

THE INFLUENCE OF STRIGOLACTONE ON AUXIN TRANSPORT

Buchtová D.¹, Chmelová D.¹, Kalousek P.¹, Balla J.¹, Pernisová M.², Reinöhl V.¹, Procházka S.¹

¹Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 2, 625 00 Brno, Czech Republic

E-mail: d.buchtov@seznam.cz

ABSTRACT

Our objective was to assess the influence of the newly described plant hormone strigolactone on the polar auxin transport, that could play a role in a feedback regulation of the homeostasis of auxin and strigolactone. As a model system the roots of *Arabidopsis* WT (Columbia), max1 – max4 mutants and PIN1:PIN1:GFP plants were used. The plants were grown on vertical agar plates on control (MS medium) and GR24 (synthetic strigolactone analog) supplemented medium. The root architecture (length of primary root and number of lateral roots), PIN1-3 gene expression and PIN1 protein localization were determined.

The addition of GR24 caused an increase in the length of the WT primary root and decreased the number of lateral roots (LR). This could be explained by a lower auxin level in the root elongation zone and by a delay in formation of auxin maxima needed for lateral root initiation, both effects signaling that GR24 impairs polar auxin transport. The roots of max1 – max4 are known to have higher auxin transport capacity form more lateral roots than WT plants and GR24 decreased the number of LR to WT level. The observed longer primary root of these mutants and further elongation by GR24 addition could not be satisfactorily explained yet.

Real time PCR quantification of PIN1 – 3 gene expression revealed the most pronounced decrease after 2 days of GR24 treatment. There was also observed by confocal microscopy of PIN1:PIN1:GFP roots a dramatic decrease of expression on the protein level. Altogether the results show a modulation of polar auxin transport capacity by strigolactone on transcriptional or translational level and possibly also by influencing protein stability.

Key words: strigolactone, auxin transport, root architecture, *Arabidopsis*

Acknowledgments: This work was supported by a grant of IGA MUAUF Nr. 5/2009.

ÚVOD

Nedávno nově popsaným mobilním signálem transportovaným z kořenů a ovlivňujícím inhibici větvení stonku je zřejmě strigolakton nebo jeho deriváty (Gomez-Roldan et al. 2008; Umehara et al. 2008). Biosyntézy této látky u *Arabidopsis* se účastní dvě karotenoidy štěpící deoxygenázy (MAX3 a MAX4) (Sorefan et al. 2003; Booker et al. 2004) a protein ze skupiny cytochromu P450 (MAX1) (Lazar and Goodman 2006). Přenosu strigolaktonového signálu ve stonku se pak účastní F-box protein MAX2 (Stirnberg et al. 2007). Mutace v kterémkoliv z uvedených genů vede k zvýšenému větvení stonku rostlin (Stirnberg et al. 2002; Sorefan et al. 2003). Tento mechanismus je pravděpodobně konzervovaný u jedno i dvouděložných, neboť jsou popsány homologní geny nejen u hrachu (*Pisum sativum*) (Beveridge 2000), petunie (*Petunia hybrida*) (Snowden et al. 2005), ale i u rýže (*Oryza sativa*) (Arite et al. 2007).

Mnohem déle je známo, že větvení je ovlivněno dalším hormonem – auxinem (Thimann and Skoog 1934) a jeho basipetálním polárním transportem ve stonku. U intaktní rostliny je kapacita tohoto transportního systému nasycená auxinem z apikální části stonku, axilární pupeny nejsou schopny exportovat auxin do stonku (Balla et al. 2009). Kapacita polárního transportu auxinu je daná především množstvím a lokalizací vstupních (AUX1) a výstupních (proteiny ze skupiny PIN) membránových přenašečů auxinu. Například právě v axilárních pupenech intaktních rostlin hrachu byla prokázána přítomnost PIN1, ale jeho lokalizace byla nepolární po obvodu buněk. Teprve po dekapitaci došlo k rychlé polarizaci PIN1 na bazální straně buněk a k ustavení polárního transportu auxinu z pupenů do stonku (Balla et al. 2009). U mutantních rostlin *Arabidopsis max1 – 4* vykazujících zvýšené větvení byla zároveň prokázána zvýšená transportní kapacita auxinu (Bennett et al. 2006). Tato interakce auxinu a strigolaktonu byla nedávno podpořena zjištěním, že exprese MAX3 a MAX4 je pozitivně regulována auxinem a tento signál je předáván TIR1 signální dráhou (Hayward et al. 2009).

