

AXILLARY BUD OUTGROWTH AFTER DECAPITATION IN PEA CAN BE BASED ON THE CANALIZATION OF AUXIN

VYRASTANIE AXILÁRNEHO PUPEŇA PO DEKAPITÁCII U HRACHU
MÔŽE BYŤ PODMIENENÉ KANALIZÁCIOU AUXÍNU

Medved'ová Z.¹, Balla J.^{1,2}, Procházka S.¹

¹CEITEC - Central European Institute of Technology, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: zuzana.medvedova@mendelu.cz

ABSTRACT

Initiation of bud outgrowth in pea (*Pisum sativum* L.) after release from the apical dominance by removal of the dominant apex is accompanied by polar auxin transport. Following decapitation the axillary buds establish directional auxin export by subcellular polarization of PIN1 auxin transporters. Competition between two lateral auxin sources after removal the primary source and application of auxin efflux inhibitor, and furthermore, influence of length of the decapitated stem stump on gene expression in axillary buds was studied. Application of auxin efflux inhibitor (NPA, TIBA) to the second axillary bud of decapitated plants reduces bud outgrowth. Inhibition of outgrowth of the second axillary bud in these plants caused outgrowth of the first bud. This competition between the second and first axillary buds is associated with changes in expression profiles of *AUX1*, *PIN1* and *DRM1* genes. These results support the competitive canalization theory, by which canalization of auxin from the lateral auxin source is possible only if the primary source is removed or weakened. Length of the decapitated stem stump may affect timing of changes in expression of *AUX1*, *PIN1* and *DRM1* genes in the second axillary bud and hence the timing of bud outgrowth initiation after removal of the dominant apex. The signal for axillary bud outgrowth therefore could be the auxin decrease or depletion in the stem.

Key words: polar auxin transport, *Pisum sativum* L., bud outgrowth

Acknowledgments: This work was supported by the project "CEITEC - Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

ÚVOD

Rastlinný hormón auxín je nevyhnutný pre ovplyvňovanie rôznych vývojových procesov v rastlinách a podstatnú úlohu má i v apikálnej dominancii. Apikálna dominancia je fyziologický jav charakterizovaný ako nadvláda vrcholu stonky nad postrannými pupeňmi, ktorým zabraňuje vo vyrastaní (Cline, 1997). Pre udržanie apikálnej dominancie je nevyhnutný polárny transport auxínu, ktorý je produkovaný z väčšej časti v apikálnej oblasti rastliny a transportovaný v stonke bazipetálne (Ongaro a Leyser, 2008). Polárny transport auxínu je v bunkách sprostredkovaný pomocou proteínových prenášačov AUX1 a PIN1, ktoré sú v rastlinách hrachu (*Pisum sativum* L.) kódované génni *PsAUX1* a *PsPIN1*. AUX1 proteín umožňuje vstup auxínu do bunky, PIN1 proteín naopak zabezpečuje výstup auxínu z bunky (Vieten et al., 2007), pričom smerovanie auxínového toku je podmienené predovšetkým subcelulárnou lokalizáciou PIN1 proteínu (Wisniewska et al., 2006). Auxínový tok repolarizuje bunky v smere jeho prúdenia a formuje nové vaskulárne spojenia pozdĺž týchto buniek (Sauer et al., 2006).

