



## Doctoral Thesis

# Initiation of seed coat development is controlled by polycomb group proteins and requires a signal from the sexual endosperm

**Author(s):**

Roszak, Pawel Jan

**Publication Date:**

2012

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007316839> →

**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 NO. 20165

**Initiation of seed coat development is controlled by Polycomb  
group proteins and requires a signal from the sexual endosperm**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

PAWEL JAN ROSZAK

Master of Science in Biotechnology  
Poznan University of Life Sciences

Born on January 14, 1982  
Citizen of Poland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Claudia Köhler, examiner  
Prof. Dr. Rita Groß-Hardt, co-examiner  
Prof. Dr. Samuel C. Zeeman, co-examiner

2012

## SUMMARY

Sexual reproduction and seed formation strongly contributed to the evolutionary success of flowering plants. These processes involve the generation of gametes by the female and male gametophytes and transport of male sperm cells to the female gametophyte. During double fertilization two sperm cells fuse with the egg and the central cell, leading to the initiation of seed formation. Developing seeds contain the embryo surrounded by nourishing endosperm tissue and surrounded by the protective seed coat. While the endosperm is utilized by the expanding embryo as a nutrient source and the seed coat cells undergo cell death during seed maturation, the embryo is a developing organism of the following generation. In the absence of fertilization, the female gametophyte with surrounding maternal tissues does not form a seed but degenerates within a few days. This ensures that no assimilates are invested in the formation of a seed that would not fulfill its role in reproduction. Development of the seed that consists of the maternal diploid seed coat, the ephemeral, sexually derived triploid endosperm and the diploid organism of the next generation, require tight regulation of gene activity during their coordinated growth.

Polycomb Group (PcG) proteins are involved in the transcriptional repression of target genes by specific chromatin modifications, changing accessibility of the locus to the transcriptional machinery. PcG proteins are conserved in animals and plants. In plants, they control an array of developmental processes like flowering time determination, vernalization, and flower organ development. They also actively participate in the development of the seed regulating divisions of the central cell and cellularization of the endosperm. PcG proteins in *Arabidopsis* form at least three Polycomb Repressive Complexes (PRC2) with partially redundant function between their homologous subunits. The activity of the Fertilization Independent Seed (FIS) PRC2 complex is restricted to the female gametophyte and developing endosperm. Lack of any FIS complex subunit causes defects in endosperm development, leading to seed abortion. Moreover, in the absence of fertilization *fis* mutants autonomously initiate development of seed like structures containing autonomous endosperm, but no embryo.

In my work I addressed the question whether differences in the penetrance of the Fertilization Independent Seed (FIS) phenotype between FIS complex subunits results from redundant action of their homologous genes. I could demonstrate that there is no

redundancy between the *FIS2* gene and its homologs but demonstrated that the differences in the phenotype between different *fis* mutants results from malfunction of FIS complex subunits that play an additional role in sporophytic tissues of the surrounding integuments.

I discovered that decreased level of PcG proteins in the integuments cause initiation of their differentiation into seed coat, revealing that PcG proteins not only repress divisions of the central cell but also development of the seed coat in the absence of fertilization. Subsequent analysis of autonomous seeds revealed that the difference in penetrance of the FIS phenotype between FIS complex subunits is additionally accompanied by a difference in seed coat development. While mutants of FIS complex components that have an additional function in sporophytic tissues developed a normal seed coat, mutants of FIS complex components that function specifically in the female gametophyte did not develop a seed coat and the integuments degenerated. Moreover, I could directly show that seed coat development is initiated as a response to the developing endosperm what most probably encompass mobile signal formation and transmission to the ovule integuments. Therefore, I propose that only the sexual, but not the autonomous endosperm forms a signal necessary for seed coat formation and the need for this signal is bypassed in mutants with lowered dosage of PcG proteins in the integuments.

Although the nature of the signal remains undiscovered, I found the endosperm-specific MADS box protein *AGAMOUS LIKE 62 (AGL62)* being involved in the process of signal formation. Fertilized *agl62*<sup>-</sup> mutant seeds develop endosperm and embryo but fail to develop a seed coat, implicating that the seed coat initiation signal is absent in *agl62*. Inevitably, future work will focus on the elucidation of the signal that drives seed coat formation.

