



Doctoral Thesis

Identification and analysis of flowering promoting factors in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*

Author(s):

Kania, Thomas

Publication Date:

1996

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001646753> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 11643

Identification and Analysis of *Flowering Promoting Factors*
in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doktor of Natural Sciences

presented by
Thomas Kania
Diplom Biologe
Universität Hohenheim
born February 19th, 1963
in Giessen,
Bundesrepublik Deutschland

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Klaus Apel, examiner
PD Dr. Jürg Schmid, co-examiner
Dr. Siegbert Melzer, co-examiner

Zürich 1996

Abstract

A novel class of genes encoding proteins that are able to promote flowering by constitutive expression in *Arabidopsis thaliana* was identified. The present work describes the isolation and characterization of these Flowering Promoting Factors (FPFs) in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*.

The first representative of FPFs, SaFPF2, was isolated by differential cDNA screening from white mustard (*Sinapis alba*) by Melzer *et al.* (1990). During the present PhD work another FPF cDNA was identified in this plant, SaFPF1. Southern blot analysis showed that at least 4 genes exist in mustard that hybridise to the FPF probe. A third FPF gene, SaFPF3, that showed high homology to SaFPF2 (97.4%), was isolated by screening of a genomic mustard library. The precise inducibility of the long-day plant *Sinapis alba* by the appropriate photoperiod was exploited for expression studies. Both genes, SaFPF1 and 2, are characterized by their expression only in apical tissues that were induced to flowering. Northern blot and *in situ* hybridisation analyses revealed that both mRNAs can be detected in mustard apices already 2 days after floral induction in the flanking regions of the inflorescence meristem. Expression increases up to day 7 after the floral switch, before it seems to decline. FPF expression at days 5 and 7 is still detectable in the inflorescence meristem, but also in floral meristems as well as very weakly in the axils of the latest formed leaves, where secondary inflorescences emerge from. Expression seems to persist in the remaining meristematic portion of the floral buds until the meristem is consumed by the formation of reproductive organs. In vegetative tissues no FPF expression at all was detectable in mustard.

Since white mustard is very difficult to transform *Arabidopsis thaliana* was investigated on the existence of FPF genes. *Arabidopsis* can easily be transformed and is furthermore a very close relative of mustard. As FPF proteins in both species therefore may have a similar function *Arabidopsis* was used for transgenic approaches. In *Arabidopsis* Southern blot analysis revealed the existence of two genes of the FPF species. Promoter-GUS studies using the heterologous mustard promoters, however, showed that FPF is expressed in *Arabidopsis* in root tissues as well as in the axils of vegetative rosette leaves and of cauline leaves formed at the inflorescence. No expression was detectable in these experiments in root meristems or in the shoot apical meristem, either vegetative or

reproductive. Results, however, should be interpreted with care since the heterologous mustard promoter was used.

The cDNA AtFPF1 was isolated in the course of this work from *Arabidopsis* and the other *Arabidopsis* cDNA, AtFPF2, was ordered from the *Arabidopsis* Biological Resource Center (Ohio) and characterized together with AtFPF1. Only AtFPF1 showed to be very homologous to the mustard sequences, AtFPF2, however, showed only approximately 78% identity.

Functional analysis of FPF was carried out in *Arabidopsis* by overexpression experiments. Constitutive expression of the coding regions of SaFPF1 and SaFPF3 under control of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter resulted in a very drastic phenotype in the investigated ecotypes C24 and Columbia. FPF overexpressing plants show elongated structures, like hypocotyls, leaves, and internodes, weak roots and a light green leaf colour. Internode elongation in these plants leads to an abolishment of the rosette structure, precocious bolting, and early flowering. The reproductive phase seems to be unaffected in FPF overexpressing plants. The early flowering effect is still dependent on the photoperiod and does not occur before a certain number of vegetative leaves has been formed.

The resemblance of the FPF phenotype to effects caused by gibberellin application to wild type plants led to experiments directed towards an elucidation of FPF function in gibberellin synthesis or sensitivity in *Arabidopsis*. First results, however, cannot confirm an involvement of FPF exclusively in gibberellin regulated pathways.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine neue Gruppe von Genen, die für Proteine kodieren, deren konstitutive Expression die Einleitung des Blühprozesses in transgenen *Arabidopsis* Pflanzen zu stimulieren vermag. Es wird die Isolierung und Charakterisierung der Gene dieser „Flowering Promoting Factors“ (FPFs) in *Sinapis alba* und *Arabidopsis thaliana* beschrieben.