Cílem této práce bylo prokázat vliv strigolaktonu na kapacitu polárního transportu auxinu, který by tak mohl hrát roli zpětnovazební regulace rovnováhy mezi auxinem a strigolaktonem. Pro studium účinků strigolaktonu na auxin a jeho transport byl jako modelový systém vybrán kořen *Arabidopsis* cv. Columbia, mutanty *max1 – 4* a transgenní rostliny *PIN1::PIN1:GFP*.

MATERIÁL A METODIKA

V experimentech byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* – divoký typ Columbia (Col), mutantní rostliny *max1*, *max2*, *max3*, *max4* a transgenní rostliny *PIN1::PIN1:GFP*. Kontrolní varianty byly pěstovány na MS médiu s 0,8% agarem a varianta s přísadkou syntetického analogu strigolaktonu obsahovala navíc 1 μ M GR24. Kultivace probíhala v řízených podmínkách v boxech Percival při teplotě 18/21 °C a fotoperiodě 16/8 h.

Pro sledování růstu kořenů byly využity 13denní rostliny *Arabidopsis* pěstované na MS médiu s 0,8 % obsahem agarů. Byla provedena fotografická dokumentace a vyhodnocení délky kořenů pomocí programu ImageJ.

Lokalizace PIN proteinů v kořenech *PIN1::PIN1:GFP* rostlin *Arabidopsis* byla pozorována pomocí laserové konfokální mikroskopie (mikroskop fy Olympus BX60, Fluoview 200). Pro tyto účely byly

kořeny 7denních rostlin nejprve obarveny propidium jodidem (10 µg/ml; po dobu 5 min) a poté snímány při nastavení filtrů pro detekci GFP (excitace při 460-495 nm a emise při 510-550 nm).

Genová exprese *PIN1-3* byla měřena metodou kvantitativní PCR v reálném čase u 6denních rostlin *Arabidopsis* pěstovaných na MS médiu s 1 % obsahem agaru. Byly kultivovány 4 varianty: kontrola (K), médium s 1 µM GR24 (S), rostliny přenesené na 24 h z kontrolního na médium s 1 µM GR24 (S24) a rostliny přenesené na médium s 1 µM GR24 na 48 h (S48). Po skončení kultivace byly odebrány kořeny a z nich izolována celková RNA pomocí komerčního kitu Qiagen. cDNA byla připravena z 1 µg celkové RNA a kvantifikována na přístroji Rotor-Gene 3000 (CORBETT RESEARCH) pomocí DyNamo Flash SYBR Green qPCR kitu (Finnzymes). Hladiny exprese byly normalizovány na *ACTIN2*. Byly použity tyto primery:

PIN 1: 5'-TACTCCGAGACCTTCCAACCTACG-3' 5'-TCCACCGCCACCACTTCC-3'

PIN 2: 5'-GGCGAAGAAAGCAGGAAGA-3' 5'-GGTGGGTACGACGGAACA-3'

