

ANALYSIS OF THE DEVELOPMENT OF TRANSGENIC *NICOTIANA TABACUM* SEEDLINGS OVERPRODUCING THE CYTOKININ-GLUCOSIDE SPECIFIC BETA-GLUCOSIDASE ZM-P60.1

Chmelík D.¹, Dubová J.¹, Kiran N.S.², Brzobohatý B.²

¹Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic

²Department of Molecular Biology and Radiobiology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: chmelikd@seznam.cz

ABSTRACT

Reversible glucosylation of zeatin-type cytokinins is important for the homeostasis of active cytokinin (CK) forms at certain developmental stages. Using the zeatin-*O*-glucoside (ZOG)-specific β -glucosidase Zm-p60.1, we have been able to disrupt the zeatin metabolic network during early tobacco seedling development.

The maize β -glucosidase Zm-p60.1 was localized in meristematic root cells of young seedlings of *Zea mays*, it supplements the developing embryo with active CK. This work will deepen our understanding of the phenotype of plants over-expressing the extracellular version of β -glucosidase Zm-p60.1 on medium containing exogenous zeatin. Zm-p60.1 was chosen as a suitable molecular tool for detecting changes in zeatin metabolism.

Transgenic variants of *Nicotiana tabacum* L. over-expressing Zm-p60.1 in the extracellular space were chosen for this work. There were no readily observable morphological differences between transgenic seedlings and wild-type seedlings. When grown on medium containing zeatin, transgenic plants did not accumulate fresh weight as observed in other variants of Zm-p60.1. However, when grown on medium without supplement, transgenic plants were significantly heavier than wild-type three weeks after sowing. RT-PCR confirmed the expression of Zm-p60.1 in transgenic plants. Zm-p60.1 enzyme was histochemically localised in cotyledons, leaves and ectopic structures at the base of the hypocotyl using an indigogenic substrate for β -glucosidase.

Database searches were conducted to look for *N. tabacum* orthologues to Arabidopsis response regulators, the effector molecules in cytokinin signal transduction. We used EST databases (*N. tabacum* L. taxid 4097) and the receiver domain amino acid sequence as a query. Three suitable candidates were found and primers designed to monitor expression of these genes in the transgenic variants mentioned above.

Key words: β -glucosidase, cytokinin metabolism, hormone conjugates, *t*-zeatin, zeatin-*O*-glucoside, extracellular space

Acknowledgments: This work was supported by grant nos. LC06034 from Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic and 204/09/P289 from the Grant Agency of the Czech Republic.

ÚVOD

Cytokinininy (CK) patří mezi klasické rostlinné hormony se schopností vyvolat buněčné dělení spolu s auxinem. Podílejí se na regulaci mnoha fyziologických procesů, jako je diferenciace chloroplastů, příjem a translokace živin, klíčení semen, růst a senescence listů (Haberer a Kieber, 2002). Z chemického hlediska se jedná o *N6*-substituenty adeninu, v závislosti na postranním řetězci se dělí na izoprenoidní a aromatické. Vyjimku tvoří syntetické molekuly difenyl-močoviny, thidiazuronu a jejich deriváty. Nejběžněji jsou zastoupeny CK izoprenoidní z nichž nejjednodušší je isopentenyladenin, jehož hydroxylovaná forma je *t*-zeatin, nejhojněji zastoupen v rostlinách ze všech přirozených CK (Yonekura-Sakakibara a kol., 2004). Rozlišujeme dva izomery zeatinu *cis*- a *trans*-. Inaktivace zeatinu je možná buď konjugací nebo degradací. Zeatin může konjugovat na purinovém kruhu v pozici *N7* a *N9* nebo na OH-skupině izoprenoidního řetězce. *N9* atom je schopný konjugace s glukosou, ribosou a aminokyselinami. Možná je i oxidativní degradace způsobená CK oxidasou/dehydrogenasou a redukce na dihydrozeatin (Mok a Mok, 2001).

