Aus dem Department für Nutzpflanzenwissenschaften,
Abteilung Pflanzenvirologie
der Georg-August-Universität Göttingen

Nutzung phytobakterieller Gene zur Beeinflussung der pflanzlichen Apikaldominanz - Untersuchungen in transienten und induzierbaren transgenen Expressionssystemen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Agrarwissenschaften
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Elke Nitschke
geboren in Saalfeld/Saale

Göttingen, Dezember 2006

D 7

1. Referent:	Prof. Dr. Mark Varrelmann (Juniorprofessor)
2. Korreferentin:	Prof. Dr. Traud Winkelmann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2007

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis ..... *II*

II. Abkürzungsverzeichnis ..... *V*

1. Einleitung *1*

1.1. Phytohormone sind endogene Wachstumsregulatoren **1**
1.1.1. Auxine 1
1.1.2. Cytokinine 4

1.2. Die Apikaldominanz bestimmt die Lateralverzweigung **6**
1.2.1. Regulation der Apikaldominanz durch Auxin und Cytokinin 7
1.2.2. Beteiligung eines weiteren Signals an der Apikaldominanz 9
1.2.3. Nutzung phytobakterieller Gene zur Beeinflussung der Apikaldominanz 11

1.3. Möglichkeiten transgener und transienter Expressionsansätze zur Modulation der Cytokinin-Auxin Balance *in planta* **16**
1.3.1. Pflanzenvirale Expressionsvektoren 16
1.3.2. Ethanol-induzierbares Expressionssystem 18
1.3.3. Transientes RNAi durch VIGS 19

1.4. Zielstellung dieser Arbeit **20**

2. MATERIAL *22*

2.1. Pflanzenmaterial **22**

2.2. Bakterienstämme **22**

2.3. Pflanzenvirale Klone **22**

2.4. Plasmide **23**

2.5. Synthetische Oligonukleotide **24**

2.6. Enzyme **25**

2.7. Kulturmedien **26**
2.7.1. Medienbestandteile 26
2.7.2. Bakterienkulturmedien 27
2.7.3. Pflanzenkulturmedien 27

2.8. Phytohormone **28**

2.9. Antibiotika und selektive Agenzien **28**

2.10. Größenstandard für die Gelelektrophorese **28**

2.11. Chemikalien **29**

2.10. Kommerzielle Extraktionssysteme **30**

2.11. Geräte **31**

2.12. Sonstiges Labormaterial **32**

2.13. Software **32**

3. METHODEN *33*

3.1. Herstellung der Medien, Lösungen und Puffer **33**

3.2. Kultivierung von Pflanzen **33**
3.2.1. Sterilisation von Samen für die *in vitro*-Kultur 33
3.2.2. *In vitro*-Kultur von Tabakpflanzen und Petunienlinien 34
3.2.3. Überführung von *in vitro*-Pflanzen ins Gewächshaus 34

3.3. Kultivierung von Bakterienstämmen **34**

3.3.1. Bakterienanzucht ... 34
3.3.2. Bestimmung des Bakterientiters ... 34
3.3.3. Anlegen von Bakteriendauerkulturen ... 35

3.4. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* und Transformation ... 35

3.5. Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* und Transformation ... 36

3.6. Gentechnische Methoden ... 37
3.6.1. Allgemeine Methoden ... 37
3.6.2. Nukleinsäure-Isolierung ... 39
3.6.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 44
3.6.4. Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) ... 44
3.6.5. Klonierung ... 45
3.6.6. DNA-Sequenzierung ... 47
3.6.7. Infektion von Pflanzen mit viralen Klonen ... 47

3.7. Transformation von Pflanzen ... 49
3.7.1. *Agrobakterien*-vermittelte Transformation von *N. tabacum* ... 49
3.7.2. Erhaltung transgener T_0-Linien und Erzeugung der T_1-Generation ... 50

3.8. Analyse transgener Tabakpflanzen ... 50
3.8.1. Segregationsanalyse des *nptII*-Gens ... 50
3.8.2. PCR-Nachweis transgener Insertionen ... 50
3.8.3. Induktion induzierbarer Promotoren ... 51
3.8.4. Erfassung von Wachstumsparameter ... 51

3.9. Epifluoreszenzmikroskopie ... 51

4. Ergebnisse ... 52

4.1. Transiente Expression bakterieller Phytohormongene mit pflanzenviralen Vektoren ... 52

4.1.1. Erstellung der pflanzenviralen Expressionskonstrukte ... **52**
4.1.2. Expressionsuntersuchungen in Jungpflanzen von *N. tabacum*, *N. benthamiana* und *P. hybrida* ... 54
4.1.3. Pflanzenvirales *in vitro*-Expressionssystem ... 67

4.2. Ethanol-induzierbare Expression bakterieller Phytohormongene in transgenen *N. tabacum*- Pflanzen ... 71
4.2.1. Herstellung von Expressionskassetten zur Pflanzentransformation ... 72
4.2.2. Erzeugung transgener *N. tabacum*-Pflanzenlinien ... 77
4.2.3. Charakterisierung der transgenen Linien auf Nukleinsäure- Ebene ... 79
4.2.4. Ethanolinduzierbare Beeinflussung des pflanzlichen Phänotyps in transgenen Tabaklinien ... 89
4.2.5. Auxin-responsive GFP-Expression ... 104

4.3. „Virus induced gene silencing“ (VIGS) von Genen des pflanzlichen Phytohormonmetabolismus ... 108
4.3.1. Herstellung eines Markergenkonstruktes zur Etablierung eines VIGS-Systems in *P. hybrida* ... 108
4.3.2. Überprüfung der VIGS induzierenden Funktion des auf dem TRV-Isolat PpK20 basierenden Markergenkonstruktes pYL-PhPDS ... 109
4.3.3. Versuche zur Optimierung des VIGS-Systems in *P. hybrida* ... 112
4.3.4. Erstellung von VIGS-Konstrukten zur Beeinflussung des pflanzlichen Habitus ... 117
4.3.5. Erstellung von modifizierten VIGS-Konstrukten zur Phytohormonmetabolismus-Beeinflussung in *P. hybrida* W113 ... 119

5. Diskussion ... 124

5.1. Nutzung bakterieller Phytohormonmetabolismusgene zur gerichteten Beeinflussung pflanzlicher Phänotypen ... 124
5.1.1. Erzeugung starker phänotypischer Effekte durch die Nutzung pflanzenviraler Expressionssysteme ... 124
5.1.2. Möglichkeiten transienter pflanzenviraler Expressionssysteme ... 127

5.1.3. Nutzung eines Ethanol-induzierbaren Expressionssystems zur konditionellen Beeinflussung der Phytohormonhomöostase 130
5.1.4. Genetische und physiologische Charakterisierung der erzeugten Linien 134
5.1.5. Untersuchungen zur Beeinflussung der Pflanzenentwicklung in ausgewählten transgenen Linien..... 138
5.1.6. Untersuchungen zur Beeinflussung der Auxinkinetik mittels Auxin-induzierbarer Reportergenaktivität..... 142

5.2. Untersuchungen zur Nutzung eines transienten RNAi-Ansatzes zur Beeinflussung der pflanzlichen Cytokininhomöostase 144
5.2.1. Untersuchungen zum Abschalten eines Markergens 144
5.2.2. Funktionelle Charakterisierung potentieller Gensequenzen des Cytokininmetabolismus aus *P. hybrida* 147

6. Zusammenfassung 151

7. Literaturverzeichnis 154

8. Anhang 178

8.1. Sequenzen der verwendeten bakteriellen Gene 178

8.2. Insertionsbestimmung in den erzeugten transgenen *N. tabacum*-Linien..... 181

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
19S-CaMV	19S-Promotor des CaMV
35S-CaMV	35S-Promotor des CaMV
Abb.	Abbildung
A. bidest.	Bidestilliertes Wasser
Abs.	Absolut
A. thaliana	*Arabidopsis thaliana*
ADP	Adenosin-di-phosphat
alcA	Ethanolinduzierbarer Promotor
alcR	Transkriptionsfaktor des Ethanolinduzierbaren Promotors
AMP	Adenosin-mono-phosphat
Amp	Ampicillin-Natriumsalz
ATP	Adenosin-tri-phosphat
A. tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Cam	Chloramphenicol
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus (“cauliflower mosaic virus”)
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CCD	“carotinoid cleaving dioxygenase”
cDNA	komplementäre DNA
CfU	Kolonie-bildende Einheit („colony forming unit“)
CKX	Cytokininoxidase/dehydrogenase
CP	Hüllprotein ("coat protein")
DAD	“decreased apical dominance“
DEPC	Diethyldicarbonat
d.h.	das heißt
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleicacid“)
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat (G/A/T/C)
dpi	Tage nach Inokulation (“days post inoculation”)
DR5	synthetischer Auxininduzierbarer Promotor
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
E. coli	*Escherichia coli*
et al.	et alii
EtOH	Ethanol

F	Farad
Fa.	Firma
g	Gravitätskonstante (9,81 m/s^2)
GA	Gibberellinsäure („gibberellic acid“)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GUS	ß-Glucuronidase
h	Stunde
HR	Hypersensitive Reaktion
HPLC	“high performance liquid chromatography”
HSP	Hitzeschock-Promotor (“heat shock promotor”)
IAA	Indolacetic acid
iaaH	Indolacetamid-Hydrolase
iaaL	IAA-Lysin-Synthetase
iaaM	IAA-Tryptophan-Monooxygenase
iADP	Isopentenyl-Adenosin-di-phosphat
IAM	Indol-3-acetamid
iAMP	Isopentenyl-Adenosin-mono-phosphat
IAN	Indol-3-acetonitril
iATP	Isopentenyl-Adenosin-tri-phosphat
IES	Indolessigsäure
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl-ß-D-1-Thiogalactosidase
ipt	Isopentenyltransferase
IR	“inverted repeat”
Kan	Kanamycinsulfat
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
Klx	Kilolux
LB	Luria-Bertani-Medium
LB	linke Integrationsgrenze
Lsg.	Lösung
m35S	minimaler 35S-CaMV Promotor
M	Molar
mA	Milliampere
MAX	„more axillary branched“
MCS	„multiple cloning side“
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Murashige & Skoog Medium
MS	Massenspektroskopie

N	Normal
NAA	“naphtalene acetic acid”
NAM	“naphatalene acetamid”
n.b.	nicht bekannt
NbPDS	Phytoendesaturase aus *N. benthamiana*
NCBI	Biotechnologieinformationszentrum der Vereinigten Staaten von Amerika („National Center for Biotechnology Information“)
nM	nanomolar
nm	Nanometer
nos	Nopalinsynthetase
*npt*II	Neomycinphosphotransferase II
N. tabacum	*Nicotiana tabacum*
o.a.	oben aufgeführt
OD	optische Dichte
OD_{600}	optische Dichte gemessen bei 600 nm
o.e.	oben erwähnt
p	Promotor
pA-CaMV	Polyadenylierungssignal des CaMV
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDS	Phytoendesaturase
PEBV	*Pea early browning virus*
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PhPDS	Phytoendesaturase aus *P. hybrida*
P. hybrida	*Petunia hybrida*
pNOS	Promotor aus NOS
P. sativum	*Pisum sativum*
PTGS	“post transcriptional gene silencing”
pv.	pathovar
PVX	*Potato virus X*
RB	rechte Integrationsgrenze
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
rel	relativ
Rif	Rifampicin
Ri-Plasmid	“root-inducing plasmid”
RMS	ramosus
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
Rz	Ribozym
SAUR	“small auxin up RNA”
sgP	subgenomischer Promotor
spec.	Spezies

ssp	Subspezies
ssRNA	“single stranded RNA”
Tab.	Tabelle
Taq	*Thermus aquaticus*
T-DNA	Transfer-DNA
Tet	Tetrazyklin
Ti-Plasmid	Tumor-induzierender Plasmid
TKS	Torfkultursubstrat
tNOS	Polyadenylierungssignal aus NOS
*tob*71	Actin-Gen aus *N. tabacum*
tRNA	Transfer-RNA
TRV	*Tobacco rattle virus*
U	Unit (1µmol Stoffumsatz/min)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
u.U.	unter Umständen
V	Volumen
V	Volt
Vgl.	vergleiche
VIGS	“virus-induced gene silencing”
V/v	Volumen/Volumen
V/w	Volumen/Gewicht
WT	Wildtyp
X	fach
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactopyranoside
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
α	Alpha
ß	Beta
λ	Lambda
χ^2	Chi-quadrat
µ	Mikro
Ω	Ohm

1. Einleitung

1.1. Phytohormone sind endogene Wachstumsregulatoren

Wachstum und Entwicklung der Höheren Pflanzen werden durch genetische Faktoren, lokale Umweltbedingungen und interne Signale reguliert.
Die Vermittlung und Koordinierung dieser Informationen erfolgt durch Phytohormone, die als endogene chemische Botenstoffe eine große Bedeutung in der Pflanze haben.
Zu der klassischen Gruppe der Phytohormone werden die Auxine, Cytokinine, Gibberelline, Ethylen und Abszissinsäure gezählt (Kende & Zeevart, 1997). Darüber hinaus werden durch Untersuchungen in den letzten Jahrzehnten weitere pflanzliche Verbindungen zu den Pflanzenhormonen gerechnet. Dabei handelt es sich um Jasmonate und Brassinosteroide, sowie Salicylsäure-Verbindungen (Creelman & Mullett, 1997).
Die Regulation der pflanzlichen Entwicklungsprozesse erfolgt durch synergistische und antagonistische Wechselwirkungen einzelner Phytohormone miteinander, aus denen ein interaktives Netzwerk auf unterschiedlichen Reaktionsebenen (z.B. Metabolismusreaktionen und Signaltransduktionswege) resultiert (Rodrigues-Pousada *et al*., 1999). Neben der Konzentration von Phytohormonen werden auch eine variable Zell- und Gewebesensitivität als Bestimmungsfaktor für das Wirken phytohormoneller Signale angesehen (Trewavas & Cleland, 1983).
Die sich daraus ergebenden komplexen Interaktionsmöglichkeiten stellen die Basis der sehr weiten Wirkungsspektren der Phytohormone dar.

1.1.1. Auxine

1.1.1.1. Bedeutung, Biosynthese und Metabolismus

Auxin ist in nahezu allen Entwicklungsprozessen der Pflanzen von Bedeutung. Es wirkt bei der Zelldifferenzierung, koordiniert die Vaskularentwicklung, ist an Wurzelbildung und -entwicklung, Blattentwicklung und Steuerung der Fruchtentwicklung beteiligt, stimuliert die Sprossstreckung, reguliert die Apikaldominanz und steuert Photo- und Gravitropismus (Davies, 1995).

Die aktive Auxinsubstanz ist Indolessigsäure (IES/IAA). Diese freie Form macht jedoch nur 1 % des Auxins in Pflanzen aus (Park *et al*., 2001), der Hauptteil liegt in inaktiver Form, konjugiert mit Aminosäuren, Peptiden, Kohlenhydraten und myo-Inositol vor (Cohen & Bandurski, 1982). Konjugierten Auxinen wird eine Funktion für Speicherung und Transport zugeordnet (Cohen & Brandurski, 1982; Bandurski *et al*., 1995).

Die Untersuchungen von Ljung *et al*. (2001a, 2001b) wiesen nach, dass alle pflanzlichen Gewebe zur IAA-Synthese befähigt sind. Die Hauptsynthese findet jedoch im Apikalmeristem und jungen Blättern statt (Normanly, 1997), wo es dann über den polaren Auxintransport zur Sprossbasis verlagert wird und in Wurzelspitzen akkumulieren kann (Estelle, 2001). Durch den darüber ausgebildeten Konzentrationsgradienten werden Entwicklungsprozesse von Auxin gesteuert (Jackson, 1993).

Aufgrund der elementaren Bedeutung von Auxin für die Steuerung pflanzlicher Entwicklungsprozesse ist die Kontrolle der Auxinbalance von entscheidender Bedeutung. Als Regelgrößen der Auxinkonzentration wurden neben *de novo* Synthese und oxidativer Decarboxylierung physikalische Mechanismen, wie Transport und Kompartimentierung, sowie biochemische Möglichkeiten, wie Konjugation und Dekonjugation beschrieben (Normanly *et al.*, 1995; Normanly, 1997). Als eine weitere Regulationsebene wurde weiterhin eine ausgeprägte Redundanz der Metabolismuswege von Synthese und Katabolismus beobachtet (Schneider & Wightman, 1978; Moore, 1989; Normanly & Bartel, 1999).

Bei der Auxinbiosynthese wird von Tryptophan-abhängigen und Tryptophan-unabhängigen Reaktionswegen ausgegangen (Bartel, 1997; Cohen *et al*., 2003). Die relative Bedeutung dieser zwei prinzipiellen Wege für die Auxinsynthese in Pflanzen ist noch ungeklärt, konnte aber u.a. für *Arabidopsis thaliana* (Normanly *et al*., 1993; Müller & Weiler, 2000) und Mais (Wright *et al*., 1992) gezeigt werden. Untersuchungen von Michalczuk *et al*. (1992) führen eine entwicklungsabhängige Aktivierung der verschiedenen Biosynthesewege aus.

Bislang liegt noch kein umfassendes Bild der Auxinbiosynthese in Pflanzen vor. Die Identifizierung, Klonierung und heterologe Expression von Genen, die für Enzyme des Tryptophan-abhängigen Auxinsyntheseweges kodieren, wurden in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen begonnen. Dazu gehört die Nitrilase-Genfamilie aus *A. thaliana*, die die Konversion von Indol-3-acetonitril

(IAN) zu IAA katalysiert (Bartling *et al*., 1992; Bartling *et al*., 1994; Bartel & Fink, 1994) und von Bedeutung für die IAA-Synthese in dieser Spezies und anderen Brassicaceen sein soll (Ludwig-Müller & Hilgenberg, 1988), aber auch für den Glucosinolat-Metabolismus wichtig sind (Vorwerk *et al*., 2001).
Ebenso wurden Gene des Indol-3-pyruvatweges aus *A. thaliana* kloniert (Sekimoto *et al*., 1997, 1998). Aldehyd-Oxidasen leiten die Umsetzung von Indol-3-acetaldehyd zu IAA und werden für die Auxinüberproduktion in der *A. thaliana*-Mutante *superroot* verantwortlich gemacht (Boerjan *et al*., 1995). Doch neben den Arbeiten zur Gen-Identifizierung stehen Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung und Bestimmung der möglichen Relevanz für die pflanzliche Auxinsynthese noch aus.
Auf Seiten des Auxinmetabolismus wurden bisher noch keine beteiligten Gene identifiziert und heterolog exprimiert.

1.1.1.2. Der synthetische Auxin-induzierbare Promotor DR5

Ein Wirkungsmechanismus von Auxin ist durch Auxin-induzierte Transkription von Genen. Bislang wurden drei unterschiedliche Familien von Auxin-responsiven Genen bestimmt. Dazu gehören die AUX/IAA-Familie, die GH3-Familie und die SAUR-Genfamilie (Abel & Theologis, 1996; Hagen & Guilfoyle, 2002).
Diese Genfamilien zeigen sehr schnelle Expressionsanstiege nach Auxinapplikation, die durch spezifische Promotorelemente verursacht sind.
Auf der Basis dieser Beobachtungen wurde der Promotor DR5 zum Studium auxinabhängiger Genexpression entwickelt. Dieses Regulationselement ist die Fusion aus einem synthetischen Promotor, der aus der siebenfachen Wiederholung der Auxin-responsiven Basenfolge TGTCTC besteht und einem minimalen 35S-Promotor (Ulmasov *et al*., 1997). Die Charakterisierung dieses Promotors zeigte eine schnelle Reaktion auf aktives Auxin bei Konzentrationen von 10^{-08}-10^{-04} M IAA (Ulmasov *et al*., 1997).
Damit stellt dieser synthetische Promotor einen spezifischen und sensitiven Indikator für aktive Auxine dar und ermöglicht die Visualisierung von Auxin auf Zellebene in pflanzlichen Geweben (Sabatini *et al*., 1999; Casimiro *et al*., 2001; Benkova *et al*., 2003). Ein Vergleich der Ergebnisse zur endogenen IAA-Verteilung, zum einen erhoben aus DR5 gesteuerter Beta-Glucuronidase

(DR5-GUS) Reportergenaktivität mit Ergebnissen aus MS-Messungen ergaben eine Übereinstimmung (Sabatini *et al*., 1999; Casimiro *et al*., 2001).
Damit steht über die Erstellung von DR5-Reportergenlinien eine Möglichkeit zur Verfügung Veränderungen in der Auxinkinetik auf Zellebene abzubilden.

1.1.2. Cytokinine

Cytokinine repräsentieren eine Phytohormonklasse, die eine wichtige Funktion in der Entwicklungskoordinierung der Pflanze einnehmen. Sie wirken in allen pflanzlichen Entwicklungsstadien, wie Kontrolle von Zellteilung und -differenzierung, Induktion der Samenkeimung, Ausbildung und Entwicklung von Knospen, Blattexpansion, Kontrolle der apikalen Dominanz, Inhibierung des Wurzelwachstums, Blütenbildung, Entwicklung von Chloroplasten, Chlorophyllsynthese und Verzögerung der Seneszenz (Binns, 1994; Davies, 1995).

Biochemisch betrachtet stellen alle in Pflanzen vorkommenden Cytokinine N^6-substituierte Adeninderivate dar (Kaminek, 1992). Nach der Art des N^6-Restes findet eine Unterscheidung in Isoprenoid-Adenin und Benzyl-Adenin (auch als aromatische Cytokinine bezeichnet) statt, deren biologische Aktivität vergleichbar ist, wobei jedoch Isoprenoid-Cytokinine den größeren Teil in Pflanzen ausmachen (Schmülling, 2004). Die Isopentenylseitenkette der Isoprenoid-Cytokinine kann eine Hydroxylierung aufweisen, woraus die Zeatinbildung resultiert. Eine weitere Reduktion führt zur Bildung von Dihydrozeatin.
Neben den Modifikationen des N^6-Restes bestehen auch Substituierungsmöglichkeiten an Position 3, 7 und 9 des Adeninrings und führen zu Glukosylierungen und Ribosylierungen.
Aufgrund dieser Vielzahl von Modifikationsmöglichkeiten kommen Cytokinine in der Pflanze als freie Basen, Glucoside, Nukleotide, Riboside und Ribotide vor. Diese metabolischen Konversionsmöglichkeiten sind ein wichtiger Mechanismus bei der Regulation der Konzentration des aktiven Cytokinins. Nur den freien Basen und ihren Ribosiden kommt eine Funktion als aktive Cytokinine zu. Glukosylderivate stellen inaktive Cytokinine dar, deren Bedeutung in Transport und Inaktivierung liegen (Letham 1994).

Die Cytokininbildung erfolgt in Pflanzen über *de novo* Synthese. Dabei wird eine Isopentenylgruppe von Dimethylallyl-Diphosphat (DMAPP) auf Adeninmoleküle (ATP, ADP oder AMP) übertragen und Isopentenyladenosin-5'-phosphat (iAMP, iADP, iATP) gebildet. Diese Reaktion wird von Isopentenyltransferasen katalysiert. Erst 2001 gelang die Identifizierung pflanzlicher Isopentenyltransferasen (Kakimoto, 2001; Takei *et al*., 2001). Frühere Versuche resultierten lediglich in Enzymaufreinigungen, die eine *ipt*-Aktivität aufwiesen (Holtz & Klämbt, 1978; Chen & Melitz, 1979).
Eine zweite Möglichkeit der Cytokininbildung liegt in der Degradation von tRNA-Molekülen. Dabei wird ebenfalls von Isopentenyltransferasen ein Isopentenyladenosinrest auf das tRNA-Molekül übertragen. Bei der Degradation dieser isopentenylierten tRNAs werden dann freie Cytokinine gebildet. Kalkulationen des tRNA-Umsatzes schließen jedoch aus, dass es sich dabei um den hauptsächlichen Cytokininsyntheseweg handelt (Kaminek, 1974; Kaminek, 1992; McGaw, 1987).
Ein *ipt*-unabhängiger Cytokininbildungsweg wurde von Astot *et al*. (2000) beschrieben, nach dem eine hydroxylierte Seitenkette direkt an die N^6-Position des Adeninrings angefügt wird.
Bislang liegen jedoch keine Untersuchungen in der Literatur vor, die eine Einordnung der Bedeutung des *ipt*-abhängigen und *ipt*-unabhängigen Syntheseweges für die pflanzliche Cytokininbildung zulassen.

Als Hauptorte der Cytokininbiosynthese wurden die Wurzeln beschrieben, von denen dann über das Xylem die Verteilung in der Pflanze erfolgt (Letham, 1994). Die Untersuchungen von Singh *et al*. (1992) und Nordström *et al.* (2004) zeigten jedoch, dass auch junge Blätter zur Cytokininsynthese fähig sind. Auch die Transkriptanalysen der *ipt*-Gene in *A. thaliana* weisen eine differenzielle Expression der Genfamilie aus, die in Wurzelspitzen, Blattachseln, unreifen Samen, jungen Blättern und generativen Organen nachgewiesen wurde (Miyawaki *et al*., 2004).
Aus diesen Analysen ließen sich auch erste regulierende Einflussfaktoren auf die Cytokininsynthese bestimmen. So zeigten die Autoren in den Transkript-Analysen, dass Cytokinine als Expressionsrepressoren wirken, Auxin und Nitrat hingegen als Expressionsaktivatoren. Diese Ergebnisse basieren auf Promotor-GUS Analysen

der einzelnen Isopentenyltransferase-Gene aus *Arabidopsis thaliana*. Nordström *et al*. (2004) applizierten Auxin und quantifizierten die Cytokininbildung über die Messung von Zeatinribosid-5'-monophosphat und Zeatinribosid. Dabei wiesen sie nach, dass Auxin eine negative Regulationsfunktion auf den Cytokiningehalt über Repression des *ipt*-unabhängigen Biosynthesewegs ausübt.

Der irreversible Abbau der Cytokinine erfolgt durch das Enzym Cytokininoxidase/-deydrogenase (CKX). Wie Kaminek *et al.* (1997) ausführten, bewirkt die Erhöhung dieser Enzymaktivität eine Reduktion der Phytohormonkonzentration in der Zelle und stellt einen wichtigen Mechanismus der Regulation der Cytokininhomöostase dar (Werner *et al*., 2001; Schmülling, 2003). Dies unterstützt die Ergebnisse von Motyka *et al*. (1996), die eine Substrat-induzierte Kinetik des Enzyms zeigen konnten.
Ähnlich den Isopentenyltransferasen war die katabolische Aktivität eines Pflanzenenzyms auf die Cytokininkonzentration lange bekannt und partielle Aufreinigungen erfolgten aus Tabak (Paces *et al*., 1971) und Mais (Whitty & Hall, 1974). Die Identifizierung dieses Enzyms gelang aber erst kürzlich (Houba-Hérin *et al.*, 1999; Morris *et al*. 1999). Die CKX katalysiert den Abbau von Cytokinin durch Abspaltung der Isoprenoidseitenkette zu Adenin und dem entsprechenden Aldehyd. Die N^6-Substitution der Cytokininverbindungen führt zur Substraterkennung (Galuszka *et al*., 2001).
Mit der heterologen Expression von 35S-*AtCKX* in *N. tabacum* konnte Werner *et al.* (2001) erstmalig neben dem biochemischen Nachweis der Cytokininoxidaseaktivität auch pflanzenphysiologische Merkmale einer Reduktion der Cytokininkonzentrationen *in planta* zeigen.