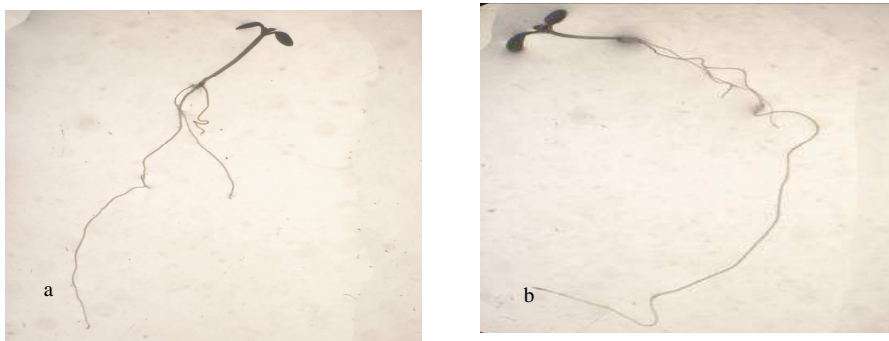
PIN 3: 5'-GAGGGAGAAGGAAGAAAGGGAAC-3' 5'-CTTGCGTTGTAATGTTGGCATCAG-3'

ACTIN2 5'-TTGACTACGAGCAGGAGATGG-3' 5'-ACAAACGAGGGCTGGAACAAG-3'

VÝSLEDKY A DISKUZE

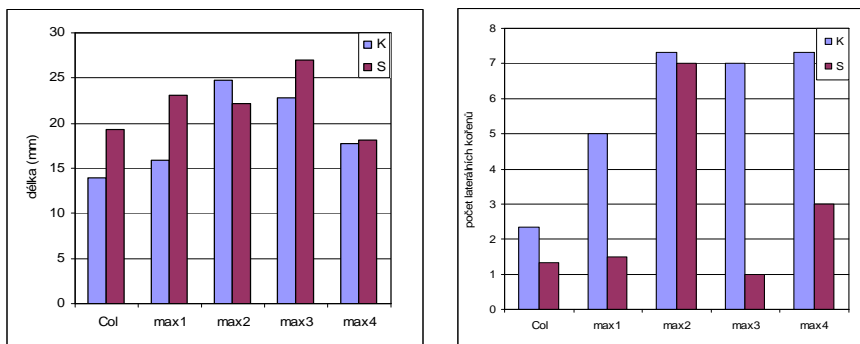
Sledováním vývoje kořenevé architektury rostlin *Arabidopsis* pěstovaných na agaru ve vertikálně postavených Petriho miskách (obr. 1) ukázalo, že kořeny ovlivněné dlouhodobě sloučeninou GR24 - syntetickým analogem strigolaktonů - vykazují odlišný fenotyp. Primární kořen se v přítomnosti GR24 oproti kontrole více prodlužuje (obr. 2a) a naopak tvorba laterálních kořenů je potlačena (obr. 2b). To odpovídá snížené hladině auxinu především v prodlužovací zóně kořene, kde vysoká hladina auxinu brzdí prodlužování buněk (Blilou et al. 2005). Tento efekt regulace prodlužování buněk auxinem je také znám ze studií gravitropní odezvy kořene (Geldner et al. 2001). Také v našich experimentech se kořeny gravistimulovaných rostlin s přídavkem GR24 v médiu ohýbaly pomaleji, než kořeny na kontrolním médiu (data předběžných pokusů neuvedena). Snížená tvorba laterálních kořenů přídavkem GR24 je způsobena omezením tvorby lokálních maxim auxinu potřebných pro iniciaci tvorby laterálních kořenů (Benkova et al. 2003).

Obr. 1 13-tidenní rostliny *Arabidopsis Col* na médiu MS (a) a s přídavkem 1 µM GR24 (b)



