

CHARACTERIZATION OF ARABIDOPSIS THALIANA LINE WITH T-DNA INSERTION IN THE INOSITOL POLYPHOSPHATE 5-PHOSPHATASES8 GENE

N.S. KUSHWAH

Indian Council of Agricultural Research-National Institute of Plant Biotechnology, Pusa Campus, New Delhi-110 012, India
E-mail: Neetu.Kushwah@icar.gov.in

Inositol polyphosphate 5-phosphatases (5Tase) are the important enzymes of the phosphatidylinositol (PI) signaling pathway and have been found to play important roles in plant growth, development, and stress responses. Most of the Arabidopsis genes encoding Inositol polyphosphate 5-phosphatases have been characterised. However, promoters of genes encoding Inositol polyphosphate 5-phosphatases of plants have not been characterized so far. Here, we report the characterization of Arabidopsis thaliana SALK mutant lines having T-DNA insertion in the upstream intergenic region of the Inositol polyphosphate 5-phosphatases8 (At5Tas8) gene. The location of T-DNA insertion in the SALK line was confirmed by PCR, and plant homozygous and hemizygous for the T-DNA insertion were identified. The homozygous plants were observed for the morphological difference as well as for the root phenotype. However, no significant morphological differences were observed in the mutant and wild-type plants. The expression analysis using qRT-PCR revealed a similar level of At5Tase8 transcript in the mutant and wild-type plants suggesting T-DNA insertion lies beyond the At5Tase 8 promoter. In silico analysis of the 3000 bp sequence upstream of the translation start site covering the T-DNA insertion site has revealed the presence of potential cis-regulatory elements for heat, light, drought, salt, sugar, and hormone. Besides, most predicted cis-elements were located downstream of the T-DNA insertion site, further supporting that the promoter of At5Tase8 lies within the 2738 bp sequence upstream of the translation start site. Further study is required to delineate the At5Tase8 promoter using promoter-reporter fusion in the transgenic Arabidopsis.

Key words: Arabidopsis/At5Tase8/SALK T-DNA insertion line/qRT-PCR/Promoter.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІНІЇ ARABIDOPSIS THALIANA ЗІ ВСТАВКОЮ Т-ДНК У ГЕН ІНОЗИТОЛ ПОЛІФОСФАТ 5-ФОСФАТАЗИ 8

Інозитол поліфосфат-5-фосфатази (5Тази) є важливими ферментами фосфатидилінозитолового (ФІ) сигнального шляху і відіграють важливу роль у рості,

розвитку та стресових реакціях рослин. Попередньо було охарактеризовано більшість генів арабідопсису, що кодують інозитол поліфосфат 5-фосфатази. Однак промотори генів, що кодують інозитол поліфосфат-5-фосфатази рослин, досі не були охарактеризовані. У цій роботі охарактеризовано мутантні лінії *Arabidopsis thaliana* SALK, що мають вставку Т-ДНК у висхідній міжгенній ділянці гена інозитол-поліфосфат-5-фосфатази 8 (At5Tas8). Місце вставки Т-ДНК в лінії SALK було підтверджено за допомогою ПЛР та ідентифіковано рослини, гомозиготні та гемізиготні за вставкою Т-ДНК. У гомозиготних рослин спостерігали за морфологічними відмінностями, а також фенотипами коренів. Однак, не було виявлено суттєвих морфологічних відмінностей між мутантними рослинами та рослинами дикого типу. Аналіз експресії за допомогою кЗТ-ПЛР виявив подібний рівень транскрипту At5Tase8 у мутантних і диких рослин, що свідчить про те, що вставка Т-ДНК знаходиться за межами промотора At5Tase 8. Аналіз *in silico* послідовності довжиною 3000 п.н. перед сайтом початку трансляції, що охоплює місце вставки Т-ДНК, показав наявність потенційних цис-регуляторних елементів щодо тепла, світла, посухи, солі, цукру та гормонів. Крім того, більшість передбачених цис-елементів були розташовані нижче від місця вставки Т-ДНК, що додатково підтверджує, що промотор At5Tase8 знаходиться в межах послідовності 2738 п.н. вище від сайту початку трансляції. Необхідно провести подальші дослідження для визначення промотора At5Tase8 за допомогою злиття промотора і репортера в трансгенному арабідопсисі.

Ключові слова: арабідопсис, At5Tase8, лінія SALK, вставка Т-ДНК, кЗТ-ПЛР, промотор.

REFERENCES

- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ et al (2003) Genome wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* 301:653–657
- Berdy SE, Kudla J, Gruissem W et al (2001) Molecular characterization of At5PTase1, an inositol phosphatase capable of terminating inositol trisphosphate signalling. *Plant Physiol* 126:801–810
- Burnette RN, Gunesequera BM and Gillaspay GE (2003) An Arabidopsis inositol 5-phosphatase gain-of-function alters abscisic acid signalling. *Plant Physiol* 132:1011–1019
- Carland FM and Nelson T (2004) COTYLEDON VASCULAR PATTERN2 mediated inositol (1,4,5) trisphosphate signal transduction is essential for closed venation patterns of Arabidopsis foliar organs. *Plant Cell* 16:1263–1275
- Chow CN, Lee TY, Hung YC (2019) PlantPAN3.0:

- a new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from ChIP-seq experiments in plants. *Nucl Acids Res* 47(D1): 1155-D1163
- Doyle JJ and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15
- Ercetin ME and Gillaspay GE (2004) Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding a phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase. *Plant Physiol* 135:938–946
- Golani Y, Kaye Y, Gilhar O (2013) Inositol polyphosphate phosphatidylinositol 5-phosphatase 9 (At5PTase9) controls plant salt tolerance by regulating endocytosis. *Mol Plant* 6:1781–94
- Heilmann I (2016) Plant phosphoinositide signalling dynamics on demand. *Biochim Biophys Acta* 1861(9): 1345–1351
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucl Acids Res* 27:297–300
- Hernandez N (1993) TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes & development* 7(7b):1291–1308
- Jia Q, Kong D, Li Q et al (2019) The function of inositol phosphatases in plant tolerance to abiotic stress. *Int J Mol Sci* 20(16):3999
- Kaye Y, Golani Y, Singer Y et al (2011) Inositol polyphosphate 5-phosphatase7 regulates the production of reactive oxygen species and salt tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 157:229–241
- Kushwah NS (2019) Tissue-specific activation tagging in *Arabidopsis thaliana* for identification and isolation of genes of agronomic importance. *Curr Sci* 117 (4):627–637
- Lin WH, Wang Y, Mueller-Roeber B et al (2005) At5PTase13 modulates cotyledon vein development through regulating auxin homeostasis. *Plant Physiol* 139:1677–1691
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25:402–408
- Ringli C, Baumberger N, Keller B (2005) The Arabidopsis root hair mutants der2-der9 are affected at different stages of root hair development. *Plant Cell Physiol* 46(7):1046–1053
- Sanchez JP, Chua NH (2001) Arabidopsis PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals. *Plant Cell* 13:1143–1154
- Wang Y, Chu Y-J, Xue H-W (2012) Inositol polyphosphate 5-phosphatase-controlled Ins(1,4,5)P₃/Ca²⁺ is crucial for maintaining pollen dormancy and regulating early germination of pollen. *Dev* 139: 2221–2233
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2(8):e718. doi: 10.1371/journal.pone.0000718
- Xue HW, Chen X, Mei Y (2009) Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *Biochem J* 421:145–156

Received February 19, 2023

Received October 25, 2023

Accepted May 18, 2024