1.2. Die Apikaldominanz bestimmt die Lateralverzweigung

Pflanzen sind aufgrund ihrer standortgebundenen Lebensweise darauf angewiesen ihren Lebenszyklus von der Keimung bis zur Reproduktion aus den verfügbaren Konditionen zu bestreiten. Sie müssen dafür u.a. ihr Wuchsverhalten den gegebenen Bedingungen entsprechend anpassen. Dazu gehört auch das Ausmaß der Seitenverzweigung, die die Pflanzen ausbilden, zu regulieren.

Untersuchungen zu Pflanzenverzweigungsmustern haben sowohl genetische Faktoren als auch Umweltvariable als Einflussfaktoren auf die Ausbildung der Pflanzenmorphologie herausgestellt (Horvath *et al*., 2003; McSteen & Leyser, 2005).
Ein in vielen Pflanzenspezies beobachtetes Phänomen ist die Apikaldominanz, die die Unterdrückung des Seitenknospenaustriebes durch eine intakte Apikalsprossknospe bezeichnet. Erst nach Übergang der Pflanzen aus der vegetativen in die generative Wachstumsphase kommt es zur Seitentriebbildung.
Untersuchungen zur Regulation dieses Mechanismus haben die Bedeutung des relativen Verhältnisses von Auxin und Cytokinin zueinander für die Ausprägung der Apikaldominanz herausgestellt (Stafstrom, 1993). Neueste Untersuchungen belegen die Beteiligung eines zusätzlichen, bislang aber noch nicht identifizierten Signals (Beveridge, 2006).

1.2.1. Regulation der Apikaldominanz durch Auxin und Cytokinin

Dekapitierungsstudien von Thimann & Skoog (1933) in *Vicia faba* zeigten, dass die Aktivität der Seitenknospen unter Kontrolle des Sprossapex steht und eine Entfernung dessen zum Lateralaustrieb führt. Dieses Reaktionsmuster wurde in späteren Jahren für eine Reihe weiterer Pflanzenspezies bestätigt (Phillips, 1975). Die inhibierende Substanz konnte aus den Bohnensprossspitzen isoliert und als Auxin identifiziert werden. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass Auxinapplikationen auf die Dekapitierungsstelle den Lateralaustrieb verhinderten (Thimann & Skoog, 1934).
Dass diese Wirkung des Auxins u.a. durch den basipetalen Auxintransport vermittelt wird, konnte in späteren Arbeiten mit Auxintransport-Inhibitoren, deren Applikation in einem Lateralaustrieb resultierte, bestätigt werden (Snyder, 1949; Panigrahi & Audus, 1966; Tamas, 1987; Prasad *et al.*, 1989). Auch die *Arabidopsis*-Mutante *tir3,* die einen reduzierten Auxintransport aufweist, ist morphologisch u.a. durch eine erhöhte Seitenverzweigung gekennzeichnet (Ruegger *et al*., 1997).
Auxin und dessen basipetaler Transport waren aus diesen Beobachtungen als das Signal, das die Wuchsinhibierung von der apikalen Sprossknospe in die

Lateralknospen vermittelt, vermutet worden. Doch durch Untersuchungen an Mutanten des Auxinsignalweges wurden Defekte in der Sprossverzweigung und Auxinresponsivität der Lateralknospen beschrieben, die auch eine Beteiligung des Auxinsignalweges an der Regulation der Apikaldominanz herausstellten (Lincoln *et al*., 1990; Leyser *et al*., 1993,1996; Hamann *et al*., 1999; Stirnberg *et al*., 1999).
Auf welche Weise Auxin in der Vermittlung der Apikaldominanz wirkt, war über viele Jahre der Untersuchungen unklar. Viele Ergebnisse zeigten, dass Auxin nicht direkt in den Lateralknospen wirkt. So konnte gezeigt werden, dass basipetal transportiertes Auxin nicht in die Knospen gelangt (Hall & Hillmann, 1975; Morris, 1977; Everat-Bourbouloux & Bonnemain, 1980, Prasad *et al*., 1993; Booker *et al*., 2003). Ebenso zeigen verschiedene Untersuchungen, dass die Auxingehalte in Seitenknospen nicht mit dem Grad der Knospeninhibierung korrelieren, sondern z.T. nach Brechung der Apikaldominanz in auswachsenden Seitenknospen konstant bleiben oder ansteigen (Hillmann *et al*., 1977, Pilate *et al*., 1989; Gocal *et al.*, 1991). Auch konnte die direkte Applikation von Auxin auf Lateralknospen den Seitenaustrieb nicht verhindern (Brown *et al.*, 1979). Erst 2003 konnten durch Booker *et al*. gezeigt werden, dass der Wirkungsort von Auxin bei der Inhibierung des Seitenknospenwachstums Xylem-assoziiertes Gewebe am Nodium ist.
Die Beobachtungen zur indirekten Wirkung von Auxin bei der Vermittlung der Apikaldominanz stützen frühere Argumentationen von Snow (1937), dass Auxin ein indirekter Einflussfaktor ist und ein weiteres Signal an der Vermittlung der Apikaldominanz beteiligt sein muss. Cytokinin wurde aufgrund seiner funktionellen Bedeutung für die Zellteilungsaktivität bereits sehr früh als zweiter beteiligter Faktor an der Ausprägung der Apikaldominanz vermutet (Wickson & Thimann, 1958).
Die stimulatorische Wirkung von Cytokinin auf den Lateralaustrieb konnte verschiedentlich gezeigt werden. Zum einen resultierte die direkte Applikation von Cytokininen auf Seitenknospen in ihrem Austrieb (Sachs & Thimann, 1964; Chatfield *et al*., 2000; Li & Bangerth, 2003) und zum anderen konnte basal appliziertes Cytokinin den inhibierenden Effekt apikalen Auxins verhindern (Chatfield *et al.*, 2000). Auch in austreibenden Seitenknospen wurde der Anstieg der Cytokiningehalte gezeigt (Cline 1991; Turnbull *et al*., 1997).
In vielen Untersuchungsergebnissen konnte dabei auch die gegenseitige, wechselseitige Beeinflussung von Auxin und Cytokinin gezeigt werden. Welche

dieser Interaktionsebenen für die Vermittlung der Apikaldominanz eine regulatorische Bedeutung hat, ist jedoch noch nicht gezeigt worden. Palni *et al*. (1988) wies eine inverse Korrelation der Cytokininstabilität zur Auxinkonzentration nach. Zuvor konnten Hansen *et al.* (1987) bereits zeigen, dass Auxin die Cytokininakkumulation verhindert. Auch die Biosynthese und der Export von Cytokinin aus den Wurzeln werden von Auxin kontrolliert (Bangerth, 1994; Eklöf *et al.*, 1996; Li *et al*., 1995). Im Gegenzug konnten Li & Bangerth (2003) nach Cytokininapplikation auf Nodien von *P. sativum* zeigen, dass der Lateralknospenaustrieb von steigenden IAA-Gehalten im Spross begleitet wurde. Erste Nachweise auf molekularer Ebene wurden von Tanaka *et al.* (2006) gezeigt. Sie wiesen eine negative Regulatorfunktion von Auxin auf die Cytokininsynthese am Nodium nach. Danach wurde die *ipt*-Expression in *P. sativum* nach Dekapitierung deutlich gesteigert und führte zu steigenden Cytokiningehalten in diesen Geweben.

1.2.2. Beteiligung eines weiteren Signals an der Apikaldominanz

Eine Gruppe von pflanzlichen Mutanten, die durch erhöhte Verzweigung, reduzierte Wuchshöhe und insbesondere Auxin-resistenten Seitenknospenwuchs auffiel, wurde in den letzten Jahren untersucht. Aufgrund der beobachteten Phänotypen war eine Beteiligung der mutierten Genorte für die Ausprägung der Apikaldominanz naheliegend. Erste Ergebnisse der Untersuchungen in *P. sativum* und *A. thaliana* zeigen, dass neben Auxin ein weiterer negativer Regulator in der Vermittlung der Sprossverzweigung existiert.

In *P. sativum* wurden fünf Gene (*rms*1-5), in *A. thaliana* vier Gene (*max*1-4) und in *P. hybrida* ein Gen als Beteiligte der Auxin-vermittelten Inhibierung des Lateralknospenwuchses beschrieben (Beveridge *et al*., 1994, 1996, 1997b; Morris *et al*., 2001; Stirnberg *et al*., 2002; Sorefan *et al.*, 2003; Booker *et al*., 2004, 2005; Snowden *et al*., 2005).

Bei *max4*, *rms1* und *dad1* handelt es sich um Orthologe (Sorefan *et al.*, 2003; Snowden *et al.*, 2005), ebenso wurde zu *max2* ein Ortholog in Reis beschrieben (Ishikawa *et al.*, 2005). Zou *et al*. (2006) wiesen in Reis ein weiteres Ortholog zu *max3* nach. Dadurch ist anzunehmen, dass es sich dabei um einen hochkonservierten Regulationsmechanismus handelt.

Jedoch deuten erste Charakterisierungen bereits eine unterschiedliche Regulation der Signalwege an. So erfolgt die Interaktion von Auxin mit diesem Signalweg in Erbse bereits bei der Expression von *RMS*1, hingegen wird das *RMS*1-Ortholog in *A. thaliana*, *MAX*4, posttranskriptionell beeinflusst (Booker *et al*., 2005; Bainbridge *et al*., 2005).

RMS1 gehört zur Familie der Carotinoid-spaltenden Dioxygenasen (CCD) (Sorefan *et al*., 2003). Die Untersuchungen von Beveridge *et al.* (2000) und Foo *et al.* (2001) zeigten, dass *RMS1* erforderlich ist für die Bildung eines Langstrecken-, Pfropfungs-übertragbaren und akropetal transportierten Signals, dass die Verzweigung inhibiert. Die Expression von *RMS1* wird zum einen von IAA induziert, aber zum anderen auch durch ein IAA-unabhängiges Rückkopplungssignal (Foo *et al.*, 2005). Diese Expressionsanalysen stimmen mit den Beobachtungen aus physiologischen Studien überein (Beveridge *et al.*, 1997a; Beveridge, 2000)
Weitere Analysen der Mutanten bezüglich Cytokinin- und Auxinveränderungen im Vergleich zum Wildtyp wiesen eine Reduktion der Cytokininbeladung des Xylemsaftes aus den Wurzeln in den Mutanten *rms*1, *rms*3, *rms*4 und *rms*5 aus, während der IAA-Transport in *rms*2, *rms*3 und *rms*4 unverändert war (Beveridge *et al.*, 1994, 1997a; Beveridge, 2000; Morris *et al.*, 2001).

Alle vier *MAX*-Loci sind Bestandteil eines Signalweges, der auf die Ausprägung der Apikaldominanz einwirkt (Stirnberg *et al.*, 2002; Sorefan *et al.*, 2003; Booker *et al.*, 2004). Nach dem gegenwärtigen Modell, dass sich aus den Ergebnissen der molekularen Identifizierung der MAX-Genprodukte, sowie Expressionsstudien ergibt, wirkt der *MAX*-Signalweg unabhängig vom Auxinsignalweg über die Regulation der Auxintransportkapazität in der Sprossachse (Bennett *et al.*, 2006). *MAX*1, *MAX*3 und *MAX*4 sind an der Bildung dieses Signals beteiligt. *MAX2*, kodiert für ein F-Box Protein der SCF Familie von Ubiquitinligasen, dessen Funktion in der Vermittlung der Proteindegradation liegt (Woo *et al*., 2001; Stirnberg *et al*., 2002) und in der Signaltransduktion wirkt (Ward & Leyser, 2004; Booker *et al.*, 2005).
MAX1 kodiert ein Mitglied der Cytochrom P450-Familie (Sorefan *et al*., 2003; Booker *et al*., 2004; Booker *et al*., 2005) und wirkt als positiver Regulator des

Flavonoidweges (Lazar & Goodmann, 2006), dessen Bedeutung für den Seitenaustrieb als endogene Auxintransport-Inhibitioren von Borevitz *et al.* (2000) und Brown *et al.* (2001) gezeigt worden war.
MAX3 und *MAX4* kodieren Mitglieder der Carotinoid-spaltenden Dioxygenasen (CCD) und sind erforderlich für die Synthese eines Langstreckensignals für die Lateralverzweigungskontrolle (Sorefan *et al*., 2003; Booker *et al.,* 2004). In einem bakteriellen Expressionsassay wurde gezeigt, dass sie eine Vielzahl von Carotinoidsubstraten spalten können, aber die *in planta* Substrate sind noch nicht bestimmt worden (Booker *et al.*, 2004; Schwartz *et al*., 2004). Bei der Überexpression von 35S-*MAX4* in *A. thaliana* blieben phänotypische Auffälligkeiten aus, so dass u.U. aus dem Zusammenwirken von *MAX3* und *MAX4* das Signal zur Inhibierung der Lateralverzweigung entsteht (Bainbridge *et al.*, 2005).

1.2.3. Nutzung phytobakterieller Gene zur Beeinflussung der Apikaldominanz

Phytohormongene aus phytopathogenen Bakterien wurden in vielen Untersuchungen aus Mangel an identifizierten Genen, die in Pflanzen an der Regulation des Auxin- und Cytokininmetabolismus beteiligt sind, verwendet. Durch Nutzung heterologer Expression dieser Gene in Pflanzen konnten die Möglichkeiten der Manipulation der Auxin-Cytokinin Balance aufgezeigt werden (Hamill, 1993; Napoli & Klee, 1993; Klee & Romano, 1994; Gaudin *et al.*, 1994; Hedden & Phillips, 2000).

iaaH

iaaH ist Bestandteil eines bakteriellen Auxinbiosyntheseweges in *A. tumefaciens*. In diesem wird Tryptophan von dem Enzym Tryptophan-Monooxygenase (*iaaM*-Gen) zu IAM konvertiert. Dieses stellt das Substrat für *iaaH* (Indol-3-acetamid Hydrolase) dar und wird zu IAA hydrolysiert. Dieser bakterielle Auxinsyntheseweg wurde in verschiedenen Bakteriengattungen, wie *Agrobacterium* (Schröder *et al*., 1984), *Azospirillium* (Bar & Okon, 1993), *Pseudomonas* (Magie *et al*., 1963) und *Streptomyces* (Manulis *et al*., 1994) beschrieben, in Pflanzen existiert dieser Auxinbildungsweg nicht. Unklarheit

besteht über das Auftreten des Zwischenproduktes Indolacetamid in Pflanzen (Letham *et al*., 1978).
Die bakteriellen Auxinbiosynthesegene *iaaM* und *iaaH* wurden in verschiedenen Pflanzenspezies wie Petunie (Klee *et al*., 1987), Tabak (Sitbon *et al.,* 1991, 1992) und Arabidopsis (Romano *et al*., 1991, 1993) transformiert und auf ihre Effekte bezüglich der pflanzlichen Auxinbalance und resultierende phänotypische Veränderungen untersucht. Bei der Expression dieser Gene von ihren nativen Promotoren wurden keine phänotypischen Effekte beobachtet (Follin *et al*., 1985). Wurde die Transkription jedoch von einem 19S-CaMV Promotor kontrolliert, kam es zur Erhöhung der Auxingehalte in der Pflanze um den Faktor 10 und die resultierenden Phänotypen wiesen Merkmale vergleichbar einer exogenen Auxinapplikation auf, wie epinastisches Blattwachstum, erhöhte Xylemproduktion, Adventivwurzelbildung und Apikaldominanz (Klee *et al.*, 1987).
Als entscheidender Schritt der Beeinflussung der Auxinhomöostase erwies sich die Transformation mit dem *iaaM*-Gen, welches ausreichend für eine Erhöhung der Auxingehalte in der Pflanze ist (Klee *et al.,* 1987), jedoch wiesen die Arbeiten von Inzé *et al*. (1984) und Budar *et al.* (1986) die Möglichkeiten der Pflanzentransformation mit dem *iaaH*-Gen und anschließender Phänotypenselektion unter Zugabe des Substrats NAM aus.

iaaL

Das Bakterium *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* besitzt auf seinem Plasmid ein Auxinmetabolismusgen. Dieses *iaaL*-Gen kodiert für eine IAA-Lysin-Synthetase, welche die Auxinkonjugatbildung aus Auxin und Lysin katalysiert (Glass & Kosuge 1986, Roberto *et al.,* 1990) und in einem Verlust der Auxinaktivität resultiert. Neben Lysin können aber auch andere basische Aminosäuren für die Konjugatbildung von dem Enzym genutzt werden (Kosuge *et al.,* 1983, Roberto *et al.,* 1990).
Transgene Pflanzen, darunter Tabak (Spena *et al*., 1991), Kartoffel (Spena *et al.,* 1991) und *Arabidopsis* (Romano *et al.,* 1995), die das *iaaL*-Gen unter konstitutiver 35S-CaMV Kontrolle exprimierten, zeigten morphologische Veränderungen, die für eine Reduktion des aktiven Auxingehaltes in diesen Pflanzen sprechen. Dazu gehörten reduziertes Wurzelwachstum, erhöhte Seitentriebbildung, verringerte

Apikaldominanz und epinastisches Blattwachstum. Die Reduktion des aktiven Auxingehaltes erfolgte um den Faktor 19 (Klee & Lanahan, 1995), wogegen Romano *et al.* (1991) und Spena *et al*. (1991) keine signifikante Reduktion des Gehaltes freien Auxins trotz deutlicher Auxinkonjugat-Akkumulation beobachteten. Die kontrollierte Habitusbeeinflussung durch eine *iaaL*-Expression wurde von Romano *et al.* (1993) unter Verwendung des Hitze-induzierbaren Promotors HSP70 versucht.

ipt

Ein bakterielles Cytokinin-Synthesegen befindet sich auf dem Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens*. Dieses Gen kodiert eine Isopentenyltransferase, die die Kondensierung von Isopentenyl Pyrophosphat (IPP) und Adenosin-5`-Monophosphat (AMP) zu Isopentenyl-AMP katalysiert (McGaw, 1987). Dies ist die Vorstufe aller Cytokinine und kann von der Pflanze zu aktiven Cytokininen metabolisiert werden (vgl. 1.1.2.).

Dieses bakterielle Gen wurde in zahlreichen Untersuchungen als Möglichkeit der Steigerung endogener Cytokiningehalte verwendet.

In Studien zur Pflanzentransformation mit einem konstitutiv exprimierten *ipt*-Gen unter Kontrolle des nativen Promotors oder des 35S-CaMV Promotors wurden deutlich erhöhte Cytokiningehalte und verringerte Konzentrationen freier und konjugierter Auxine beobachtet (Klee *et al.*, 1987; Smigocki & Owens, 1988; Smigocki & Owens, 1989). Daraus resultierten dramatische phänotypische Entwicklungsveränderungen, wie Brechung der Apikaldominanz, Verlust der Wurzelbildung und Kallusbildung an der Sprossbasis, Verzwergung und reduzierte Blattfläche durch kleinere runde Blätter ohne Expansionswachstum.

Durch die nicht zu kontrollierende Cytokininüberproduktion bei konstitutiver *ipt*-Expression wurde die normale Pflanzenentwicklung verhindert und die erzeugten transgenen hochverzweigten nicht-elongierenden Sprosse konnten nicht bewurzelt werden (Schmülling *et al.*, 1989; Smigocki, 1991; Hewelt *et al.*, 1994).

Durch den Einsatz induzierbarer oder lokal-begrenzter Expression des *ipt*-Gens wurden Ansätze zur kontrollierten Cytokininsynthese in transgenen Pflanzen beschrieben. Dabei wurden ein hitzeinduzierbarer Promotor (*hsp70*) (Medford *et*

al., 1989), ein Dexamethason-induzierbares Regulationselement eines humanen Glucocorticoid-Rezeptors (Kunkel *et al*., 1999), ein Kupfer-induzierbarer Promotor (McKenzie *et al*., 1998), sowie der bakterielle Tetrazyklin-Repressor (TetR) (Redig *et al.,* 1996; Faiss *et al*., 1997) untersucht. *Hsp70* zeigte eine hohe Basalexpression, deren phänotypische Auswirkungen bereits ohne Hitzeinduktion deutlich einer Überexpression entsprachen. TetR zeigte stringente Regulationseigenschaften, die Apikaldominanz konnte gebrochen werden, jedoch traten auch phytotoxische Effekte auf. Ein ähnliches Ergebnis konnte mit dem Kupfer-induzierbaren Promotor erzielt werden.

rolA

Das *rolA* Gen wurde aus dem Ri-Plasmid von *A. rhizogenes* isoliert. Bei der Expression in *A. thaliana* (Dehio & Schell, 1993) und *N. tabacum* (Schmülling *et al.*, 1988; Sinkar *et al.*, 1988; Sun *et al*., 1991; Dehio *et al.*, 1993 Carneiro & Vilaine, 1993) kam es zur Ausbildung pleiotroper Phänotypen, die die Entwicklung nahezu aller Pflanzenorgane betraf. Die beobachteten phänotypischen Veränderungen ließen sich durch Verwendung des 35S-CaMV-Promotors deutlich verstärken (Guivarc'h *et al*., 1996; Nilsson & Olsson, 1997).

Die morphologischen Merkmale *rolA*-transgener Pflanzen umfassen eine Reduktion des Pflanzenwuchses aufgrund verkürzter Internodien, welche bis zur Verzwergung unter 35S-CaMV Transkriptionskontrolle ausgeprägt sein kann, sowie hochgradig faltige Blätter durch die Entkopplung des koordinierten Wachstums von Vaskular- und Blattparenchymgewebe, einhergehend mit einem veränderten Blattlängen zu Blattweiten-Verhältnis (Schmülling *et al.*, 1988; Sinkar *et al.*, 1988; Sun *et al*., 1991; Dehio *et al.*, 1993). Zum Teil wurde auch Epinastie der Laubblätter beobachtet. Weiterhin war das Blühverhalten in *rolA*-exprimierenden Pflanzen betroffen. Neben einer reduzierten männlichen Fertilität wurden verkürzte Blütenstände mit größeren Blüten bei Tabak (Schmülling *et al.*, 1988; Sinkar *et al.*, 1988) beobachtet, aber auch eine verspätete Blüte mit kleinen aberranten Blüten trat bei Tabak (Martin-Tanguy *et al.*, 1990; Sun *et al*., 1991) und Tomate (van Althorst *et al*., 1992) auf.

Die molekulare Funktion des *rolA*-Genproduktes ist noch unklar. Entsprechend der beobachteten phänotypischen Merkmale wurden Veränderungen in Phytohormongehalt und –sensitivität der Transgenen vermutet.
Die Untersuchungen von Maurel *et al*. (1991) und Vansuyt *et al.* (1992) wiesen eine erhöhte Sensitivität von Tabakprotoplasten bzw. Plasmamembranvesikeln aus. Weiterhin konnte ein veränderter Auxingradient im Spross von Prinsen *et al*. (1994) beobachtet werden.
Ebenso konnte eine deutliche Beeinflussung der Gibberellin-Gehalte nachgewiesen werden. Die Konzentration des aktiven Gibberellins GA_1 war im apikalen Sprossbereich und den Laubblättern reduziert (Schmülling & Schell, 1993; Dehio *et al*., 1993). Eine Reduktion des Gibberellin-Gehaltes kann den beobachteten Zwergwuchs in *rolA* transgenen Pflanzen erklären, aber nicht allein die Ursache der *rolA*-Merkmale sein, denn Moritz & Schmülling (1998) zeigten, dass durch exogene GA-Applikation der Phänotyp des Wildtyps nicht wiederhergestellt werden kann.
Neben dieser Beeinflussung des Metabolismus verschiedener Phytohormone führten die Untersuchungen von Sun *et al.* (1991) und Ben-Hayyim *et al.* (1996) eine Korrelation des *rolA*-Phänotyps mit einem veränderten Polyaminmetabolismus an, sie zeigten die Inhibierung der Akkumulation von Polyaminkonjugaten.

rolC

rolC ist neben *rolA* ein weiteres auf dem Ri-Plasmid von *A. rhizogenes* lokalisiertes Gen, dessen Expression in trangenen Pflanzen zu markanten phänotypischen Habitusveränderungen führte.
Bei einer *rolC*-Expression in *N. tabacum* (Schmülling *et al.*, 1988; Oono *et al.,* 1990; Scorza *et al.*, 1994), *Osteospermum ecklonis* (Giovanni *et al.*, 1999) und Petunie (Winefield *et al*., 1999), war allen Untersuchungen eine Reduktion der Pflanzenhöhe durch verkürzte Internodien, sowie ein Verlust der Apikaldominanz, resultierend in einem kompakten buschigen Phänotyp gemein. Daneben war das Blühverhalten beeinflusst; die Blütenbildung war verstärkt und der Blütenzeitpunkt verfrüht. In vielen Fällen konnte eine männliche Sterilität der Pflanzen beobachtet werden. Die Blätter wiesen eine Lanzettform auf, wodurch eine Reduktion der

Blattfläche resultierte. Außerdem war der Chlorophyllgehalt reduziert, sodass die Blätter hellgrün erschienen.
In Untersuchungen an Nelke (Casanova *et al.*, 2003, 2004) konnte eine verbesserte Bewurzelung von Stecklingen beobachtet werden.
Aufgrund dieser beobachteten phänotypischen Merkmale wurde für die *rolC*-Aktivität eine Modulation endogener Pflanzenwachstumsfaktoren bzw. eine modifizierte Sensitivität gegenüber Phytohormonen abgeleitet. Ein Teil der *rolC*-assoziierten Habitusveränderungen deutet auf eine Verstärkung der Cytokiningehalte in den transgenen Pflanzen hin. Doch obwohl Estruch *et al.* (1991) zeigen konnte, dass das *rolC*-Genprodukt eine ß-Glucosidase ist, die Cytokininkonjugate in aktive Cytokininverbindungen metabolisieren kann, konnte der Nachweis dieser Funktion *in planta* nicht erbracht werden. Neben veränderten Cytokiningehalten konnte auch eine deutliche Reduktion des aktiven Gibberellins GA_1 gezeigt werden, wodurch sich die Verzwergung der *rolC*-transgenen Pflanzen erklären lässt (Nilsson *et al*., 1993, 1996).
Faiss *et al*. (1996) führen als Primärwirkung des *rolC* eine Modifizierung von „low molecular weight substances“ an, wie z.B. Oligosaccharine, denen phytohormonähnliche Wirkungseffekte zugeschrieben werden.

1.3. Möglichkeiten transgener und transienter Expressionsansätze zur Modulation der Cytokinin-Auxin Balance *in planta*

1.3.1. Pflanzenvirale Expressionsvektoren

Untersuchungen zur Nutzung pflanzenviraler Expressionsvektoren haben gezeigt, dass es sich um ein starkes, systemisches, aber temporäres Expressionssystem handelt (Donson *et al*., 1991; Chapman *et al*., 1992; Dolja *et al.*, 1998). Wie Scholthof *et al*. (1996) ausführten, kann durch die Nutzung autonom replizierender pflanzenviraler Vektoren ein hohes Niveau an transienter Genexpression erzielt werden.
Verschiedene Strategien wurden bei der Entwicklung pflanzenviraler Expressionsvektoren beschrieben (Lacomme *et al*., 1998). Im Folgenden werden

zwei pflanzenvirale Expressionsvektoren vorgestellt, die in den Untersuchungen dieser Arbeit verwendet wurden. Beide nutzen als Expressionsstrategie für Fremdgene die Gen-Insertion. D.h. die Transkriptionskontrolle des zu exprimierenden Fremdgens wird durch Verdoppelung eines subgenomischen pflanzenviralen Promotors erzielt.