Der erste FPF-Repräsentant, SaFPF2, wurde mittels differentiellen Screenings aus Senf (*Sinapis alba*) isoliert (Melzer *et al.*, 1990). Im Laufe der vorliegenden Dissertation konnte eine weitere cDNA isoliert werden, SaFPF1. Southern blot- Experimente wiesen auf eine Anzahl von wenigstens 4 Genen im Senf hin, die mit der FPF-Sonde hybridisierten. Ein dritter Vertreter, SaFPF3, konnte als genomischer Klon aus einer Genbank von *Sinapis alba* isoliert werden. Dieser Klon wies eine hohe Homologie von 97,4% zur cDNA SaFPF2 auf. Die exakte Induzierbarkeit der Langtagpflanze *Sinapis alba* durch entsprechende photoperiodische Bedingungen wurde für Expressionsstudien genutzt. Charakteristisch für beide Gene ist deren Expression ausschliesslich in apikalen Geweben nach Blühinduktion. Northern blots und *in situ* Hybridisierungen enthüllten, dass FPF mRNA bereits 2 Tage nach Blühinduktion, welches der erste Zeitpunkt der Messung war, in Senfapices detektierbar ist, und zwar in den flankierenden Bereichen des Infloreszenzmeristems. Die Expression steigt bis zum siebten Tag nach Induktion an und scheint anschliessend abzunehmen. In den Stadien 5 und 7 Tage nach Induktion ist FPF mRNA weiterhin in den flankierenden Bereichen des apikalen Meristems detektierbar, sowie darüberhinaus in floralen Meristemen und, wenn auch nur sehr schwach, in den Blattachsen der zuletzt gebildeten Blättchen, wo Seiteninfloreszenzen entstehen. In den verbleibenden meristematischen Resten der Blühknospen scheint FPF solange exprimiert zu werden, bis mit der Bildung der reproduktiven Organe das Meristem völlig aufgebraucht wurde. In vegetativen Geweben konnte keine FPF-Expression in Senf nachgewiesen werden.

In Anbetracht der schlechten Transformierbarkeit von Senf wurde *Arabidopsis thaliana* auf das Vorkommen von FPF hin untersucht. *Arabidopsis* ist sehr gut transformierbar und auch aufgrund der sehr nahen Verwandtschaft zum Senf für transgene Ansätze geeignet. Southern blot- Analysen in *Arabidopsis* wiesen auf die Existenz von 2 FPF-

Genen hin. Durch Promotor-GUS-Studien unter Verwendung der heterologen Senf-Promotoren konnte jedoch gezeigt werden, dass FPF in *Arabidopsis* sowohl in Wurzeln als auch in den Achseln vegetativer Rosettenblätter und cauliner Blätter an der Infloreszenz exprimiert wird. Durch die angewandte Methodik konnte bislang keinerlei FPF-Expression in Wurzelmeristem oder apikalen Meristemen, gleich ob induziert oder nicht, nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studien müssen allerdings hinsichtlich der Verwendung der heterologen Promotoren interpretiert werden.

Die cDNA AtFPF1 konnte im Rahmen dieser Arbeit aus *Arabidopsis* isoliert werden. Die zweite cDNA, AtFPF2, wurde vom *Arabidopsis* Biological Resource Center (Ohio) geordert und zusammen mit AtFPF1 im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert. Ausschliesslich AtFPF1 zeigte hohe Homologie zu den Senf-Sequenzen, wohingegen AtFPF2 nur etwa 78% Identität zu diesen aufwies.

Die funktionelle Analyse wurde mittels Ueberexpressionsstudien in *Arabidopsis* durchgeführt. Die konstitutive Expression der codierenden Regionen von SaFPF1 bzw. SaFPF3 unter Kontrolle des CaMV-35S Promotors führte zu der Expression eines sehr auffälligen Phänotyps in den untersuchten Oekotypen C24 und Columbia. FPF überexprimierende Pflanzen zeichneten sich durch die Ausbildung langgestreckter Hypokotyle, Blätter und Internodien aus, ferner durch schwächliche Wurzeln und eine hellgrüne Blattfarbe. Die Internodienverlängerung führte in diesen Pflanzen zur Aufhebung des Rosettenwachstums, zu vorzeitigem Schiessen und zu früher Blüte. Die reproduktive Phase wird von der konstitutiven FPF-Expression nicht beeinträchtigt. Der Effekt des frühen Blühens ist jedoch weiterhin abhängig von der jeweiligen Photoperiode und wird nicht wirksam, bevor eine bestimmte Anzahl vegetativer Blätter gebildet wurde. Da diese Effekte sehr stark an die Auswirkungen von exogener Gibberellin-Behandlung auf Wildtyppflanzen erinnern, wurden Experimente durchgeführt, die auf eine funktionelle Erklärung von FPF im Rahmen der Gibberellinbiosynthese bzw. -sensitivität in *Arabidopsis* ausgerichtet waren. Erste Ergebnisse konnten jedoch keine Beschränkung der FPF-Funktion ausschliesslich auf Gibberellin-gesteuerte Signalwege nachweisen.