

## EKSPRESJA GENÓW SYNTAZY SACHAROZOWEJ I PIROFOSFORYLAZY UDP-GLUKOZY W LIŚCIACH *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. W WARUNKACH ZMIENNEGO POZIOMU FOSFORU I SACHAROZY<sup>1</sup>

Iwona Ciereszko<sup>1</sup>, Leszek Kleczkowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

<sup>2</sup>Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet w Umea, Szwecja

### Wstęp

Badania prowadzone w ostatnich latach wskazują na sacharozę oraz fosforan nieorganiczny (Pi) jako czynniki regulujące ekspresję wielu genów. Deficyt fosforu stymuluje m.in. transkrypcję genu odpowiedzialnego za syntezę wakuolarnych fosfataz, podwyższa ekspresję genów kodujących transportery Pi w korzeniach roślin, genów kodujących rybonukleazy, genu  $\beta$ -glukozydazy oraz genu odpowiedzialnego za syntezę karboksylazy PEP [CIERESZKO 2000].

Przy niedoborze fosforu często obserwowano nagromadzenie cukrów w tkankach roślin. Wzrost zawartości cukrów może wynikać ze zwiększonej aktywności enzymów syntetyzujących sacharozę, zmian w transporcie asymilatów, a także wzmożonego rozkładu sacharozy i jednocześnie obniżonej fosforylacji heksoz i niższej intensywności oddychania w warunkach niedoboru Pi [RYCITER, RANDALL 1994; CIERESZKO i in. 1996; CIERESZKO, BARBACHOWSKA 2000]. Nadmiar cukrów może powodować represję genów kodujących białka uczestniczące w procesie fotosyntezy, natomiast niedobór glukozy czy sacharozy wzmagają ekspresję tychże genów [KOCH 1996]. Stwierdzono, że współdziałanie Pi i sacharozy regulowało gen kodujący pirofosforylazę ADP-glukozy, lecz nie wpływało na syntezę karboksylazy/oksygenazy RuBP [NIELSEN i in. 1998]. Niedobór fosforu wzmagał natomiast ekspresję genu kodującego pirofosforylazę UDP-glukozy oraz indukował zarówno poziom białka jak i aktywność tego enzymu [CIERESZKO i in. 2001]. Pirofosforylaza UDP-glukozy łącznie z syntazą sacharozy uczestniczą w produkcji UDP-glukozy w tkankach roślinnych, prekursora syntezy m.in. sacharozy, celulozy, pektyn czy  $\beta$ -glukanu.

Celem pracy było porównanie ekspresji *Ugp*, genu kodującego pirofosforylazę UDP-glukozy oraz *Sus1*, kodującego syntazę sacharozową, w warunkach zmiennej żywienia fosforanowego oraz podwyższonego poziomu cukrów.

---

<sup>1</sup> Badania dotowane ze środków Komitetu Badań Naukowych (6 P04C 019 20).

## Materiał i metody

Materiałem doświadczalnym były liście rzodkiewnika, *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. (Columbia). Rośliny uprawiono 5–6 tygodni na mieszance ziemi, torfu i perlitu (2 : 1 : 1), a następnie przenoszono na pożywkę płynną pełną (+P) lub bez fosforu (-P) [CIERESZKO i in. 1996]. Mutanty *pho1* (z obniżoną zawartością fosforu w liściach) i *pho2* (akumulujące Pi w pędach) oraz rośliny kontrolne rosły przez okres 8–9 tygodni na mieszance ziemi, torfu i perlitu w fitotronie (fotoperiod 10/14 h, promieniowanie fotosyntetycznie czynne – PAR 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , temp. 23/19°C, wilgotność 80%).