Monosacharidový konjugát *t*-Zeatin-*O*-glukosid (ZOG) je rezistentní k působení CK oxidasy/dehydrogenasy a zřejmě slouží jako zásobní a transportní forma zeatinu. *O*-glukosidový konjugát může být převeden na aktivní formu pomocí CK specifické β -glukosidasy (Armstrong, 1994; Letham, 1994). Rostlinný genom kóduje velké rodiny β -glukosidas s různou substrátovou specifitou. Zm-p60.1 reprezentuje doposud nejlépe charakterizovaný enzym vhodný jako molekulární nástroj ke studiu CK *O*-glukosilace v rostlinách. Aplikací zeatin-*O*-glukosid specifické β -glukosidasy Zm-p60.1. během časného vývoje semenáčků, narušíme jejich metabolickou síť (Brzobohatý a kol., 1993; Kiran a kol., 2006).

Cytokininová signální dráha je podobná bakteriální dvoukomponentní signální dráze, tvořenou receptorovou histidin kinázou (HK), fosfotransferovým proteinem (HP) a response regulátorem (RR). CK receptory u *Arabidopsis* jsou hybridní histidin kinázy AHK2, AHK3, AHK4. Obsahují extra-celulární doménu vážící CK – CHASE domain, histidin kinázovou doménu a receiver doménu. HP jsou u *Arabidopsis* kódovány pěti geny, zprostředkovávají vedení signálu od histidin kináz k response regulátorům (Suzuki a kol., 2001).

U *Arabidopsis* najdeme 32 response regulátorů, rozdělených do tří hlavních skupin: typ-A, typ-B a pseudo-response regulátory. Typ-A je tvořen jednoduchou receiver doménou obsahující konzervovanou oblast s motivem D-D-K, kde druhý aspartátový zbytek získává fosforylovou skupinu z fosfotransmiteru (Hwang a kol., 2002; Kakimoto ,2003). Pouze typ-A je transkripčně regulován cytokinininy, a negativně reguluje svojí vlastní CK indukovanou expresi. Odpověď na CK nastává do deseti minut a vrcholí do 40 min (Brandstatter a Kieber, 1998). Typ-B má velkou

N-terminální receiver doménu následovanou velkým C-terminálním rozšířením bohatým na glutamin (transkripčně aktivační funkce) a obsahujícím GARP DNA-vázací doménu (Hosoda a kol., 2002). Mnoho typ-B regulátorů se ukázalo jako pozitivní regulátory typ-A ARR (Hwang a Sheen, 2001; Sakai a kol., 2000). Pseudo-response regulátory mají atypickou receiver doménu bez D-D-K motivu (Hutchison a Kieber, 2002).

MATERIÁL A METODIKA

Rostlinný materiál

Byly zvoleny transgenní linie rostliny *Nicotiana tabacum* L. B10.8 a B10.7 nadprodukující cytokinin specifické β -glukosidasy. Pro tyto linie je konečným úložištěm β -glukosidasy extracelulární prostor. Jako kontrolní varianta byl zvolen *Nicotiana tabacum* cv Petit Havana SR1.

Růstové medium a podmínky kultivace

Na každou Petriho misku bylo vyseto deset semínek transgenní linie a deset z SR1. Semínka byla vyseta na živné MS medium s přísadkou 15g.l⁻¹ sacharózy, 2,5 μ M *t*-zeatin a 0,8% agaru pro ztužení. Misky byly umístěny do kultivační komory ve vertikální poloze a inkubovány za konstantních podmínek při režimu 8h světlo/16h tma; 21/19 °C, den/noc; a při osvětlení 80 μ mol fotonů na m⁻².s⁻¹. Jednotlivé odběry byly po 14, 21, 28 a 32 dnech po vysetí (DAS). U jednotlivých odběrů byla nejprve stanovena FW a získaný materiál byl podroben dalším analýzám (CK analýza, imunolokalizace, histochemické barvení β -glukosidasy, RT PCR).

Stanovení přítomnosti β -glukosidasy

K histochemické detekci β -glukosidasy bylo použito dvoustupňové indigogenní reakce využívající jako substrát 5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glukopyranosid (X-Glc). Barvicí směs obsahovala 0,4 M citrát-fosfát pufru (ph 5,6), 500 μ M K₄[Fe(CN)₆], 500 μ M K₃[Fe(CN)₆] a 0,1 mg.ml⁻¹ X-Glc. Semenáčky byly barvivem prosycovány 3 x 5 min ve vakuu a následně inkubovány čtyři hodiny při 30 °C. Po inkubaci byly semenáčky opláchnuty ve vodě a odbarveny 70% ethanolom.