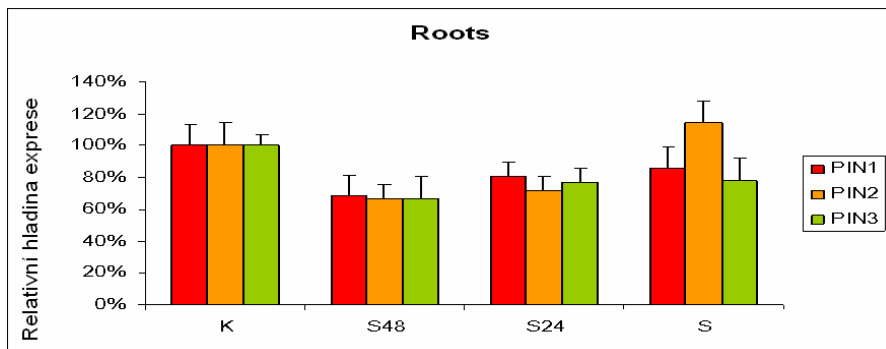
Mutantní rostliny *max1,3,4* mají snížený obsah strigolaktону a u rostlin *max2* by neměl přídavek strigolaktónu vyvolat odezvu. Tvorba laterálních kořenů je regulována především aktivitou vstupního přenašeče AUX1 (Benkova et al. 2003). Snížení obsahu strigolaktónu, které vede ke zvýšení kapacity polárního transportu auxinu (Bennett et al. 2006), zřejmě způsobuje rychlejší tvorbu auxinových maxim a tím také dřívější a četnější větvení kořene. Přídavek GR24 do kultivačního média způsobil u *max1,3,4* pokles tvorby laterálních kořenů na úroveň divokého typu a *max2* je dle předpokladu vůči ošetření touto látkou necitlivý. Prodloužená délka primárního kořene u těchto mutantů je pravděpodobně způsobena zvýšenou kanalizací auxinu z prodlužovací zóny kořene, ale přitom přídavkem GR24 dochází k jejich dalšímu prodloužení u rostlin *max1* a *max3*. Tyto předběžné výsledky se zatím nepodařilo uspokojivě interpretovat a jsou předmětem dalšího studia.

Obr. 2 Délka primárního kořene (a) a počet laterálních kořenů (b) 13-tidenních rostlin *Arabidopsis*



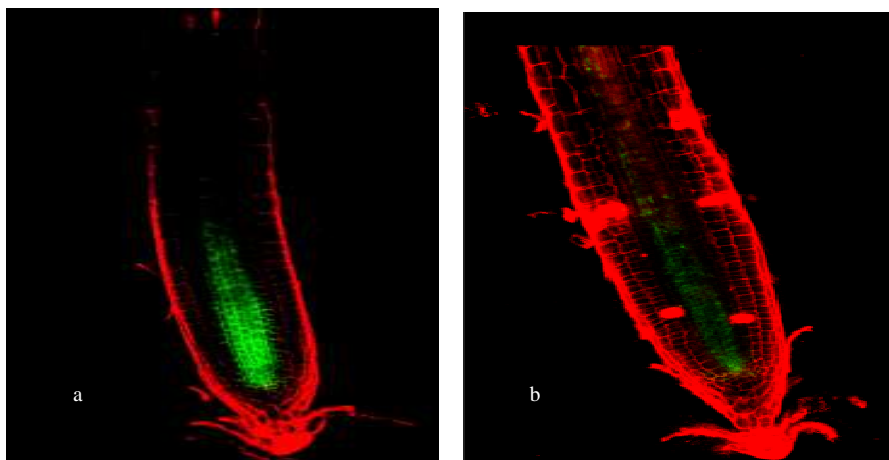
Na základě pozorované změny kořenové architektury vlivem GR24, bylo cílem prokázat vliv GR24 přímo na expresi přenašečů auxinu na úrovni RNA i proteinu. S pomocí kvantitativní PCR v reálném čase byla stanovena exprese *PIN1-3* po dlouhodobém i krátkodobém působení GR24. Nejvýraznější snížení exprese všech tří genů i genu *AUX1* (data neuvedena) bylo prokázáno po dvoudenním působení analogu strigolaktónu (obr. 3).

Obr. 3 Exprese *PIN1-3* v kořenech šestidenních rostlin *Arabidopsis* pěstovaných na MS médiu (K), MS médiu s přídavkem GR24 (S), přenesených na médium s přídavkem GR24 na 1 den (S24) a na dva dny (S48).