Zawartość fosforu nieorganicznego i cukrów w liściach oznaczano wg CIERESZKO i in. [2001]. D-mannoza, sacharoza, glukoza, sorbitol, mannitol, PEG oraz Pi podawane były do uciętych liści wraz z prądem transpiracyjnym. Po 10–12 h ekspozycji w ciemności materiał mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp. -80°C. Analizę ekspresji genów *Ugp* i *Sus1*, kodujących pirofosforylaze UDP-glukozy i syntazę sacharozową przeprowadzono metodą Northern blotting wg [SAMBROOK i in. 1989] z modyfikacjami [CIERESZKO i in. 2001].

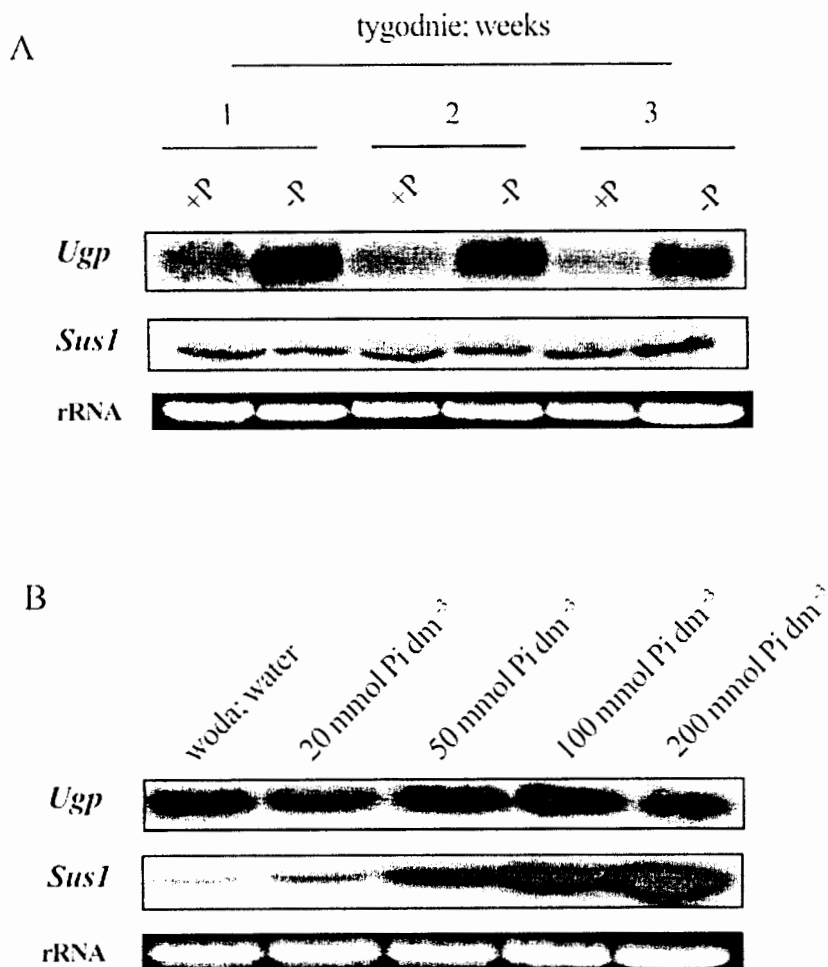
## Wyniki i dyskusja

Niedobór fosforu w pożywkę (-P) zwiększał ekspresję *Ugp*, genu kodującego pirofosforylaze UDP-glukozy, lecz nie wpływał na poziom *Sus1*, genu kodującego syntazę sacharozową (rys. 1A). Zwiększoną ekspresję *Ugp* obserwowano również w liściach mutantu *pho1* (z deficytem fosforu w pędach), (rys. 3). Egzogennie podawany do liści Pi (20–200  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) stymulował *Sus1*, najsilniej przy stężeniu 200  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  i nie zmieniał ekspresji *Ugp* (rys. 1B).