1.3.1.1. PVX-basierter pflanzenviraler Expressionsvektor

Potato virus X (PVX), Genus *Potexvirus*, besitzt ein ssRNA-Genom (Huisman *et al.*, 1988).
Der Wirtspflanzenkreis ist hauptsächlich auf Solanaceaen beschränkt. Dort verursacht das Virus Mosaiksymptome unterschiedlicher Intensität und Ausprägung in Abhängigkeit von Virusisolat und Wirtspflanze.
Für den in dieser Arbeit verwendeten PVX-basierten Expressionsvektor konnte die Eignung zur heterologen Expression verschiedentlich gezeigt werden (Chapman *et al*., 1992; Hammond-Kosack *et al*., 1995).
Der infektiöse cDNA Klon von PVX befindet sich unter CaMV 35S Kontrolle (Abb.1.3-1). Der Hüllproteinpromotor wurde verdoppelt und einige Restriktionsschnittstellen zum Einklonieren von Fremdgenen wurden eingefügt (Chapmann *et al*., 1992).

1.3.1.2. TRV-basierter pflanzenviraler Expressionsvektor

Tobacco rattle virus (TRV), Genus *Tobravirus*, besitzt ein bipartites ssRNA-Genom. Auf der RNA1 sind die Gene für die virale Replikation nötige RNA abhängige RNA Polymerase (RdRp), das Transportprotein sowie der Pathogenitätsfaktor lokalisiert. RNA2 ist für die Infektiosität des Virus nicht erforderlich und kann damit für die Expression von Fremdgenen modifiziert werden. Dazu wurden in der RNA2 hinter dem Hüllprotein alle weiteren Gene, die für die Vektorübertragung des Virus verantwortlich sind, entfernt und durch einen subgenomischen Promotor, der aus dem *Pea early-browning virus* (PEBV) stammt und einer „multiple cloning site“ zum Einfügen von Fremdgenen ersetzt (MacFarlane & Popovich, 2000). Beide TRV cDNA Klone befinden sich unter Kontrolle eines verdoppelten CaMV 35S Promotors.
Das TRV besitzt einen sehr weiten Wirtspflanzenkreis.

1.3.2. Ethanol-induzierbares Expressionssystem

Verschiedene Genexpressionssysteme, die die Möglichkeit bieten, zeitlich, räumlich und quantitativ die Fremdgenexpression in Pflanzen zu kontrollieren, wurden entwickelt. Dazu gehören vornehmlich verschiedene Methoden chemisch regulierter Expression des Transgens (Gatz, 1997; Gatz & Lenk, 1998; Jepson *et al*., 1998; Zuo & Chua, 2000; Padidam *et al.*, 2003).

Induzierbare Expressionssysteme bieten neben der steuerbaren Expression von Genen, welche bei konstitutiver Expression einen letalen Phänotyp bewirken oder pflanzliche Entwicklungsvorgänge beeinträchtigen, die Möglichkeit Genfunktionen in unterschiedlichen pflanzlichen Entwicklungsstadien oder variablen Expressionsstärken gezielt zu untersuchen.

Zu diesen induzierbaren Expressionssystemen gehört das Ethanol-induzierbare alcR/alcA-System (Salter *et al*., 1998; Caddick *et al*., 1998).

Das alc-Regulon aus *Aspergillus nidulans* ist ein chemisch induzierbares Zwei-Komponenten System, bestehend aus dem Transkriptionsfaktor alcR und dem Promotor alcA (Felenbok *et al*., 1988).

Für die Nutzung des alcR/alcA-Systems in Höheren Pflanzen wurden zwei Expressionskassetten konstruiert (Caddick *et al*., 1998; Salter *et al*., 1998). Das Regulatorkonstrukt exprimiert den Transkriptionsfaktor alcR konstitutiv von dem CaMV 35S Promotor. Das Effektorkonstrukt besteht aus einer Promotorfusion der regulatorischen Domäne des alcA-Promotors, welche zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor enthält und einem CaMV 35S Minimalpromotor, der die TATA Box dieses Promotors beinhaltet. Nach Applikation des Induktors ändert der konstitutiv exprimierte Transkriptionsfaktor seine Konformation und kann den Zielpromotor aktivieren (Jepson *et al*., 1998).

Die Effizienz dieses chimären Promotorkonstruktes wurde für eine erfolgreiche induzierbare Genexpression in verschiedenen Pflanzenspezies gezeigt, darunter *Arabidopsis thaliana, Brassica napus, Nicotiana tabacum* und *Solanum tuberosum* (Caddick *et al*., 1998; Salter *et al*., 1998; Roslan *et al*., 2001; Sweetman *et al*., 2002).

Diese Untersuchungen wiesen aus, dass sich der alcA-Promotor durch eine geringe Basalaktivität, gute Induktionsfähigkeit, eine schnelle reversible Induktionskinetik und Expressionslevel, die sich zur Ausbildung von Phänotypen

eignen, auszeichnet. Expressionsdauer und Expressionsniveau konnten über die Induktorapplikation reguliert werden.

1.3.3. Transientes RNAi durch VIGS

Pflanzen verfügen über einen RNA-vermittelten Abwehrmechanismus gegen pflanzenvirale Infektionen (VIGS), bei dem virale Transkripte sequenzspezifisch abgebaut werden (Ratcliff *et al.,* 1997, 1999; Kooter *et al.,* 1999; Dalmay *et al.,* 2000a,b; Fagard *et al.,* 2000).

Pflanzenviral induziertes Abschalten von Genen wurde als Methode zur funktionellen Genomanalyse von Pflanzengenen etabliert (Holzberg *et al*., 2002; Liu *et al*., 2002a; Ekengren *et al,.* 2003; Sharma *et al*., 2003; Yoshioka *et al*., 2003). Für die Nutzung dieser Methode tragen pflanzenvirale Expressionsvektoren eine Sequenz des abzuschaltenden pflanzlichen Gens und werden dadurch Ziel des pflanzlichen Abwehrmechanismus (Kumagai *et al*., 1995; Ruiz *et al*., 1998; Baulcombe 1999; Waterhouse *et al*., 2001). Damit stellt VIGS eine Alternative zur „Knock-out“ Mutantenherstellung von Pflanzen dar, durch deren Anwendung eine transiente Reprimierung des zu untersuchenden Pflanzengens erfolgt und aus dem resultierenden Phänotyp eine Analyse der Genfunktion ermöglicht wird.

Unter verschiedenen beschriebenen viralen Vektorsystemen (Robertson, 2004) wird der TRV-basierte VIGS-Vektor (Ratcliff *et al*., 2001; Liu *et al*., 2002a) aufgrund seines weiten Wirtspflanzenkreises, der milden Symptominduktion und der Fähigkeit Pflanzenmeristeme zu infizieren am häufigsten angewendet.

1.4. Zielstellung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die pflanzliche Apikaldominanz durch Übertragung von phytobakteriellen Genen, die in den pflanzlichen Phytohormonhaushalt eingreifen, zu beeinflussen und in ihrer Ausprägung zu kontrollieren. Dazu wurden Gene, deren Wirkungsmechanismus in den Auxin- und Cytokininmetabolismus der Pflanze eingreift, wie *ipt* und *iaaH* aus *Agrobacterium tumefaciens*, *rolA* und *rolC* aus *Agrobacterium rhizogenes*, sowie *iaaL* aus *Pseudomonas syringae* ausgewählt, um darüber die Apikaldominanz zu modulieren.

Die Untersuchungen sollten an ausgewählten Modellpflanzen erfolgen, die sich zum einen im Hinblick auf die anzuwendende Methodik und zum anderen bezüglich des Pflanzenhabitus als besonders geeignet empfehlen. Dazu gehörten *N. tabacum*, welche sich über eine ausgeprägte Apikaldominanz charakterisiert und des weiteren sowohl für transiente als auch stabile Transformationsversuche geeignet ist. *N. benthamiana* wurde aufgrund seiner besonderen Eignung für pflanzenvirale Expressionsuntersuchungen ausgewählt. *P. hybrida* sollte einen Bezug zur praktischen Nutzbarkeit der dargestellten Versuche zu setzen ermöglichen.

Aufgrund der ausgeprägten homöostatischen Kontrolle, dem der pflanzliche Phytohormonhaushalt unterliegt, sollten transgene *N. tabacum* erstellt werden, die die bakteriellen Gene unter Kontrolle eines Ethanol-induzierbaren Regulationselementes exprimieren, sowie über ein Auxin-induzierbares Reportergen verfügen. Dies sollte neben der morphologischen Beurteilung auch eine Untersuchung der Beeinflussung der Auxinkinetik in den erstellten transgenen Pflanzen in Abhängigkeit von konditionell induzierbarer Expression bakterieller Phytohormongene ermöglichen. Dieses Expressionssystem sollte auf seine Eignung pflanzliche Phänotypen durch regulierbare Expression von bakteriellen Phytohormongenen zu induzieren, untersucht werden. Dabei war insbesondere eine mögliche unerwünschte Basalexpression des verwendeten Induktionssystems zu untersuchen, sowie eine geeignete Induktionsstrategie zu bestimmen.

Für die Überprüfung der Funktionalität des verwendeten Genmaterials sollten die Möglichkeiten der Nutzung pflanzenviraler Expressionsvektoren bezüglich einer

Eignung eine phänotypische Habitusveränderung durch Expression Phytohormon-beeinflussender Gene zu induzieren, untersucht werden.
Ergänzend zu diesen Arbeiten sollte weiterhin die Möglichkeit geprüft werden, inwiefern pflanzeneigene Gene des Phytohormonmetabolismus für die Beeinflussung der Apikaldominanz nutzbar gemacht werden können.

Aus den Ergebnissen soll ein besseres Verständnis der phytohormonellen Wechselwirkungen (Auxin und Cytokinin) an der Beteiligung der Apikaldominanz entstehen.

2. MATERIAL

2.1. Pflanzenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Tabakspezies (*Nicotiana tabacum* „Samsun-nn“ und *Nicotiana benthamiana*), sowie eine samenvermehrbare Petunienlinie W113 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Zahn, Universität Hannover) verwendet.

2.2. Bakterienstämme

Tab. 2-1: Liste der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Charakteristische Merkmale	Verwendungszweck	Referenz
E. coli DH5alpha	Genotyp: F^-, ф 80, lacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17(r_k m_k), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF), U169	Klonierung	Clontech
A. tumefaciens LBA4404	Genotyp: Ach5 pTiAch5ΔT	Tabaktransformation, virale Expression	Hoekema *et al*. (1983)
A. tumefaciens C58C1	Rif^R, Tet^R, Gm^R, pTiB6s3ΔT	virale Expression, VIGS	Deblaere *et al*. (1985)
A. tumefaciens	DSM 5172	Amplifizierung des Gens *iaaH*	DSMZ, Braunschweig
Pseudomonas savastanoi pvar. *phaseolicola*	DSM50282	Amplifizierung des Gens *iaaL*	DSMZ, Braunschweig

2.3. Pflanzenvirale Klone

Tab. 2-2: Liste der verwendeten pflanzenviralen Voll-Längenklone

Bezeichnung	Charakteristische Merkmale	Referenz
pPVX201	PVX cDNA Klon	Baulcombe *et al*. (1995)
pGr106	PVX201 in binärem Vektor	Ruiz & Baulcombe, unveröffentlicht

Fortsetzung Tab. 2-2: Liste der verwendeten pflanzenviralen Voll-Längenklone

Bezeichnung	Charakteristische Merkmale	Referenz
pTRV1	RNA1-cDNA Klon des TRV-Isolates PpK20	Liu *et al*. (2002a)
pYL156-*NbPDS*	Zur Verwendung als VIGS-Vektor RNA2 cDNA-Klon des TRV-Isolates PpK20 enthält *NbPDS*-Fragment	Liu *et al*. (2002a)
pK20GFPc[1]	zur Expression von Fremdgenen RNA2 cDNA-Klon des TRV-Isolates PpK20 unter T7-Promotor Kontrolle Expression von *gfpc* durch subgenomischen *PEBV*-Hüllproteinpromotor	MacFarlane & Popovich (2000)

1 der cDNA-Klon wurde als AatII/KpnI-Fragment aus pK20GFPc in pYL156 kloniert, resultierend in pYL156-sgP-GFPc, damit unter 35S-Kontrolle, Inokulation über Agroinfektionen möglich (zur Verfügung gestellt von M. Varrelmann)

2.4. Plasmide

Tab. 2-3: Liste der verwendeten Klonierungsvektoren und vorhandenen Plasmide

Plasmid	Charakteristische Merkmale	Referenz
pBluescript II SK-	Amp^R, *lacZ*, MCS	Stratagene
pBluescript II SK-	Cam^R, *lacZ*, MCS	Stratagene
pGEM-T Easy	Amp^R, *lacZ*, MCS	Promega
pBINSRNACatN	Kan^R, binärer Vektor mit AlcA/AlcR-Induktionskassette	Caddick *et al*. (1998)
pACN	Amp^R, *CAT* kontrolliert von pAlcA und NOS-Termination	Caddick *et al*. (1998)
pUC19-DR5-GUS	Amp^R, ß-Glucuronidase-Gen unter Auxin-induzierbaren synthetischen Promotor DR5	Ulmasov *et al*. (1997)
pUC119-mgfp4	Amp^R, mgfp4-Reportergen	Haseloff *et al*. (1997)
pUC19-rolA	Amp^R, bakterielles *rolA*	Prof. T. Schmülling, FU Berlin
pPCV002-rolC	Kan^R, bakterielle Cytokinin-ß-Glucosidase (*rolC*)	Dr. M. Fladung, BFA Forst- und Holzwirtschaft Großhansdorf
pUC9-ipt	Amp^R, bakterielle Isopentenyltransferase (*ipt*)	Prof. T. Schmülling, FU Berlin

2.5. Synthetische Oligonukleotide

Die Konstruktion der spezifischen Primerpaare wurde mittels Sequenzinformationen bekannter Gene (NCBI Datenbank) und mithilfe der Primeranalyse aus dem Programm Vector NTI (Invitrogen) durchgeführt.

Die als Primer eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg synthetisiert.

Tab. 2-4: Liste der verwendeten Oligonukleotide für Amplifizierung und Sequenzierung von Genen und Genfragmenten

Bezeichnung	Basensequenz[1]	Verwendung
T3	5'-aattaaccctcactaaagg-3'	Sequenzierung
T7	5'-aatacgactcactatagc-3'	Sequenzierung
M13rev(-29)	5'-caggaaacagctatgacc-3'	Sequenzierung
M13rev(-49)	5'-gagcggataacaatttcacacagg-3'	Sequenzierung
M13uni(-21)	5'-tgtaaaacggccagt-3'	Sequenzierung
M13uni(-43)	5'-agggttttcccagtcacgacgtt-3'	Sequenzierung
mgfp4-up	5'-cg**ggatcc**aacaatgagtaaaggaga-3'	Amplifizierung
mgfp4-low	5'-g**gagctc**ttatttgtatagttc-3'	Amplifizierung
DR5-up	5'-gggg**taccgc**agcccccttttgtc-3'	Amplifizierung
DR5-low	5'-cg**ggatcc**attgtaattgtaaata-3'	Amplifizierung
rolA-up	5'-ccg**gaattcgtcgac**aatggaattagccggactaaa-3'	Amplifizierung
rolA-low	5'-gcg**ggatccgtcgac**ttaatcccgtaggtttgtttc-3'	Amplifizierung
rolC-up	5'-ccg**gaattcctggac**aatggctgaagacgacctgtg -3'	Amplifizierung
rolC-low	5'-gcg**ggattcctggac**ttagccgattgcaaacttgc -3'	Amplifizierung
iaaL-up	5'-cg**gaattcgtcgac**aatgactgcctacgatatgga-3'	Amplifizierung
iaaL-low	5'-gcg**gattcctggac**tttcggcggtcgatgatgta-3'	Amplifizierung
iaaH-up	5'-cg**gaattcgtcgac**aatggtggccattacctgg-3'	Amplifizierung
iaaH-low	5'-gcg**gattcctggac**atttgggtaaaccgggc-3'	Amplifizierung
ipt-up	5'-ccg**gaattcgtcgac**atggacctgcatctaattttc-3'	Amplifizierung
ipt-low	5'-gg**tctagagtcgac**ctaatacattccgaacggat-3'	Amplifizierung
sho-up	5'-gc**tctaga**tgcaacaggttcaggaaaatc-3'	Amplifizierung
sho-low	5'-ta**gagctc**gtggcatctactctttgtag-3'	Amplifizierung
ckx-up	5'-aatcgtggacggattatctc -3'	Amplifizierung
ckx-low	5'-ccaaactgaccaagtccaccg-3'	Amplifizierung

[1] Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, die für die Klonierung eingefügt wurden, sind hervorgehoben

Tab. 2-5: Liste der verwendeten Oligonukleotide für den semiquantitativen Expressionsnachweis in den erzeugten selektierten transgenen Linien (4.2.3.)

Bezeichnung	Basensequenz	Verwendung
actin-up	5'-gctccacgagctgtattccc-3'	Charakterisierung
actin-low	5'-agttcctgttcatagtcaag-3'	Charakterisierung
alcR-up	5'-atacgcgccgacgccagaat-3'	Charakterisierung
alcR-low	5'-tgaccagttcgggccccatt-3'	Charakterisierung
ipt-up	5'-ccggaattcgtcgacatggacctgcatctaattttc-3'	Charakterisierung
ipt-low	5'-gctctagagtcgacctaatacattccgaacggat-3'	Charakterisierung
iaaH-up	5'-atggtggccattacctcgtt-3'	Charakterisierung
iaaH-low	5'-agcggtatgggtggcattct-3'	Charakterisierung
rolC-up	5'-ccggaattcctgcagaatggctgaagacgacctgtg-3'	Charakterisierung
rolC-low	5'-aactgcagttagccgattgcaaacttgc-3'	Charakterisierung
alcA-up	5'-tgctctcctaccccaggatc-3'	Charakterisierung
T-DNA-low	5'-ttgtaaaacgacggccagtg-3'	Charakterisierung
gfp-up	5'-aaggagaagaacttttcact-3'	Charakterisierung
gfp-low	5'-agattgtgtggacaggtaat-3'	Charakterisierung
iaaL-up	5'-atgactgcctacgatatgga-3'	Charakterisierung
iaaL-low	5'-agttaagcgcttcgaaatgg-3'	Charakterisierung
rolA-up	5'-atggaattagccggactaaa-3'	Charakterisierung
rolA-low	5'-gtctgaattttcacgtccgg-3'	Charakterisierung

2.6. Enzyme

Tab. 2-6: Liste der verwendeten DNA-modifizierenden Enzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller
Klenow Fragment	2 U/µl	MBI-Fermentas
Proteinase K	20 mg/ml	Roth
*RQ*1 DNase	1 U/µl	Promega
T4 DNA-Ligase	1 U/µl	MBI-Fermentas
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	Genecraft
AMV-Reverse Transkriptase	10 U/µl	Promega
PfU-Polymerase	3 U/µl	Promega
Alkaline Phosphatase	1U/µl	Roche
Ribonuklease A	90 U/mg	Sigma

Tab. 2-7: Liste der verwendeten Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzym	Konzentration	Hersteller
*Acc*65I (G/GTACC)	10 U/µl	MBI-Fermentas
*BamH*I (G/GATCC)		
*Ecl*136II (GAG/CAT)		
*Eco*32I (GAT/ATC)		
*Eco*105I (TAC/GTA)		
*Eco*147I (AGG/CCT)		
*EcoR*I (G/AATTC)		
*Hind*III (A/AGCTT)		
*Kpn*I (GGTAC/C)		
*Nco*I (C/CATGG)		
*Not*I (GC/GGCCGC)		
*Pst*I (CTGCA/G)		
*Pvu*II (CAG/CTG)		
*Sac*I (GAGCT/C)		
*Sma*I (CCC/GGG)		
*Xba*I (T/CTAGA)		
*Xho*I (C/TCGAG)		
*EcoR*V (GAT/ATC)	10 U/µl	New England Biolabs
*Sal*I (G/TCGAC)		

2.7. Kulturmedien

2.7.1. Medienbestandteile

Tab. 2-8a: Bakterienkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
Agar	Roth
Hefeextrakt	Roth
Pepton	Roth
Natriumchlorid	Roth

Tab. 2-8b: Pflanzenkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
Plant-Agar	Duchefa
MS-Mischung	Duchefa
Sucrose	Nordzucker

2.7.2. Bakterienkulturmedien

LB (Luria Bertoni)-Medium
modifiziert nach Sambrook *et al*. (1989):

15 g Agar
10 g Pepton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
1000 ml A. bidest.
Autoklavieren, bei 4°C lagern

SOB-Medium (pH 6-7):

10 g Pepton
5 g Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
1000 ml A. bidest.
Autoklavieren, bei 4°C lagern

SOC-Medium: 1 ml 2 M Glucose
1 ml 2 M $MgCl_2$
100 ml SOB-Medium

2.7.3. Pflanzenkulturmedien

Tab. 2-9: Übersicht der Zusammensetzung der verwendeten Pflanzenkulturmedien

Bestandteil (Angaben je Liter)	Bezeichnung				
	Null-medium	Regenerations-medium	Selektives Regenerations-medium	Selektives Nullmedium	Selektives Aussaat-medium
MS-Mischung[1]	4,4 g	4,4 g	4,4 g	4,4 g	4,4 g
BAP	/	1 mg	1 mg	/	/
NAA	/	0,1 mg	0,1 mg	/	/
Kanamycin	/	/	150 mg	150 mg	400 mg
Cefotaxim	/	/	500 mg	/	/
Saccharose	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
Plant-Agar	8 g	8 g	8 g	8 g	8 g
pH-Wert	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

Bestandteil (Angaben je Liter)	Bezeichnung				
	Cytokinin-medium	Cytokinin-betontes Regenerations-medium	Auxin-medium	Auxin-betontes Regenerations-medium	Wasser-agar
MS-Mischung[1]	4,4 g	4,4 g	4,4 g	4,4 g	4,4 g
BAP	1 mg	1 mg	/	0,5 mg	/
NAA	/	0,5 mg	1 mg	1 mg	/
Saccharose	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
Plant-Agar	8 g	8 g	8 g	8 g	8 g
pH-Wert	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

[1]MS-Mineralsalz- und Vitaminmischung nach Murashige & Skoog (1962)

2.8. Phytohormone

Tab. 2-10: Liste der verwendeten Phytohormone

Phytohormon	Stammlösung	Arbeitslösung	Hersteller
BAP	500 mg/ ml NaOH	500 µg/ ml	Duchefa
NAA	500 mg/ ml NaOH	50 µg/ml	Duchefa

2.9. Antibiotika und selektive Agenzien

Tab. 2-11: Liste der verwendeten Antibiotika und Selektionsmittel

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitslösung	Hersteller
Ampicillin-Natriumsalz	150 mg/ ml H_2O	150 µg/ ml	Applichem
Cefotaxim-Natriumsalz	50 mg/ ml H_2O	500 µg/ ml	Duchefa
Chloramphenicol	30 mg/ ml EtOH	30 µg/ ml	Applichem
IPTG	46 mg/ ml H_2O	46 µg/ ml	Applichem
Kanamycinsulfat	50 mg/ ml H_2O	50 µg/ ml	Applichem
Streptomycinsulfat	25 mg/ ml H_2O	25 µg/ ml	Applichem
Rifampicin	50 mg/ ml DMSO	50 µg/ ml	Applichem
Tetrazyklin-HCl	4 mg/ ml $EtOH_{70\%}$	4 µg/ ml	Applichem
X-Gal	40 mg/ml DMF	40 µg/ ml	Applichem

2.10. Größenstandard für die Gelelektrophorese

Als Längenstandard in der Gelelektrophorese wurde *PstI* verdaute Lambda-DNA eingesetzt, die die nachfolgenden Fragmentgrößen aufwies:

11501 bp	1700 bp	339 bp	150 bp
5080 bp	1159 bp	264 bp	94 bp
4505 bp	1093 bp	247 bp	87 bp
2840 bp	805 bp	216 bp	72 bp
2454 bp	516 bp	211 bp	
2139 bp	467 bp	200 bp	
1986 bp	448 bp	164 bp	

2.11. Chemikalien

Tab. 2-12: Übersicht der verwendeten festen Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acetosyringon	Fluka
Agarose	Roth
Bromphenolblau	Applichem
Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2$)	Applichem
Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat (Na_2HPO_4)	Applichem
Dithiotreitol (DTT)	Applichem
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA)	Serva
Glucose	Applichem
Guanidin Hydrochlorid (GHCl)	Applichem
Guanidin Thiocyanat (GSCN)	Applichem
Kaliumacetat (KAc)	Applichem
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Applichem
Kaliumhydroxid (KOH)	Applichem
Lysozym	Applichem
Manganchlorid-Dihydrat ($MnCl_2$)	Applichem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2$)	Applichem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4$)	Applichem
Morpholinethansulfonsäure (MES)	Applichem
Natriumacetat-Trihydrat (NaAc)	Applichem
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Applichem
Natriumchlorid (NaCl)	Duchefa
Natriumcitrat-Dihydrat (NaCitrat)	Applichem
Natriumdodecylsulfat Ultra Pure (SDS)	Gibco BRL
Natriumhydroxid (NaOH)	Applichem
Natriumjodid (NaI)	Applichem
Natriumperchlorat	Applichem
Natriumsulfit (Na_2SO_3)	Applichem
N-Laurylsarcosin-Natriumsalz	Applichem
Pipes	Applichem
Polyvinyl Polypyrrolidone 40 (PVPP-40)	Applichem
Silica Partikel	Applichem
Sucrose	Nordzucker
Trinatriumphosphat (Na_3PO_4)	Applichem
Tris Acetat	Applichem
Trishydrochlorid (Tris-HCl)	Applichem

Tab. 2-13: Übersicht der verwendeten flüssigen Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Applichem
Chloroform	Applichem
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Applichem
Dimethylformamid (DMF)	Applichem
Dimethylsulfoxyd (DMSO)	Applichem
Eisessig (100 %)	Applichem
Ethanol (99,6 %), reinst	Applichem
Ethanol (99,6 %), vergällt	Applichem
Ethidiumbromid (1%)	Applichem
Glycerin (87 %)	Applichem
Isopropanol (99,7 %)	Applichem
Isoamylalkohol	Applichem
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween-20)	Applichem
Roti-Phenol (destilliert und äquilibriert)	Applichem
Salzsäure (37 %)	Applichem
Triton X-100	Applichem

2.10. Kommerzielle Extraktionssysteme

Tab. 2-14: Übersicht der verwendeten Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Plasmid-Isolierung	Qiagen
DNeasy® Plant Mini Kit	DNA-Extraktion	Qiagen
Prep-a-gene	Nukleinsäure-Extraktion	Biorad

2.11. Geräte

Tab. 2-15: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Elektrophoresekammern (Mini, Midi)	Harnischmacher Polymehr
Elektroporator	Biorad
Filtersysteme für die Mikroskopie	AHF Analysentechnik
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axioskop
Gelelektrophoresezubehör	Harnischmacher Polymehr
Gefrierschrank	Liebherr
Kamera der Geldokumentation	Intas
Kühlschrank	Liebherr
Lichtthermostat	Mytrom
Magnetrührer	H+P Labortechnik
Mikrowelle	Sharp
Schüttler	Schütt
Schüttler mit Temperaturregelung (Certomat)	Braun Biotech
pH-Meter	Wissenschaftlich technische Werkstätten (WTW)
Photometer	Eppendorf
Pipetten (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Gilson
Spannungsquelle	Apelex
Sterile Werkbank	Kendro
Thermoblock	Grant Instruments
Thermocycler	Eppendorf
Thermoschränke	Binder
Tischzentrifuge	Eppendorf
Tischzentrifuge mit Kühlung	Sigma
UV-Handlampe	UVP Upland
UV-Tisch	Vilber
Vakuumkonzentrator	Eppendorf
Vortexer	IKA-Works
Waagen	Sartorius
Wasserbad	Memmert

2.12. Sonstiges Labormaterial

Tab. 2-16: Übersicht des verwendeten Einweg-Labormaterials

Bezeichnung	Hersteller
Aluminium-Wägeschalen	Roth
Einwegspritzen	Braun
Elektroporationsküvetten	Biozym
PE-Probenbeutel	Roth
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Photometerküvetten	Eppendorf
Sterilfilter	Roth

2.13. Software

Sequenzauswertung und -bearbeitung

Die Auswertung von Sequenzierungsergebnissen, sowie Analyse und Vergleich von Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm Lasergene (DNASTAR).
Zusätzlich wurde für Homologievergleiche Blast unter www.ncbi.nlm.nih.gov/blastv (Altschul *et al*., 1997) herangezogen.
Plasmidkarten und Klonierungen wurden mit dem Programm VectorNTI (Invitrogen) *in silico* erstellt und bearbeitet.

