

UPTAKE AND METABOLISM OF DIHYDROZEATIN AND ZEATIN DURING SHOOT ORGANOGENESIS ON TOBACCO LEAF SEGMENTS *IN VITRO*

PŘÍJEM A METABOLISMUS DIHYDROZEATINU A ZEATINU V SEGMENTECH LISTŮ TABÁKU *IN VITRO*

¹⁾Prokešová Z., ¹⁾Klemš M., ²⁾Motyka V., ¹⁾Procházka S.

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

²⁾ Ústav experimentální botaniky České akademie věd, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6 – Lysolaje, Česká republika.

E-mail: xprokes5@mendelu.cz

ABSTRAKT

Za použití zeatinu (Z) a dihydrozeatinu (DHZ) byl sledován vztah mezi regenerací na segmentech listů tabáku *in vitro* a fyziologickou aktivitou cytokininů aplikovaných do média. Vyšší regenerace byla sledována na segmentech listů transgenního tabáku (cv. Petit Havana SR 1 transformovaného cytokinin specifickou β -glukosidázou Zm-p60.1) v případě indukce organogeneze na médiu se zeatinem. Současně byly během indukční periody sledovány metabolity Z a DHZ za účelem sledování podílu jejich aktivních a neaktivních metabolitů. Přijaté cytokininy byly metabolizovány do ribosidů, ribotidů a glukosidů, přičemž obsah volného zeatinu a jeho metabolitů kromě zeatin-7-glukosidu se snižoval (narozdíl od volného dihydrozeatinu a jeho metabolitů, jejichž obsah se zvyšoval). Současně byla stanovena vyšší aktivita cytokininoxidázy v segmentech listů standardního tabáku a β -glukosidázy v segmentech transgenního tabáku.

Klíčová slova: dihydrozeatin, zeatin, organogeneze, cytokininoxidáza, β -glukosidáza

ABSTRACT

Relationship between regeneration on tobacco leaf segments *in vitro* and activity of cytokinins added to medium was studied by using zeatin (Z) and dihydrozeatin (DHZ). Higher regeneration on transgenic tobacco leaf segments (cv. Petit Havana SR1 transformed with cytokinin specific β -glucosidase Zm-p60.1) was observed in the case of organogenesis on the medium containing zeatin. Concurrently levels of metabolites of Z and DHZ during induction period were aimed to quantification of active and nonactive forms of Z and DHZ. Taken up cytokinins were converted into ribosides, ribotides and glucosids, and the content of free zeatin and its metabolites decreased with the exception of zeatin-7-riboside (in opposite

to increasing of the level of free DHZ and its metabolites). Concurrently the higher activity of CKOX in tobacco leaf segments (wild type) and β -glucosidase activity in transgenic tobacco leaf segments were established.

Keywords: dihydrozeatin, zeatin, organogenesis, cytokininoxidase,.

ÚVOD

Indukce organogeneze *in vitro* probíhá nejčastěji na médiích s vyšším obsahem cytokininů než auxinů (Skoog a Miller 1957), přičemž cytokininy musí být přítomny v aktivních formách (Kamínek 1992). Po příjmu z média jsou metabolizovány a jejich utilizace se tím mění (viz schéma 1; Dobrev, P. 2001). V buňkách se mohou tvořit z prekursorů (nukleotidů a ribosidů) nebo ze zásobních forem (O-glukosidů a 3N-glukosidů).