K potvrzení overexprese extracelulární β -glukosidasy Zm-p60.1 u zvolených linií sloužilo RT-PCR. Jako loading-control byl použit tubulin.

Hmotnostní analýza – stanovení čerstvé hmotnosti (FW)

Pro tuto analýzu byly pěstovány rostliny na výše zmíněném mediu (MS) a i na mediu s přísadkou zeatinu (Z). Semenáčky byly váženy po pěti. Po zvážení došlo k jejich hlubokému zamražení v tekutém dusíku a následnému uložení do mrazícího boxu pro pozdější CK analýzu.

Vyhledávání v EST databázích

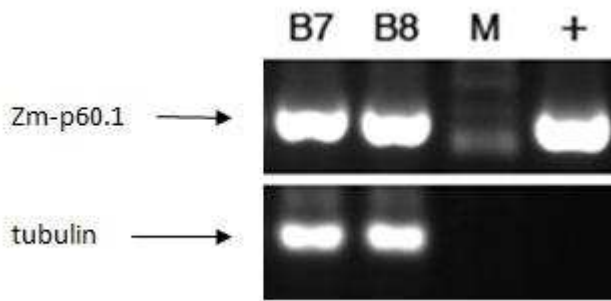
MENDELNET 2010

Postup pro vyhledávání tabákových ortologů k typu-A Arabidopsis response regulatorů (ARRs) byl zvolen podle Cortizo a kol., 2010, kteří stejným postupem hledali typ-A response regulátory u *Pinus pinea* L. K vyhledávání bylo použito šest předloh ARRů – ARR3, ARR4, ARR5, ARR6, ARR7, ARR15. U těchto šesti proteinů byl na aminokyselinové úrovni stanoven sekvenční konsenzus. Největší shoda byla v oblasti úseku receiver domény, charakteristické konzervované aminokyselinové zbytky D-D-K, které jsou konzervované ve všech response regulátorech. Vyhledávání proběhlo v EST databázích *N. tabacum taxid 4097* pomocí protokolu tblastn na NCBI, hledána byla konzervovaná oblast receiver domény s konzervovanými zbytky D-D-K.

VÝSLEDKY A DISKUZE

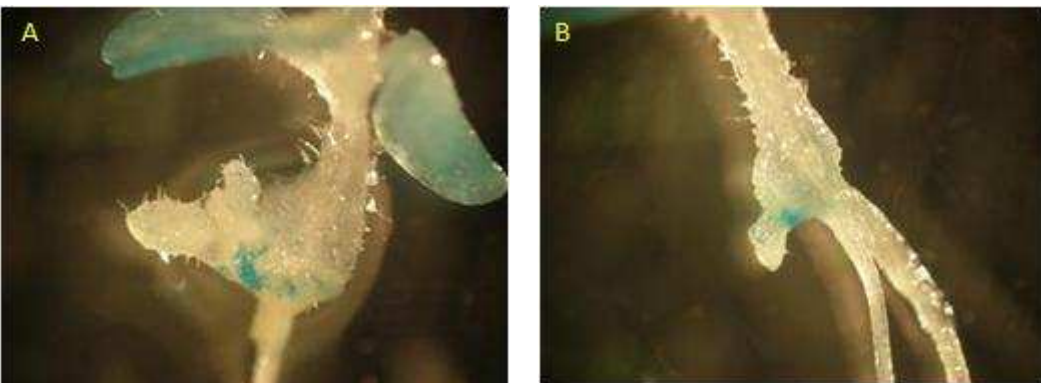
Monitorování exprese

Na základě výsledků RT-PCR extracelulární Zm-p60.1 byla zjištěna stejná hladina exprese u obou analyzovaných variant (Obr.1).



Obr. 1. RT-PCR extracelulární Zm-p60.1 - Výrazné proužky odpovídají Zm-p60.1 cDNA přítomné pouze u transformantů (B10.8, B10.7) Jako kontrola byla použita amplifikace tubulinové cDNA.

