

Diss. ETH No. 13377

Isolation and Characterization of *THI2.1* Signal-Transduction Mutants of *Arabidopsis thaliana*

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Bernadette Hilpert
Dipl. Biologin, Universität Konstanz

born December 10th, 1967
in Waldshut, Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. K. Apel, examiner
Prof. Dr. N. Amrhein, coexaminer
PD Dr. H. Bohlmann, coexaminer

Zürich 1999

ABSTRACT

Thionins are a group of antimicrobial peptides synthesized by plants to defend themselves against pathogen attack. Unlike SAR-genes, the *Arabidopsis* thionin *THI2.1* is regulated via the octadecanoid pathway, a signaling cascade also shown to be important for the induction of plant defensins and several wound inducible genes. To start a systematic genetic analysis of components involved in the regulation of this gene, it was decided to isolate thionin signal transduction mutants constitutively activating the *THI2.1* gene. Since no known phenotype was associated with the constitutive expression of this gene, a genetic approach was developed. The *bar* gene, which confers resistance to the herbicide Basta, was cloned behind a 1.5 kb *THI2.1*-promoter fragment. The construct was delivered to the *A. thaliana* ecotype Col2 by *Agrobacterium* mediated *in planta* transformation. The plants were EMS mutagenized and screened for constitutive herbicide resistance. Ten *cet*-mutants have been isolated which show a constitutive expression of the *THI2.1* gene. Allelism tests showed that they represent at least seven different loci. Some mutants are affected in a (semi) dominant, some in a recessive gene, but all *cet*-mutations behaved as monogenic traits when backcrossed with *THI2.1*-GUS2.4 plants.

The mutants isolated display a fine regulation between the SA- and JA-dependent pathways. The expression pattern of the different marker genes *THI2.1*, *PDF1.2*, *PRI*, and *HEL* differed greatly between the various *cet*-mutants. One group of mutants showed a strong induction of both the SA- and JA-dependent signaling-cascades, whereas a second group predominantly affected the octadecanoid pathway. In addition, it could be confirmed that *THI2.1* and *PDF1.2* transcription are activated independently, though both are regulated by JA. Furthermore, eight out of ten mutants spontaneously developed either microscopic or macroscopic lesions, indicating that common factors might be responsible for the activation of the octadecanoid pathway and for HR-formation.

ZUSAMMENFASSUNG

Thionine sind antimikrobielle Peptide. Sie werden von Pflanzen zur Pathogenabwehr produziert. Im Gegensatz zu den SAR-Genen, wird das *Arabidopsis* Thionin *THI2.1* über den Octadecanoidweg reguliert. Diese Signaltransduktionskette ist auch von Bedeutung für die Induktion der Pflanzendefensine und verschiedener wundinduzierbarer Gene. Um die an der Regulation dieses Genes beteiligten Komponenten systematisch zu untersuchen, wurde beschlossen, Mutanten mit einer konstitutiven *THI2.1*-Expression zu isolieren. Da kein bekannter Phänotyp mit einer konstitutiven Thioninexpression assoziiert ist, wurde ein genetischer Ansatz gewählt. Die kodierende Region des *bar*-Genes, das Resistenz gegen das Herbizid Basta verleiht, wurde hinter ein 1.5 kb *THI2.1*-Promotorfragment kloniert. EMS mutagenisierte Pflanzen wurden auf konstitutive Herbizidresistenz selektiert. Zehn sogenannte *cet*-Mutanten wurden isoliert. Sie zeigen alle eine konstitutive *THI2.1*-Expression (constitutive expression of thionin). Allelismustests zeigten, dass sie zu mindestens sieben voneinander unabhängigen Loci gehören. Einige Pflanzen sind in einem einzigen rezessiven, andere in einem einzigen dominanten Gen mutiert.

Die isolierten *cet*-Mutanten deuten auf die Existenz eines fein regulierten Zusammenspiels zwischen den einzelnen Signaltransduktionswegen hin. Das Expressionsmuster der verschiedenen Markergene *THI2.1*, *PDF1.2*, *PRI* und *HEL* variierte beträchtlich zwischen den einzelnen *cet*-Mutanten. Eine Gruppe von Mutanten zeigte eine starke Induktion der Salycilat (SA)- und Jasmonat (JA)- abhängigen Signaltransduktionswege, wohingegen in einer zweiten Gruppe vor allem der Octadecanoidweg aktiviert wurde. Zudem wurde bestätigt, dass die Expression von *THI2.1* und *PDF1.2* unabhängig voneinander reguliert wird, obwohl beide Gene über den Octadecanoidweg gesteuert werden. Acht der zehn isolierten *cet*-Mutanten entwickelten spontan makroskopische oder mikroskopische Läsionen. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise gemeinsame Faktoren an der Induktion des Octadecanoidweges und der Entstehung von Läsionen beteiligt sind.