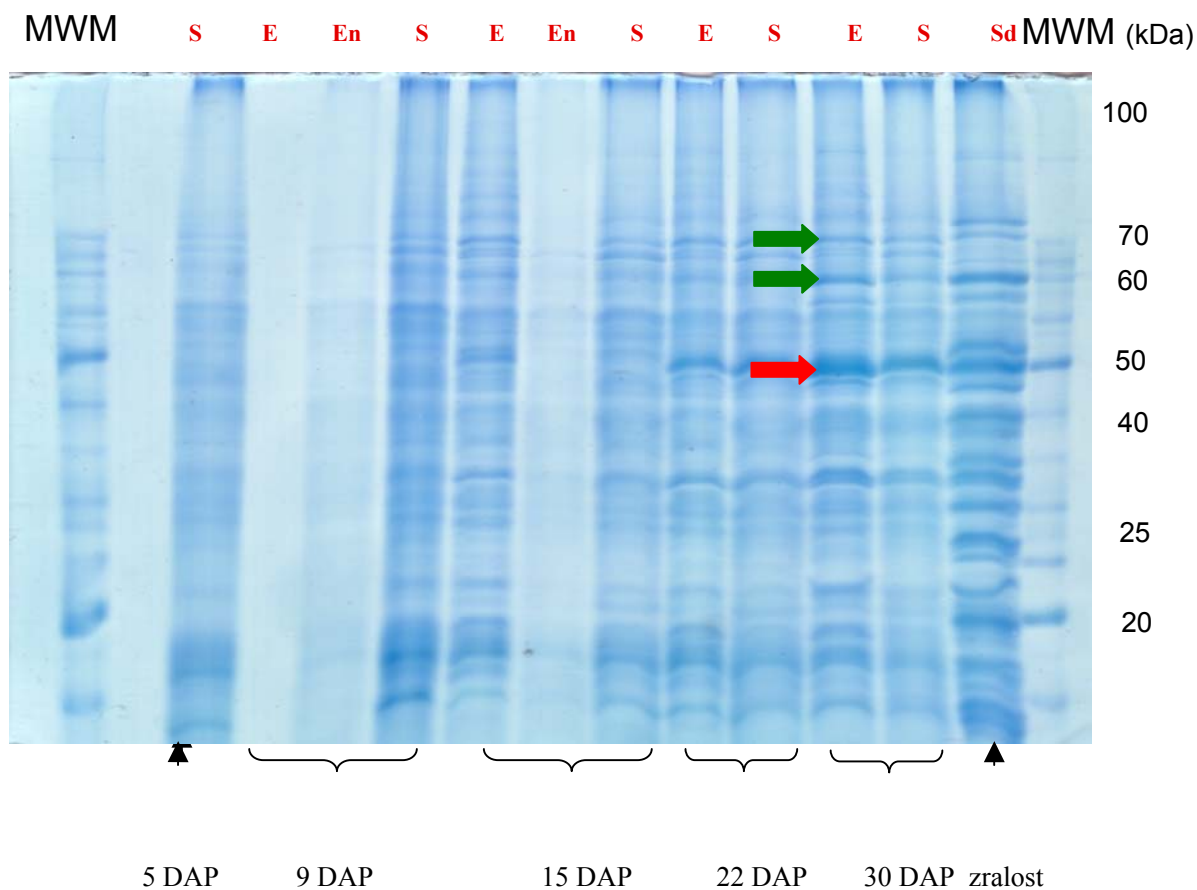
Graf č. 2 - Endogenní hladina ABA (ng/g čerstvé hmotnosti) v testě, embryu a endospermu semen hrachu setého ošetřeného 20 μ M flurochloridonem

Expresi zásobních proteinů byla provedena v embryích, endospermu a v semenech. Hmotnostní marker 50 kDa odpovídá jedné ze subjednotek zásobního proteinu vicilinu (označeno červenou šipkou) a marker 40 kDa zásobnímu proteinu legumin a. Ze snímku č. 1 a 2 je možno konstatovat, že ošetření flurochloridonem oddálilo expresi zásobních proteinů.



Snímek č. 1 – Elektroforeogram zásobních proteinů semen (S) a embryí (E) kontrolních rostlin

Expresi vicilinu začala v termínu 22 DAA, ale leguminu a convicilinu (označeno zelenou šipkou) později v termínu 30 DAA. V tomto období byla detekována subjednotka vicilinu s molekulovou hmotností 34 kDa i v semenech a embryích flurochloridonem ošetřených rostlin.



Snímek č. 2 – Elektroforeogram zásobních proteinů semen (S) a embryí (E) flurochloridonem ošetřených rostlin

Při kultivaci izolovaných embryí *in vitro* bylo charakteristické, že embrya zbavená děloh intenzivněji klíčila, zvláště v případě kultivace na médiu s flurochloridonem. Takto ošetřená embrya měla méně výraznou expresi zásobních proteinů oproti embryím kontrolní varianty (neošetřená). Flurochloridon obsah ABA u takto ošetřených embryí snižoval. Expresie zásobních proteinů v embryu flurochloridonem neošetřených rostlin následovala pík vysokého obsahu ABA v období dozrávání kotyledonárního embrya. Obsah ABA byl nejvyšší po kultivaci embryí na médiu s ABA a to i v případě odstranění děloh (výsledky budou komentovány v ústní prezentaci). 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.

LITERATURA

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

LIU, C.M., JOHNSON, S., WANG, T.L. (1995): *cyd*, a mutant of pea that alters embryo morphology is defective in cytokinesis. *Develop. Genet.* 16: 321-331.

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.

PRÉVOST, I. and Le PAGE-DEGIVRY, M.Th. (1985): Changes in abscisic acid content in axis and cotyledon of developing *Phaseolus vulgaris* embryos and their physiological consequences. *J. Exp. Bot.* 36 (173): 1900-1905.

REISDORPH, N.A. and KOSTER, K.L. (1999): Progressive loss of desiccation tolerance in germinating pea (*Pisum sativum*) seeds. *Physiol. Plant.* 105: 266-271.

WANG, T.L., COOK, S.K., FRANCIS, R.J., AMROSE, M.J. and HEDLEY, C.L. (1987): An analysis of seed development in *Pisum sativum*. *J. Exp. Bot.* 38 (196): 1921-1932.

WANG, T. L. and HEDLEY, C. L. (1993): Genetic and developmental analysis of the seed. In: CASEY, R., DAVIES D.R. (eds.): *Peas. Genetic, molecular biology and biotechnology.* CAB International: 83-120.

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.

Poděkování

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