Pokiaľ sú založené dva zdroje auxínu, dochádza medzi nimi ku kompetícii, pričom jeden zdroj môže inhibovať tvorbu kanálu pre auxín zo zdroja druhého, na čom je založená teória kompetitívnej kanalizácie. U rastlín, ktoré majú vyvinutú silnú apikálnu dominanciu, prítomnosť primárneho auxínového zdroja zabraňuje počas vývoja rastliny exportu a kanalizácii auxínu zo sekundárneho zdroja. Kanalizácia auxínu z axilárneho pupeňa alebo z laterálneho zdroja auxínu je možná len v prípade, ak je primárny zdroj odstránený či oslabený (Balla et al., 2011). Po odstránení apikálneho vrcholu dekapitáciou dochádza k vyrastaniu axilárnych pupeňov. Pupene sú po výstupe z inhibície schopné syntetizovať vlastný auxín, čím sa stávajú jeho novým zdrojom. Tento proces je sprevádzaný zmenou v expresii génov ako je *PsPIN1* a *PsAUX1* kódujúcich prenášače auxínu i zmenou v expresii génu *PsDRM1*, ktorý je spojený s dormantným stavom pupeňa (Stafstrom et al., 1998). Výrazný auxínový export, ktorý vznikne na základe polarizácie PIN1 transportných prenášačov formuje auxínové transportné kanály a následne vaskulárne zväzky, ktoré sú potrebné pre sústavný rast pupeňa (Balla et al., 2011).

Polárny transport auxínu môže byť špecificky blokovaný kyselinou 2,3,5-trijódbenzoovou (TIBA) alebo 1-N-naftylftalámovou (NPA). Inhibitory polárneho transportu auxínu sú dôležitý nástroj pre štúdium jeho funkcie vo vývoji rastlín, čo bolo sledované i v tejto práci. Narušujú výstup auxínu z bunky bez toho aby interagovali so samotnými prenášačmi (Geldner et al., 2001).

MATERIÁL A METODIKA

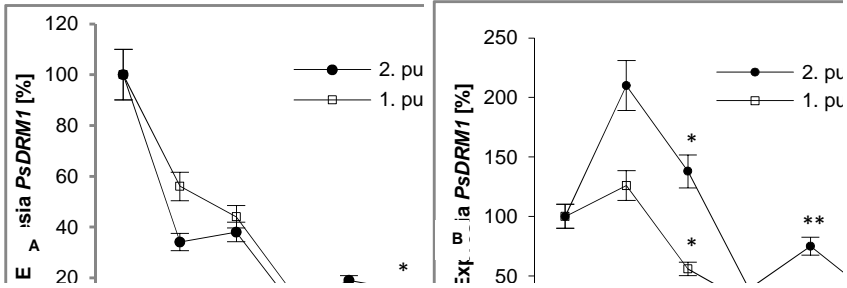
Pre jednotlivé experimenty boli použité sedem dní staré rastliny hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) odroda Vladan dopestované v podmienkach klimaboxu pri teplote 20/18 °C a fotoperióde 16/8 hod (deň/noc). Na druhý axilárny pupeň bola nanosená 1% kyselina 1-N-naftylftalámová (NPA) alebo 1% kyselina 2,3,5-trijódbenzoovou (TIBA) v lanolínovej paste v závislosti na experimente. Po aplikácii NPA/TIBA boli rastliny dekapitované 10 mm nad ošetrovaným pupeňom. Pre stanovenie expresie génov transportných proteínov auxínu boli odoberané ošetrované druhé axilárne pupene a neošetrené prvé axilárne v časových intervaloch po aplikácii NPA/TIBA a dekapitácii.

Vplyv dĺžky ponechanej dekapitovanej stonky, a tým aj vyprázdnenia auxínu zo stonky na zmenu expresie transportných proteínov auxínu v axilárnych pupeňoch bol tiež sledovaný na rastlinách hrachu. Pre prvý variant boli rastliny dekapitované tesne nad druhým axilárnym pupeňom a pre druhý variant boli rastliny dekapitované 60 mm nad druhým axilárnym pupeňom. Pre stanovenie génovej expresie boli odoberané druhé axilárne pupene u oboch variantov v časových intervaloch po dekapitácii.