Bildbearbeitung

Das Bildmaterial wurde mit AdobePhotoshop erstellt.

Mikroskopische und epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen erfolgten mit Leica-Kamera (DM-RB) und dem Programm Leica IM500. Die Parameter Verstärkung und Belichtungszeit sind bei den Abbildungen angegeben.

Statistische Versuchsauswertung

Als Statistikprogramm wurde SAS, Version 8.1 (SAS Institute Corp.) verwendet.

3. METHODEN

3.1. Herstellung der Medien, Lösungen und Puffer

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert.
Hitzeunbeständige Substanzen wurden sterilfiltriert und den abgekühlten Medien und Lösungen zugegeben.
Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl oder 1 N NaOH eingestellt.
Für die Arbeiten mit RNA wurde dem Wasser DEPC (0,1%) zugesetzt und über Nacht unter ständigem Rühren inkubiert und dann autoklaviert.

3.2. Kultivierung von Pflanzen

Die sterile Kultivierung der Pflanzen erfolgte in einem Klimaraum unter folgenden Bedingungen:
Tag: 16h 26°C 5000 Lux
Nacht: 8h 26°C

Pflanzen im Gewächshaus wurden in den Sommermonaten dem natürlichen Tag-/Nachtrhythmus unterstellt. In den Wintermonaten wurden die Pflanzen zusätzlich mit Assimilationsleuchten (ca. 4 klx) bestrahlt, so dass die Pflanzen immer einer Tageslänge von 12-14 h ausgesetzt waren.

Zusätzlich standen Klimaschränke für Versuche zur Verfügung in denen die Temperatur zwischen 15°C-30°C bei 70% rel. Luftfeuchte reguliert werden konnte.

3.2.1. Sterilisation von Samen für die *in vitro*-Kultur

Die Samen wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 15 min unter ständigem Schütteln bei 800 U/min in 3% NaOCl-Lösung oberflächensterilisiert. Anschließend wurde die NaOCl-Lösung mit einer Pipette vollständig entfernt und die Samen viermal in sterilem destilliertem Wasser für jeweils vier Minuten gewaschen.

3.2.2. *In vitro*-Kultur von Tabakpflanzen und Petunienlinien

Steriles Pflanzenmaterial von *N. tabacum* cv. „Samsun-nn“, *N. benthamiana* sowie *Petunia hybrida* W113 wurde durch sterile Aussaat etabliert.
Die Vermehrung des Pflanzenmaterials erfolgte vegetativ durch regelmäßige Überführung des apikalen Sprosses auf ein Grundmedium (Nullmedium, 2.7.3.).

3.2.3. Überführung von *in vitro*-Pflanzen ins Gewächshaus

Für den Transfer von *in vitro*-Pflanzen ins Gewächshaus wurden diese zunächst für zehn Tage auf Nullmedium zur Wurzelbildung (2.7.3.) kultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen aus dem Weckglas entnommen und unter fließend Wasser anhaftendes Kulturmedium entfernt. Dann konnten die Pflanzen in ein gut durchfeuchtetes TKS-Sandgemisch gesetzt werden. Die Töpfe wurden mit Plastikhauben abgedeckt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit aufzubauen und im Gewächshaus für 2-3 Tage kultiviert. Dann erfolgte ein schrittweises Entfernen der Plastikhaube für die Adaption der Pflanzen an die Gewächshausbedingungen.

3.3. Kultivierung von Bakterienstämmen

3.3.1. Bakterienanzucht

E. coli-Stämme wurden zunächst aus Dauerkulturen auf LB-Selektivplatten ausgestrichen und bei 37°C bis zur Kolonienbildung inkubiert. Für die Anzucht von *A. tumefaciens*-Stämmen erfolgte die Inkubation bei 28°C.
Zwei bis drei Einzelkolonien wurden in flüssiges LB-Medium überimpft und unter ständigem Schütteln bis zu einer deutlichen Trübung der Bakteriensuspension ü.N. inkubiert.

3.3.2. Bestimmung des Bakterientiters

Die optische Dichte der Bakteriensuspension wurde photometrisch bei 600 nm bestimmt.

3.3.3. Anlegen von Bakteriendauerkulturen

850 µl einer ü.N. Kultur wurden mit 450 µl 87% (v/v) Glycerin versetzt und nach gründlicher Durchmischung bei –80°C gelagert.

3.4. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* und Transformation

Die Herstellung und Transformation von *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Inoue *et al.* (1990).

Die Arbeitsschritte bei der Anzucht kompetenter Zellen müssen alle auf Eis erfolgen und mit großer Sorgfalt durchgeführt werden, so ist es möglich mit diesem Protokoll kompetente Zellen für eine Transformationsrate von 10^7-10^8 CfU/µg Plasmid zu erzeugen.

Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*

- Ausstreichen von *E. coli* DH5α auf LB-4µg/ml Tc-Platten
- Inkubation ü.N. bei 37°C
- Animpfen einer Vorkultur von 25 ml SOB
- Inkubation für 8 h bei 37°C und 200 Upm
- Animpfen der Hauptkultur (250 ml) mit 10 ml der Vorkultur in SOB (SOB mit 20 g statt 10g Pepton)
- Inkubation ü.N. bei 18°C und 200 Upm bis zu einer OD_{600} von 0,55 (ungefähr 16-18 h)
- Überführung der Bakteriensuspension in Zentrifugenbecher
- Inkubation auf Eis für 10 min
- Zentrifugation für 10 min bei 2500 g und 4°C
- Gründliches Verwerfen des Überstandes
- Vorsichtiges Resuspendieren des Bakterienpellets in 80 ml eisgekühltem TFB-Puffer
- Zentrifugation für 10 min bei 2500 g und 4°C
- Gründliches Verwerfen des Überstandes
- Vorsichtiges Resuspendieren des Bakterienpellets in 20 ml eisgekühltem TFB-Puffer
- Zugabe von 1,5 ml DMSO und vorsichtiges Mischen
- Inkubation auf Eis für 10 min
- Zügiges aliquotieren von 100 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäßen
- Einfrieren in flüssigem Stickstoff
- Lagerung bei –80°C

TFB-Puffer: 55 mM $MnCl_2*4H_2O$
15 mM $CaCl_2*2H_2O$
250 mM KCl
10 mM PIPES

Transformation

- Auftauen eines Aliquots chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen in der Hand
- Zusammenführung von Ligationsansatz und kompetenten Zellen
- Inkubation für 30 min auf Eis
- Hitzeinduktion für exakt 90 sec bei 42 °C
- Inkubation für 90 sec auf Eis
- Zugabe von 400 µl SOC zu jedem Eppendorfgefäß
- Inkubation der Reaktionsgefäße für 60 min bei 37°C und 200 Upm
- Ausplattieren von 50-100µl Suspension auf Selektivmedium
- Inkubation der Petrischalen ü.N. bei 37°C

3.5. Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* und Transformation

Zur Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* LBA4404 wurde eine kombinierte Methode nach Nagel *et al.* (1990) und Mattanovich *et al.* (1989) gewählt. Die Transformationsrate beträgt für *A. tumefaciens* ca. 1,5 x 10^6 CfU.

Die Arbeitsschritte sind zügig und auf Eis durchzuführen:

Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens*

- Ausstreichen von *A. tumefaciens* auf Selektiv-LB
- Inkubation für 48 h bei 28°C
- Animpfen der Vorkultur in 20 ml LB
- Inkubation ü.N. bei 250 Upm und 28°C
- Animpfen der Hauptkultur von 1000 ml LB (5 g NaCl statt 10 g) mit 10 ml Vorkultur
- Inkubation bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 28°C und 250 Upm (ungefähr 5-6 h)
- Überführung der Bakteriensuspension in Zentrifugenbecher
- Inkubation auf Eis für 30 min
- Zentrifugation für 15 min bei 4000 g und 4°C
- Gründliches Verwerfen des Überstandes
- Vorsichtiges Resuspendieren des Bakterienpellets in 1 l eisgekühltem 1 mM HEPES pH 7
- Zentrifugation für 15 min bei 4000 g und 4°C
- Gründliches Verwerfen des Überstandes
- Vorsichtiges Resuspendieren des Bakterienpellets in 500 ml eisgekühltem 1 mM HEPES pH7
- Zentrifugation für 15 min bei 4000 g und 4°C
- Gründliches Verwerfen des Überstandes
- Vorsichtiges Resuspendieren des Bakterienpellets in 20 ml eisgekühltem 10%-igem Glycerin
- Zentrifugation für 15 min bei 4000 g und 4°C

- Gründliches Verwerfen des Überstandes
- Vorsichtiges Resuspendieren des Bakterienpellets in 2 ml eisgekühltem 10%-igem Glycerin
- Zügiges aliquotieren von 40 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäßen
- Einfrieren in flüssigem Stickstoff
- Lagerung bei –80°C

Elektroporation

- Auftauen der elektrokompetenten *A. tumefaciens* für ca. 5 min auf Eis
- Zugabe von 1 µl Plasmid einer Minipräparation
- Überführung des Gemisches in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,1 cm)
- Elektroporation mit den Parametern: Kapazität 25 µF, Widerstand 200 Ω, Spannung 1250 V
- Zugabe von 1 ml eisgekühltem SOC in die Elektroporationsküvette und mischen
- Überführen der Suspension in ein Eppendorfgefäß
- Inkubation für 3 h bei 28°C und 250 Upm
- Ausplattieren von 50-100µl Suspension auf Selektivmedium
- Inkubation der Petrischalen für 48 h bei 28 °C

3.6. Gentechnische Methoden

3.6.1. Allgemeine Methoden

Die Reinigung der Nukleinsäureextrakte von Proteinen und Konzentrierung der Proben erfolgte über Phenol-Chloroformbehandlung und anschließende Ethanolfällung der Proben nach folgendem Protokoll:

3.6.1.1. Phenolbehandlung von Nukleinsäuren

- Zugabe desselben Volumens TE-Phenol zur Probe
- Vortexen des Gemisches
- Zentrifugation für 4 min bei 13000 Upm
- Überführen der oberen Phase in ein neues Eppendorfgefäß
- Zugabe desselben Volumens Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 v/v)
- Vortexen des Gemisches
- Zentrifugation für 4 min bei 13000 Upm
- Überführen der oberen Phase in ein neues Eppendorfgefäß
- Natriumacetat/Ethanol-Fällung der Probe (3.6.1.2.)

3.6.1.2. Natriumacetat-Fällung mit Ethanol

- Zugabe von 0,1x Vol 3 M NaAc-Lösung (pH5,5) und 2,5x Vol. eiskaltem $Ethanol_{abs.}$ (-20°C) zur Probe
- Vortexen
- Inkubation für mindestens 30 min bei –20°C
- Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 13000 Upm
- Überstand verwerfen
- Waschen des Pellets mit 1 ml $EtOH_{70\%}$
- Überstand verwerfen
- Pellet im Vakuumkonzentrator trocknen
- Resuspendieren des trockenen Pellets in TE 10/0,1 pH8,0
- Lagerung der Proben bei –20°C

TE 10/0,1-Puffer (pH 8,0): 10 mM Tris-base
0,1 mM EDTA

3.6.1.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren

Ein Aliquot der Probe wurde zur visuellen Bestimmung der Menge und Sauberkeit der Nukleinsäure in einem Agarosegel aufgetrennt und bei Bedarf im Photometer bei einer OD_{260} und OD_{280} bestimmt, der Quotient OD_{260}/OD_{280} gibt Aufschluss über die Verunreinigung der Probe mit Proteinen und Zuckern. Saubere RNA-Präparationen sollten einen Quotienten von 2 aufweisen, saubere DNA-Extraktionen liegen bei 1,8-2.

3.6.1.4. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäureproben wurde in horizontalen Gelen mit TBE als Laufpuffer durchgeführt. Als Größenstandard diente PstI-verdaute λ-DNA (MBI-Fermentas).

Es wurden jeweils separate Gelkammern zur Auftrennung von DNA und RNA verwendet. Als Standardkonzentration wurden 1%-ige Gele verwendet, bei Bedarf wurde die Agarosekonzentration zur Verbesserung des Auftrennverhaltens variiert.

Analytische Gele wurden bei 312 nm fotografisch dokumentiert. Präparative Gele wurden zum Schutz der Nukleinsäureproben vor DNA-Schäden bei 365 nm belichtet.

- Lösen von 0,5 g Agarose in 50 ml 1xTBE-Puffer in der Mikrowelle
- Abkühlen der Lösung auf ca. 55°C

- Zugabe von 1,5 µl $EtBr_{1\%}$
- Gießen in einen Gelträger und Einführen eines geeigneten Probenkamms
- Einlegen des Gels in eine horizontale Elektrophoresekammer
- Gel vollständig mit 1xTBE-Puffer bedecken
- Einfüllen der Proben und des Längenstandandards in die Geltaschen
- Gellauf zunächst bei 80 V/ 260 mA, später bei 120 V/ 260 mA
- Belichten des Gels mit einem UV-Transilluminator

10xTBE-Puffer:	1 M Tris-Base 830 mM Borsäure 10 mM EDTA
Gelbeladungspuffer:	$Glycerin_{33\%}$ Bromphenolblau
DNA-Marker:	140 µl Lambda-DNA (0,4 mg/l) 8 µl PstI (10U/µl) 30 µl 10x Restriktionspuffer 122 µl A. bidest - Inkubation des Restriktionsverdaus für 120 min bei 37°C - Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 µl Gelbeladungspuffer - Lagerung bei –20°C

3.6.2. Nukleinsäure-Isolierung

3.6.2.1. Analytische Plasmid-Isolierung aus *E. coli* nach Birnboim & Doly (1979)

Diese Methode wurde verwendet zur Identifizierung positiver Klone durch nachfolgenden Restriktionsverdau.

Dazu wurde eine Einzelkolonie für mindestens 6 Stunden bei 37°C in Reagenzgläsern mit 2 ml antibiotikahaltigem LB auf einem Schüttelinkubator angezogen.

- Überführen der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß
- Zentrifugation für 3 min bei 13000 Upm
- Resuspendieren des Bakterienpellets in 200 µl Lösung A
- Zugabe von 400 µl Lösung B
- Vorsichtiges Mischen durch leichtes Bewegen des Gefäßes
- Zugabe von 300 µl Lösung C
- Invertieren des Eppendorfgefäßes
- Inkubation für 10 min auf Eis
- Zentrifugation für 10 min bei 13000 Upm
- Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß
- Zentrifugation für 10 min bei 13000 Upm
- Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß
- Zugabe von 600 µl eiskaltem Isopropanol (-20°C)

- Vortexen des Reaktionsgemisches
- Zentrifugation für 10 min bei 13000 Upm
- Vollständiges und gründliches Entfernen des Überstandes
- Zugabe von 200 µl Lösung D zum Pellet
- Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur
- Resuspendieren des Pellets in Lösung D
- Zugabe von 400 µl eiskaltem $Ethanol_{abs.}$ (-20°C)
- Vortexen des Reaktionsgemisches
- Zentrifugation für 10 min bei 13000 Upm
- Vollständiges und gründliches Entfernen des Überstandes
- Trocknen des Pellets im Vakuumkonzentrator
- Resuspendieren des Pellets in 80 µl RNAse/TE
- Lagerung bei –20°C

Lösung A: 15 mM Tris-HCl
10 mM EDTA
50 mM Glucose

Lösung B: 200 mM NaOH
1 % SDS

Lösung C: 3 M NaAC (pH4,8)
pH-Wert einstellen mit Eisessig

Lösung D: 100 mM NaAc (pH 7,0)
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

RNase-Lösung : 10 µg RNAse/ml TE10/01 (pH 8,0)

Herstellung der Stammlösung: 10 mg RNase / ml TE 10/01 lösen und 15 min bei 95°C behandeln, anschließend auf Eis abkühlen und bei –20°C lagern; Stammlösung 1:1000 verdünnen zur Herstellung der Arbeitslösung.

3.6.2.2. Plasmidminipräparation für Sequenzierungen

Für kommerzielle Sequenzierungen wurden die Plasmide mit dem QIAprep-Miniprep-Kit aufgereinigt. Die Anzucht einer Einzelkolonie erfolgte in 3 ml flüssigem LB-Medium für max. 8 h. Das Protokoll wurde nach den Angaben und mit den Puffern des Herstellers durchgeführt:

- Überführen der Bakteriensuspension in ein Eppendorfgefäß
- Zentrifugation bei 13000 Upm für 3 min
- Resuspendieren des Bakterienpellets in 250 µl P1-Puffer
- Zugabe von 250 µl P2-Puffer
- Mehrfaches Invertieren der Probe
- Zugabe von 350 µl N3-Puffer und sofortiges Invertieren der Probe
- Zentrifugation bei 13000 Upm für 10 min
- Überführen des Überstandes auf eine QIAprep-Säule
- Zentrifugation für 45 sec
- Verwerfen des Durchflusses
- Waschen des QIAprep-Säule mit 500 µl PB-Puffer

- Zentrifugation für 45 sec und verwerfen des Durchflusses
- Waschen der QIAprep-Säule mit 750 µl PE-Puffer
- Zentrifugation für 45 sec und verwerfen des Durchflusses
- Nochmaliges Zentrifugieren zum Trocknen der Säule für 1 min
- Platzieren der Säule in einem neuen Eppendorfgefäß
- Zugabe von 50 µl EB-Puffer in die Mitte der QIAprep-Säule
- Inkubation für 1 min, anschließend 1 min zentrifugieren

3.6.2.3. Analytische Plasmid-Isolierung aus *A. tumefaciens*
(nach www.arabidopsis.org/info/Protocols_Mundy2.jsp#Agro.mp1)

Zur Überprüfung rekombinanter Agrobakterien nach der Elektroporation wurden Einzelkolonien in 4 ml Selektivmedium für 16-24 h angezogen. Dann erfolgte die Plasmidisolierung mit nachfolgendem Kontrollverdau zur Verifizierung des Bakterienklons. Das nachfolgende Protokoll liefert ausreichend saubere Plasmidprobe zum Einsatz für PCR oder Restriktionsverdau.

- Überführen der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß
- Zentrifugation bei 13000 Upm für 3 min
- Verwerfen des Überstandes
- Vortexen des Pellets
- Zugabe von 120 µl Lysozym-Lysispuffer
- Resuspendieren des Pellets
- Inkubation bei 37°C für 15 min
- Zugabe von 200 µl Lösung B
- Mehrfaches Invertieren der Probe
- Inkubation auf Eis für 5 min
- Zugabe von 150 µl Lösung E
- Vortexen der Probe für 10 sec und Inkubation auf Eis für 10 min
- Zentrifugation bei 13000 Upm für 5 min
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Zugabe von 200 µl Phenol und 200 µl Chloroform-Isoamyl (24:1 v/v)
- Vortexen und für 3 min zentrifugieren
- Überführen der oberen Phase in ein neues Eppendorfgefäß
- Erneute Zugabe von Phenol und Chloroform-Isoamyl und Zentrifugation
- Überführen der oberen Phase in ein neues Eppendorfgefäß und mit 400 µl Chloroform-Isoamyl mischen
- Zentrifugation bei 13000 Upm für 4 min
- Überführen der oberen Phase in ein neues Eppendorfgefäß und mit 300 µl Isopropanol (-20°C) mischen
- Inkubation auf Eis für 10 min
- Zentrifugation für 5 min
- Waschen des Pellets mit eiskalten $EtOH_{70\%}$
- Trocknen des Pellets im Vakuumkonzentrator für 10 min
- Resuspendieren des Pellets in 50 µl RNaselösung
- Lagerung bei –20°C

Lysozym-Lysispuffer:	50 mM Glucose 25 mM Tris-Base (pH 8,0) 10 mM EDTA 3 mM Lysozym (vor Benutzung aus der Stammlösung (20mg/ml) zugeben)
Lösung B:	200 mM NaOH 1 % SDS
Lösung E:	60 ml 5 M Ammoniumacetat 11,5 ml Eisessig 28,5 ml A. bidest.
RNase-Lösung :	10 µg RNAse/ml TE10/01 (pH 8,0) Herstellung siehe 3.5.2.1.

3.6.2.4. Gesamt-RNA-Präparation aus pflanzlichen Geweben

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte zum Zwecke der cDNA-Synthese und anschliessender PCR. Die Reinheit des Nukleinsäureextraktes und damit die Eignung für PCR-Anwendungen wurden über Verwendung interner Positivkontrollen überprüft.

- Homogenisieren von 150 mg Pflanzenmaterial in 1500 µl Extraktionspuffer
- Überführen von 500 µl der Extraktionslösung in ein Reaktionsgefäß
- Zugabe von 100 µl N-Lauryl-Sarcosyl-Lösung$_{10\%}$
- Inkubation des Homogenats bei 70°C unter wiederholtem Schütteln für 10 min
- Abkühlung des Homogenats auf Eis für 5 min
- Zentrifugation des Homogenats bei 13000 Upm für 10 min
- Abnahme von 300 µl Überstand
- Zugabe von 300 µl NaI-Lsg., 150 µl EtOH$_{abs.}$ und 25 µl Silicasuspension
- Inkubation bei RT für 10 min unter gelegentlichen Schütteln zur Bindung der Nukleinsäure an die Silicapartikel
- Zentrifugation des Gemisches bei 6000 Upm für 60 sec
- Entfernung des Überstandes
- Resuspendieren des Pellets in 500 µl Waschpuffer
- Zentrifugation des Gemisches bei 6000 Upm für 60 sec
- Wiederholung des Waschschrittes
- Trocknen des Pellets bei RT
- Resuspendieren des getrockneten Pellets in 50 µl TE-Puffer
- Inkubation bei 70°C für 4 min
- Zentrifugation des Ansatzes bei 13000 Upm für 3 min
- Übeführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß und Lagerung bei –20°C

Extraktionspuffer: 4 M Guanidinthiocyanat
0,2 M NaAc (pH 5,2)
0,025 M EDTA
1 M KAc
2,5 % w/v PVP-40
1 % Mercaptoethanol (vor Benutzung zugeben)

NaI-Lösung: 0,75 g Na_2SO_3 in 40 ml A. bidest. lösen
36 g NaI zugeben
in dunkler Flasche bei 4°C lagern

Silica-Lösung: 60 g Silica-Partikel in 500 ml A. bidest. geben, mischen
24 h absetzen lassen
470 ml Überstand verwerfen
500 ml A. bidest. zugeben und gut mischen
5 h absetzen lassen
440 ml Überstand verwerfen
verbliebene Lösung mit HCl auf pH 2,0 einstellen
autoklavieren und aliquotiert bei 4°C lagern

Die RNA-Präparation wurde anschliessend einem DNAse-Verdau unterzogen.
DNAse Verdau: 3-5 µl RNA-Extrakt
1 µl 10x Reaktionspuffer
2-3 U DNAse
A. bidest. ad 10 µl

3.6.2.5. Präparation genomischer DNA aus pflanzlichen Geweben

Für die DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial wurde das QIAGEN DNeasy Kit verwendet und das Protokoll nach Angaben des Herstellers mit den beigefügten Puffern durchgeführt:

- Mörsern von 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff
- Überführung der Probe in ein Reaktionsgefäß
- Zugabe von 400 µl Puffer AP1 und 4 µl RNAse (100 mg/ml)
- Inkubation bei 65°C für 10 min
- Zugabe von 130 µl Puffer AP2
- Inkubation auf Eis für 10 min
- Zentrifugation der Probe bei 13000 Upm für 2 min durch die QIAshredder-Säule
- Zugabe des 1,5-fachen Volumens Puffer AP3/E
- Zentrifugation der Probe bei 13000 Upm für 1 min durch die QIAspin mini-Säule
- Zweimaliges Waschen der Säule mit 500 µl Puffer AW und Zentrifugation für 2 min bei 13000 Upm
- Eluierung der DNA mit 100µl Puffer AE, vorgewärmt auf 65°C durch Inkubation bei RT für 5 min
- Zentrifugation bei 13000 Upm für 2 min
- Lagerung der DNA-Probe bei –20°C

3.6.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen wurden im „Mastercycler gradient“ (Eppendorf) durchgeführt.
Für präparative Anwendungen der PCR, bei der die entstehenden Fragmente sequenziert und kloniert werden sollten, wurde dem Ansatz zusätzlich 1 U PfU-Polymerase (Promega) hinzugefügt.
Die Aufreinigung der PCR-Produkte für einen Restriktionsverdau erfolgte über Phenol-Chloroformextraktion (3.6.1.1.) und nachfolgende Ethanolfällung (3.6.1.2.).