Podawanie D-mannozy (związku obniżającego cytozolową pulę Pi) z prądem transpiracyjnym do liści wzmagало ekspresję obu genów, jednak *Ugp* stymulowane było przez znacznie niższe stężenie D-mannozy (5  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) niż *Sus1* (10  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) sugerując, iż w przypadku *Sus1* indukcja ekspresji nie była spowodowana deficytem Pi lecz innymi czynnikami (dane nieprzedstawione). Ekspresja genów kodujących pirofosforylaze UDP-glukozy oraz syntazę sacharozową znacząco wzrastała po podaniu do liści sacharozy (100  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ); ekspresja *Sus1* wzrastała również po podaniu glukozy (100  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), mannitolu (100  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) i PEG-6000 (6%), co wskazuje na zależność ekspresji tego genu nie tylko od cukrów, ale i związków zwiększających ciśnienie osmotyczne w tkankach roślin (rys. 2A). Największy wzrost ekspresji *Ugp* obserwowano po podaniu sacharozy 150  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , podczas gdy ekspresja *Sus1* wzrastała wraz ze wzrostem stężenia cukru i była najwyższa po podaniu sacharozy 300  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (rys. 2B). Zależny od sacharozy wzrost ekspresji *Ugp* był hamowany po podaniu do liści kwasu okadaikowego (ang. – okadaic acid, 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), inhibitora fosfataz, natomiast ekspresja *Sus1* była znacząco indukowana przez ten inhibitor (dane nieprzedstawione).

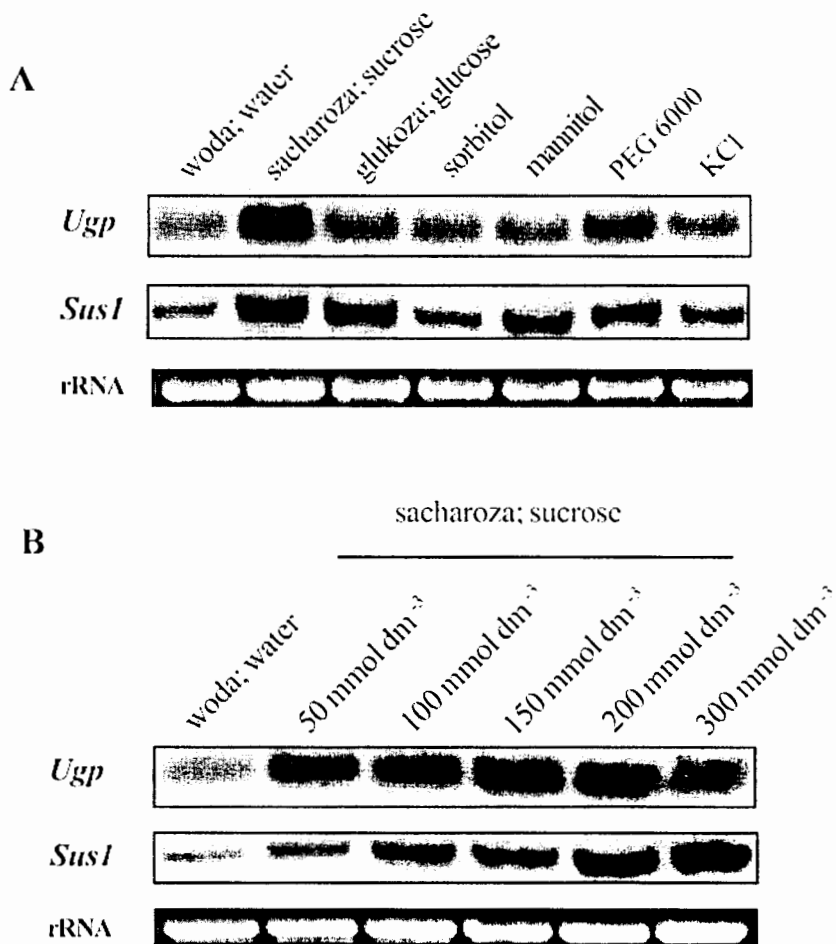
Podkarmienie sacharozą (20  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) liści mutantów *pho1* zwiększało ekspresję *Ugp* i *Sus1* w podobnym stopniu jak u roślin dzikiego typu (rys. 3). Podanie sacharozy 100  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  do liści mutantu *pho2* (akumulator fosforu) w niewielkim stopniu wpływało na ekspresję *Ugp* natomiast ekspresja *Sus1* wzrastała silniej niż u roślin kontrolnych (dane nieprzedstawione). W liściach mutantu *pho1*