V závislosti na experimente bola z axilárnych pupeňov dekapitovaných rastlín za použitia produktu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Nemecko) izolovaná celková RNA. RNA bola metódou dvojkrokovej semikvantitatívnej RT-PCR najprv reverznou transkripciou prepísaná na cDNA. Prepis izolovanej celkovej RNA na cDNA a následná amplifikácia PCR produktu bola vykonaná pomocou kitu Enhanced Avian HS RT-PCR Kit (Sigma-Aldrich, USA). Pre vlastnú PCR boli použité špecifické primery sledovaných génov *PsAUX1*, *PsPIN1* a *PsDRM1*. PCR produkty boli rozdelené pomocou agarózovej elektroforézy a elektroforeogramy produktov PCR boli vyhodnotené pomocou počítačového programu. Vlastné experimenty boli vykonané v štyroch opakovaniach. Získané priemerné hodnoty expresie génov v jednotlivých časoch boli normalizované na expresiu konštitutívneho génu *Psβ-tubulín* a výsledné hodnoty boli prepočítané na percentá vzťahujúce sa na expresiu kontrolných rastlín jednotlivých variantov. Štatisticky významné rozdiely boli identifikované pomocou t-testu ($\alpha=0,05^*$ a $\alpha=0,01^{**}$).

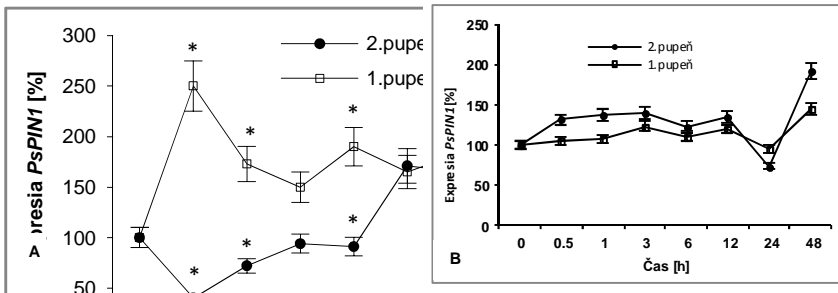
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe izolovanej RNA bolo zistené, že po aplikácii 1% NPA na druhý axilárny pupeň dochádza v tomto pupeni k miernejšiemu poklesu expresie v porovnaní s neošetreným prvým pupeňom. V priebehu 6 hodín od dekapitácie klesne hladina *PsDRM1* mRNA 20-krát a po 12 hodinách je takmer nedetekovateľná (Stafstrom et al., 1998). Napriek tomu, že rastliny boli dekapitované, v ošetrovaných druhých pupeňoch bola expresia *PsDRM1* zaznamenaná vo všetkých časových intervaloch po odstránení apikálneho vrcholu (obr. 1A). Výrazný pokles však bol sledovaný v neošetrených prvých axilárnych pupeňoch, v ktorých expresia klesla nulovým hodnotám. Podobný expresný profil *PsDRM1* bol zistený i u rastlín, u ktorých bola na druhý axilárny pupeň aplikovaná 1% TIBA. TIBA viedla k výraznejšiemu poklesu expresie *PsDRM1* v prvom neošetrenom pupeni v porovnaní s pupeňom z rastlín ošetrovaných NPA (obr. 1B).



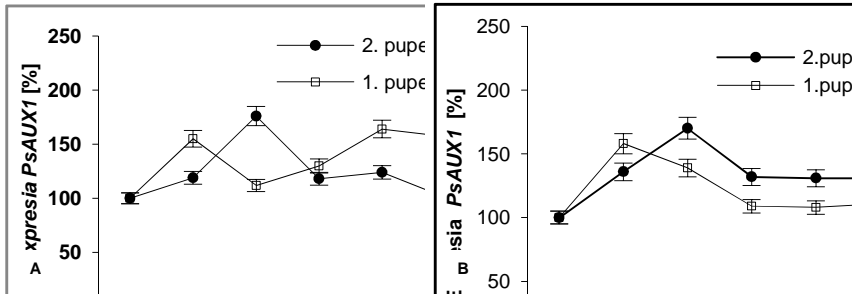
Obr. 1: Expresia génu *PsDRM1* v neošetrenom prvom axilárnom pupeni a v druhom pupeni ošetrenom 1% NPA (A) alebo 1% TIBA (B).