Na médiu s přidavkem zeatinu došlo u transgenních i standartních rostlin kolem 21 dne růstu k formování ektopických výrůstků v oblasti báze hypokotylu, které již 28 den byly znatelně viditelné. Vývoj těchto výrůstků byl u transgenních variant pokročilejší než u SR1. V této oblasti byla na základě indigogeního histochemického barvení používající X-Glc, prokázána přítomnost enzymu Zm-p60.1 (Obr. 2A, 2B). Spojení mezi hypokotylem a kořenem je jedno z míst akumulace auxinů (Ni a kol., 2001) a současná dostupnost aktivních cytokininů může vést k aditivnímu efektu na jeho vývoj (Rashotte a kol., 2005). To může být možnou příčinou proč ektopické struktury vznikají v tomto místě (Kiran a kol., 2006). Dále byla Zm-p60.1 u linií B10.8 a B10.7 detekována v listech, zde však bez morfologického projevu. Listy obvykle neakumulují auxin a tak nedochází k tvorbě ektopických výrůstků jako u hypokotylu.



Obr.2. – Histochemické barvení β -glukosidasy Zm-p60.1 u semenáčků *N. tabacum L.*, 28DAS.

(A, B)-transgenční linie akumulující Zm-p60.1 extracelulárně

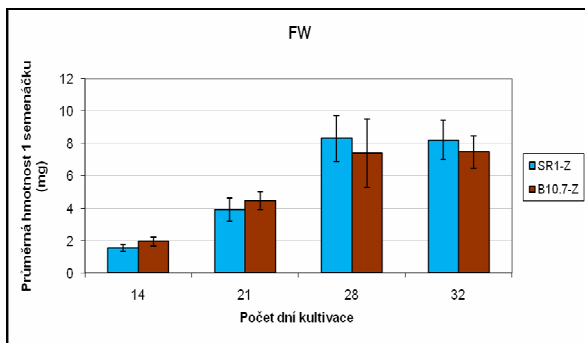


Obr.2. – Histochemické barvení β -glukosidasy Zm-p60.1 u semenáčků *N. tabacum L.*, 28DAS. (C) - SR1, detail stonkové apikální části; (D) – SR1, detail báze hypokotylu. Žádné viditelné indigogenní zbarvení \rightarrow Zm-p60. Inení v rostlině přítomná

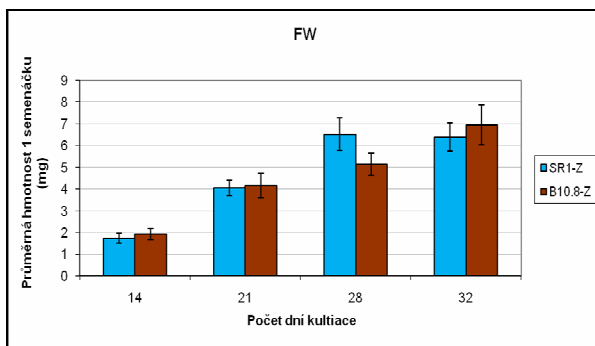
Fenotypová analýza

Linie B10.8 a B10.7 rostoucí na Z mediu nevykazovaly žádné signifikantní rozdíly v čerstvé hmotnosti v porovnání s SR1 (Obr. 3A, 3B).