zawartość Pi stanowiła jedynie 15% kontroli, podczas gdy liście *pho2* zawierały 2,5-krotnie więcej Pi niż rośliny kontrolne. Zawartość glukozy i sacharozy w liściach mutantu *pho1* (przed podkarmieniem) była nieco niższa niż w liściach roślin dzikiego typu, natomiast poziom skrobi wzrastał ponad 2-krotnie (dane nieprzedstawione). Zawartość cukrów w liściach *pho2* była podobna jak u roślin kontrolnych.



Rys. 1. Wpływ poziomu Pi na zawartość transkryptów *Ugp* i *Sus1* w liściach *Arabidopsis thaliana*. (A) RNA ekstrahowano z liści roślin rosnących przez okres 1–3 tygodni na pożywkach płynnych, pełnej (+P) i bez fosforu (-P) (rośliny 6–8 tygodniowe). (B) RNA ekstrahowano z liści, którym podawano wraz z prądem transpiracyjnym roztwory Pi (20–200 mmol·dm<sup>-3</sup>) przez 12 godz. ciemności

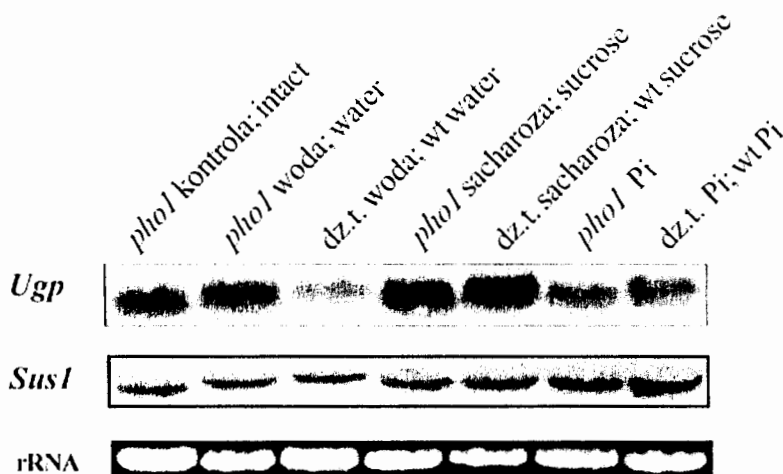
Fig. 1. Effects of Pi status on the content of *Ugp* and *Sus1* transcripts in *Arabidopsis thaliana* leaves. (A) Effect of growth on the Pi-deficient liquid media – total RNA was extracted from mature leaves of 6–8 – week-old plants that were grown for 1–3 weeks on +P or -P nutrient media (B) Effects of Pi treatment – total RNA was extracted from mature leaves that were fed with different concentrations of Pi (20–200 mmol·dm<sup>-3</sup>) for 12 h in the dark



Rys. 2. Regulacja ekspresji *Ugp* i *SusI* w liściach *Arabidopsis thaliana* przez cukry. (A) Wpływ sacharozy, glukozy, sorbitolu, KCl (podanych w stężeniach 100 mmol·dm<sup>-3</sup>) oraz 6% PEG i mannitolu 150 mmol·dm<sup>-3</sup>. (B) Wpływ różnych stężeń sacharozy (50–300 mmol·dm<sup>-3</sup>). Wszystkie roztwory podawano egzogenicznie do uciętych liści przez 10 h w ciemności