V prípade génu *PsPIN1* bol zaznamenaný len mierny nárast expresse v ošetrených pupeňoch 1% NPA, pričom sa expresia po 12 hodinách od aplikácie NPA a dekapitácie začala znižovať. Naopak v neošetrených pupeňoch bol zistený podstatne vyšší nárast expresse *PsPIN1* (obr. 2A). Vzhľadom na to, že auxín sám o sebe spolu s bunkovo špecifickými faktormi pozitívne ovplyvňuje transkripciu *PIN* (Vieten et al., 2005), v aktivovanom pupeni dochádza k transportu auxínu, a tak aj k zvyšovaniu expresse *PsPIN1*. Aj keď takto významný rozdiel v expresii *PsPIN1* medzi ošetreným a neošetreným pupeňom v porovnaní s NPA nebol sledovaný po aplikácii TIBA i v tomto prípade bola expresia v ošetrenom pupeni na nízkej úrovni a nedochádzalo k významnému nárastu (obr. 2B).



Obr. 2: Expresia génu *PsPIN1* v neošetrenom prvom axilárnom pupeni a v druhom pupeni ošetrenom 1% NPA (A) alebo 1% TIBA (B).

Rovnako ani v expresii génu *PsAUX1* v druhých axilárnych pupeňoch ošetrených NPA či TIBA nedochádzalo po dekapitácii rastlín k významnému nárastu. U rastlín, u ktorých bola aplikovaná NPA bol v neošetrených prvých pupeňoch zistený stály nárast expresse (obr. 3A). U variantu s TIBA podobne ako v prípade génu *PsPIN1* nebol zaznamenaný výrazný nárast expresse *PsAUX1* v prvom pupeni, avšak ani v druhom pupeni (obr. 3B).

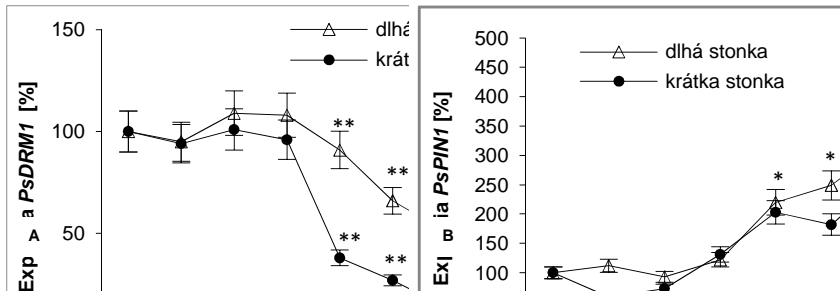


Obr. 3: Expresia génu *PsAUX1* v neošetrenom prvom axilárnom pupení a v druhom pupení ošetrenom 1% NPA (A) alebo 1% TIBA (B).