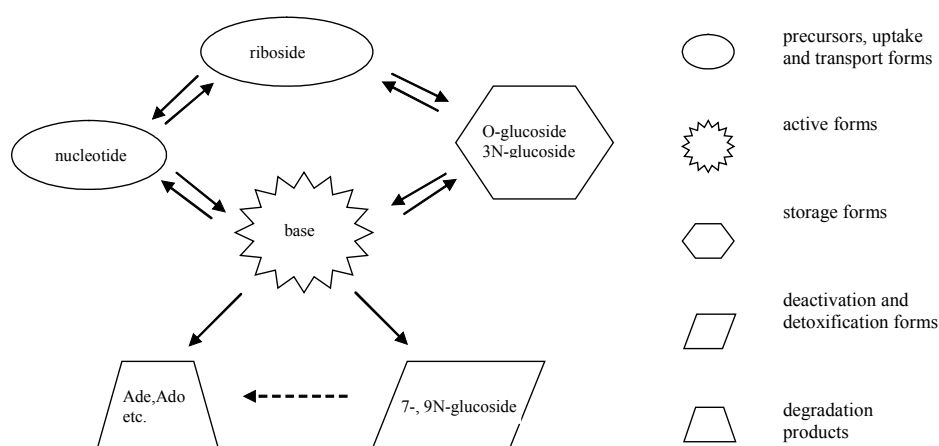


Schéma 1: Dobrev, P. (2001) PhD thesis

Při hydrolýze O-glukosidů CK mají velký význam glukosyl hydrolázy (EC 3.2.1.), mezi něž patří glukosidázy nalezené v bakteriích a eukaryotech, ale i vyšších rostlinách jako například β -glukosidáza Zm-p60 izolovaná z koleoptylí kukuřice (Brzobohatý et al. 1993) se Zm-p60 proteinem lokalizovaným v plastidech (Kristoffersen et al. 2000). Na degradačních procesech izoprenoidních cytokininů (izopentenyladenin a zeatin) se podílejí dehydrogenázy (cytokinin oxidázy; CKX; EC 1.5.99.12), které cytokinin přemění na adenin a 3-methyl-2-butenal (Mok et al. 2001).

Cílem naší práce bylo studium příjmu a metabolismu zeatinu a dihydrozeatinu v segmentech listů transgenního a netransgenního tabáku *in vitro*, sledování fyziologických aktivit použitých cytokininů v regeneraci a určení obsahu β -glukosidázy a cytokininoxidázy.

METODIKA

Pro studium příjmu a metabolismu cytokininů byly použity segmenty ze střední části listů (bez střední žilky) tabáku Petit Havana SR1 a transgenního tabáku Petit Havana SR1 s vneseným genem pro tvorbu cytokinin specifické β -glucosidázy Zmp60.1.

Pro studium tvorby prýtlů byly segmenty listů kultivovány na Petriho miskách na MS médiu s přidavkem $0,09 \mu\text{M}$ 2,4-D a $9 \mu\text{M}$ cytokininu (zeatinu nebo dihydrozeatinu), po pěti dnech byly přeneseny na MS médium bez růstových regulátorů.

Obsah cytokininů byl hodnocen v materiálu odebíraného v intervalech 0, 2, 8, 20 a 48 hodin a 2 týdny z média obsahujícího Z nebo DHZ prostřednictvím LC/MS/MS (Malbeck a Trávníčková 2000) po předchozí purifikaci vzorků.

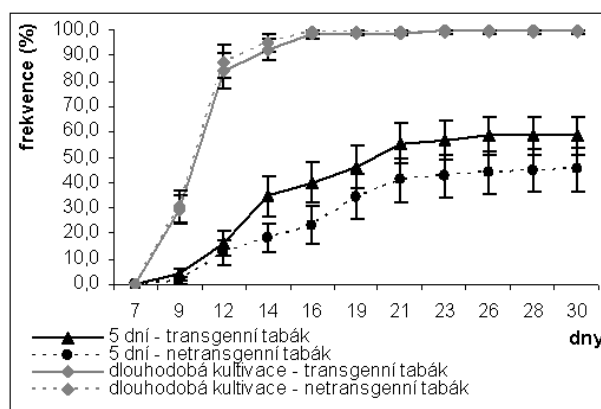
Aktivita β -glucosidázy (Benková et al. 1996) a aktivita cytokininoxidázy (Motyka et al. 1996) byla vyjádřena v U/mg čerstvé hmotnosti bílkovin (Bradfordová 1976).

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny Studentovým t-testem.