Fig. 2. Sugar regulation of *Ugp* and *SusI* expression in *Arabidopsis thaliana* leaves. (A) Effects of sucrose, glucose and osmotic agents. Sucrose, glucose, sorbitol and KCl were applied at 100 mmol·dm<sup>-3</sup> each, and mannitol and PEG 6000 – at 150 mmol·dm<sup>-3</sup> and 6%, respectively. (B) Effects of various concentrations of sucrose (50–300 mmol·dm<sup>-3</sup>). Excised leaves were fed with sugars/osmotic agents in the dark for 10 h

Uzyskane wyniki sugerują udział różnorodnych mechanizmów w regulacji ekspresji *Ugp* i *SusI*, w zależności od czynnika indukującego zmiany. Zmiany w puli Pi oraz w stężeniu sacharozy przekazywane są prawdopodobnie odmiennymi drogami, lecz na pewno ściśle związane są z procesami aklimatyzacji roślin do wielu czynników środowiskowych.



Rys. 3. Wpływ mutacji obniżającej poziom Pi na ekspresję *Ugp* i *Sus1* w liściach *Arabidopsis* podkarmianych sacharozą ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) i Pi ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), (5 godz. w ciemności). RNA ekstrahowano z dojrzałych liści mutantów *pho1* i roślin dzikiego typu (dz.t.)

Fig. 3. Effects of mutations affecting Pi-status on the contents of *Ugp* and *Sus1* transcripts in *Arabidopsis* leaves fed with sucrose ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) or Pi ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), (5 h in the dark). Total RNA was extracted from mature leaves of *pho1* plants, and from leaves of wild-type grown on soil

### Wnioski

1. Niedobór fosforu stymuluje ekspresję *Ugp*, genu kodującego pirofosforylazę UDP-glukozy w liściach *Arabidopsis thaliana*, natomiast nie ma wpływu na ekspresję *Sus1*, genu kodującego syntazę sacharozową.
2. Zarówno *Ugp* jak i *Sus1* są stymulowane przez egzogennie podawaną sacharozę, ekspresja *Sus1* jest również zależna od związków zwiększających ciśnienie osmotyczne.
3. Stymulacja ekspresji genów *Ugp* i *Sus1* jest spowodowana głównie podawaniem egzogennych cukrów, w mniejszym stopniu zależy od wewnętrznego stężenia cukrów.
4. W regulacji ekspresji *Ugp* i *Sus1*, zależnej od cukrów, uczestniczą prawdopodobnie fosfatazy białkowe typu 1 (PP1) i 2A (PP2A).

### Literatura

- CIERESZKO I. 2000. *Wzrost i metabolizm roślin w warunkach deficytu fosforu*. Kosmos 49: 179–189.
- CIERESZKO I., BARBACHOWSKA A. 2000. *Sucrose metabolism in leaves and roots of*

bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *J. Plant Physiol.* 156: 640–644.

CIERESZKO I., GNIAZDOWSKA A., MIKULSKA M., RYCHTER A.M. 1996. Assimilate translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *J. Plant Physiol.* 149: 343–348.

CIERESZKO I., JOHANSSON H., HURRY V., KLECKOWSKI L.A. 2001. Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and *pho* mutants of *Arabidopsis*. *Planta* 212: 598–605.

KOCH K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 509–540

NIELSEN T.H., KRAPP A., RÖPER-SCHWARZ U., STITT M. 1998. The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. *Plant Cell Environ.* 21: 443–454.

RYCHTER A.M., RANDALL D.D. 1994. The effect of phosphate deficiency on carbohydrate metabolism in bean roots. *Physiol. Plant.* 91: 383–388.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

**Słowa kluczowe:** *Arabidopsis thaliana*, cukry, deficyt Pi, pirofosforylaza UDP-glukozy, syntaza sacharozowa

### Streszczenie

Badano wpływ Pi oraz cukrów na ekspresję genów kodujących pirofosforylazę UDP-glukozy (*Ugp*) oraz syntazę sacharozową (*Sus1*) w liściach rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L. HEYNH.). Niedobór fosforu zwiększał ekspresję *Ugp* lecz nie wpływał na poziom transkryptu *Sus1*. Egzogennie podawany do liści Pi (20–200 mmol·dm<sup>-3</sup>) stymulował *Sus1* i nie zmieniał ekspresji *Ugp*. Podawanie D-mannozy z prądem transpiracyjnym do liści wzmagało ekspresję obu genów, jednak *Ugp* stymulowane było przez znacznie niższe stężenie D-mannozy niż *Sus1*.