Reaktionsansatz:
1µl Plasmidprobe oder 3µl cDNA
5µl Polymerasepuffer mit 15 mM $MgCl_2$
2µl $MgCl_2$ (25mM)
1µl dNTP-Mix (jeweils 25 mM)
1µl Primer low (10mM)
1µl Primer up (10mM)
2U Taq-Polymerase
ad 50 µl H_2O

Standard-PCR-Programm:

	Denaturierung	96°C	4 min 30 sec
35 Zyklen	Denaturierung	96°C	30 sec
	Primer „Annealing“	50-60°C	30 sec
	Synthese	72°C	1 min/1 kb
	Synthese	72°C	10 min

3.6.4. Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Für die Übersetzung von RNA in cDNA mittels spezifischer Primer wurde ein Standardansatz mit Standardprogramm verwendet:

Reaktionansatz:
5 µl A. bidest.
2,5 µl RT-Puffer
1 µl Primer low (100µM)
0,25 µl dNTP-Mix (jeweils 25 mM)
0,25 µl AMV-Reverse Transkriptase
1 µl RNA-Nukleinsäureextrakt

RT-PCR: 45 min bei 42°C im Thermocycler

3.6.5. Klonierung

Für die Klonierung von Fragmenten in Vektoren und verschiedene Subklonierungen wurden Vektor und Fragment mit Restriktionsendonukleasen verdaut und in einem Agarosegel aufgetrennt. Erfolgte die Klonierung über den Verdau mit einem Enzym, war es notwendig den Vektor einer Dephosphorylierungsreaktion zu unterziehen, um Ligieren des Vektors ohne Aufnahme des Fragmentes zu reduzieren. Des Weiteren war es für einige Klonierungsstrategien nötig, die von Restriktionsendonukleasen erzeugten „sticky ends“ zu „blunt ends“ über eine weitere Enzymbehandlung umzuwandeln (Klenow-Behandlung).
Im nachfolgenden sind die Reaktionsansätze für die entsprechenden Enzymbehandlungen aufgeführt, sie richten sich nach den Angaben des Herstellers.

3.6.5.1. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Verdau von Plasmidminipräparationen zur Kontrolle (analytisch)

- Verdau von 3-6 µl Plasmid-DNA
- Zugabe von 1,5 µl 10x Restriktionspuffer
- Zugabe von 10 U Restriktionsenzym
- Auffüllen der Reaktion auf 15 µl Gesamtvolumen
- Inkubation für 30-45 min bei 37°C
- Auftrennung der Probe in der Agarosegelelektrophorese

Verdau von Plasmidpräparationen/PCR-Fragmenten zur Klonierung (präparativ)
- Verdau von 5-10 µl Nukleinsäure
- Zugabe von 4 µl 10x Restriktionspuffer
- Zugabe von 20 U Restriktionsenzym
- Auffüllen der Reaktion auf 40 µl Gesamtvolumen
- Inkubation für 60-90 min bei 37°C
- Auftrennung der Probe in der Agarosegelelektrophorese
- Präparation der Fragmente aus dem Gel

3.6.5.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

- Präparativer Verdau der Nukleinsäureprobe
- Zugabe von 5 µl A. bidest.
- Zugabe von 5 µl 10 x CIP-Puffer
- Zugabe von 1 µl Alkalischer Phosphatase
- Inkubation für 20 min bei 37°C

- Zugabe von 1 µl Alkalischer Phosphatase
- Inkubation für 30 min bei 56°C
- Abstoppen der Reaktion durch Inkubation für 10 min bei 70°C
- Phenol/Chloroformextraktion des Reaktionsansatzes (3.6.1.1.)
- Fällung (3.6.1.2.)
- Kontrolle der Reaktion durch Auftragen von 2-3 µl Reaktionsprodukt in der Agarosegelelektrophorese
- Einsatz für die Ligation

3.6.5.3. Auffüllen überstehender einzelsträngiger DNA-Bereiche nach Restriktion

- Präparativer Verdau der Nukleinsäureprobe
- Zugabe von 3 µl 2 mM dNTP
- Zugabe von 5 U Klenow-Fragment
- Inkubation für 20 min bei 37°C
- Abstoppen der Reaktion durch Inkubation für 10 min bei 70°C
- Phenol/Chloroformextraktion des Reaktionsansatzes (3.6.1.1.)
- Fällung (3.6.1.2.)
- Kontrolle der Reaktion durch Auftragen von 2-3 µl Reaktionsprodukt in der Agarosegelelektrophorese
- Einsatz zur Ligation

3.6.5.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte in Anlehnung an das Prep-a-gene-DNA Purification Kit von Biorad. Dazu wurde die Quantum prep-Matrix von Biorad modifiziert. Die Matrix ist in GuHCl gelöst und muss 3-4 x in 5-fachen Volumen A. bidest. gewaschen werden zur vollständigen Entfernung des GuHCl. Nach dem Waschen wird die Matrix in A. bidest. im Verhältnis 1:1 aufgenommen.

- Zugabe das dreifachen Volumens Binding-Puffer
- Inkubation bei 42°C im Heizblock zur vollständigen Auflösung der Agarose
- Zugabe von 6-8 µl Quantum-Prep-Matrix
- Inkubation für 10 min bei RT und regelmäßigem Invertieren
- Zentrifugation für 30 sec bei 13.000 Upm
- Überstand verwerfen und Pellet in 500 µl Binding-Puffer resuspendieren
- Zentrifugation für 30 sec bei 13.000 Upm
- Überstand verwerfen und Pellet in 500 µl Wasch-Puffer resuspendieren
- Zentrifugation für 30 sec bei 13.000 Upm
- Überstand verwerfen und Pellet in 500 µl Wasch-Puffer resuspendieren
- Zentrifugation für 30 sec bei 13.000 Upm
- Überstand vollständig mit der Pipette abnehmen ohne das Pellet zu zerstören
- Pellet in 25 µl A. bidest. resuspendieren und 5 min bei 42°C im Heizblock inkubieren
- Zentrifugation für 30 sec bei 13.000 Upm

- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Aliquot kann für die Ligation eingesetzt werden

Binding-Puffer: 6 M Natrium-Perchlorat
50 mM Tris-Base
10 mM EDTA

Wasch-Puffer: 400 mM NaCl
20 mM Tris-base
2 mM EDTA
50 % $EtOH_{abs.}$

3.6.5.5. Ligation von DNA-Fragmenten

- Einsatz geeigneter Nukleinsäuremengen
- Zusatz von 1µl 10x Ligasepuffer
- Zusatz von 5 U T4-DNA-Ligase
- Ansatz mit A. bidest. auf 10 µl auffüllen
- Inkubation ü.N. bei Raumtemperatur
- Lagerung des Ligationsansatzes bei –20°C oder direkt zur Transformation von *E. coli*-Zellen einsetzen

3.6.6. DNA-Sequenzierung

DNA-Proben zur Sequenzierung wurden an die Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg eingeschickt. Dazu wurde eine geeignete Menge Plasmidprobe auf dem Agarosegel abgeschätzt und das entsprechende Volumen in einem Reaktionsgefäß im Heizblock bei 50°C getrocknet. Die Reaktionsgefäße wurden gut verschlossen versandt.

3.6.7. Infektion von Pflanzen mit viralen Klonen

Alle verwendeten viralen Expressionsklone lagen in binären Vektoren vor. Diese wurden in *A. tumefaciens* transformiert, sodass die Infektion von Pflanzen mit viralen Klonen durch transiente Agrobakterientransformation erfolgte.

3.6.7.1. Herstellung der Agrobakteriensuspension

20 ml flüssiges kanamycinhaltiges LB-Medium wurde mit 30 µl einer Bakteriendauerkultur (LBA4404 mit entsprechendem Plasmid) angeimpft und bei 28°C und 250 Upm bis zu einer OD_{600}=0,6 kultiviert. Anschließend wurde die

Bakteriensuspension in Zentrifugenbecher überführt und bei 4°C und 4000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet im Infektionspuffer resuspendiert und die Bakteriendichte dabei auf eine OD_{600}=1 eingestellt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, gelegentlich musste in dieser Zeit die Suspension geschüttelt werden. Anschließend konnte diese Bakteriensuspension zur Infiltration benutzt werden.

Infektionspuffer: 10 mM MES
10 mM $MgCl_2$
pH 5,6 einstellen
150 µM Acetosyringon (frisch bei Benutzung zugeben)

3.6.7.2. Infiltration der Blätter

Die Infiltration wurde mit einer Injektionsspritze ohne Nadel (5 ml Einmalspritze) durchgeführt. Dazu wurde die Spritze gegen die Blattunterseite von voll entwickelten und gesunden, aber noch nicht zu alten Blättern gedrückt und mit dem Finger auf der Blattoberseite, der Spritze komplementär, ein Gegendruck ausgeübt und dabei die Agrobakteriensuspension in die Interzellularen des Blattes gepresst. Die erfolgreiche Infiltration lässt sich an der Durchnässung des Intrazellularraumes des Blattes an der Blattunterseite erkennen.

3.6.7.3. Inokulation von Jungpflanzen über die Wurzel

Für die Inokulation sehr junger Pflanzen wurde die „Agrodrench“-Methode nach Ryu *et al*. (2004) verwendet. Sämlinge wurden dafür in 10-er Töpfe pikiert und 6-10 Tage später inokuliert. Die Agrobakterien wurden wie unter 3.6.8.1. angegeben, angezogen. 5 ml der Suspension wurde jeweils auf den „Kopf“ der Pflanzen gespritzt, wobei darauf geachtet wurde die Pflanzenmitte zu treffen und mit dem angewendeten Druck die Pflanze nicht durch Dekapitierung zu verletzen.

3.6.7.4. *in vitro* Inokulation von Sämlingen und Jungpflanzen

Steril angezogene Sämlinge wurden zehn Tage nach der Aussaat vereinzelt und in Petrischalen vertikal kultiviert für weitere 5-7 Tage. Dann erfolgte eine Verletzung der Pflanzen mit einer sterilen Impfnadel, anschließend wurden 25 µl

einer Agrobakteriensuspension auf den Sämling gegeben und für 48 h horizontal im Dunkeln inkubiert. Die weitere Kultur erfolgte dann wieder vertikal.

3.7. Transformation von Pflanzen

Für die stabile *Agrobakterium*-vermittelte Transformation von *N. tabacum* wurde das Protokoll von Horsch *et al*. (1985) angewandt.

3.7.1. *Agrobakterien*-vermittelte Transformation von *N. tabacum*

Vorbereitung der Agrobakteriensuspension

- Ausstreichen der entsprechenden Agrobakteriendauerkultur auf LB-Platten
- Inkubation bei 28°C bis Kolonien erscheinen
- Animpfen von 10 ml flüssigem LB mit einigen Bakterienkolonien
- Inkubation ü.N. bei 250 Upm und 28°C
- Bestimmung der OD_{600}
- Zentrifugation der Bakteriensuspension für 10 min bei 4000 g und 4°C
- Resuspendieren des Bakterienpellets in flüssigen Pflanzenkulturgrundmedium
- Einstellen der OD_{600}=0,4
- Zugabe von Acetosyringon zur Bakteriensuspension

Pflanzentransformation

- Präparierung von quadratischen Blattstücken (4x4 mm) durch Entfernen des Blattrandes und der Blattmittelrippe
- Überführen der Blattexplantate in Petrischalen mit 10 ml sterilem Flüssigkulturmedium
- Zugabe der Agrobakteriensuspension in die Petrischale
- Inkubation für 10-15 min unter leichtem Schwenken
- Abtupfen der Blattstücke auf sterilem Handpapier
- Auflegen der Explantate auf Ko-Kulturmedium für 48 h
- Wiederholtes Waschen der Blattstücke in cefotaximhaltigen sterilem A. bidest.
- Abtupfen der Blattstücke auf sterilem Handpapier
- Auflegen der Explantate auf Selektionsmedium
- Regelmäßige Subkultivierung auf frischem Selektionsmedium
- Abtrennen von Regenerationsereignissen und Überführung auf Bewurzelungsmedium
- Von jedem Blattexplantat wurde nur ein Sproß regeneriert, um Doppeltestungen des gleichen Transformationsereignisses zu verhindern.

3.7.2. Erhaltung transgener T_0-Linien und Erzeugung der T_1-Generation

Regenerierte Sprosse aus der Agrobakterien-vermittelten Transformation wurden in regelmäßigen Abständen auf 2 cm Sprosssegmente eingekürzt und subkultiviert. Die Sproßspitzen wurden auf Grundmedium (2.7.3.) zur Bewurzelung überführt und nach Ausbildung deutlicher Wurzeln erfolgte die Überführung ins Gewächshaus. Dazu wurden die Pflanzen unter fließend warmen Wasser von Medienresten gereinigt und in TKS gepflanzt. Zum Schutz der Pflanzen wurden sie zunächst unter Plastikhauben kultiviert bis eine Anpassung an Gewächshausbedingungen erfolgt war. Die Pflanzen blühten frei ab und wurden bis zur Samenreife kultiviert. Die Samen wurden geerntet und kühl und trocken gelagert.

3.8. Analyse transgener Tabakpflanzen

3.8.1. Segregationsanalyse des *nptII*-Gens

Aus der Selbstbefruchtung der Primärtransformanden gewonnene Samen wurden auf kanamycinhaltigem Medium (Aussaatmedium, 2.7.3.) steril ausgesät. 100-200 Samen transgener T_1-Linien wurden je Wiederholung untersucht. Nach 2 Wochen auf dem Selektionsmedium konnten Kanamycin-resistente grüne Sämlinge von Kanamycin-sensitiven weißen Sämlingen unterschieden und ausgezählt werden.
Die statistische Analyse der Nachkommenschaften wurde mittels eines χ^2-Testes überprüft. Der Freiheitsgrad beträgt bei zwei Klassen 1. Eine signifikante Ablehnung der Hypothese des erwarteten Spaltungsverhältnisses von 3:1 wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von α = 0,05 bei einem χ^2-Wert $\geq$ 3,84 abgelehnt. Damit konnte die Zahl der transgenen Insertionen bestimmt werden.

3.8.2. PCR-Nachweis transgener Insertionen

Der Nachweis der vollständigen Insertion des Transformationskonstruktes erfolgte über PCR an ausgewählten Arbeitslinien. Die Überprüfung erfolgte sowohl an T_0-Blattmaterial als auch an T_1-Sämlingsmaterial.

3.8.3. Induktion induzierbarer Promotoren

Für verschiedene Versuchsfragen war es nötig, die verwendeten induzierbaren Promotoren DR5 und AlcA durch eine künstliche Induktorapplikation auf Funktionsfähigkeit und Sensitivität zu kontrollieren. Die Art und Konzentration des Induktors ist dabei im Ergebnisteil (Kap. 4) angegeben. Die Kontrolle der erfolgreichen Genexpression erfolgte über Transkriptnachweis in der RT-PCR, visuelle Bonitur des Phänotyps und Fluoreszenzmikroskopie.

3.8.4. Erfassung von Wachstumsparametern

Für die makroskopische morphologische Charakterisierung von Veränderungen in der Phänotypausprägung nach Ethanolapplikation in unterschiedlichen transgenen Linien wurden verschiedene Parameter erhoben.

- Messung der Pflanzenhöhe
- Zählung der Nodien
- Messung des Internodiendurchmesser zwischen dem 6. und 7. Nodium
- Erfassung der Wurzeltrockenmasse
  Der oberirdische Pflanzenteil wurde abgeschnitten. Der Wurzelballen wurde in einem Sieb ausgewaschen. Die verbliebenen Pflanzenwurzeln wurden in Aluminium-Wägeschalen überführt und für 48 h bei 70°C getrocknet und anschließend gewogen.

3.9. Epifluoreszenzmikroskopie

Pflanzliche Gewebeproben wurden mit einem Zeiss Axioskop Mikroskop betrachtet, das mit einer 100 Watt-Quecksilberdampflampe für Fluoreszenzanwendungen ausgestattet war.

Es wurde für die mGFP4-Detektion der Filter F31-043 mit folgenden Eigenschaften verwendet:

Anregungsfilter	D395/40
Strahlenteilender Spiegel	425 dclp
Bandpassfilter	D510/40

4. Ergebnisse

4.1. Transiente Expression bakterieller Phytohormongene mit pflanzenviralen Vektoren

Neben der Erzeugung transgener Tabaklinien, die die in dieser Arbeit verwendeten phytobakteriellen Hormonmetabolismusgene unter Kontrolle eines Ethanol-induzierbaren Expressionssystems exprimieren (4.2.), wurde zunächst die Möglichkeit untersucht pflanzenvirale Expressionsvektoren zu nutzen.
Unter Verwendung dieses Expressionsansatzes sollte geprüft werden, inwieweit dieses, sich über ein hohes Expressionsniveau auszeichnende transiente Expressionssystem für den Nachweis der Funktionsfähigkeit der amplifizierten und klonierten phytohormonbeeinflussenden phytobakteriellen Gene genutzt werden kann und in einer morphologischen Veränderung der Pflanzen resultiert.
Für diese Untersuchungen wurden die phytobakteriellen Hormonmetabolismusgene in pflanzenvirale Expressionsvektoren kloniert. Zunächst musste der Einfluss der Virusinfektion auf die in diesen Untersuchungen verwendeten Pflanzen (*N. benthamiana, N. tabacum* und *P. hybrida*) bestimmt werden, um die Differenzierung pflanzenviraler Symptome von den zu erwartenden Phytohormongeneffekten differenzieren zu können. Auf diese Untersuchungen folgend wurde die prinzipielle Eignung pflanzenviraler Expressionssysteme für die Beeinflussung des pflanzlichen Phytohormonhaushaltes resultierend in der Änderung phänotypischer Entwicklungsmuster zu nutzen, geprüft.

4.1.1. Erstellung der pflanzenviralen Expressionskonstrukte

In den Untersuchungen zur pflanzenviralen Expression der phytobakteriellen Hormonmetabolismusgene *ipt*, *iaaH*, *iaaL*, *rolA* und *rolC* wurde mit zwei unterschiedlichen pflanzenviralen Expressionsvektoren gearbeitet, die in binären Vektoren für eine *Agrobakterium*-vermittelte Infektion vorlagen. Der strukturelle Aufbau der resultierenden PVX-basierenden Expressionskonstrukte ist in Abbildung 4.1-1 schematisch dargestellt.

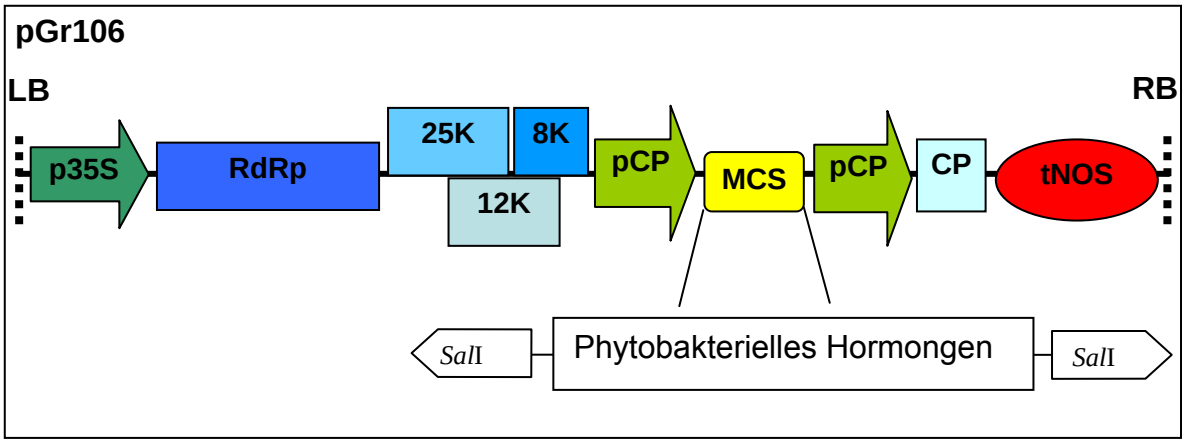


Abb. 4.1-1: Darstellung der hergestellten PVX-basierten pflanzenviralen Expressionskonstrukte (nach Chapmann *et al*., 1992)

Die bakteriellen Phytohormongene *ipt, iaaL, iaaH, rolA* und *rolC* wurden aus den in 2.4. aufgeführten Plasmiden amplifiziert und in pBluescript-Plasmide kloniert. Nach Verifizierung der Gensequenz erfolgte die Subklonierung über einen *Sal*I Restriktionsverdau in den PVX-Vektor. Nach Überprüfung der Orientierung des eingefügten phytobakteriellen Hormongens im pflanzenviralen Expressionsvektor, wurden die resultierenden Konstrukte PVX-*ipt*, PVX-*iaaL*, PVX-*iaaH,* PVX-*rolA* sowie PVX-*rolC* in den Agrobakterienstamm LBA4404 transformiert.

Um nachzuweisen, dass die, aus der pflanzenviralen Expression oben aufgeführten Gene resultierenden phänotypischen Veränderungen in den Pflanzen auf die Expression der eingefügten Phytohormongene zurückzuführen sind und unabhängig vom verwendeten Wirt-Pathogensystem aufreten, wurde das *ipt*-Gen ebenfalls von dem TRV-Vektor exprimiert. Dieser besitzt ein bipartites Genom (siehe Einleitung). RNA1 lag als agroinfizierbarer cDNA-Klon vor. In die RNA2, konnte über eine „multiple cloning site“ Sequenzen eingefügt werden.

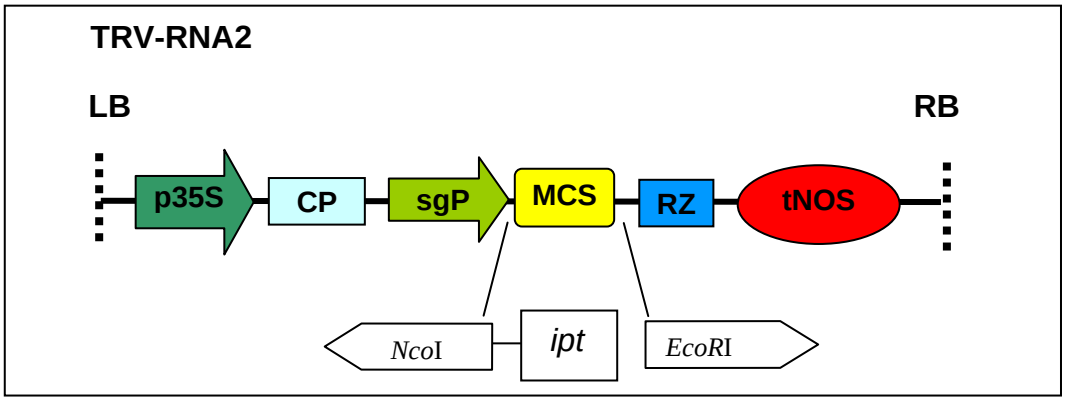


Abb. 4.1-2: Darstellung des TRV-basierten *ipt*-Expressionskonsruktes (nach MacFarlane & Popovich, 2000)

Für die Erzeugung des TRV-Konstruktes TRV-*ipt* erfolgte zunächst eine Amplifizierung der Gensequenz, wobei die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *EcoR*I dem PCR-Fragment angefügt wurden. Damit wurde die Klonierung in den TRV-RNA2 Klon (Abb. 4.1-2) möglich. Der resultierende Klon wurde ebenfalls in Agrobakterien transformiert.

4.1.2. Expressionsuntersuchungen in Jungpflanzen von *N. tabacum*, *N. benthamiana* und *P. hybrida*

4.1.2.1. Systemische Infektion der Pflanzen mit den pflanzenviralen Vektoren PVX und TRV

Zunächst wurde durch Inokulation der Pflanzen *N. tabacum* „Samsun-nn“, *N. benthamiana* und *P. hybrida* mit den Konstrukten PVX-*gfp* und TRV-*gfp* (2.3.) die systemische Infektion der Pflanzen durch die pflanzenviralen Vektoren überprüft.

Drei Wochen alte Jungpflanzen im Vierblattstadium wurden mit den *gfp*-exprimierenden pflanzenviralen Vektoren infiltriert. Als Kontrolle erfolgte die Infiltration mit einer Agrobakteriensuspension, die keinen binären pflanzenviralen Vektor enthielt, um den Einfluss der Inokulationsmethode von den Untersuchungsvarianten abgrenzen zu können. Zusätzlich wurden auch unbehandelte Pflanzen als weitere Kontrolle mitgeführt.

Alle drei verwendeten Pflanzenarten zeigten eine systemische Infektion durch PVX-*gfp*. Der Infektionsverlauf war jedoch unterschiedlich.

Drei Tage nach der Infiltration konnte in den *Nicotiana*-Arten eine GFP-Fluoreszenz im infiltrierten Blattbereich festgestellt werden. Bereits sieben Tage nach Infiltration war ein weitläufiges systemisches Ausbreiten der Virusinfektion in den Neuaustrieb und in nicht-infiltrierten Pflanzenbereichen (Abb. 4.1-3b) zu beobachten; die systemische Infektion setzte sich in den darauffolgenden Tagen fort. Nach ungefähr 10 Tagen wurde in der gesamten *N. benthamiana* Pflanze GFP-Fluoreszenz beobachtet. In den *N. tabacum* Pflanzen erfolgte der Infektionsverlauf ähnlich, hier wurde ebenfalls wenige Tage

nach der Infiltration ein systemisches Ausbreiten des Virus beobachtet (nicht dargestellt).

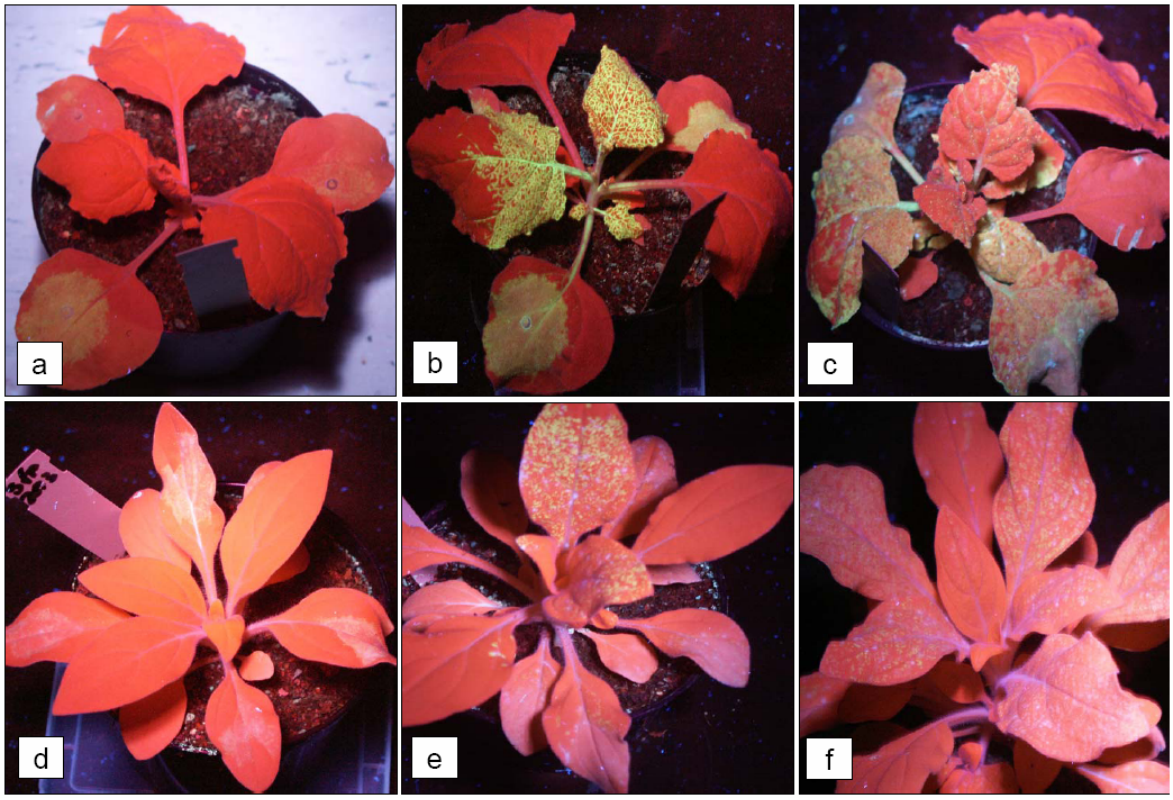


Abb. 4.1-3: Verlauf der *PVX*-Infektion in *N. benthamiana* (obere Reihe) und *P. hybrida* (untere Reihe) nach Infektion mit *gfp*-exprimierenden pflanzenviralen PVX-Expressionsvektor. (a) 3 dpi, (b) und (d) 7 dpi, (c) und (e) 14 dpi, (f) 21dpi

In *P. hybrida* verlief die Entwicklung der *gfp*-Expression verglichen mit den Tabak-Arten langsamer. Hier konnte erst nach fünf bis sieben Tagen eine schwache GFP-Expression im infiltrierten Bereich nachgewiesen werden. Nach weiteren zehn Tagen war eine systemische Infektion festzustellen (Abb. 4.1-3e). Die beobachtete Fluoreszenz war im Vergleich mit *N. benthamiana* schwächer und auf kleinere Blatt- bzw. Pflanzenbereiche beschränkt. Sie setzte sich aber in immer größeren Bereichen fort (Abb. 4.1-3f). Nach 21 Tagen war eine Ausbreitung des Virus trotz abnehmender GFP-Fluoreszenz zu erkennen.

