



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unraveling the auxin mechanism in 2,4-D induced somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*

Philipsen, C.

Citation

Philipsen, C. (2017, March 30). *Unraveling the auxin mechanism in 2,4-D induced somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/47238>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/47238>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/47238> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Philipsen, Cheryl

Title: Unraveling the auxin mechanism in 2,4-D induced somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*

Issue Date: 2017-03-30

Samenvatting

Vegetatieve vermeerdering van planten vindt veelal plaats door middel van stekken, waarbij cellen door een dedifferentiatie fase moeten gaan om vervolgens weer te herdifferentiëren tot wortel- of scheutvormende cellen. Een alternatieve methode van vegetatieve vermeerdering is somatische embryogenese (SE), waarbij in een enkele stap van een wortel-scheut as, een vasculair systeem en functionele meristemen worden geproduceerd. In de modelplant *Arabidopsis thaliana* (zandraket) kan SE efficiënt geïnduceerd worden door onrijpe zygotische embryos (immature zygotic embryos, IZE) te incuberen op SE inductie medium (SEIM) met een hoge concentratie van het auxine analoog 2,4-dichlorofenoxyazijnzuur (2,4-D). Tijdens SE worden somatische cellen “geherprogrammeerd” tot totipotenten cellen, waaruit vervolgens wordt opnieuw een embryo-identiteit wordt aangenomen, waarna somatische embryo ontwikkeling volgt. Het genetische en moleculaire mechanisme verantwoordelijk voor de initiatie van SE door 2,4-D is nog niet volledig opgehelderd en was het doel van dit promotieonderzoek.

Hoofdstuk 2 beschrijft de ontwikkeling van een gestandaardiseerd systeem voor SE initiatie en uitgroei van somatische embryo's met behulp van 12 dagen oude *Arabidopsis* IZEs. In dit systeem werd *pWOX2::NLS-YFP* gebruikt als een marker voor het aanduiden van de embryo identiteit in cellen en de eerste *WOX2-YFP* gemarkeerde cellen waren zichtbaar na 5 tot 7 dagen in kweek op SEIM. Opvallend was dat deze gemarkeerde clusters van cellen gelokaliseerd waren in regio's van een lage auxine response., Cellen gelegen naast deze SE initiatie regio's met een lage auxine response, tonen expressie van *AUX1* influx eiwitten, wat de suggestie wekt dat de lage auxine concentratie regio's vereist voor het genereren van SE initiatie veroorzaakt worden door een verhoogde opname in de aangrenzende cellen. *aux1 lax* verlies-van-functie mutante IZEs toonden een verhoogde scheut/wortel-regeneratie, ten koste van SE, en experimenten met behulp van blokkers voor cellulair auxine transport benadrukten de belangrijke rol voor auxine influx eiwitten in de initiatie van SE, terwijl de auxine efflux eiwitten enkel van belang lijken te zijn tijdens de ontwikkeling van het embryo later tijdens SE.

Hoofdstuk 3 is toegewijd aan de rol van auxine biosynthese in SE. Door een combinatie van chemische biologie, genetica en markers te gebruiken is de Trp-afhankelijke biosynthese route tijdens 2,4-D geïnduceerde SE initiatie ontrafeld. De meest bekende Trp-afhankelijke route is de indole-3-pyruvic acid (IPyA) route waarin twee enzymatische stappen Trp successievelijk naar IPyA en IPyA naar IAA converteren. De eerste enzymatische stap wordt uitgevoerd door de TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1 / TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED1-4 (TAA1/TAR1-4) enzym familie. De tweede stap door

de YUCCA1-11 (YUC1-11) enzym familie. Histologische analyse in combinatie met het gebruik van YUC of TAA1/TAR specifieke inhibitoren suggereert dat YUC activiteit cruciaal is voor de overleving van IZE overleving tijdens de weefselweek fase en voor de latere ontwikkeling van het somatische embryo, en dat de TAA1/TAR enzymen nodig zijn voor het genereren van een dynamische auxine response, welke de cel deling tijdens SE initiatie te aanstuurt.

In **Hoofdstuk 4** is wederom een combinatie van chemische biologie, genetica en promoter marker lijnen gebruikt om de componenten van de auxine response in kaart te brengen die een rol spelen in 2,4-D geïnduceerde SE in *Arabidopsis* IZEs. Door het blokkeren van het co-receptor complex TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB) met de auxine antagonist auxinole lieten we zien dat dit co-receptor complex vereist is voor SE initiatie. Aanvullend vonden we dat de activatie van AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) zuster paren ARF7/19 en ARF6/8 beide vereist zijn voor efficiënte SE initiatie. Aanvullend vonden we dat SE bijna volledig geïnhibeerd is in de semi-dominante *solitary root-1* (*slr-1*) mutant. Deze bevindingen suggereerden dat 2,4-D geïnduceerde SE en laterale wortel ontwikkeling in *Arabidopsis* dezelfde auxine response module gebruiken. De auxine response mutanten die een SE deficiënt fenotype hadden, ontwikkelden ook minder 2,4-D geïnduceerde wortel callus. Dit suggereert dat dit wortel callus fenotype gebruikt kan worden om mutanten te voorselecteren voor SE. Op basis van onze resultaten, stellen wij een SE initiatie model voor waarin *SLR/IAA14*-gereguleerde dynamische auxine responsen zijn vereist om voor zowel laterale wortel als voor somatische embryogene cel differentiatie te bewerkstelligen en voor de daaropvolgende celdelingen welke de ontwikkeling starten van laterale wortels en somatische embryo's.

In conclusie stellen wij dat laterale wortel ontwikkeling vergelijkbaar is met SE initiatie op het gebied van de in beide systemen vereiste auxine maximum gevolgd door een auxine minimum, En dat beide processen worden gestuurd door de *SLR/IAA14* module. Aanzienlijk werk is nog nodig om de processen die worden aangestuurd door *SLR/IAA14* te ontrafelen. Deze processen bevatten mogelijk de regulatie van auxine biosynthese door TAA1/TAR en de gecoördineerde expressie van AUX/LAX transporters welke de dynamische auxine response reguleren die leidt tot SE initiatie.

