



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Novel roles for phospholipase C in plant stress signalling and development

Zhang, Q.

Publication date

2017

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Zhang, Q. (2017). *Novel roles for phospholipase C in plant stress signalling and development*.

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Summary

For many years, efforts have been made to explore PLC signaling in plants. Compared to the classical eukaryotic, mammalian PLC signaling pathway, a different picture is emerging for plants. Several roles for PLC in plant development and stress responses have been claimed but genetic evidence for this is mostly missing.

In **chapter 2**, we functionally characterized the role of *PLC3* and found it mainly expressed in vascular tissue, but was also present in guard cells and trichomes. Loss-of-function mutants showed different phenotypes, including delayed seed germination, slightly less-elongated primary roots (~5%), fewer lateral roots (15%), and decreased sensitivity to ABA in terms seed germination inhibiting and stomatal-closure induction. ABA triggered an increase in PIP₂ in various Arabidopsis tissues, however, no difference in PLC substrate- or product levels in two independent *plc3* KD mutants were found. Overexpression of *PLC3* increased the drought tolerance of plants and decreased their stomatal aperture.

In **chapter 3**, similar analyses were processed for *PLC5*, which was also predominantly expressed in the vasculature, but also in the root apical meristem, guard cells and trichomes. Knock-down mutant, *plc5-1* displayed shorter primary roots (~10%) and exhibited fewer lateral roots (~20%), which could be restored by the expression of the endogenous *PLC5*-wt gene, driven by its own promoter. Double-*plc3plc5* mutant did not intensify the root phenotype, indicating the involvement of (a)other *PLC*(s). Overexpression of *PLC5* enhanced drought tolerance and reduced stomatal aperture, like *PLC3*, but in this case also led to a new phenotype, i.e. a stunted root-hair growth. ³²P-phospholipid labeling analyses revealed no differences between wt and *plc5-1* seedlings, however, decreased levels of PIP and PIP₂ were found with increased levels of PA in *PLC5* over-expressor lines. Inducible overexpression of *PIP5K3* in *PLC5-OE* line rescued the root hair phenotype and restored the level of PIP₂, providing independent evidence for PIP₂'s crucial role in tip growth.

In **chapter 4**, we characterized the role of *PLC7*, another phloem-expressed *PLC*. Expression was throughout the plant vasculature, including roots, leaves and flowers, and also appeared in trichomes and hydrotodes. We obtained a *plc7-3* KO- and *plc7-4* KD mutant but found no effects in root development, which is different from the *plc3*- and *plc5* mutants. However, like *plc3* mutants, *plc7* mutants exhibited a reduced sensitivity to ABA-dependent stomatal closure. Double-knockout mutants of *plc3plc7* were lethal, whereas *plc5plc7* (*plc5/7*) mutants were viable, and revealed several new phenotypes not observed earlier. These include a defect in seed coat mucilage, enhanced leaf serration, and an increased tolerance to drought. The latter phenotype was previously found when *PLCs* were overexpressed. Overexpression of *PLC7* also led to an enhanced drought tolerant phenotype. *In vivo* ³²P_i-labeling of seedlings treated with sorbitol to mimic drought stress revealed increased PIP₂ responses in both drought tolerant *plc5/7* and *PLC7-OE* mutants. Together, these results reveal several novel functions for PLC in plant stress and development.



Samenvatting

De rol van PLC in signaaltransductieprocessen in planten is nog grotendeels onbekend. Het is in ieder geval duidelijk dat dit anders moet zijn dan de klassieke, dierlijke, PLC-signaleringsroute, voornamelijk omdat planten de targets missen voor zowel IP_3 als DAG. Dit roept veel vragen op zoals, dienen er soms andere moleculen als second messengers, en hoe werkt dat dan? Is PIP_2 het enige substraat voor PLC of wordt standaard het meer abundante PIP gebruikt? En is de functie van PLC om PPI signalering te dempen of om second messengers te produceren? Meer bewijs is verzameld voor rollen van PLC in de ontwikkeling van de plant en stressreacties, langzaam waardoor meer en meer stukken van deze puzzel op tafel.