Ein anderes Bild zeigte sich bei der Infektion mit dem pflanzenviralen TRV-Vektor. Hier konnte nur mit *N. benthamiana* und *P. hybrida* gearbeitet werden, da eine TRV-Infektion in *N. tabacum* „Samsun-nn“ eine Hypersensitive Reaktion (HR)

auslöst und damit keine systemische Infektion der Pflanze erfolgt (Liu *et al.*, 2002b).

Auch für TRV war die Infektion mit dem pflanzenviralen *gfp*-Konstrukt bei *N. benthamiana* im Vergleich zu *P. hybrida* schneller, stärker und vollständiger (siehe Abb. 4.1-4). Erstere zeigten bereits fünf Tage nach Inokulation ein systemisches Ausbreiten der Infektion. Hingegen war bei der Petunienlinie zunächst nur eine schwache *gfp*-Expression im infiltrierten Blattbereich zu beobachten (Abb. 4.1-4d). Erst 17 Tage nach der Infektion konnte eine erste virale Ausbreitung in Petunie gesehen werden (Abb.4.1.-4e).

Abb. 4.1.-4: Verlauf der *TRV*-Infektion in *N. benthamiana* (obere Reihe) und *P. hybrida* (untere Reihe) nach Infektion mit *gfp*-exprimierenden pflanzenviralen Expressionsvektor. (a) und (d) 5 dpi, (b) 8 dpi, (c) 12 dpi, (e) 17 dpi, (f) 28 dpi

Neben der Bestimmung des Verlaufs der pflanzenviralen Infektion durch die zur Verfügung stehenden infektiösen cDNA Klone von PVX und TRV war es wichtig für die Etablierung dieses Expressionssystems den Einfluss der Virusinfektion auf die zu untersuchenden Pflanzen zu bestimmen.

Die aus künstlicher Inokulation resultierenden Virusinfektionen der Pflanzen waren von einer Symptomausbildung in infizierten Pflanzen begleitet. Die beobachtete

Symptombildung war zum einen Virus-abhängig und zum anderen Pflanzenspezies-abhhängig.

Der PVX-Vektor infizierte *N. tabacum*, *N. benthamiana* und *P. hybrida* systemisch. Deutliche Unterschiede in der Symptombildung und -ausprägung konnte zwischen den Pflanzen beobachtet werden. Während der Habitus von *N. tabacum* kaum beeinflusst wurde und nur leichte Mosaiksymptome auftraten, war die Pflanzenentwicklung bei *N. benthamiana* durch eine PVX-Infektion wesentlich stärker beeinträchtigt. Es traten Stauchungen und Verzwergungen des Habitus, sowie Blattanomalien auf (Abb. 4.1-5a). Weiterhin wurde eine starke Entwicklung von Chlorosen und teilweise auch Nekrosen beobachtet. Bei *P. hybrida* war keine Beeinflussung des Wachstumsverhaltens zu beobachten, jedoch traten starke Mosaiksymptome in infizierten Pflanzen auf (Abb. 4.1-5c).

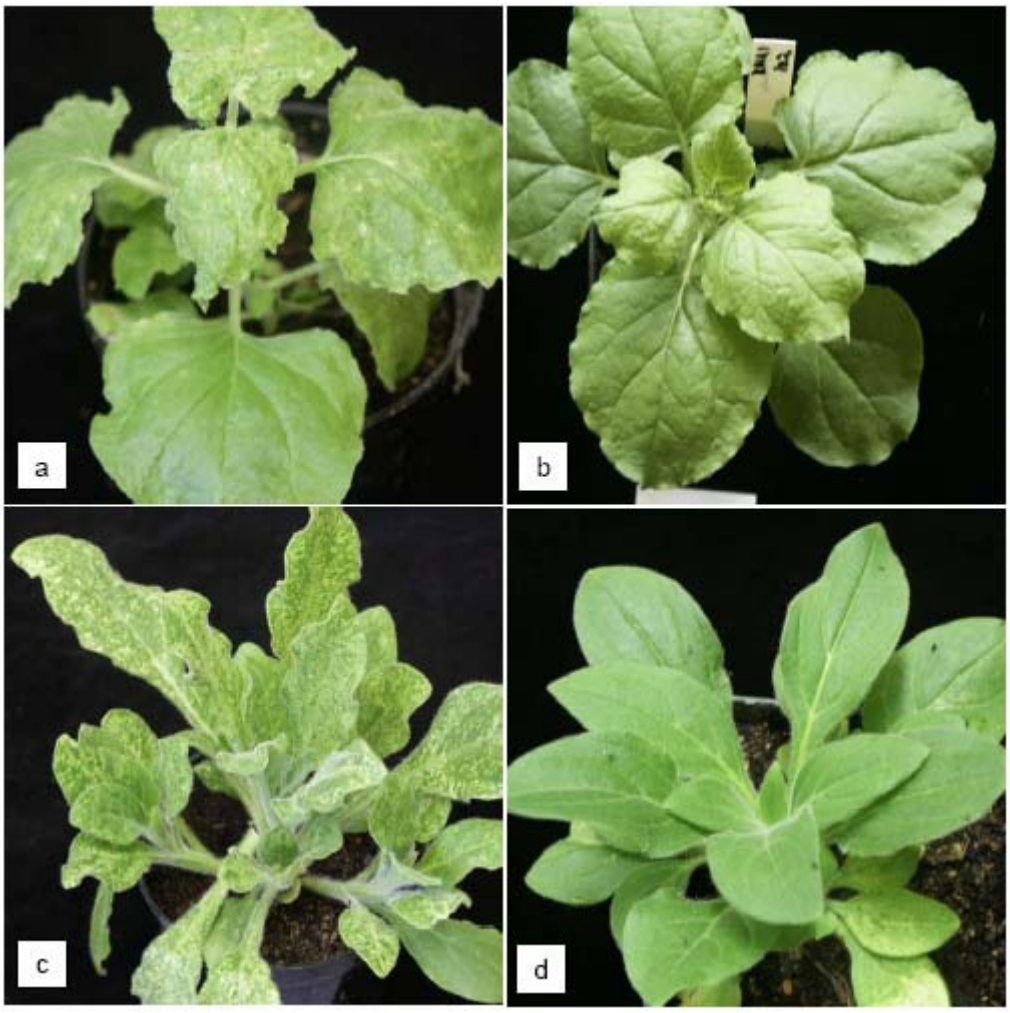


Abb. 4.1-5: Symptome einer *PVX*-Infektion 18 Tage nach Infiltration des infektiösen cDNA-Klons, (a) *N. benthamiana*, (c) *P. hybrida, (b)* nicht-infizierte Kontrollpflanze von *N. benthamiana*, (d) nicht-infizierte Kontrollpflanze von *P. hybrida*

Durch eine Überlagerung der Symptome einer pflanzenviralen Infektion mit phänotypischen Veränderungen durch eine pflanzenvirale Fremdgenexpression könnte die kausale Differenzierung erschwert werden, insbesondere wenn Symptome wie Verzwergung und Blattanomalien auftreten, deren Ausbildung mit phytohormonellen Veränderungen in Verbindung gebracht werden.
Diese Problematik bestand bei der Verwendung des TRV-Vektors nicht. Dieser verursachte in *N. benthamiana* verglichen mit dem PVX-Vektor keine starken Symptome einer viralen Infektion. Dies könnte die deutliche phänotypische Erfassung der Merkmalsausprägung einer viral exprimierten Phytohormongenexpression in Pflanzen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen vereinfachen.

Ergänzend zu den Infektionen von Jungpflanzen im Gewächshaus wurde auch die Möglichkeit einer *in vitro*-Infektion untersucht. Dazu wurden 10 Tage alte steril angezogene Sämlinge mit einer Impfnadel am Hypokotyl durch zwei-drei Einstiche verletzt und mit der Agrobakteriensuspension (3.6.8.1.) inokuliert.
Neben der Infektion mit den *gfp*-exprimierenden viralen Expressionsvektoren erfolgte auch eine Inokulation mit einer LBA4404-Suspension, die keinen binären pflanzenviralen Vektor enthielt. Dadurch wurde der virale Infektionsverlauf überprüft und eine Beeinträchtigung des methodischen Versuchsansatzes durch die *Agrobakterium*-vermittelte Inokulation kontrolliert. Es musste sichergestellt sein, dass die applizierten Agrobakterien die Sämlingsentwicklung durch ein Überwachsen auf dem zuckerhaltigen Kulturmedium nicht negativ beeinflussen.
Mit der untersuchten Inokulationsmethode war es möglich gewesen eine virale Infektion in den *in vitro*-Sämlingen zu erzielen, ohne dass eine negative Beeinflussung der Pflanzenentwicklung durch die applizierten Agrobakterien zu beobachten war.
Die systemische Infektion von *N. tabacum* und *N. benthamiana* begann wenige Tage nach der Inokulation und breitete sich in den darauffolgenden Tagen in den Sämlingen aus. Auch in diesem Versuchsdesign war die Infektion sowohl durch PVX-*gfp*, als auch TRV-*gfp* in *P. hybrida* im Vergleich zu *N. benthamiana* schwächer.

4.1.2.2. Erzeugung phänotypischer Effekte durch die pflanzenvirale Expression von bakteriellen Phytohormongenen

Nach den, den Infektionsverlauf und die Symptomausprägung beschreibenden Vorversuchen, konnten Inokulationsversuche mit den Phytohormongen-exprimierenden pflanzenviralen Konstrukten durchgeführt werden.
Dazu wurden jeweils zehn Jungpflanzen im Vier-Blattstadium mit den, in Tab. 4.1-1 aufgeführten Varianten, inokuliert, wobei je Pflanze 1 ml der Agrobakteriensuspension infiltriert wurde (3.5.7.2.). Dies sollte gewährleisten, dass in den Versuchsgliedern keine Unterschiede bezüglich des eingesetzten Primärinokulums vorlagen.

Tab. 4.1-1: Überblick der verwendeten pflanzenviralen Expressionskonstrukte und einer Angabe des erwarteten Einflusses auf den pflanzlichen Phytohormonhaushalt, sowie der erzielten Resultate

Konstrukt	Erwartete Beeinflussung von Auxin-Cytokinin[1]	Ergebnisse[2]
PVX-*gfp*	n.b.	Ohne phänotypische Veränderung
PVX-*ipt*	Cytokininerhöhung	Lateralverzweigung, Verzwergung, Sprossverdickung, Chlorosen
PVX-*iaaL*	Auxinreduktion	Pflanzenhöhenreduktion, Kleinere Blätter
PVX-*iaaH*	Auxinerhöhung	Apikaldominanz, Blattepinastie
PVX-*rolA*	Auxinsensitivität	Ohne phänotypische Veränderung
PVX-*rolC*	Cytokininerhöhung	Ohne phänotypische Veränderung
TRV-*ipt*	Cytokininerhöhung	Lateralverzweigung, Verzwergung, Sprossverdickung, Chlorosen

[1] Hypothesen wurden von den in der Literatur beschriebenen Genwirkungen abgeleitet (siehe Einleitung 1.2.3.)
[2] Angaben der Veränderung morphologischer Merkmale nach Infektion mit Phytohormongen-exprimierenden pflanzenviralen Vektoren beziehen sich auf den Vergleich mit PVX-infizierten Kontrollen

Aufgrund eines massiven Eingriffes in den Phytohormonhaushalt der Pflanze durch eine temporär starke Genexpression im infiltrierten Pflanzengewebe bis hin zu einer systemischen Ausbreitung des Viruskonstruktes und damit einhergehender Ausweitung des Expressionsbereiches war die Ausbildung deutlicher Phänotypen entsprechend der in Tabelle 4.1-1 aufgeführten, beschriebenen Genwirkungen zu erwarten.

Bei der Expression von PVX-*ipt*, PVX-*iaaL*, PVX-*iaaH* und TRV-*ipt* konnte ein Einfluss auf den pflanzlichen Habitus in allen Versuchspflanzen nachgewiesen werden. Die resultierenden morphologischen Entwicklungsveränderungen traten im Vergleich mit den Kontrollpflanzen deutlich hervor. So konnte die prinzipielle Funktionalität dieses Expressionsansatzes demonstriert werden.

Pflanzenvirale *ipt*-Expression

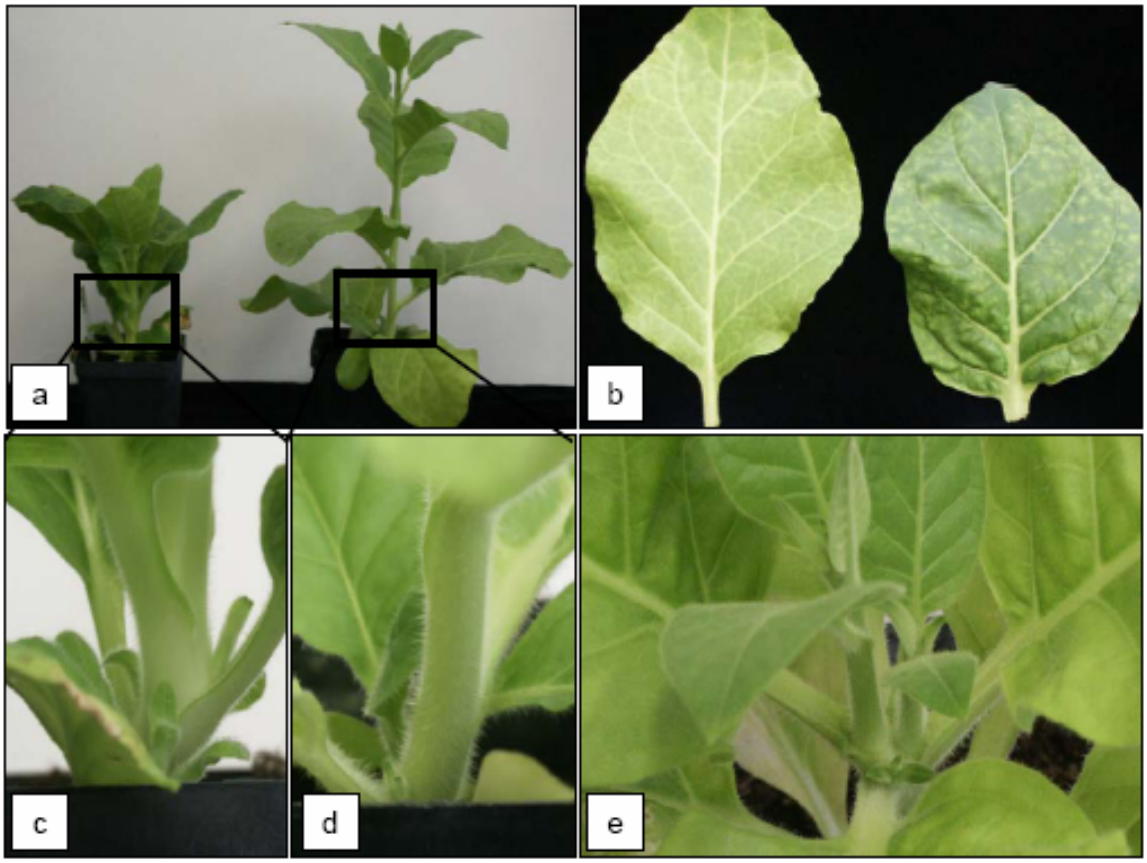


Abb. 4.1-6: Symptome einer PVX-*ipt* Expression in *N. tabacum* 21 Tage nach Agroinfiltration, (a) Vergleich PVX-*ipt* (links) und PVX-*gfp* (rechts) mit den entsprechenden vergrößernden Auszügen unter (c) und (d); (b) Blattvergleich: links PVX-*gfp* und rechts PVX-*ipt*; (e) multiple Sprossbildung am Apikalmeristem

Die pflanzenvirale Expression der phytobakteriellen Isopentenyltransferase resultierte in Phänotypen, die eine Steigerung der endogenen Cytokiningehalte in den Pflanzen verdeutlichte. Zu diesen Merkmalen gehörte der Austrieb der Lateralknospen, die Reduktion der Pflanzenhöhe, Verdickung der Sprossachse und kleine „rundere“ Blätter. Weiterhin fiel im Vergleich mit „mock“-inokulierten Pflanzen und nicht-inokulierten Kontrollpflanzen ein hellgrüneres Erscheinungsbild PVX-*ipt* infizierter Pflanzen auf.

In *N. tabacum* war die Bildung multipler Sprosse an Apikal- und Lateralmeristemen zu beobachten (4.1-6c, e). Auch in Petunienpflanzen wurde eine erheblich gesteigerte Anzahl von Seitensprossen gebildet (Abb. 4.1-7a-c).

Abb. 4.1-7: Verlauf der Phänotypentwicklung in *P. hybrida*, (a) 10 Tage nach PVX-*ipt* Inokulation, (b) 20 Tage nach PVX-*ipt* Inokulation, (c) 30 Tage nach PVX-*ipt* Inokulation, (d) Kontrollpflanze, 30 Tage nach PVX-*gfp* Inokulation

Im Gegensatz zu *N. tabacum* und *P. hybrida* wiesen *N. benthamiana* eine Wachstumsbeeinrächtigung durch PVX-Infektionen auf (Abb. 4.1-8). Diese äußerten sich in kleinerem Pflanzenwuchs und Blattdeformationen. PVX-*ipt* Infektionen resultierten neben diesen Veränderungen in der Ausprägung weiterer Merkmale, wie sie auch bei *N. tabacum* und *P. hybrida* zu sehen waren, wie Erhöhung der Seitentriebausbildung, Verzwergung, Sprossverdickung und Chlorosen.

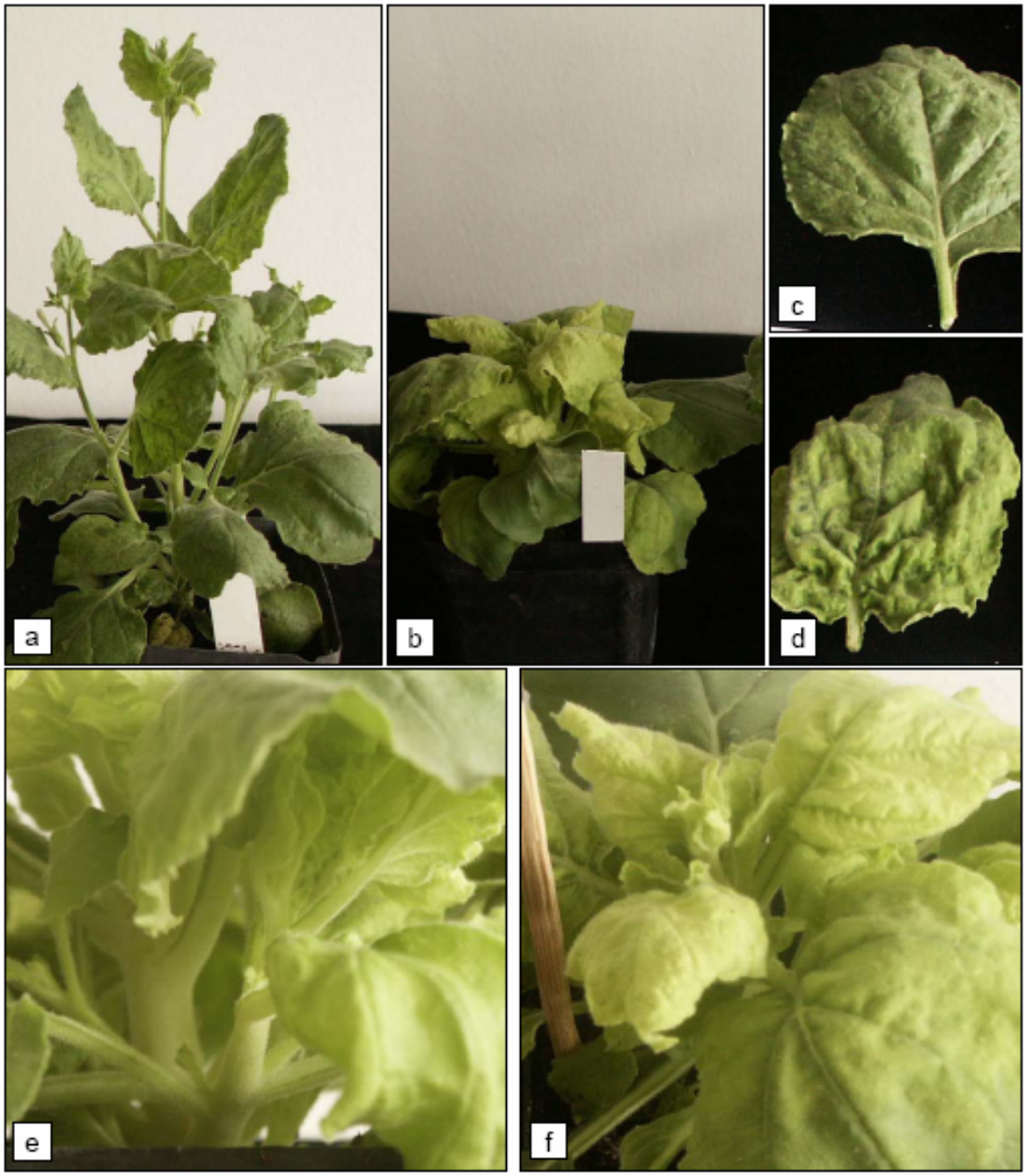


Abb. 4.1-8: Symptome einer PVX-*ipt* Expression in *N. benthamiana* (a) Kontrolle, Expression von PVX-*gfp*, (b) PVX-*ipt* Expression in *N. benthamiana* 21 Tage nach Infiltration, Blattanatomievergleich zwischen Kontrolle (c) und *ipt*-

Expression (d), (e) verdickter Hauptspross mit starkem Lateralaustrieb bei *ipt*-Expression, (f) stark chlorotischer Apikalbereich

Eine TRV-*ipt* Infektion resultierte in der Ausprägung ähnlicher morphologischer Veränderungen in *N. benthamiana* und *P. hybrida* (Abb. 4.1-9). So wurden in *N. benthamiana* Chlorosen und Stauchungen beobachtet, in *P. hybrida* wurde eine erhöhte Lateralverzweigung erhalten. Diese morphologischen Entwicklungsveränderungen waren in ihrer Ausprägung nach Infektion mit PVX-*ipt* und TRV-*ipt* vergleichbar. Dies wies eine vektorunabhängige Möglichkeit zur Beeinflussung der pflanzlichen Phänotypen aus.

Abb. 4.1-9: TRV-*ipt* Infektion in *N. benthamiana* (10 dpi) und *P. hybrida* (14 dpi), (a) TRV-*ipt* Infektion resultiert in Blattdeformationen und Chlorosen, (b) TRV-*gfp*-Fluoreszenz im Neuaustrieb zeigt die systemische Infektion durch das Virus an, (c) Phänotyp der TRV-*gfp* infizierten Kontrollpflanze, (d) Seitensprossentwicklung in *P. hybrida* nach TRV-*ipt* Infektion, (e) Phänotyp bei TRV-*gfp* Infektion

Pflanzenvirale Expression von bakteriellen Genen, die mit dem pflanzlichen Auxinmetabolismus interagieren

iaaL-Expression

Die pflanzenvirale Expression von *iaaL* führte nicht zu einer Merkmalsausbildung deutlicher Auxindefizienz in den inokulierten Pflanzen. Der Vergleich zu den Kontrollen wies aber pflanzliche Entwicklungsmuster aus, die der Genwirkung von *iaaL* zugeschrieben werden konnten. Zu diesen Symptomen zählten eine Reduktion der Pflanzenhöhe durch kürzere Internodien und eine leicht beeinflusste Blattmorphologie, wie an den lanzettförmigen Blättern in *P. hybrida* zu sehen ist (Abb. 4.1-10). Eine Brechung der Apikaldominanz konnte nicht beobachtet werden.