Z uvedených výsledkov vyplýva, že v skorých časových intervaloch po dekapitácii génová expresia nespôsobuje jednoznačnú aktiváciu ošetreného ani neošetreného pupeňa. Zistená expresia génov v axilárnych pupeňoch však poukazuje na to, že medzi prvým a druhým pupeňom ako potenciálnymi zdrojmi auxínu dochádza po dekapitácii ku kompetícii. Na základe toho je možné predpokladať, že aj po aplikácii NPA alebo TIBA na druhý axilárny pupeň je do neho prenesený signál o odstránení primárneho zdroja auxínu (apexu), rovnako ako aj do pupeňa prvého. Aj keď by ošetrený druhý pupeň mohol byť týmto signálom aktivovaný k rastu, NPA či TIBA v ňom inhibujú polárny transport auxínu, a tým aj podstatne redukujú vyrastanie ošetreného pupeňa v neskorších časových intervaloch po dekapitácii. V dôsledku toho dochádza k vyrastaniu prvého neošetreného pupeňa, ktorý sa stáva novým primárnym zdrojom auxínu. Toto je v súlade s teóriou kompetitívnej kanalizácie. Po dekapitácii sa zvyšuje hladina endogénnej IAA v axilárnom pupení u hrachu medzi 2 až 6 hodinami (Balla et al., 2002), pričom auxín je dostatočný signál pre indukciu expresie *PIN1* a polarity v kompetentných pletivách, ktoré sa následne diferencujú na nové vaskulárne spojenia pozdĺž *PIN1* značeného auxínového kanálu (Sauer et al., 2006). Následne dochádza k spojeniu nového auxínového zdroja s centrálnym vodivým systémom stonky, pričom tvorba nových auxínových kanálov je spojená so zmenami v expresii transportných auxínových proteínov ako je *PsPIN1* a *PsAUX1* (Balla et al., 2011). NPA i TIBA blokuje tok auxínu, a tým aj diferenciaciu vaskulárnych elementov (Yoshida et al., 2005).

Dekapitácia spôsobuje rýchly pokles expresie *PsPIN1* i *PsAUX1* v stonke, čo je spôsobené vyprázdňovaním auxínu zo stonky a poklesom jeho hladiny v dôsledku absencie jeho zdroja (Hoshino et al., 2005; Kitazawa et al., 2008). Po 4 až 6 hodinách od odstránenia apexu je indukovaný rast pupeňa (Morris et al., 2005), ktorý sa môže stať novým primárnym zdrojom auxínu. Vzhľadom na to, že auxín je v stonke transportovaný rýchlosťou $1\text{cm}\cdot\text{hod}^{-1}$, je možné po dekapitácii predpokladať rýchlejšiu aktiváciu axilárneho pupeňa u rastlín, ktoré majú apikálny vrchol odstránený tesne nad pupeňom, než u rastlín, kde je ponechaná 60 mm stonka, čo bolo tiež sledované v tejto práci. Po odstránení apikálneho vrcholu bolo zaznamenané rýchlejšie znižovanie expresie génu *PsDRM1* vo variante, v ktorom boli rastliny dekapitované tesne nad druhým axilárnym pupeňom, než vo variante, v ktorom bola ponechaná 60 mm dekapitovaná stonka

(obr. 4A). Rozdiel medzi variantmi bol približne 3 hodiny. Podobný rozdiel v expresii bol zistený i v prípade expresie génu *PsPIN1*, pričom k rýchlejšiemu nárastu expresie dochádzalo u rastlín dekapitovaných tesne nad pupeňom druhého nodu (obr. 4B). Výsledky ukazujú, že dĺžka ponechanej dekapitovanej stonky nad pupeňom môže ovplyvniť rýchlosť zmien v génovej expresii po odstránení apikálneho vrcholu, a tým aj rýchlosť iniciácie rastu axilárneho pupeňa, ktorý začína fungovať ako nový primárny zdroj auxínu.



Obr. 4: Expresia génu *PsDRM1* (A) a génu *PsPIN1* (B) v axilárnom pupeňi dekapitovaných rastlín

ZÁVER

Modelová rastlina hrach má geneticky podmienenú silnú apikálnu dominanciu. Po dekapitácii dochádza k vyrastaniu postranných pupeňov, čo je spojené i so zmenou génovej expresie v axilárnych pupeňoch. Jeden z vyrastajúcich pupeňov preberá funkciu dekapitovaného apikálneho vrcholu, stáva sa novým primárnym zdrojom auxínu a na základe kompetície bráni transportu auxínu zo sekundárneho zdroja auxínu.