Ekspresja genów kodujących pirofosforylazę UDP-glukozy oraz syntazę sacharozową znacząco wzrastała po podaniu do liści sacharozy; ekspresja *Sus1* wzrastała również po podaniu glukozy, mannitolu i PEG. Podkarmienie sacharozą liści mutantu *pho1* (z deficytem fosforu w pędzie) zwiększało ekspresję *Ugp* i *Sus1* w podobnym stopniu jak u roślin dzikiego typu. Podanie sacharozy do liści mutantu *pho2* (akumulator fosforu) w niewielkim stopniu wpływało na ekspresję *Ugp* natomiast ekspresja *Sus1* wzrastała silniej niż u roślin kontrolnych. Zależny od sacharozowego wzrost ekspresji *Ugp* był hamowany po podaniu do liści kwasu okadaikowego, inhibitora fosfataz, natomiast ekspresja *Sus1* była indukowana przez ten inhibitor.

Uzyskane wyniki sugerują udział różnorodnych mechanizmów w regulacji ekspresji *Ugp* i *Sus1*, w zależności od czynnika indukującego zmiany.

EXPRESSION OF SUCROSE SYNTHASE AND UDP-GLUCOSE  
PYROPHOSPHORYLASE GENES IN THE LEAVES  
OF *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. AS AFFECTED  
BY PHOSPHATE/SUGAR STATUS

Iwona Ciereszko<sup>1</sup>, Leszek Kleczkowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Physiology, Institute of Biology,  
The University of Białystok, Białystok

<sup>2</sup> Umel Plant Science Centre, Department of Plant Physiology,  
Umeå University, Umeå, Sweden

Key words: *Arabidopsis thaliana*, sucrose synthase, Pi deficiency, UDP-glucose pyrophosphorylase, sugars

### Summary

The effect of inorganic phosphate (Pi) level and carbohydrate/osmotic status on expression of genes encoding UDP-glucose pyrophosphorylase (*Ugp*) and sucrose synthase (*Sus1*) were investigated in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. leaves. Phosphate deficiency strongly induced *Ugp* gene expression and had no influence on the level of *Sus1* transcript in the leaves of *Arabidopsis*. Feeding leaves with Pi, at the concentration of 20–200 mmol·dm<sup>-3</sup>, increased *Sus1* expression and had no significant effect on *Ugp* transcript level.

Genes for UDP-glucose pyrophosphorylase and sucrose synthase were found to be strongly regulated by sugar and sugar/osmoticum, respectively. The increase of *Ugp* and *Sus1* expression after feeding of sucrose to the leaves of *pho1* mutant of *Arabidopsis* was not significantly higher than the transcripts level in wild-type plants. Sucrose, exogenously provided to the leaves of *pho2* mutant had lower effect on *Ugp* transcript level than in wild-type plants, however *Sus1* upregulation was higher in *pho2* than in w-t. Sucrose-related induction of *Ugp* was inhibited by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases; on the other hand, *Sus1* expression was enhanced after okadaic acid treatment.

The obtained results suggest that *Ugp* and *Sus1* genes expression, both P-modulated and sugar/osmoticum-dependent, are regulated *via* distinct sensing mechanisms and distinct signaling pathways and are closely involved in homeostatic readjustments of plant responses to environmental stresses.

Dr Iwona Ciereszko  
Instytut Biologii  
Uniwersytet w Białymstoku  
Świerkowa 20b  
15-950 BIAŁYSTOK  
e-mail: icier@uwb.edu.pl