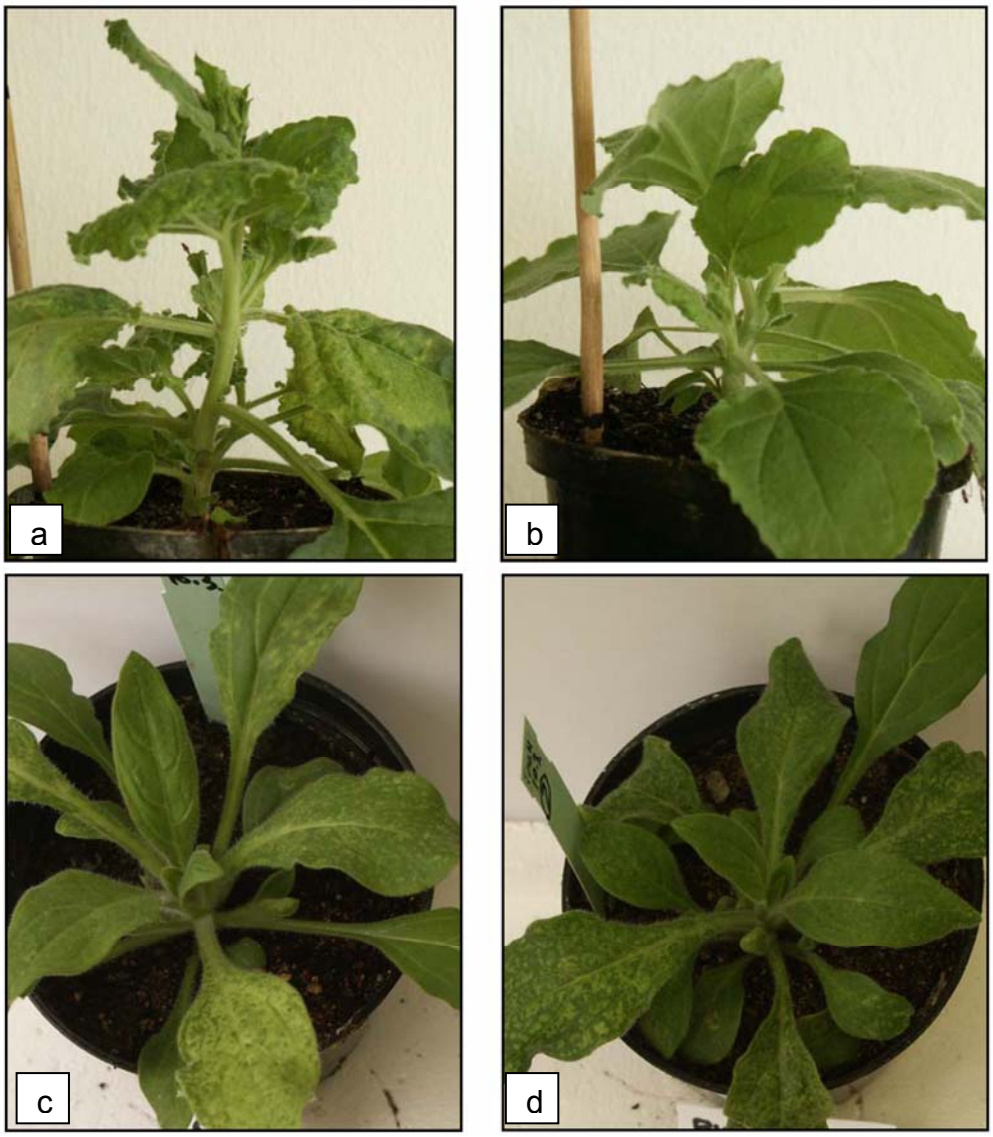


Abb. 4.1-10: Pflanzenvirale *iaaL*-Expression, (a) PVX-*iaaL* in *N. benthamiana*, (b) PVX-*gfp* in *N. benthamiana*, (c) PVX-*iaaL* in *P. hybrida*, (d) PVX-*gfp* in *P. hybrida*

iaaH-Expression

Die bakterielle Indolacetamid-Hydrolase katalysiert die Synthese von IAA aus Indolacetamid (IAM). Die Frage nach dem Vorkommen von IAM in Pflanzen und einer möglichen Bedeutung für die pflanzliche IAA-Synthese kann noch nicht beantwortet werden (siehe Einleitung 1.2.3.).

Eine Applikation des synthetischen *iaaH*-Substrates Naphtalenacetamid (NAM) ermöglicht die Selektion auf *iaaH*-Enzymaktivität (Budar *et al*., 1986).

Aus diesen Gründen wurde in den Versuchen der pflanzenviralen Expression von *iaaH* eine zusätzliche Applikation von NAM durchgeführt (Tab. 4.1-2).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten das Vorliegen von *iaaH*-Substraten in den Pflanzen an. Die Expression von *iaaH* durch den pflanzenviralen Vektor PVX führte zu einer leichten Beeinflussung der Auxinhomöostase. Die Abb. 4.1-11 zeigt die Ausbildung epinastischer Blätter nach Infektion mit PVX-*iaaH.*

Abb. 4.1-11: Ausbildung der Blattepinastie in *P. hybrida* nach PVX-*iaaH* Infektion, (a) 10 dpi; (b) 30 dpi

Die Ausprägung dieser phänotypischen Merkmale konnte durch die Applikation von NAM verstärkt werden. Dieses Ergebnis deutet die limitierte Verfügbarkeit von Substrat für die *iaaH*-Hydrolase an. Die alleinige Applikation von NAM führte nicht zur Ausbildung von Merkmalen, die eine Auxinversorgung der Pflanzen durch NAM ausschloss.

Tab.4.1-2: Versuchsüberblick

Versuchsvariante	Versuchsglieder	NAM-Applikation (50µM)
PVX-*gfp*	10	ohne
PVX-*gfp* + NAM	10	50 ml
PVX-*iaaH*	10	ohne
PVX-*iaaH* + NAM	10	50 ml
NAM	10	50 ml

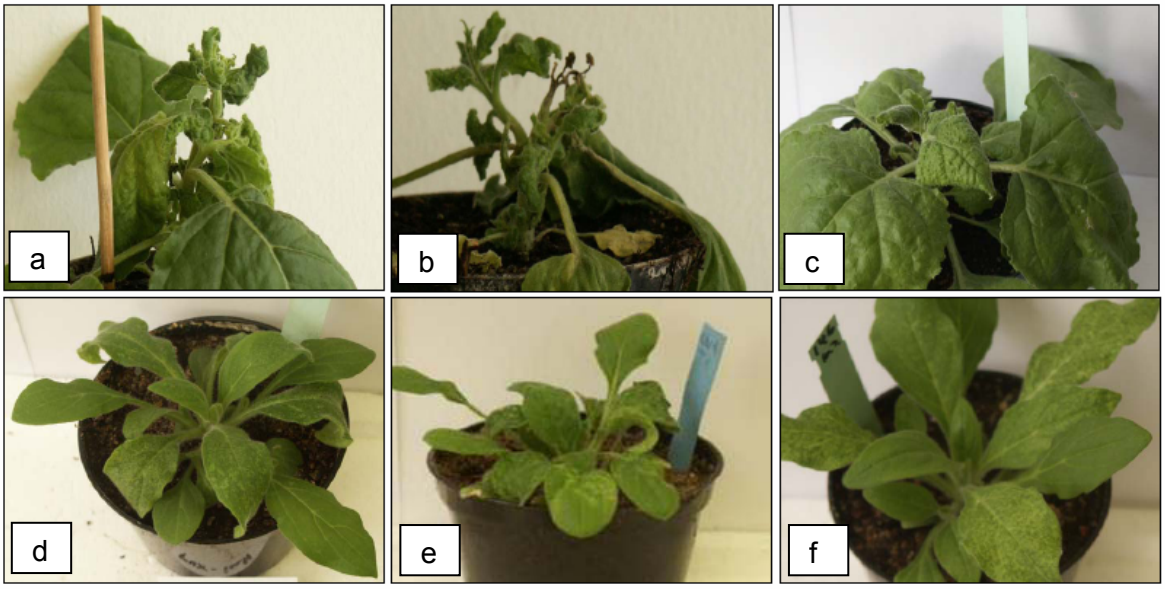


Abb. 4.1-12: Morphologische Entwicklung der Versuchspflanzen nach pflanzenviraler *iaaH*-Expression in Kombination mit NAM-Applikation, Applikation erfolgte wöchentlich nach dem Schema aus Tab. 4.1-2, Bonitur 21 Tage nach Inokulation, obere Reihe *N. benthamiana*, untere Reihe *P. hybrida*, linke Spalte PVX-*iaaH* Expression, mittlere Spalte PVX-*iaaH* Expression und NAM-Applikation, rechte Spalte PVX-Expression.

Es waren sowohl in *N. benthamiana* als auch in *P. hybrida* epinastische Blätter zu beobachten. In *N. benthamiana* waren zusätzlich starke Blattkräuselungen sichtbar. In den Varianten mit Applikation von NAM kam es zu einer weiteren Symptomverstärkung, die Blattepinastie trat deutlich hervor (Abb.4.1-12). Ebenfalls konnte eine Beeinträchtigung der Entwicklung des apikalen Pflanzenbereiches beobachtet werden. In *N. benthamiana* war die Beeinflussung derart stark, dass die Pflanzen im Apikalbereich abstarben.

Pflanzenvirale Expression von *rol*-Genen

Für die Konstrukte PVX-*rolC* und PVX-*rolA* konnten keine deutlichen Merkmale eines Habituseinflusses durch die pflanzenviral exprimierten Gene bonitiert werden.

4.1.3. Pflanzenvirales *in vitro*-Expressionssystem

Da in dem Jungpflanzenexpressionsversuch nicht bei allen inokulierten pflanzenviralen Expressionskonstrukten Geneffekte erzeugt werden konnten, so war die PVX-*rolA* und PVX-*rolC* Expression ohne sichtbare phänotypische Merkmale geblieben, wurde der pflanzenvirale Expressionsansatz auch in einem *in vitro*-Assay benutzt.
Ausgehend von der Hypothese, dass neben der Konzentration des Phytohormons auch die Gewebesensitivität für die Wirkung von Einfluss sind, wurde untersucht, ob junge Sämlinge ein anderes, u.U. sensitiveres Reaktionsmuster auf die pflanzenvirale Expression der bakteriellen Phytohormongene zeigen.
Für diese Analysen wurden junge Sämlinge mit den in Tab. 4.1-1 aufgeführten Konstrukten inokuliert und in regelmäßigen Abständen auf Geneffekte bonitiert.
Die pflanzenvirale Expression von *ipt* in *in vitro*-Kulturen führte zu ähnlichen Symptomen, wie sie zuvor an Gewächshauspflanzen beobachtet worden waren. Die Hauptsprossachse war stark gestaucht (4.1-13e) und verdickt (4.1-13f, g). Die Blätter wirkten kleiner und runder (Vergleich Abbildung 4.1-13g). Der Lateralaustrieb war gefördert (4.1-13g), in *N. benthamiana* kam es zu derart starker multipler Sprossbildung, dass die Sämlingsentwicklung zugunsten der alleinigen Ausbildung von Adventivsprossen aufgehoben wurde (4.1-13h-j).
Ähnlich starke Phänotypen wurden bei pflanzenviraler *iaaH*-Expression auf NAM-Medium (2.7.3.) ausgebildet. Abbildung 4.1-14 g,h zeigt die Ausbildung von Wurzeln entlang der Hauptsprossachse. Außerdem sind die Blattepikotyle stark verlängert, ebenso wie die gesamte Sprossachse. Dieser Merkmalstyp ist bei *iaaH*-Expression auf MS-Medium weniger extrem ausgebildet, deutet sich aber bei einem Vergleich mit dem Kontrollsämling (4.1-13h) an.

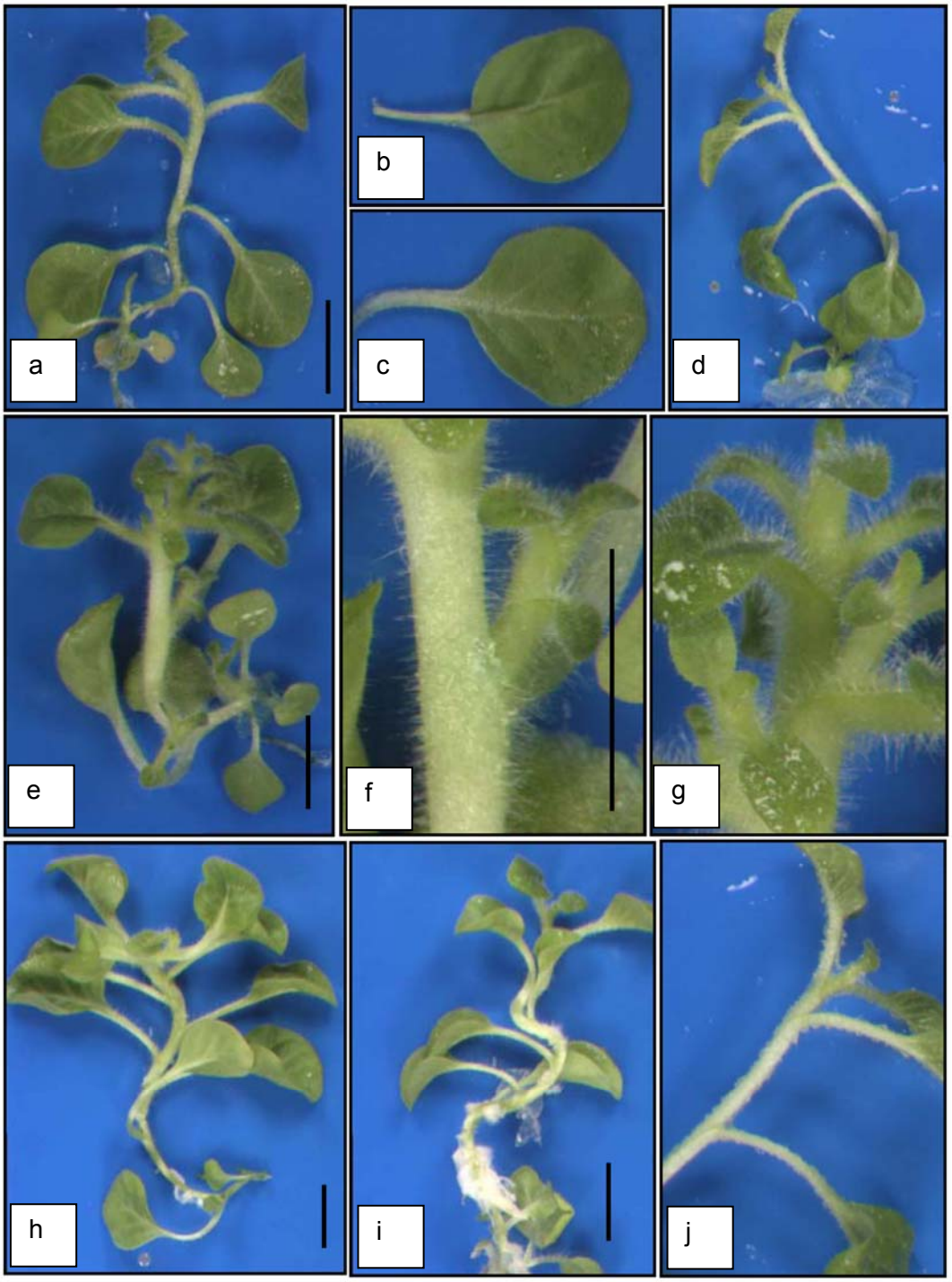


Abb. 4.1-13: Phänotypentwicklung in *N. tabacum* bei Expression bakterieller Phytohormongene durch einen PVX-Vektor in einem *in vitro* Kulturassay, Aufnahmen 21 Tage nach Inokulation. (a)-*iaaL*-Expression; (b)-Blattmorphologie bei *iaaL*-Expression: (c)- Blattmorphologie bei *rolC*-Expression (d) *rolC*-Expression; (e-g) *ipt*-Expression; (h) *iaaH*-Expression auf MS-Medium; (i) i*aaH*-Expression auf NAM-Medium; (j) PVX-*gfp*-infizierter Sämling; Balken entsprechen 1 cm; je Petrischale lagen 3 Sämlinge vor, je Versuchsvariante wurden 5 Petrischalen untersucht

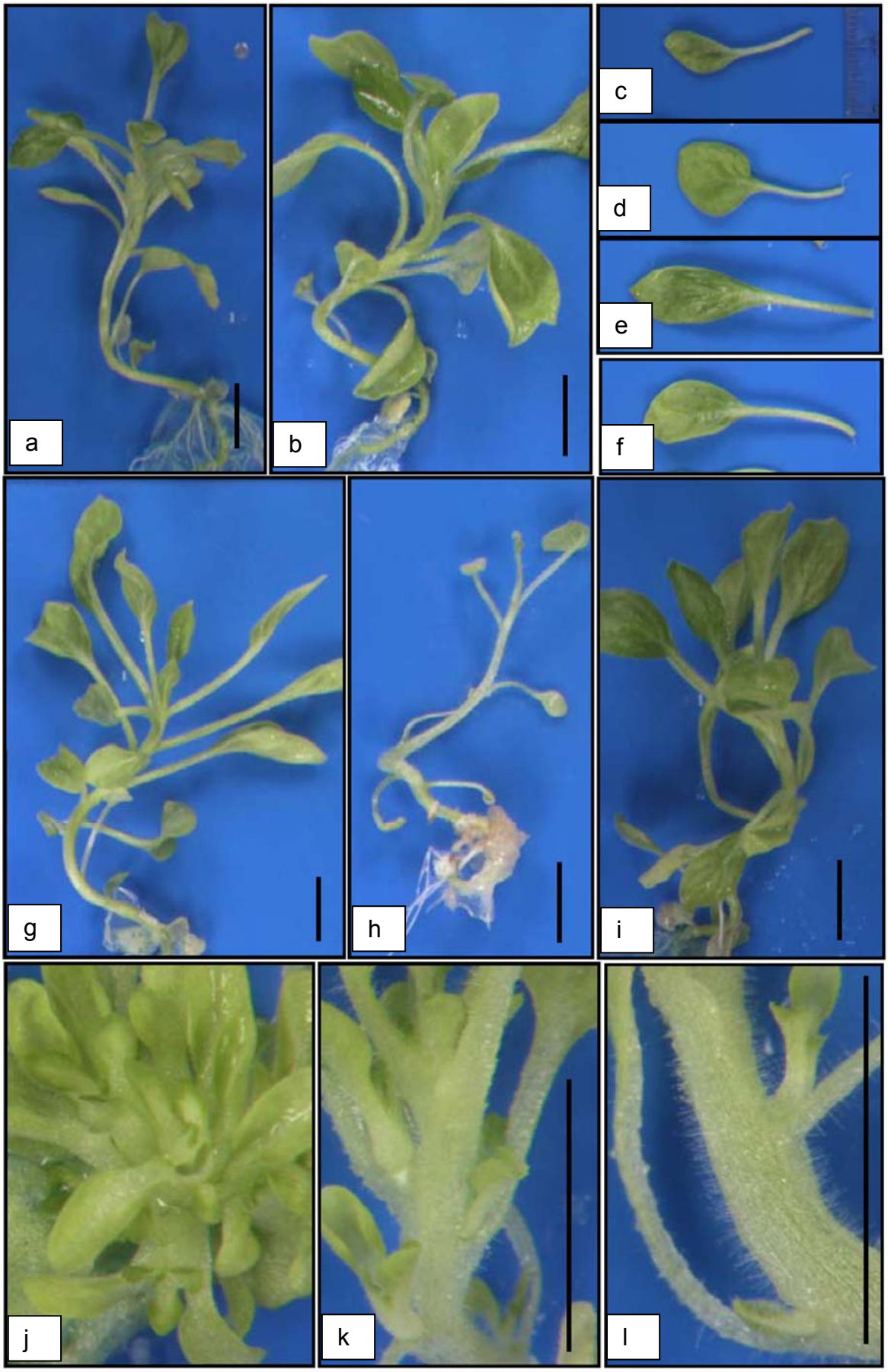

a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l

Abb. 4.1-14: Phänotypentwicklung in *N. benthamiana* bei Expression bakterieller Phytohormongene durch einen PVX-Vektor in einem *in vitro* Kulturassay, Aufnahmen 21 Tage nach Inokulation.
(a) *gfp*-Expression, Kontrolle; (b) *rolC*-Experssion (c) *gfp*-Expression (d) *iaaL*-Expression; (e) *rolC*-Expression; (f) *iaaH*-Expression auf MS-Medium; (g) *iaaH*-Expression auf MS-Medium, (h) *iaaH*-Expression auf NAM-Medium, (i) *iaaL*-Expression, (j-l) *ipt*-Expression; Balken entsprechen 1 cm; je Petrischale lagen 3 Sämlinge vor, je Versuchsvariante wurden 5 Petrischalen untersucht

Weiterhin war besonders bei Expression in *N. benthamiana* eine Reduktion der Blattfläche zu beobachten. Stark elongierte Hypokotyle und Epikotyle traten auf.

Die pflanzenvirale Expression von *iaaL* resultierte in diesem Versuchsansatz in einem gestauchten Sämlingswachstum mit kürzeren Internodien (Abb. 4.1-13a). Der Lateralaustrieb wurde in *N. benthamiana* induziert.

Bei einem Vergleich der Morphologie der gebildeten Laubblätter fällt auf, das diese durch eine unterschiedliche Phytohormongenexpression in *N. tabacum* nicht beeinflusst war. In *N. benthamiana* wurden deutlich rundere Blätter bei *iaaL*-Expression gebildet. Bei den anderen Phytohormongenen konnte keine derart starke Beeinflussung beobachtet werden.

Auch in diesem *in vitro*-Assay resultierte die Expression des *rolA*-Gens und *rolC*-Gens nicht in der Induktion morphologischer Veränderungen der untersuchten Pflanzen.

4.2. Ethanol-induzierbare Expression bakterieller Phytohormongene in transgenen *N. tabacum*-Pflanzen

Ziel der im Folgenden vorgestellten Untersuchungen sollte die gezielte Beeinflussung und Kontrolle der apikalen Dominanz in *N. tabacum* sein.

Dazu sollten im Rahmen dieser Arbeit Gene aus phytopathogenen Bakterien (*ipt, iaaL, iaaH, rolA, rolC*), die bei konstitutiver Expression in transgenen Pflanzen unerwünschte Nebenwirkungen in der Pflanzenentwicklung verursachen, unter Kontrolle eines Ethanol-induzierbaren Expressionssystems gebracht und in Pflanzen transformiert werden.

Mit der Nutzung dieses Systems sollte eine zeitlich begrenzte Genaktivierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Pflanzenentwicklung ermöglicht werden. Zunächst musste untersucht werden, inwiefern eine mögliche Basalexpression des verwendeten induzierbaren Systems zu unerwünschten Nebeneffekten in der Pflanzenentwicklung führt. Der nächste Schritt sollte die Entwicklung einer Induktionsstrategie sein, die untersuchen sollte, inwieweit eine temporäre Genexpression den pflanzlichen Habitus beeinflussen kann oder ob eine wiederholte gezielte Expression zur merklichen Phänotypveränderung nötig ist.

Neben dieser grundlegenden Charakterisierung des Expressionssystems sollte weiterhin das Potenzial der einzelnen verwendeten bakteriellen Gene, die Apikaldominanz und den Pflanzenhabitus durch kontrollierte Expression gezielt zu beeinflussen, bestimmt werden. Durch die Auswahl der verwendeten bakteriellen Gene sollte ein Vergleich des Habituseinflusses von induzierter Auxininaktivierung (*iaaL*), induzierter Cytokininüberproduktion (*ipt*, *rolC*), sowie induzierter Auxinüberproduktion (*iaaH, rolA*) erfolgen.

Weiterhin wurde mit der Pflanzentransformationskassette ein GFP-Reportergen unter Kontrolle eines Auxin-induzierbaren Promotors übertragen.

Unter Nutzung dieses Promotors sollte untersucht werden, ob in bestimmten pflanzlichen Geweben pflanzeneigene Auxine die Markergenexpression aktivieren können, um damit Untersuchungen der Auxinkinetik zu ermöglichen.

Die Auxin-induzierbare GFP-Expression sollte neben der Erfassung pflanzenmorphologischer Parameter in ausgewählten Ethanol-induzierten Pflanzenlinien als direkter zusätzlicher Parameter zur Charakterisierung des

Einflusses der bakteriellen Phytohormongene auf die Pflanze und die Auxindynamik dienen.

4.2.1. Herstellung von Expressionskassetten zur Pflanzentransformation

4.2.1.1. Erstellung des Auxin-induzierbaren Reportergenkonstruktes pBIN-DR5-*mgfp4*

Das Konstrukt zur Auxin-beeinflussbaren Reportergenexpression wurde über die in Abbildung 4.2-1 dargestellten Subklonierungsschritte erstellt. Zunächst wurden der synthetische Auxin-induzierbare Promotor DR5 aus dem Plasmid pUC19-DR5-*GUS* (Tab. 2-3) mit dem spezifischen Primerpaar DR5-up/DR5-low (Tab. 2-4) amplifiziert, wobei über die Primer die Restriktionsschnittstellen *Kpn*I und *BamH*I für die weiteren Subklonierungsschritte angefügt wurden.

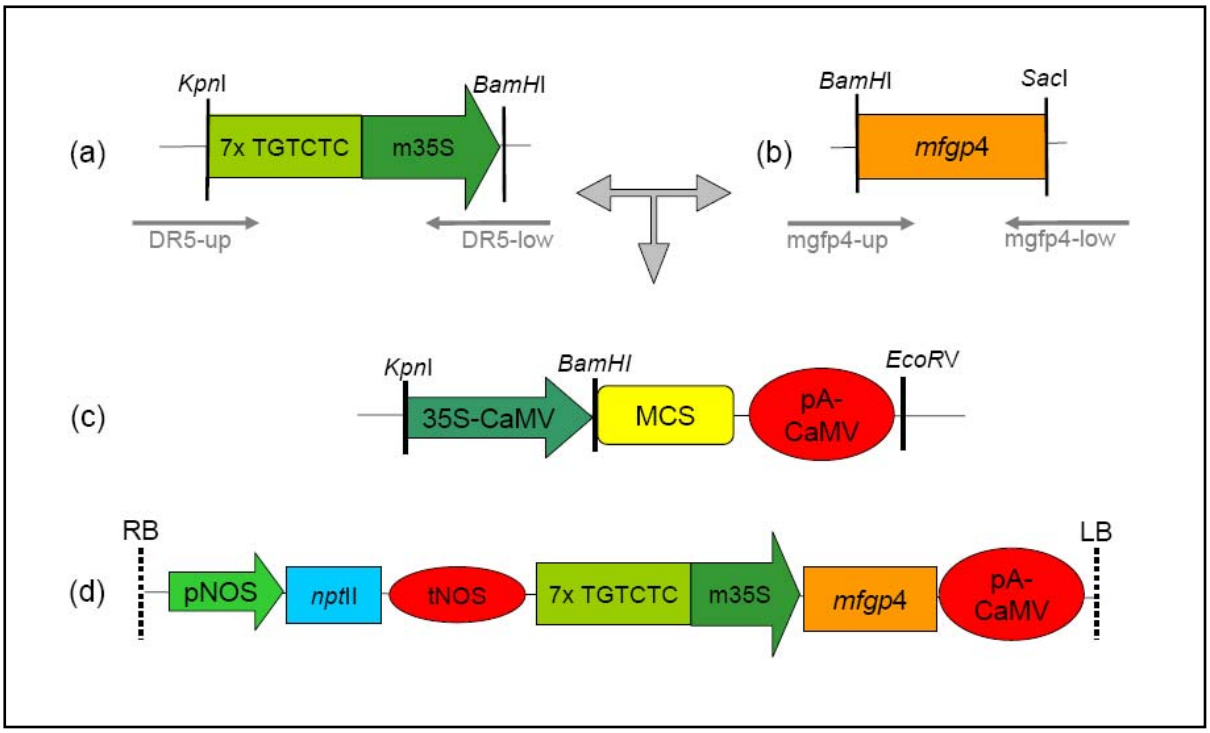


Abb. 4.2-1: Schematische Darstellung der Erstellung des Auxin-induzierbaren Reportergenkonstruktes, (a) Amplifizierung des Auxin-induzierbaren Promotors DR5, (b) Reportergen *mgfp*4 mit den flankierenden Klonierungsschnittstellen *BamH*I und *Sac*I, (c) Aufbau des Pflanzenexpressionsvektors pJIT61, (d) T-DNA Organisation zur Transformation der Kontrolllinie DR5-*gfp*

Über diese Restriktionsschnittstellen erfolgte die Klonierung des Promotors in den Pflanzenexpressionsvektor pJIT61 im Austausch gegen den darin enthaltenen CaMV 35S-Promotor.
Im darauffolgenden Klonierungsschritt wurde das Reportergen *mgfp4* (Haseloff *et al*., 1997) aus dem Plasmid pUC119-*mgfp4* (Tab. 2.2-3) über die Restriktionsschnittstellen *BamH*I und *Sac*I in das Plasmid pJIT61-DR5 eingefügt (Abb. 4.2-1b und 4.2-1c), resultierend in dem Plasmid pJIT61-DR5-*mgfp4*.