Pokiaľ bola pred dekapitáciou na druhý axilárny pupeň aplikovaná kyselina 1-N-naftyftalómová (NPA) alebo kyselina 2,3,5-trijódbenzoová (TIBA) ako inhibítor polárneho transportu auxínu, vyrastanie druhého axilárneho pupeňa bolo významne redukované. Následne však bolo sledované vyrastanie prvého axilárneho pupeňa. Tento proces bol spojený so zmenami v expresii génov *PsPIN1* i *PsAUX1* kódujúcich transportné prenášače auxínu a génu *PsDRM1* súvisiacim s dormantným stavom pletív v rastline. Vzhľadom na to, že apikálny vrchol ako primárny zdroj auxínu bol odstránený a druhý axilárny pupeň ako nový potenciálny primárny zdroj auxínu bol v dôsledku aplikácie NPA alebo TIBA inhibovaný, úlohu primárneho zdroja auxínu prebral prvý axilárny pupeň, čo je v súlade s teóriou kompetitívnej kanalizácie auxínu.

Zmeny v expresii génov *PsPIN1*, *PsAUX1* i *PsDRM1* v axilárnom pupeňi po dekapitácii môžu byť ovplyvnené dĺžkou ponechanej dekapitovanej stonky. Dĺžka dekapitovanej stonky preto môže mať vplyv aj na rýchlosť iniciácie rastu axilárneho pupeňa, ktorý sa po odstránení apikálneho vrcholu stane novým primárnym zdrojom auxínu. Toto naznačuje, že signálom pre vyrastanie pupeňa môže byť pokles koncentrácie auxínu v stonke alebo jeho vyprázdnenie zo stonky.

LITERATÚRA

- Balla J., Blažková J., Reinohl V., Procházka S. (2002): Involvement of auxin and cytokinins in initiation of growth of isolated pea buds. *Plant Growth Regulation*, 38: 149 – 156.
- Balla J., Kalousek P., Reinohl V., Friml J., Procházka S. (2011): Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth. *The Plant Journal*, 65: 571-577.
- Cline M. G. (1997): Concepts and terminology of apical dominance. *American Journal of Botany*, 84 (9): 1064–1069.
- Geldner N., Friml J., Stierhof Y. D., Jurgens G., Palme K. (2001): Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413: 425-428.
- Hoshino T., Hitotsubashi R., Miyamoto K., Tanimoto E., Ueda, J. (2005): Isolation of PsPIN2 and PsAUX1 from etiolated pea epicotyls and their expression on a three-dimensional clinostat. *Space life sciences*, 36 (7): 1284 - 1291.
- Kitazawa D., Miyazawa Y., Fuji N., Hoshino A., Iida S., Nitasaka E., Takahashi H. (2008): The gravity-regulated growth of axillary buds is mediated by a mechanism different from decapitation-induced release. *Plant Cell Physiology*, 49(6): 891–900.
- Morris S. E., Cox M. C. H., Ross J. J., Krisantini S., Beveridge CH. A. (2005): Auxin dynamics after decapitation are not correlated with the initial growth of axillary buds. *Plant Physiology*, 138: 1665-1672.
- Ongaro V., Leyser O. (2008): Hormonal control of shoot branching. *Journal of Experimental Botany*, 59 (1): 67–74.
- Sauer M., Balla J., Luschnig CH., Wisniewska J., Reinohl V., Friml J., Benková E. (2006): Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes and Development*, 20: 2902-2911.
- Stafstrom J. P., Ripley B. D., Devitt M. L., Drake B. (1998): Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. *Planta*, 205: 547-552.
- Vieten A., Sauer M., Brewer P., Friml J. (2007): Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in Plant Science*, 12 (4): 160-168.
- Wisniewska J., Xu J., Seifertová D., Brewer P. B., Ružička K., Blilou I., Rouquié D., Benková E., Scheres B., Friml J. (2006): Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, 312: 883.
- Yoshida S., Kuriyama H., Fukuda H. (2005): Inhibition of transdifferentiation into tracheary elements by polar auxin transport inhibitors through intracellular auxin depletion. *Plant Cell Physiology*, 46 (12): 2019–2028.