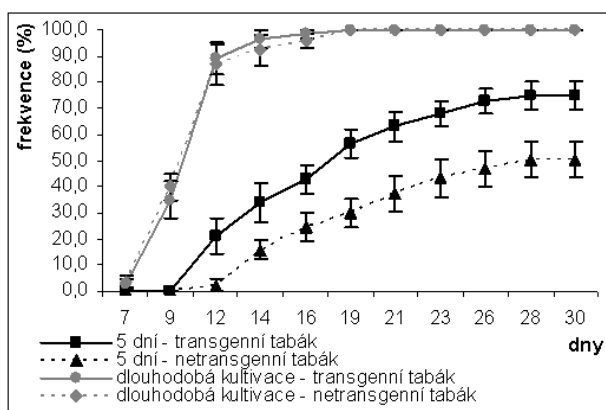
VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky ukazují, že na segmentech listů transgenního tabáku *in vitro* probíhala vyšší tvorba prýtlů než na segmentech standardního tabáku (graf 1 a 2). Krátkodobá indukce organogeneze na médiu se zeatinem byla vyšší na médiu s obsahem zeatinu než s obsahem dihydrozeatinu a dosahovala až 75 %. V organogenezi prýtlů nejsou u transgenního a netransgenního tabáku na obou typech médií při dlouhodobé kultivaci žádné statisticky průkazné rozdíly. Uvedené výsledky potvrzují, že zeatin je aktivnějším cytokininem než dihydrozeatin a dlouhodobá kultivace na cytokininech vede k regeneraci všech explantátů, což souhlasí s již dříve konstatovanými fakty dle Lethama (1963).

Graf 1:
Frekvence organogeneze
prýtlů (%) na segmentech
listů transgenního a
netransgenního tabáku
kultivovaného na médiu
s obsahem DHZ

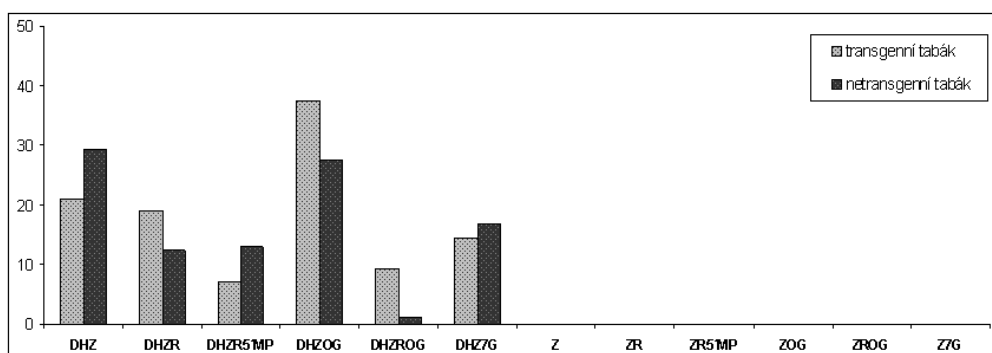


Graf 2:
Frekvence organogeneze
prýtlů(%) na segmentech
listů transgenního a
netransgenního tabáku
kultivovaného na médiu
s obsahem Z



Segmenty listů transgenního tabáku metabolizovaly přijaté cytokininy z jejich aktivních forem rychleji než segmenty standardního tabáku (viz graf 3 a 4). Zeatin přijatý z média se přeměňoval také na dihydrozeatin a jeho metabolity (dihydrozeatinribosid, dihydrozeatinribosid-5-monofosfát, dihydrozeatin-O-glukosid, dihydrozeatinribosid-O-glukosid, dihydrozeatin-7-O-glukosid). Vysoké obsahy 7-glukosidů zeatinu a dihydrozeatinu byly patrně spojeny s přítomností 2,4-D v médiu, neboť Crouch a Van Staden (1995) uvádějí stimulaci činnosti 7-glukosyl-transferázy pod vlivem 2,4-D.