## ZUSAMMENFASSUNG

Sexuelle Reproduktion und Samenbildung waren entscheidend für den evolutionären Erfolg von blühenden Pflanzen. Sexuelle Reproduktion in Blütenpflanzen beinhaltet die Bildung von Gameten durch weibliche und männliche Gametophyten und den Transport von männlichen Spermazellen in den weiblichen Gametophyten. Während der doppelten Befruchtung fusionieren zwei Spermazellen mit der Eizelle und der Zentralzelle und initiieren den Beginn der Samenbildung. Der sich entwickelnde Samen beinhaltet den Embryo, umgeben vom nährenden Endospermgewebe und umhüllt von der schützenden Samenhülle. Während das Endosperm als Nahrungsquelle dient, um das Wachstum des Embryos zu ermöglichen, wird die Samenhülle während der Samenreife dem Zelltod unterworfen. Somit ist nur der Embryo ein sich entwickelnder Organismus der nächsten Generation. Ohne Befruchtung entwickelt sich kein Samen aus dem weiblichen Gametophyten, und dieser degeneriert innerhalb von wenigen Tagen. Dadurch wird sichergestellt, dass keine Nährstoffe verschwendet werden für Samen, die ihre reproduktive Rolle nicht erfüllen können. Die koordinierte Entwicklung der Samenschale, des Endosperms und des Embryos verlangt eine streng kontrollierte Regulation der Genaktivität dieser drei Komponenten.

Polycomb Gruppen (PcG) Proteine regulieren die transkriptionelle Repression von Zielgenen durch spezifische Chromatinmodifikationen, welche die Zugänglichkeit der Transkriptionsmaschine verändert. PcG Proteine sind in Tieren und Pflanzen konserviert. In Pflanzen kontrollieren sie eine Reihe von Entwicklungsprozessen, wie Blühzeitdetermination, Vernalisation und die Entwicklung von Blütenorganen. Sie sind ebenfalls an der Entwicklung von Samen beteiligt, wie bei der Regulation der Teilung der Zentralzelle und der Zellularisierung des Endosperms. PcG Proteine in *Arabidopsis* bilden mindestens drei Polycomb Repressive Komplexe (PRC2) mit teilweiser redundanter Funktion zwischen den homologen Untereinheiten. Die Aktivität des befruchtungsunabhängigen Samen (FIS) PRC2 Komplex ist begrenzt auf den weiblichen Gametophyten und das sich entwickelnde Endosperm. Das Fehlen einer FIS Komplex Untereinheit führt zu Defekten in der Endospermentwicklung und zum Abbruch der Samenentwicklung. Zudem initiieren nicht befruchtete *fis* Mutanten die Entwicklung von samenartigen Strukturen, die ein autonomes Endosperm aber keinen Embryo enthalten.

In meiner Arbeit ging ich der Frage nach, ob der Unterschied in der befruchtungsunabhängigen Samenbildung in verschiedenen *fis* Mutanten von der

redundanten Wirkung der homologen Gene resultiert. Ich konnte zeigen, dass *FIS2* homologe Gene nicht redundant sind. Weiterhin konnte ich zeigen, dass der Unterschied im Phänotyp zwischen verschiedenen *fis* Mutanten dadurch erklärt werden kann, dass einige FIS Untereinheiten eine zusätzliche Rolle im sporophytischen Gewebe haben, das die Integumente und später die Samenschale bildet.

Ich konnte zeigen, dass eine verringerte Dosis von PcG Proteinen in den Integumenten zur Initiierung der befruchtungsunabhängigen Samenschalenbildung führt. Diese Daten zeigen, dass PcG Proteine nicht nur die autonome Teilung der Zentralzelle unterdrücken, sondern auch die befruchtungsunabhängige Entwicklung der Samenschale. Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass die Entwicklung der Samenschale eine Antwort des sich entwickelnden Endosperms ist, welche höchstwahrscheinlich eine mobile Signalbildung und Transmission zu den Ovulintegumenten beinhaltet. Diese Daten bilden die Grundlage für ein Modell, in dem ich postuliere, dass nur das sexuelle, aber nicht das autonome Endosperm ein Signal bildet, welches für die Bildung der Samenschale nötig ist. Obwohl ich das Signal nicht identifizieren konnte, habe ich zeigen können, dass das endosperm-spezifische MADS-box Protein AGAMOUS Like 62 (AGL62) in den Prozess der Signalbildung involviert ist. Befruchtete *agl62*<sup>-</sup> Mutante Samen entwickeln ein Endosperm und einen Embryo, bilden aber keine Samenschale. Dies impliziert, dass das Signal für die Bildung der Samenschale in *agl62* nicht vorhanden ist. Zukünftige Arbeiten werden sich auf die Aufklärung des Signals fokussieren, welches zur Bildung der Samenschale nötig ist.