

Diss. ETH No. 12989

**Effects of *MADS A* and *MADS B*  
on the Regulation of Flowering Time  
in *Arabidopsis thaliana***

A dissertation submitted to the  
**Swiss Federal Institute of Technology Zurich**

for the degree of  
**Doctor of Natural Sciences**

presented by  
**Birgit Kurz**  
Dipl.-Biologin, Universität Hohenheim

born January 16<sup>th</sup>, 1967  
in Stuttgart, Germany

accepted on the recommendation of  
**Prof. Dr. K. Apel, examiner**  
**PD Dr. Christof Sautter, coexaminer**  
**Dr. Siegbert Melzer, coexaminer**

Zurich 1999

## Summary

During the course of the present work, two MADS-box genes, *MADS A* and *MADS B*, were further analysed and characterised. Both had been isolated in a cDNA library screen of mustard apices induced to flowering, and their spatial and temporal expression patterns have been described by Menzel et al. (1996). Both genes are expressed earlier after floral induction than most other genes yet known to be involved in flower development. *Arabidopsis* plants transformed with the *SaMADS A* and *B* sense overexpressing constructs showed early flowering under both long and short days. In the earliest *MADS A* lines, time to flowering under long days was 28 days compared to 32 days in wild-type, and the leaf number was reduced from 15 to 12. In *MADS B* plants, flowers opened one week earlier than in wild-type with a total of only 7 leaves in long-day conditions. Additionally, *MADS B* overexpressing plants exhibited terminal flowers and did not release seeds from the siliques. In support of the results obtained for sense overexpression, late flowering, although to a lesser extent, could be observed in plants overexpressing the *Arabidopsis MADS A* and *B* genes in antisense, as well under long and short days.

When sense overexpressing lines of *MADS A* and *MADS B* were crossed, no further effect concerning flowering time could be observed, and the progeny of crosses between the antisense lines only showed a slight additional delay in flowering time.

Further results concerning the involvement of *MADS A* and *B* in the flowering process were obtained from crosses with other plant lines overexpressing genes formerly reported to be involved in the early floral transition process. The progeny of crosses between plants overexpressing *MADS A* or *MADS B* and *FPF1* and *SPL3* show additive effects concerning flowering time and total leaf number. Thus these plants flower earlier than each of the parental lines alone, again under long as well as under short days. If *MADS A* or *B* are crossed to *apetala1-1* or *2-1* mutants, the progeny show a partial reversion of the *apetala* mutant phenotype by restoring petal formation with varying petal numbers in a few flowers per plant. In particular, *apetala1-1* mutant flowers never bear petals and are tightly compressed in the inflorescence. By a cross with *MADS A* or *B* plants, these traits can partially be restored together with a marked elongation of the inflorescence.