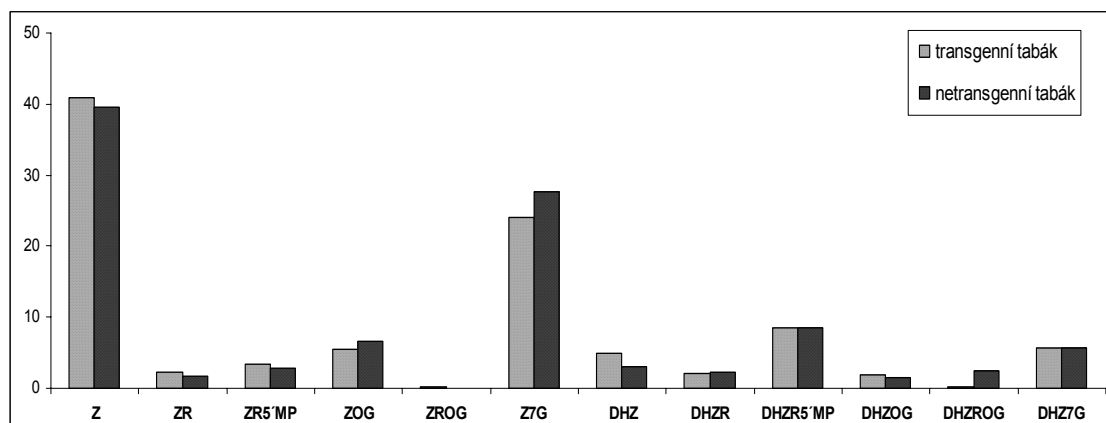
Graf 3: Obsah metabolitů cytokininů (% z celkového množství cytokininů) v segmentech listů tabáku po 48 hodinové kultivaci na médiu s DHZ



Použité zkratky:

trans-zeatin (Z), zeatinribosid (ZR), zeatinribosid-5'-monofosfát (ZR5'MP), zeatin-O-glukosid (ZOG), zeatin-7-glukosid (Z7G), dihydrozeatin (DHZ), dihydrozeatinribosid (DHZR), dihydrozeatinribosid-5'-monofosfát (DHZR5'MP), dihydrozeatin-O-glukosid (DHZOG), dihydrozeatinribosid-O-glukosid (DHZROG), dihydrozeatin-7-glukosid (DHZ7G).

Graf 4: Obsah jednotlivých cytokininů(% z celkového množství cytokininů) v segmentech listů tabáku po 48 hodinové kultivaci na médiu s Z

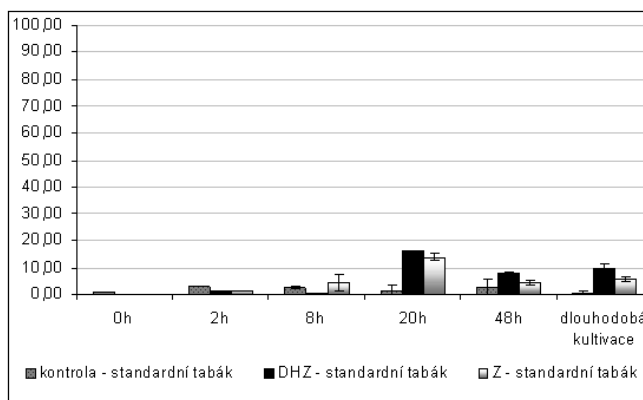


Aktivita β -glukosidázy během indukce na médiu s růstovými regulátory byla u transgenního tabáku vyšší (graf 5 a 6), aktivita cytokininoxidázy nižší oproti standardnímu typu (graf 8).