Obr. 3A. FW linie B10.7 pěstované na Z mediu

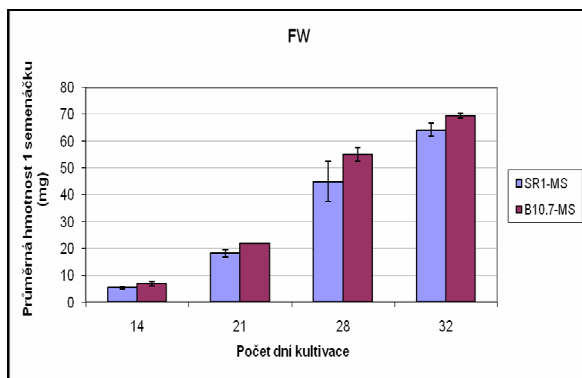


Obr. 3B. FW linie B10.8 pěstované na Z mediu

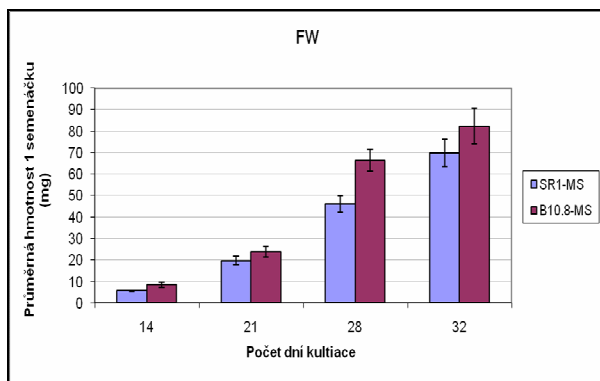


Během kultivace extracelulárních linií na MS mediu byl již pozorován statisticky významný signifikantní rozdíl nárůstu FW mezi transgenními liniemi a SR1 (Obr.4A, 4B).

Obr.4A. FW linie B10.7 pěstované na MS mediu



Obr.4b. Fw linie b10.8 pěstované na MS mediu

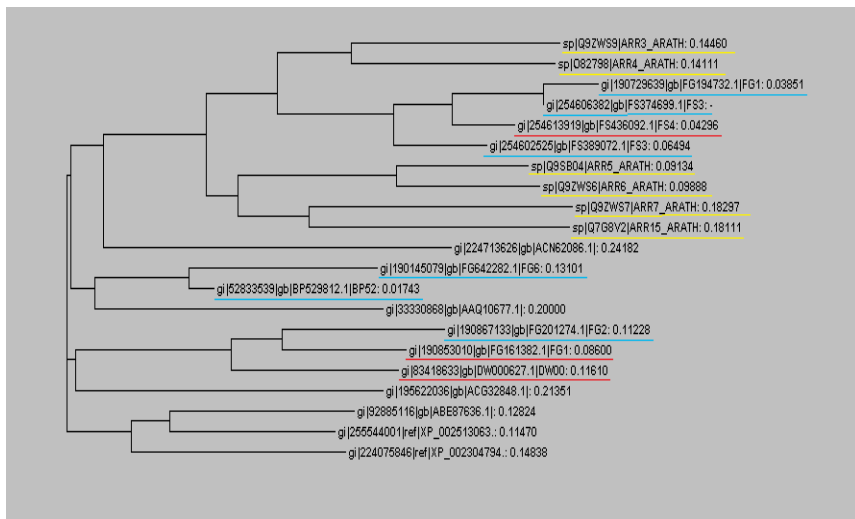


Stejný trend nárůstu FW u dvou nezávislých linií pěstovaných na MS je pravděpodobně způsoben schopností transgenických linií převadět pomocí extracelulární Zm-p60.1 větší množství zeatin-O-glukosid na aktivní zeatin, rostliny tedy disponují větším množstvím aktivního zeatinu oproti SR1. Tento jev není pozorovatelný při kultivaci na Z mediu, neboť přirozený metabolický nárůst cytokininů během kultivace je zastíněn exogenně přidaným zeatinem již od počátku kultivace.

Vyhledávání v EST databázích

Na základě vyhledaných výsledků pomocí protokolu **tblastn** bylo vybráno devět možných kandidátů (gi|83418633, gi|52833539, gi|190853010, gi|190729639, gi|190867133, gi|190145079, gi|254606382, gi|254606382, gi|254602525, gi|254613919) jako ortologů k šesti zvoleným typ-A ARRs. Pro vybrané EST byl charakteristický různý stupeň konzervovanosti. Získané EST byly porovnány na základě nukleotidových sekvencí s konzervovanou oblastí receiver domény typ-A response regulátorů (Obr.5), pomocí nástroje **ClustalW2**. Následkem tohoto alignmentu došlo k vyloučení šesti (gi|52833539, gi|190729639, gi|190867133, gi|190145079, gi|254606382, gi|254602525) z devíti kandidátů. U gi|190729639, gi|190145079, gi|254606382, gi|254602525 nebyl zachován aminokyselinový motiv v oblasti konzervovaného lysinu. U gi|52833539 a gi|190867133 byl pozorován frame-shift krátce po konzervovaném lysinu, jehož důsledkem byla koncová část receiver domény těchto dvou sekvencí odlišná od hledaného původního aminokyselinového konsenzu.