Pro studium množství PIN1 proteinu lokalizovaného na bazálním pólu buněk v kořeni byly použity rostliny PIN1::PIN1:GFP. Kořeny těchto rostlin byly *in vivo* snímány pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie. Bylo prokázáno významné snížení GFP signálu fúzního proteinu s PIN1 po kultivaci rostlin na médiu s přidavkem analogu strigolaktону. Tyto výsledky ukazují, že modulace kapacity polárního transportu auxinu mohou být na transkripční a translační úrovni, stejně jako ovlivněním stability PIN1 proteinu.

Obr. 4 Konfokální mikroskopické snímky kořene sedmidenních rostlin Arabidopsis PIN1::PIN1:GFP pěstovaných na MS médiu (a) a na médiu s přidavkem GR24 (b).



ZÁVĚR

Tabulka 1 shrnuje výsledky vlastních experimentů (zvýrazněny) a literárních údajů, které ukazují vzájemný vztah strigolaktónu a auxinu. Vliv auxinu a jeho transportu (především aktivity AUX1) na prodlužování kořene, tvorbu laterálních kořenů a gravitropní odezvu je známý. Změny těchto fyziologických reakcí působením nedávno objeveného hormonu strigolaktónu potvrzují naši hypotézu, že strigolaktón může působit jako modulátor kapacity polárního transportu auxinu.

Tab. 1 Souhrn poznatku o interakci strigolaktónu a auxinu

	<i>max1,3,4</i>	WT – Col	<i>max1,3,4</i> + GR24	WT-Col + GR24
Obsah strigolaktónu	–	0	0	+
Větvění stonku	+	0	0	–
Délka primárního kořene	+	0	++	++
Počet laterálních kořenů	+	0	–	–
Gravitropní odezva	?	0	?	–
Expresse <i>AUX1</i>	?	0	?	–
Expresse <i>PIN1,2,3</i>	+	0	?	–

Vysvětlivky: 0 – vlastnosti jako WT – Col, ± - zvýšení (snížení) obsahu, vlastnosti, ? – nebylo popsáno.

LITERATURA

- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M et al. (2007) DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant Journal* 51(6): 1019-1029.
- Balla J, Kalousek P, Reinohl V, Friml J, Procházka S (2009) Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls apical dominance in pea. in prep.
- Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D et al. (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115(5): 591-602.
- Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker J, Luschnig C et al. (2006) The Arabidopsis MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Current Biology* 16(6): 553-563.
- Beveridge CA (2000) Long-distance signalling and a mutational analysis of branching in pea. *Plant Growth Regulation* 32(2-3): 193-203.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I et al. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433(7021): 39-44.
- Booker J, Auldridge M, Wills S, McCarty D, Klee H et al. (2004) MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Current Biology* 14(14): 1232-1238.
- Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jurgens G, Palme K (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413(6854): 425-428.
- Gomez-Roldan V, Feras S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA et al. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455(7210): 189-194
- Hayward A, Stimberg P, Beveridge C, Leyser O (2009) Interactions between Auxin and Strigolactone in Shoot Branching Control. *Plant Physiology* 151(1): 400-412.
- Lazar G, Goodman HM (2006) MAX1, a regulator of the flavonoid pathway, controls vegetative axillary bud outgrowth in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(2): 472-476.
- Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM et al. (2005) The Decreased apical dominance 1/petunia hybrida carotenoid cleavage dioxygenase8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* 17(3): 746-759.
- Sorefan K, Booker J, Haurogne K, Goussot M, Bainbridge K et al. (2003) MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes & Development* 17(12): 1469-1474.
- Stimberg P, van de Sande K, Leyser HMO (2002) MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development* 129(5): 1131-1141.
- Stimberg P, Furner IJ, Ottoline Leyser HM (2007) MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant Journal* 50(1): 80-94.

Thimann KV, Skoog F (1934) On the inhibition of bud development and other functions of growth substances in *Vicia faba*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 114: 317-339.

Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T et al. (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. Nature 455(7210): 195-200.