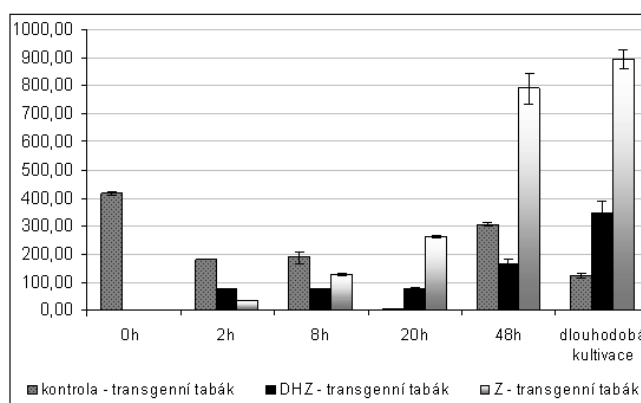
Stanovené vyšší hladiny β -glukosidázy u transgenního tabáku byly očekávány v souvislosti s možnou hydrolýzou O-glukosidů cytokininů uvolňujících volné cytokininy tak, jak to uvádějí Werbrouck et al. (1996). U transgenního tabáku se aktivita β -glukosidázy s délkou kultivace na indukčním médiu zvyšovala výrazněji na médiu s obsahem zeatinu než dihydrozeatinu (graf 6, 7), kdežto u netransgenního se příliš nezměnila (graf 7). Dlouhodobá kultivace měla výrazně pozitivní vliv na aktivitu β -glukosidázy v segmentech kultivovaných na médiu se Z (graf 7).

Obsah endogenních cytokininů transgenního tabáku a také aktivity cytokininoxidázy korelovaly se zvýšenou regenerací explantátů, jak to potvrzují výsledky Auerové et al. (1999), kteří pracovali s rozdílnými liniemi petunie metabolizujícími cytokininy přijaté z média.

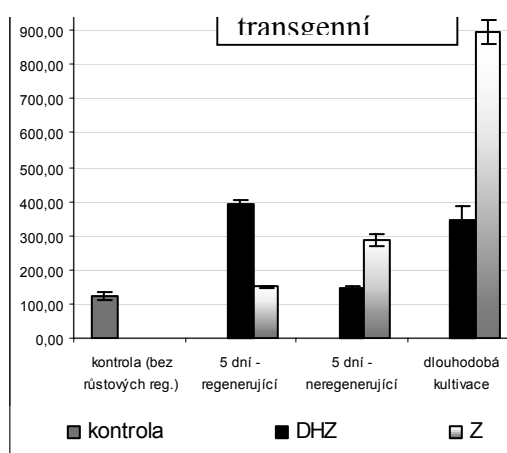
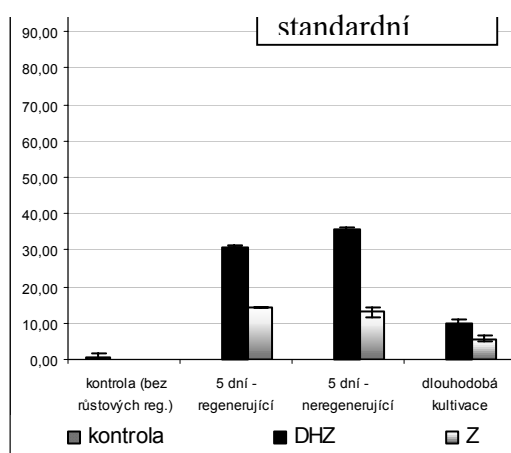
Graf 5:
Aktivita β -glukosidázy
během indukce
v segmentech listů
standardního tabáku
($\mu\text{U}/\text{mg}$ proteinu)