Pro zbylé kandidáty (gi|83418633, gi|190853010, gi|254613919) charakteristické vysokým stupněm konzervovanosti byly navrženy primery za účelem monitorování exprese genů výše zmíněných linií. Pro gi|254613919 bylo navíc nutné navrhnout forward primer s vazebným místem pro enzym HIND III nebo ECOR I, protože tento EST nemá stop kodon, který je nutné dohledat.



Obr. 5 Fylogenetický strom sestavený na základě alignmentu z vybraných typ-A response regulátorů: *Arabidopsis thaliana* (sp|Q9ZWS9, sp|O82798, sp|Q9SB04, sp|Q9ZWS6, sp|Q9ZWS7, sp|Q7G8V2), *Catharantus roseus* (gi|33330868), *Medicago truncatula* (gi|92885116), *Populus trichocarpa* (gi|224075846), *Ricinus communis* RR8 (gi|255544001), *Zea mays* (gi|195622036), *Nicotiana tabacum* L. (gi|83418633, gi|52833539, gi|190853010, gi|254613919, gi|190729639, gi|190145079, gi|254606382, gi|254602525, gi|190867133).

Položky podtržené žlutě jsou typ-A response regulátorů *Arabidopsis thaliana*, modré podtržení zvýrazňuje položky vyřazené z prvního souboru výsledků získaných na základě hledání pomocí tblastn , červeně jsou podtržené finálně vybrané položky s nejvyšším stupněm konzervovanosti receiver domény. Položky bez podtržení byly vybrány na základě práce Cortizo a kol.,2010.

ZÁVĚR

Z výše diskutovaných výsledků lze odvodit: I mírný nárůst zeatinu v extracelulárním prostoru může mít signifikantní vliv na nárůst hmotnosti extracelulárních variant semenáčků, z čehož plyne, že Zm-p60.1 je aktivní i v extracelulárním prostoru. U těchto variant lze z morfologického hlediska nalézt Zm-p60.1 na bázi hypokotylu a v listech.

Předpokládá se, že se zvýšenou expresí Zm-p60.1, dochází k pozměnění i CK metabolismu. S touto změnou souvisí pravděpodobně i změna exprese response regulátorů u transgenních variant v porovnání s SR1. Tento jev se snažíme dokázat pomocí vyhledávání tabákových ortologů k ARR5.

LITERATURA

- Brandstatter I, Kieber J.J. (1998): Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1009-1020.
- Cortizo M., Álvarez J.M., Rodríguez A., Fernández B., Ordás R.J. (2010): Cloning and characterization of a type-A response regulator differentially expressed during adventitious shoot formation in *Pinus pinea* L. *Journal of Plant Physiology*, 167: 1023-1026.
- Haberer G, Kieber J.J. (2002): Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiology* 128, 354–362.
- Hosoda K., Imamura A., Katoh E., Hatta T., Tachiki M., Yamada H., Mizuno T., Yamazaki T. (2002): Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators. *Plant Cell* 14: 2015-2029.
- Hutchison C.E., Kieber J.J. (2002): Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: S47-59.
- Hwang I., Sheen J. (2001): Two-component circuitry in *Arabidopsis* signal transduction. *Nature* 413: 383-389.
- Hwang I., Chen H-C, Cheen J. (2002). Two-component signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129:500-515.
- Kakimoto T. (2003): Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 605-627.
- Nagavalli S. Kiran, Lenka Polanská, Radka Fohlerová, Pavel Mazura, Martina Válková, Miloslav Šmeral, Jan Zouhar, Jiří Malbeck, Petre I. Dobrev, Ivana Macháčková a Břetislav Brzobohatý (2006): Ectopic over-expression of the maize b-glucosidase. Zm-p60.1 perturbs cytokinin homeostasis in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No. 4, pp. 985–996.
- Ni DA, Wang LJ, Ding CH, Xu ZH. (2001): Auxin distribution and transport during embryogenesis and seed germination of *Arabidopsis*. *Cell Research* 11, 273–278.
- Sakai H., Aoyama T., Oka A. (2000): *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J.* 24: 703-711.
- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. (2001): The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinin. *Plant Cell Physiol.* 42: 107-113.
- Rashotte A.M., Chae H.S., Maxwell B.B., Kieber J.J. (2005): The interaction of cytokinin with other signals. *Physiol. Plant.* 123: 184-194.
- Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to *cis*-zeatin. *Plant Physiol.* 134: 654-661.