To further characterise the regulation of the earliest expressed gene, a genomic clone of *SaMADS A* was examined. The gene consists of seven exons and introns, and in database comparisons, homology to genes of different plant species could be identified. The closest relative with an overall identity of 76% and a MADS-box similarity of more than 90% is a gene from *Arabidopsis*. Deletion experiments of the *SaMADS A* promoter region revealed a regulation site located between position –995 and –939 upstream of the translation start point, and further investigations strongly indicated that the *SaMADS A* gene may be autoregulated. In these assays, plants carrying *SaMADS A*-promoter::GUS constructs were crossed to plants overexpressing *SaMADS A*. The progeny of these crosses showed GUS staining of the apical region long before floral induction. The fact that the GUS expression was restricted to the apical zone leads to the conclusion that additional factors influence *MADS A* expression and therefore restrict it to the apical zone. The *LEAFY* and *CONSTANS* genes are discussed as putative regulators according to their spatially identical expression patterns.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die nähere Charakterisierung der beiden MADS-Box Gene *MADS A* und *MADS B*. Beide cDNAs wurden beim Screening einer cDNA-Bibliothek von blühinduzierten Apikalmeristemen des Weißen Senfs gefunden, und ihr zeitliches und räumliches Expressionsmuster wurde von Menzel et al. (1996) untersucht. Dabei wurde gezeigt, daß in beiden Fällen die Genexpression deutlich früher als bei den meisten anderen Genen erfolgt, deren Beteiligung an der Blütenbildung von Pflanzen bislang bekannt ist. Durch die Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen mit Überexpressionskonstrukten von *SaMADS A* und *B* in Sense-Orientierung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß beide Gene bei ektopischer Expression zu vorzeitiger Blütenbildung führen. Im Fall von *MADS A* blühten die Pflanzen unter Langtagbedingungen mit nur 12 Blättern bereits 28 Tage nach der Aussaat, während Wildtyppflanzen zur Blütenbildung 32 Tage benötigen und dabei 15 Blätter bilden. Pflanzen, in denen *SaMADS B* überexprimiert wird, blühen im Langtag sogar eine ganze Woche früher als Wildtyppflanzen und bilden hierbei nur 7 Blätter. Als weitere Merkmale fallen bei diesen Pflanzen insbesondere terminale Blüten und die Veränderung der Schotenstruktur auf. Letztere führt während des Reifungsprozesses dazu, daß die Schoten sich nicht öffnen und dadurch die Samen nicht ausgestreut werden können. Werden die beiden Konstrukte in Antisense-Orientierung in die Pflanzen eingeführt, führt dies in Übereinstimmung mit den bereits geschilderten Ergebnissen für die Sense-Konstrukte zu einer verzögerten Blütenbildung. Dieser Effekt ist zwar deutlich schwächer als in umgekehrter Orientierung, konnte aber wie zuvor unter Kurz- und Langtagbedingungen beobachtet werden. Werden beide Linien gekreuzt, sind in bezug auf den Blühzeitpunkt in Sense-Orientierung keine, und in Antisense-Orientierung nur schwache Veränderungen feststellbar.

Um die Beteiligung von *MADS A* und *B* am Blühprozeß weiter zu untersuchen, wurden Kreuzungen mit anderen transgenen Pflanzenlinien durchgeführt. Diese überexprimieren die Gene *FPF1* und *SPL3*, deren Mitwirkung an frühen Prozessen der Blütenbildung bereits erwiesen ist. In beiden Fällen konnten bei den Nachkommen der gekreuzten Pflanzen sowohl in bezug auf den Blühzeitpunkt, als auch in bezug

auf die Blattzahl additive Effekte festgestellt werden. Die Nachkommenlinien blühen somit unter Kurz-, als auch unter Langtagbedingungen deutlich früher als jede der Elternlinien alleine. In Kreuzungen mit den Mutantenlinien *apetala1-1* und *2-1* konnte zudem eine partielle Reversion des Mutantenphänotyps festgestellt werden. Während insbesondere Blüten von *apetala1-1* Mutanten starke Veränderungen aufweisen und nie Blütenblätter sichtbar sind, zeigen gekreuzte Pflanzen neben einem deutlich verstärkten Längenwachstum auch die Bildung von Blütenblättern in variierender Anzahl.

Um die Regulation des am frühesten exprimierten Genes näher zu untersuchen, wurde außerdem ein genomischer *SaMADS A Klon* analysiert. Das Gen besteht aus jeweils sieben Exons und Introns, und Datenbankvergleiche zeigten eine hohe Sequenzhomologie zu Genen aus anderen Pflanzenarten. Am nächsten verwandt ist ein Gen aus *Arabidopsis thaliana*, das innerhalb der MADS-Box eine Homologie von mehr als 90% und eine Gesamthomologie von 76% aufweist. Deletionsstudien mit der Promotorregion des *SaMADS A*-Gens zeigten im folgenden, daß sich zwischen den Basen -995 und -939 oberhalb des Translationsstarts eine Regulationsstelle befindet. Durch weiterführende Untersuchungen ergaben sich dabei Hinweise, daß das Gen möglicherweise einer Autoregulation unterliegt. Diese Untersuchungen wurden mit Promotor-GUS-Konstrukten ausgeführt, und die ausschließlich lokale GUS-Expression läßt vermuten, daß das *MADS A*-Gen zusätzlich noch von anderen Faktoren beeinflusst wird. Für diese Regulationsfunktion kommen hierbei aufgrund ihrer Expressionsmuster insbesondere die Gene *LEAFY* und *CONSTANS* in Frage.