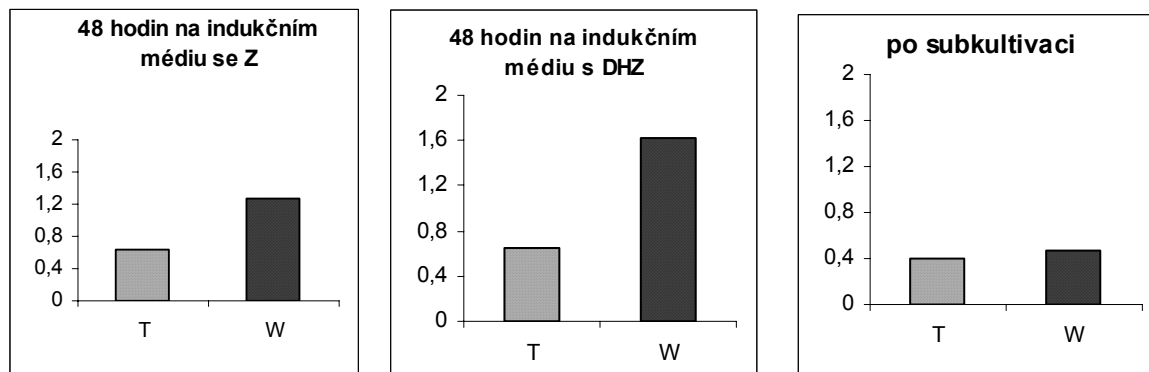


Graf 6:
Aktivita β -glukosidázy
během indukce
v segmentech listů
transgenního tabáku
($\mu\text{U}/\text{mg}$ proteinu)



Grafy 7 a 8: Aktivita β -glukosidázy po 20 dnech v segmentech přenesených po 5 dnech na
a β -glukosidázy po 20 dnech v segmentech přenesených po 5 dnech na médium
médium bez růstových regulatorů a v segmentech dlouhodobě kultivovaných na médium
s růstovými regulátory. ($\mu\text{U}/\text{mg}$ proteinu)





SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Auer CA, Motyka V, Březinová A, et al. (1999): Endogenous cytokinin accumulation and cytokinin oxidase activity during shoot organogenesis of *Petunia hybrida*. *Phys. Plant.* 105 (1): 141-147.
- Benková E, Kolár J, Macháčková I, et al. (1996): Cytokinins in chloroplasts of transgenic tobacco plants producing a cytokinin-glucoside-specific beta-glucosidase. *Chemické listy*, 90 (9): 691-691.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgramme quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., et al. (1993): Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root-meristem. *Science* 262 (5136): 1051 – 1054.
- Crouch, N. R. and Van Staden, J. (1995): Promotion by 2,4-D of 7-glucosylation of benzyladenine in seed-derived and shoot apex-derived cell culture of *Dianthus zeyheri*. *Physiologia Plantarum* 93: 645-660.
- Dobrev, P., Petkov, P., Svetleva, D., Ivanova, A., Djilianov, D., Petkova, S., Atanasov, A. (2001): Analysis of some endogenous plant hormones during induction of somatic embryogenesis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 15 [2] 17-22 (2001).
- Kamínek M. (1992): Progress in cytokinin research. *Trends on Biotech.* 10: 159 – 164.
- Kristoffersen, P., Brzobohatý, B., Hohfeld, I., Bako, L., Melkonian, M. and Palme K. (2000): Developmental regulation of the maize ZM-p60.1 gene encoding a β -glucosidase located to plastids. *Planta* 210: 407 – 415.

- Letham, D. S. (1963): Zeatin, factor inducing cell division from *Zea mays*. *Life Sci* 8, 596-599.
- Malbeck, J. - Trávníčková, A. (2000): Quantitative Analysis of Cytokinins by Liquid Chromatography/Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. In: Proceedings of the 18th Informal Meeting of Mass Spectrometry. - Praha, Spectroscopic Society 2000. - S. 118. [Informal Meeting of Mass Spectrometry/18./. Praha (CZ), 00.04.30-00.05.04]
- Mok, D. W. and Mok, M. C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 89 – 118.
- Motyka V, Faiss M, Strnad M, et al. (1996): Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of *ipt* gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. *Plant Physiol.* 112 (3): 1035-1043.
- Skoog, F., and Miller, C. O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In *The biological action of Growth Substances* (H.K. PORTER, ed.), Acad. Press, New York, 118 – 131.
- Werbrouck, S. P. O., Strnad, M., Van Onckelen, H. A. and Debergh, P. C. (1996): Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture. *Physiol. Plant.* 98: 291 – 297.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory projektu MŠMT ČR FRVŠ 4/167 and Grantové Agentury MZLU IGA 4/4.