In hoofdstuk 2 wordt de rol van *PLC3* functioneel gekarakteriseerd. Het gen komt vooral tot expressie in vaatweefsel, maar is ook aanwezig in sluitcellen en trichomen. Mutanten met een defect *PLC3* gen hebben een vertraagde zaadkieming, minder lange hoofdwortel (~ 5%), minder zijwortels (15%), en een verminderde gevoeligheid voor ABA tijdens zaadkieming en bij het sluiten van huidmondjes. ABA stimuleert de toename in PIP_2 hoeveelheden in verschillende weefsels, maar er wordt geen verschil gevonden in PLC's substraat- of productniveaus van *plc3* mutanten. Overexpressie van *PLC3* in Arabidopsis planten blijkt de droogtetolerantie te verhogen en de opening van huidmondjes te verlagen.

In hoofdstuk 3 werden soortgelijke analyses uitgevoerd voor *PLC5*, welke ook overwegend in het vaatstelsel tot expressie komt, maar ook werd gevonden in het meristeem van de worteltop, in sluitcellen en in trichomen. Een knock-down, *plc5-1* mutant heeft kortere hoofdwortels (~ 10%) en minder zijwortels (~ 20%), welke weer kan worden hersteld door expressie van het wild-type *PLC5* gen, aangedreven door de eigen promotor. Dubbel *plc3plc5*-mutanten gaven geen sterker fenotype, mogelijke doordat andere redundante PLCs de rol overnemen. Overexpressie van *PLC5* verhoogde de droogtetolerantie en verminderde de opening van huidmondjes. Daarnaast werd nog een nieuw fenotype gevonden, namelijk een remming van de wortelhaargroei. $^{32}P_1$ -fosfolipidenlabelinganalyses lieten geen verschil zien tussen wt and *plc5-1* zaailingen, echter een aanzienlijk verminderde PIP- en PIP_2 niveau en verhoogde PA niveau werden in *PLC5* over-expressie mutanten gevonden. Induceerbare overexpressie van *PIP5K3* in deze *PLC5*-overexpressielijn, kon de wortelhaargroei en de PIP_2 niveaus herstellen, welke onafhankelijk bewijs levert voor de cruciale rol die PIP_2 speelt in tip groei.

In Hoofdstuk 4 werd de rol van *PLC7*, weer een andere floëem-specifieke *PLC* gen gekarakteriseerd. Het gen komt in het gehele vaatstelsel tot expressie, inclusief wortels, bladeren, en bloemen, maar ook in trichomen en in de waterporiën van de bladeren (hydatoden). Mutanten, i.e. *plc7-3* KO en *plc7-4* KD, bleken geen defect in de wortelontwikkeling te hebben, anders dan in de *plc3*- en *plc5* mutanten. Echter, net als *plc3* mutanten, bleken *plc7* mutanten ook een verlaagde

gevoeligheid voor ABA te hebben voor het sluiten van huidmondjes. Dubbel-KO mutanten van *plc3plc7* bleken lethaal te zijn, maar *plc5plc7* (*plc5/7*) mutanten waren wel levensvatbaar. Deze laatste lieten echter verschillende nieuwe fenotypes zien die nog nooit eerder waren waargenomen, te weten: een defect in het slijm van de zaadhuid, een toename in de gezaagdheid van de bladeren, en een verhoogde tolerantie voor droogtestress. Dit laatste fenotype werd eerder gevonden wanneer juist PLCs to overexpressie werden gebracht. En ook overexpressie van *PLC7* laat wederom zien de droogtetolerantie te verbeteren. *In vivo* $^{32}\text{P}_i$ -labeling van zaailingen die behandeld werden met sorbitol om droogtestress na te bootsen, blijken sterkere PIP_2 responsen te vertonen in zowel de droogte tolerante *plc5/7*- als de *PLC7-OE* mutanten. Samen onthullen deze resultaten een aantal nieuwe functies voor planten PLCs in stressreacties en ontwikkeling.