

Diss. ETH No. 14226

**MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN  
ZUM EINFLUSS DER *FPP1*-GEN-FAMILIE  
AUF DIE BLÜHINDUKTION**

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von  
ROLAND BORNER  
Dipl. Natw. ETH Zürich

Geboren am 12. Januar 1972  
in Luzern, Schweiz

Prof. Dr. K. Apel, Referent  
Prof. Dr. N. Amrhein, Korreferent  
Dr. S. Melzer, Korreferent

Zürich 2001

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung und Charakterisierung von *fpf1*, *fpl1* und *fpl2* Mutanten beschrieben. Ausserdem wurde die Expression der drei Gene der *FPF1*-Familie mit quantitativer RT-PCR und Promotoraktivitätsstudien untersucht und eine Analyse von *FPF1*, *FPL1* und *FPL2* überexprimierenden Pflanzen durchgeführt.

Das *FPF1* Gen wurde mit einem differentiellen Screening aus einer cDNA Bibliothek von photoperiodisch induziertem apikalen Gewebe der obligaten LT-Pflanze *Sinapis alba* isoliert (Melzer *et al.*, 1990). In *Arabidopsis* konnten drei homologe Gene identifiziert werden, nämlich *FPF1*, *FPL1* und *FPL2*, wobei einzig das *FPF1* Gen nach der Blühinduktion im apikalen Meristem exprimiert wird. Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR und Promotoraktivitätsstudien konnte eine *FPF1* Expression auch in Knospen, Blüten, Schoten und Wurzeln nachgewiesen werden. Das *FPL1* Gen wird in Wurzeln, Blättern, Blüten und Schoten und das *FPL2* Gen hauptsächlich in Blättern, Blüten und Schoten exprimiert. Die Expression von *FPL1* und *FPL2* in den Rosettenblättern ist von den Lichtbedingungen abhängig. Beide Gene werden unter KT-Bedingungen stärker exprimiert als unter LT-Bedingungen. Das *FPL2* Gen wird ausserdem in den Kotyledonen von etiolierten Keimlingen deutlich hochreguliert.

Die für eine erste funktionelle Analyse der Gene *FPF1*, *FPL1* und *FPL2* durchgeführte konstitutive Expression führte in *Arabidopsis* Pflanzen sowohl unter LT- als auch unter KT-Bedingungen zu einem früheren Blühen. Die überexprimierenden Pflanzen weisen ausserdem verschiedene pleiotrope Effekte auf, unter anderem ein elongiertes Hypokotyl und verlängerte Internodien. Ähnliche Phänotypen treten bei Wildtyppflanzen auf, die mit Gibberellinen behandelt worden sind.

Für eine weiterreichende Untersuchung der Funktionen der drei Gene wurden Mutanten isoliert und charakterisiert. Durch das Screening einer grossen Population von *Arabidopsis* Pflanzen mit Transposon-Elementen konnten für alle drei Gene Null-Mutanten isoliert werden, wobei die *En-1* Insertionen in allen Fällen in den kodierenden Regionen liegen. Die *fpl1* und *fpl2* Mutanten zeigten unter den bisher untersuchten Bedingungen im Vergleich zu Wildtyppflanzen keinen veränderten Phänotyp, auch nicht in Bezug auf den Blühzeitpunkt. Die *fpf1* Mutante bildete hingegen sowohl unter LT- als auch unter KT-Bedingungen im Vergleich zu Wildtyppflanzen mehr Rosettenblätter. Mit der Integration eines *FPF1* Gens ins Genom der *fpf1* Mutante über

eine Transformation konnte der Spätblühphänotyp komplementiert werden. Es konnte somit zum ersten Mal bestätigt werden, dass das *FPF1* Gen in der Kontrolle der Blühinduktion eine Rolle spielt. Mit Hilfe von Expressionsstudien in verschiedenen Spätblühmutanten wurde ausserdem ausgeschlossen, dass das *FPF1* Gen in einem LT-abhängigen oder konstitutiven Signalweg aktiv ist. Durch Kreuzungen der *fpf1*, *fpl1* und *fpl2* Einzelmutanten konnten noch keine zusätzlichen Phänotypen beobachtet werden.

## Summary

The work presented describes the isolation and characterization of mutants in the *FPF1*, *FPL1* and *FPL2* genes. The expression pattern of the three genes was defined by quantitative RT-PCR and promotor-GUS studies. In addition, *FPF1*, *FPL1* and *FPL2* overexpressing plants were characterized.

The *FPF1* gene was isolated by differential cDNA screening using photoperiod-induced apices of *Sinapis alba* (Melzer *et al.*, 1990). In *Arabidopsis*, the three homologous genes *FPF1*, *FPL1* and *FPL2* have been identified. However, only the *FPF1* gene is expressed in apical meristems following floral induction. The expression of *FPF1* in the apices is independent of light conditions and depends only on the stage of plant development. By using the methods of quantitative RT-PCR and promotor-GUS analysis, *FPF1* expression was also found in buds, flowers, siliques and roots. The *FPL1* gene is expressed in roots, leaves, flowers and siliques and *FPL2* transcripts are detectable in leaves, flowers and siliques. The expression of *FPL1* and *FPL2* in rosette leaves depends on the light conditions: both genes are expressed more strongly under short day conditions than under long day conditions. Furthermore, *FPL2* is highly upregulated in cotyledons of etiolated seedlings.

Overexpression studies of the three genes were performed in *Arabidopsis* plants. The constitutive expression of *FPF1*, *FPL1* and *FPL2* under control of the 35S CaMV promotor leads to earlier flowering both under long day and short day conditions. In addition to the early flowering phenotype, transgenic plants show several pleiotropic effects which are similar to those observed in wild type plants treated with gibberellins.

In order to further understand the function of the genes, knockout mutants were isolated: after screening a large population of transposon tagged *Arabidopsis* plants, *En-1* insertions were identified in the coding regions of all three genes. The *fpl1* and *fpl2* mutants showed no difference in phenotype compared with wild type plants under long day and short day conditions. The mutants also showed no alteration in flowering time. However, the *fpl1* mutant produced more rosette leaves than wild type plants under both long and short day conditions. The integration of a wild type *FPF1* gene into the *fpl1* mutant by plant transformation was able to complement the late flowering phenotype, thereby directly implicating *FPF1* function in the control of flowering.

Because *FPF1* expression in induced apical meristems of different late flowering mutants of the long day or constitutive pathway is not altered in comparison to wild type plants, it could be excluded that the *FPF1* gene is regulated through one of these two flowering pathways. However, evidence from *FPF1* overexpressing plants suggests a role for the *FPF1* gene in gibberellin signalling. The analysis of double mutant combinations of *fpf1*, *fpl1* and *fpl2* and a triple mutant revealed no further phenotype.