

Diss. Nr.: 11823

**Characterisation and Functional Analysis of
Arabidopsis thaliana Thionins**

DISSERTATION

submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of

DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

Petra Epple

Dipl.-Biologin, Universität Hohenheim
born July, 15th, 1966 in Ludwigsburg
Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Klaus Apel, examiner

PD Dr. Jürg Schmid, co-examiner

Dr. Holger Bohlmann, co-examiner

1996

Abstract

In the present work it could be demonstrated that *Arabidopsis thaliana* thionins play a role in the defence mechanisms against *Fusarium oxysporum*. Two cDNAs encoding thionin preproteins were isolated from *A. thaliana*. The corresponding genes were designated *Thi2.1* and *Thi2.2*. Southern blot analysis suggests that *A. thaliana* most probably contains single genes for both thionins. *Thi2.2* transcripts are present at low levels in rosettes and seedlings, displaying diurnal variation in the latter. No potent elicitors have been found for the *Thi2.2* gene. Transcripts of the *Thi2.1* gene are not detectable in seedlings but accumulate to a very high level in flowers and siliques. In seedlings, the expression of the *Thi2.1* gene is highly inducible by silver nitrate, methyl jasmonate, and necrotrophic fungi, but not by salicylate or ethephon, indicating that the gene is induced via a signal transduction pathway which is at least in part different from that for pathogenesis-related proteins. Furthermore, the induction of the *Thi2.1* gene is negatively regulated by ethylene. In an experiment crucial for this work it could be demonstrated that the *Thi2.1* gene is differentially expressed in race-specific interactions between the ecotype Col-2 and two strains of the fungus *F. oxysporum*.

To further evaluate the biological function of both *A. thaliana* thionins, a transgenic approach was designed. The complete coding regions of the *Thi2.1* and the *Thi2.2* cDNA were constitutively expressed under the control of a CaMV 35S Ω promoter and a 35S terminator and transformed into the *A. thaliana* ecotype Col-2 via the *in planta* method. Transgenic plants with high transcript levels were submitted to further analysis. In case of the *Thi2.1* overexpressing lines translation of the *Thi2.1* transcripts and correct processing of the protein was ascertained. Seedlings of six *Thi2.1* and four *Thi2.2* sense lines were investigated for altered resistance to *F. oxysporum f. sp. matthioli*. Determination of the loss of chlorophyll in inoculated seedlings together with an evaluation of the number of hyphae per cotyledon revealed that all transgenic lines possess enhanced resistance to *F. oxysporum*. No apparent differences were observable between *Thi2.1* and *Thi2.2* sense lines. In addition, hyphae growing on seedlings of transgenic lines were shortened, swollen, and hyperbranched. This altered hyphal morphology is most probably due to antifungal activities of both *A. thaliana* thionins.

Zusammenfassung

Aus *Arabidopsis thaliana* wurden zwei cDNAs isoliert, die für Thionin-Präproteine codieren. Die zugehörigen Gene wurden *Thi2.1* und *Thi2.2* benannt. Durch Southern Blot Analyse konnte gezeigt werden, daß das Genom von *A. thaliana* vermutlich nur jeweils ein Thionin-Gen enthält. *Thi2.2* Transkripte wurden in Keimlingen und Rosetten nachgewiesen, wobei sie in Keimlingen diurnal reguliert sind. Bisher wurden keine Elicitoren der *Thi2.2* Genaktivität gefunden. Transkripte des *Thi2.1* Genes sind dagegen in Keimlingen nicht zu detektieren, wohl aber in Blüten und Schoten in hoher Konzentration. Das *Thi2.1* Gen kann im Keimlingsstadium durch necrotrophe Pilze, Methyljasmonat und Silbernitrat induziert werden, nicht aber durch Salicylsäure oder Ethephon. Dies deutet darauf hin, daß der Signaltransduktionsweg des *Thi2.1* Genes sich zumindest partiell von dem der PR-Proteine unterscheidet. Darüberhinaus wird die Induktion der *Thi2.1* Transkripte durch Ethylen negativ reguliert. Eine differentielle Induktion des *Thi2.1* Genes in rassen-spezifischen Interaktionen zwischen *A. thaliana* und dem Pilz *Fusarium oxysporum* konnte in einem für diese Arbeit entscheidenden Experiment nachgewiesen werden.

Um die biologische Funktion der Thionine von *A. thaliana* näher zu untersuchen, wurde ein transgener Ansatz gewählt. Die vollständige codierende Sequenz der beiden Thionin-cDNAs wurde unter der Kontrolle des CaMV 35S Ω Promotors und des 35S Terminators konstitutiv exprimiert. Nach Transformation des Ökotyps Col-2 mittels der *in planta* Methode wurden zunächst die transgenen Linien mit hohem mRNA-Level selektiert. Im Falle der *Thi2.1* überexprimierenden Linien wurde gezeigt, daß die transgenen Transkripte translatiert und korrekt prozessiert werden. Keimlinge von sechs *Thi2.1* und vier *Thi2.2* überexprimierenden Linien wurden nun auf eine möglicherweise veränderte Suszeptibilität gegenüber dem Pathogen *F. oxysporum f. sp. matthioli* untersucht. Mittels der Bestimmung des Chlorophyllgehaltes inokulierter Keimlinge und einer Evaluation der Anzahl von Pilzhyphen auf Kotyledonen konnte klar gezeigt werden, daß alle transgenen Linien über eine verstärkte Resistenz gegenüber *F. oxysporum* verfügen. Hierbei wurden keine Unterschiede zwischen *Thi2.1* und *Thi2.2* überexprimierenden Linien festgestellt. Desweiteren wurde beobachtet, daß Hyphen, die auf Keimlingen transgener Linien wuchsen, häufig kurz und geschwollen erschienen und

außerdem stark verzweigt waren. Diese veränderte Morphologie des Wachstums der Hyphen ist mit größter Wahrscheinlichkeit auf die Toxizität beider Thionine gegenüber *F. oxysporum* zurückzuführen. Mit der vorliegenden Arbeit konnte also die Bedeutung der Thionine aus *A. thaliana* für den Schutz der Pflanze gegen Pilzbefall gezeigt werden.