Für die Strategie der Erstellung der im nachfolgenden Abschnitt 4.2.1.2. dargestellten Ethanol-induzierbaren Habitusgenkonstrukte störte die *Hind*III-Restriktionsschnittstelle, die sich zwischen der siebenfachen Wiederholung des Auxin-responsiven Elementes und dem 35S-Minimalpromotor befand. Diese wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Stu*I und *EcoR*V und anschliessender Religierung entfernt. Bei diesem Klonierungsschritt wurde durch die Religation von zwei „blunt end“ Restriktionsenzymen deren Erkennungssequenz eliminiert.
Für die Klonierungsstrategie der Überführung der Auxin-induzierbaren Expressionskassette in den binären Vektor musste zunächst die Restriktionsschnittstelle *Acc*65I (Isochizomer von *Kpn*I) über eine Klenowbehandlung in die Restriktionsschnittstelle *SnaB*I geändert werden. Nach diesem Schritt war es möglich die Expressionskassette über einen *SnaB*I und *EcoR*V Restriktionsverdau in die *Stu*I Schnittstelle des binären Vektors einzufügen.
Das resultierende Konstrukt pBIN-DR5-*mgfp4* (Abb. 4.2-1d) sollte der Untersuchung der basalen Auxin-induzierbaren Reportergenexpression ohne Beeinflussung durch ein Ethanol-induzierbares Habitusgen dienen und wird im folgenden als Auxin-induzierbare Kontrolle DR5-*gfp* bezeichnet.

4.2.1.2. Klonierung der bakteriellen Phytohormongene unter Kontrolle des Ethanol-induzierbaren Promotors

Die bakteriellen Gene zur Beeinflussung des Auxin- und Cytokininmetabolismus wurden aus den in Tabelle 2.3 aufgeführten, zur Verfügung gestellten Plasmiden

amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die Sequenzen sind im Anhang unter 8.1. aufgeführt.

Über die PCR-Amplifizierung wurde den Gensequenzen die Restriktionsschnittstellen *Sal*I und *Pst*I zur weiteren Klonierung angefügt (Abb. 4.2-2a)

Der erste Schritt der Klonierungsstrategie bestand in der Subklonierung der amplifizierten Gensequenzen in das Plasmid pBluescript-SKM. Nach Verifizierung der Sequenz der bakteriellen Habitusgene konnte die Klonierung unter Kontrolle des Ethanol-induzierbaren alc-Systems erfolgen.

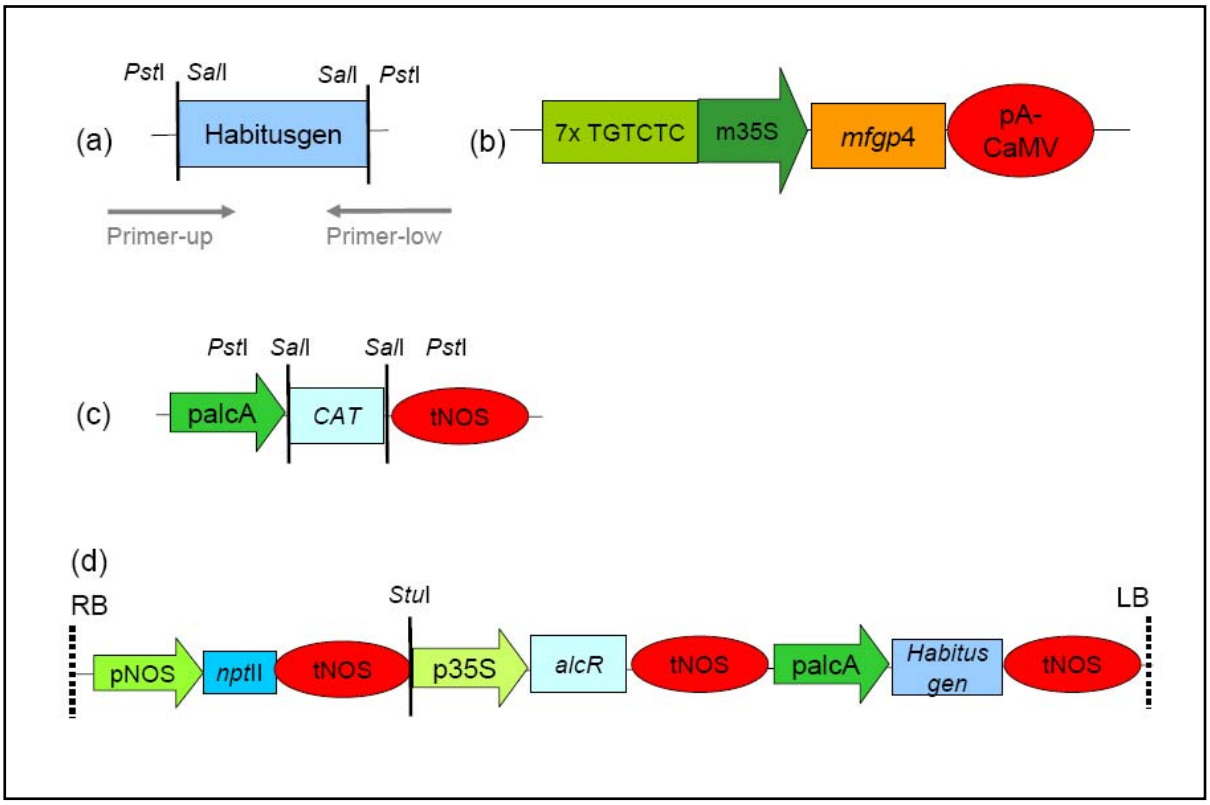


Abb. 4.2-2: Schema der Erstellung des Ethanol-induzierbaren Transformationskonstruktes, (a) PCR-amplifizierte bakterielle Habitusgensequenz mit den angefügten Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (b) Auxin-induzierbares Reportergen-Element bestehend aus *mgfp4* unter Kontrolle von DR5, (c) Klonierungsvektor pACN, welcher zwischen alcA-Promotor und NOS-Terminator ein *CAT*-Gen hat, das über *Sal*I- oder *Pst*I-Restriktionsverdau gegen ein Gen von Interesse getauscht werden kann, (d) Aufbau der T-DNA in dem Plasmid pBINSRNACatN, die Ethanol-induzierbare Expressionskassette bestehend aus alcA-Promotor, *CAT*-Gen und Terminator kann über einen *Hind*III-Restriktionsverdau ausgetauscht werden, zwischen Kanamycinresistenz und Transkriptionsfaktor *AlcR* befindet sich eine *Stu*I-Schnittstelle über die das DR5-*gfp* eingefügt werden konnte

Durch eine *Sal*I (*iaaL, iaaH, ipt, rolA*) bzw. *Pst*I-Klonierung (*rolC*) der Phytohormongene in den Vektor pACN (Tab. 2.2-3; Abb. 4.2-2c) wurden die entsprechenden Gene unter Kontrolle der Regulationselemente Ethanol-induzierbarer Promotor (palcA) und Nopalinsynthaseterminatorsignal (tNOS) gebracht, resultierend in dem Plasmid pACN-*Phytohormongen*. Aus diesem Vektor konnte über eine *Hind*III-Subklonierung der Transfer des Ethanol-induzierbaren Habitusgenkonstruktes in den binären Pflanzentransformationsvektor pBINSRNA-CatN (Tab. 2-3) im Austausch gegen das *CAT*-Gen erfolgen. In diesem Plasmid liegt das Gen *alcR* unter CaMV 35S-Kontrolle, kodierend für das Regulatorprotein des palcA vor (Abb. 4.2-2d).

Neben den bakteriellen Phytohormongenen unter Kontrolle des Ethanol-induzierbaren Promotors wurde ein Kontrollkonstrukt erstellt. Dieses besitzt das Reportergen *mgfp4* anstelle eines bakteriellen Phytohormongens und sollte über induzierbare Reportergenaktivität die Kontrolle der Ethanolinduktion ermöglichen. In dieses im folgenden mit alcA-gfp bezeichneten Konstrukt wurde die, im nachfolgenden Absatz beschriebene, Auxin-induzierbare Reportergenkassette nicht eingefügt, da dies eine Überschneidung der Reportergene bedeutet hätte.

Die Klonierung der Ethanol-induzierbaren Reportergenkassette alcA-*mgfp4* erfolgte über verschiedene Subklonierungsschritte in dem Pflanzenexpressionsvektor pJIT61 (Abb. 4.2-1). Zunächst wurde in dieses Plasmid das Reportergen *mgfp4* über die Restriktionsenzyme *BamH*I und *Sac*I eingefügt. Nach Verifizierung des erzeugten Plasmides pJIT61-*mgfp4* wurde zwischen CaMV 35S-Promotor und *mgfp4*-Gensequenz der alcA-Promotor über die Restriktionsenzyme *Hind*III und *BamH*I eingefügt. Die Ethanol-induzierbare Reportergenkassette konnte dann über eine *Hind*III und *EcoR*V Klonierung in den binären Vektor überführt werden.

In die Konstrukte, die ein Ethanol-induzierbares bakterielles Phytohormongen tragen, wurde in die *Stu*I-Restriktionsschnittstelle noch die Auxin-induzierbare Reportergenkassette DR5-*mgfp4* (Abb. 4.2-2b) über *SnaB*I und *EcoR*V eingefügt. Einen Überblick über die erstellten Transformationskonstrukte und ihre T-DNA-Größe ist in Tabelle 4.2-1 aufgeführt. Diese erstellten binären Plasmide wurden in den Agrobakterienstamm LBA4404 transformiert. Rekombinante Agrobakterien Klone wurden selektiert und über eine unter 3.6.2.3. beschriebene

Plasmidminipräparation und anschließenden analytischen Restriktionsverdau überprüft. Von den charakterisierten Klonen wurden Bakteriendauerkulturen erstellt und für die Pflanzentransformationen eingesetzt.

Tab. 4.2-1: Übersicht der erstellten Transformationskonstrukte, ihrer im folgenden verwendeten Bezeichnung, ihrer Größe und erwarteten Funktion; Fett-gedruckt sind die namengebenden Elemente der Transformationskassette

Bezeichnung	Plasmid	T-DNA-Aufbau (von LB nach RB)	T-DNA-Größe (bp)	Funktion
DR5-gfp	pBIN-DR5-*mgfp4*	**DR5-*mgfp4***-NOS-*nptII*	5081	Basiswert der auxininduzierbaren Reportergen-expression
alcA-gfp	pBIN-alcA-*mgfp4*	**alcA-*mgfp4***-35S-*alcR*-NOS-*nptII*	8368	Visuelle Kontrolle der Ethanolinduktion
alcA-rolA	pBIN-alcA-*rolA*	**alcA-*rolA***-35S-*alcR*-DR5-*mgfp4*-NOS-*nptII*	9168	Erhöhung der Auxingehalte
alcA-rolC	pBIN-alcA-*rolC*	**alcA-*rolC***-35S-*alcR*-DR5-*mgfp4*-NOS-*nptII*	9409	Erhöhung der Cytokiningehalte
alcA-ipt	pBIN-alcA-*ipt*	**alcA-*ipt***-35S-*alcR*-DR5-*mgfp4*-NOS-*nptII*	9588	Erhöhung der Cytokiningehalte
alcA-iaaL	pBIN-alcA-*iaaL*	**alcA-*iaaL***-35S-*alcR*-DR5-*mgfp4*-NOS-*nptII*	10053	Reduktion der Auxingehalte
alcA-iaaH	pBIN-alcA-*iaaH*	**alcA-*iaaH***-35S-*alcR*-DR5-*mgfp4*-NOS-*nptII*	10269	Erhöhung der Auxingehalte

4.2.2. Erzeugung transgener *N. tabacum*-Pflanzenlinien

4.2.2.1. *Agrobakterium*-vermittelte Transformation von *N. tabacum*

Mit den in Tabelle 4.2-1 aufgeführten Konstrukten erfolgte die *Agrobakterium*-vermittelte Transformation von *N. tabacum* „Samsun-nn“. Je Konstrukt wurden in drei voneinander unabhängigen Transformationen jeweils 25 Blattscheiben nach der unter 3.7. beschriebenen Methode transformiert.
Es konnten die in Tabelle 4.2-2 aufgeführten Kanamycin-resistenten Sprosse regeneriert werden. Es wurden von jedem Konstrukt mindestens fünf Transformanden erstellt. Diese wurden zunächst als sterile Sprosskulturen auf selektivem Nullmedium (2.7.3.) erhalten. Ausgehend von diesem T_0-Material wurden neben der *in vitro*-Erhaltung dieser Sprosskulturen apikale Sprosssegmente *in vitro* bewurzelt und anschließend ins Gewächshaus zur Produktion der T_1-Nachkommenschaft überführt. Alle erzeugten transgenen Linien ließen sich *in vitro* bewurzeln und ins Gewächshaus überführen.

Tab. 4.2-2: Überblick der transformierten Konstrukte und der aus der *Agrobakterium*-vermittelten Transformation hervorgegangenen transgenen Tabaklinien

Name	Gesamtanzahl transformierter Blattscheiben	Gesamtanzahl regenerierter Sprosse	Anzahl samentragender T_0-Pflanzen
DR5-gfp	75	10	8
alcA-gfp	75	10	10
alcA-rolA	75	5	4
alcA-rolC	75	7	7
alcA-ipt	75	17	15
alcA-iaaL	75	19	18
alcA-iaaH	75	10	8

Wie aus Tabelle 4.2-2 ersichtlich ist, konnte nicht von allen erzeugten T_0-Pflanzen Samenträger geerntet werden. Es standen jedoch für die weiteren charakterisierenden Arbeiten eine ausreichende Zahl transgener fertiler Linien je Konstrukt zur Verfügung.

4.2.2.2. Erstellung der Nachkommenschaft

Durch sterile Aussaat der T_0-Nachkommenschaft auf selektivem Aussaatmedium (2.7.3.) mit 400 mg Kanamycin/l Medium konnte die Zahl der Insertionen des T-DNA-Konstruktes in den einzelnen Transformanden bestimmt werden (3.6.9.1.). Transgene Sämlinge konnten durch das, auf der T-DNA enthaltene *nptII*-Gen auf dem Kanamycin-haltigen Medium zu vitalen grünen Sprossen heranwachsen, wohingegen nicht-transgene Sämlinge durch die Antibiotika-Selektion abstarben.
Über das Verhältnis vitaler Sämlinge zu seneszenten Sämlingen konnte nach den Mendelschen Regeln die Insertionsbestimmung erfolgen. Die Überprüfung auf Vollständigkeit der inserierten T-DNA erfolgte in nachfolgend dargestellten PCR-Untersuchungen.

Tab. 4.2-3: Ergebnis der Segregationsanalyse, eine Tabelle der erzeugten transgenen Linien und der Aufspaltungsverhältnisse befindet sich im Anhang unter 8.3.

	Anzahl erzeugter transgener Linien	Linien mit einer transgenen Insertion	Linien mit mehr als einer Insertion
DR5-gfp	8	5	3
alcA-gfp	10	4	6
alcA-rolA	5	4	1
alcA-rolC	7	5	2
alcA-ipt	15	7	8
alcA-iaaL	18	9	9
alcA-iaaH	8	6	2

4.2.3. Charakterisierung der transgenen Linien auf Nukleinsäure-Ebene

4.2.3.1. DNA-Nachweis der T-DNA-Insertion in transgenen Pflanzenlinien

Der Nachweis der Transgenität der selektierten Transformanden erfolgte mit Hilfe der PCR. Dazu wurde ein Testsystem (Abb. 4.2-4) aus mehreren unabhängigen Reaktionen gewählt, um auf das Vorhandensein der verschiedenen Elemente der T-DNA-Expressionskassette zu prüfen.

Für den PCR-Nachweis der transgenen Linien wurde zunächst aus *in vitro* Material von T_0-Sprosskulturen genomische DNA extrahiert. Diese wurde in einer Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Um neben dieser visuellen Überprüfung der DNA-Präparationen auch eine qualitative Kontrolle des Extraktes durchzuführen, wurde in einem, der transgenen Charakterisierung vorausgehendem Schritt eine tabakeigene Sequenz des *tob71*- Gens (Moniz de Sa & Drouin, 1996; Prior, 2000) amplifiziert. Auf diese Weise überprüfte DNA-Extraktionen konnten für die Bestimmung der Insertionen in den transgenen Linien eingesetzt werden

Für die über PCR erfolgende Charakterisierung der unterschiedlichen Linien wurde ein universelles Primerpaar TDNA-up/TDNA-low, bindend in den das Phytohormongen flankierenden palcA und tNOS, entwickelt. Damit sollte in Abhängigkeit von dem untersuchten Transformationskonstrukt ein Fragment charakteristisch für das inserierte bakterielle Phytohormongen amplifiziert werden. Zusätzlich wurden Primerpaare für den individuellen Nachweis des Transkriptionsfaktor *alcR*, des Reportergens *mgfp4* sowie der verschiedenen Phytohormongene erstellt.

Für jede transgene Linie sollten so vier unabhängige Nachweise der Elemente der T-DNA, wie in Abbildung 4.2-4 dargestellt, erfolgen.

Neben eines Nachweises der Insertion in T_0-Material wurden ebenfalls DNA-Extrakte aus T_1-Blattmaterial präpariert und für PCR-Nachweise eingesetzt. Damit wurde auch die stabile Vererbung des vollständigen T-DNA-Konstruktes überprüft.

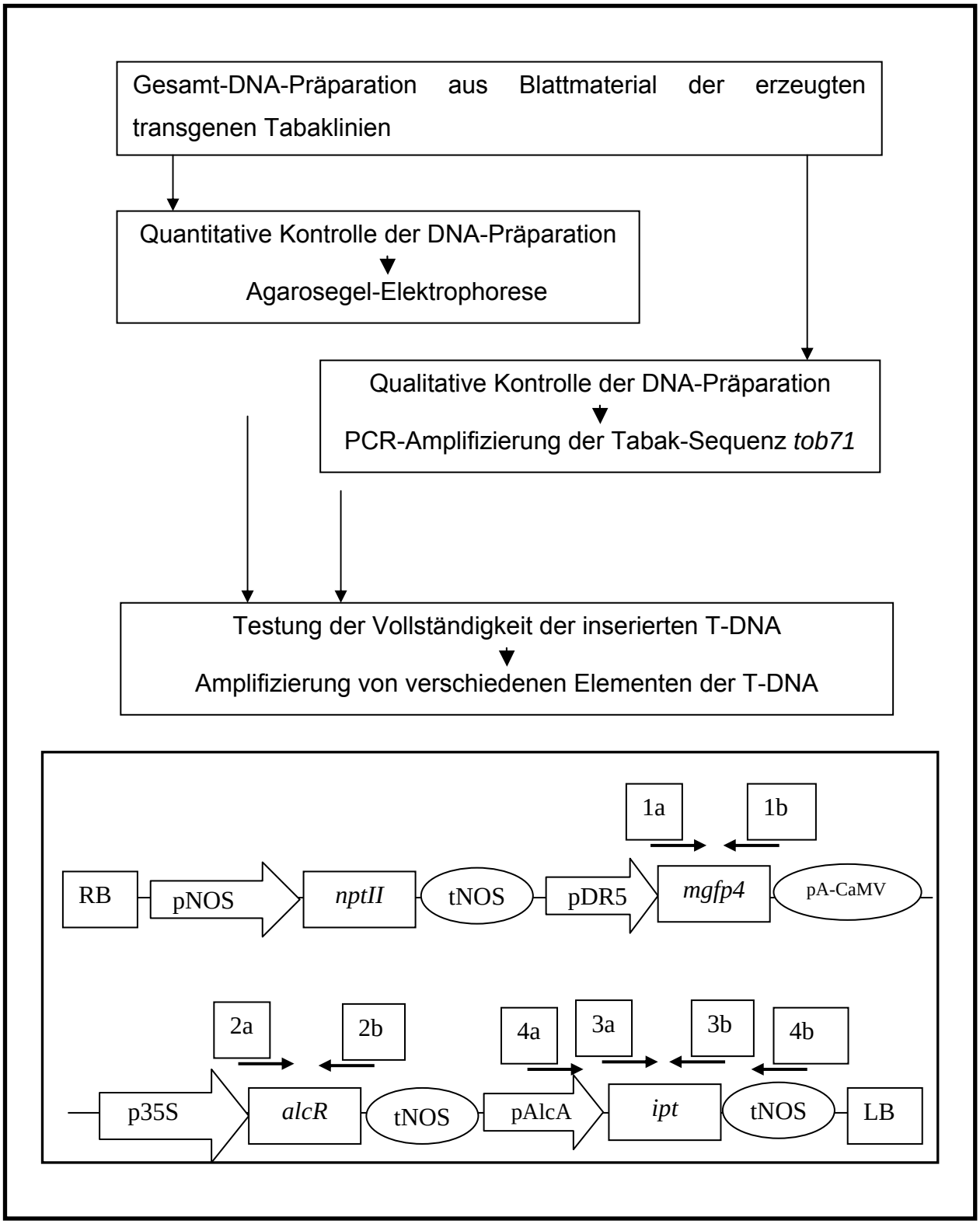


Abb. 4.2-4: Schema des Ablaufs der genetischen Charakterisierung auf DNA-Ebene. Die Pfeile geben die Primer in 5`-3`Richtung an, Primerpaar 1a/1b=gfp-up/gfp-low; 2a/2b=alcR-up/alcR-low; 3a/3b=ipt-up/ipt-low; 4a/4b=TDNA-up/TDNA-low (Primer siehe Tab. 2.4)

Als Positivkontrolle in den PCR-Ansätzen dienten jeweils die binären Plasmide, die für die Pflanzentransformation eingesetzt worden waren, als Negativkontrolle wurde eine DNA-Extraktion aus einer nicht-transformierten Tabakpflanze “Samsum-nn” eingesetzt.

In der Abbildung 4.2-5 ist das Ergebnis der PCR-Analyse der transgenen Linie alcA-ipt1 dargestellt. Mit allen vier für die genetische Charakterisierung zur Verfügung stehenden Primerpaaren wurden Amplifikate der erwarteten Größe produziert. Dazu gehören das TDNA-Primerpaar in (1), in den, das bakterielle Phytohormongen flankierende Sequenzen bindet, sowie das direkte Amplifikat des Phytohormongens *ipt* in (4). In (2) und (3) sind die Amplifikate des Reportergens *mgfp4* sowie des Transkriptionsfaktor *alcR* aufgetragen.

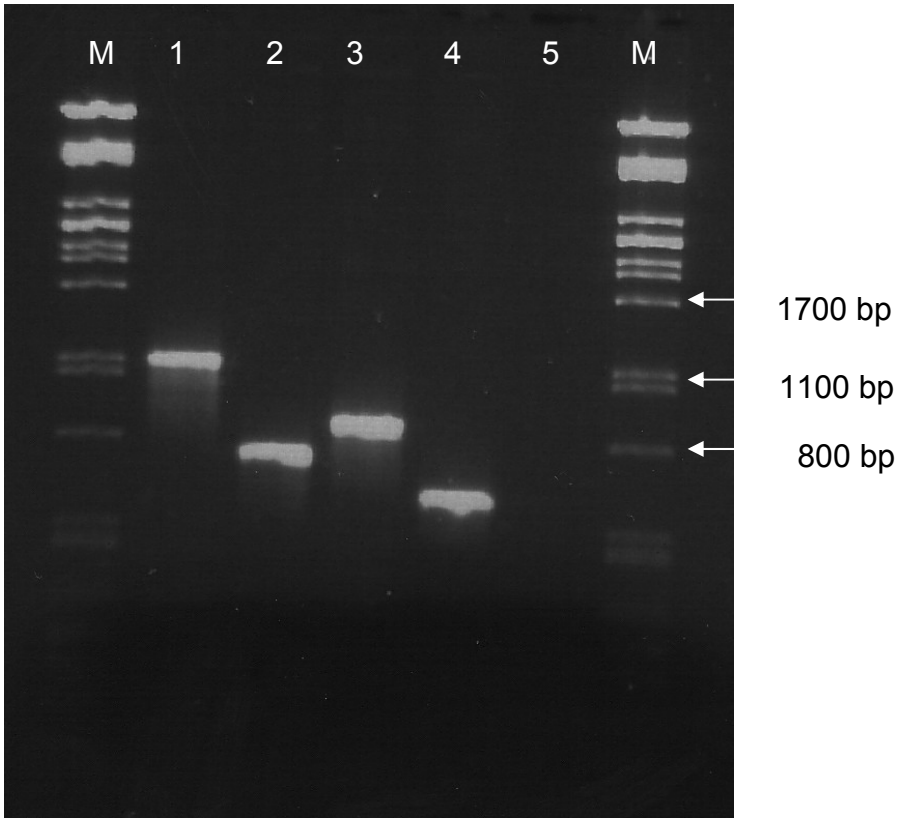


Abb. 4.2-5: PCR-Analyse der transgenen Tabaklinie alcA-ipt-1. M-Größenstandard *Pst*I-verdaute λ-DNA (2.10), 1-TDNA-Primerpaar amplifiziert ein 1113 bp Fragment, 2-gfp-Primerpaar amplifiziert ein 658 bp, 3-alcR-Primerpaar amplifiziert ein 872 bp Fragment, 4-ipt-Primerpaar amplifiziert ein 714 bp Fragment, 5-kein PCR-Produkt bei T-DNA-Amplifizierung im WT

Ein erfolgreicher PCR-Nachweis, wie in Abbildung 4.2-5 dargestellt, konnte nur für einen Teil der erzeugten transgenen Linien durchgeführt werden. In den Kontrolllinien DR5-gfp und alcA-gfp konnte mit den GFP-Primern ein PCR-Produkt

der erwarteten Größe amplifiziert werden, zusätzlich konnte in den alcA-gfp-Linien der Nachweis des Transkriptionsfaktor *alcR* erbracht werden.
In den transgenen, ein Phytohormongen tragenden Linien konnte der PCR-Nachweis nur zum Teil positiv geführt werden. In den untersuchten Linien von alcA-rolA, alcA-rolC und alcA-iaaH wurden nur PCR-Produkte mit dem GFP-Primerpaar amplifiziert, im Fall der alcA-iaaH-Linien ebenfalls für das alcR-Primerpaar.
Doch trotz verschiedener Versuche der Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte weder das inserierte Habitusgen über die spezifischen Primer nachgewiesen werden, noch ergaben sich Amplifikate bei der Verwendung des Primerpaars TDNA-up/ TDNA-low.

Die genetische Charakterisierung der erzeugten transgenen Tabaklinien war nur für die Kontrolllinien DR5-gfp und alcA-gfp, sowie die alcA-ipt- und alcA-iaaL-Linien möglich gewesen. Für die Linien alcA-rolA, alcA-rolC und alcA-iaaH konnte keine deutliche Charakterisierung über den angewendeten PCR-Nachweis erfolgen.

4.2.3.2. Überprüfung der induzierbaren Expression nach Ethanolapplikation auf Transkript- und Proteinebene

Die Transkriptinduktion nach Ethanolinduktion wurde an transgenen *in vitro*-Pflanzenmaterial der alcA-gfp-Linien überprüft. Es erfolgte eine Induktion mit 500 µl 10 %iger Ethanollösung in die Petrischale. Das Pflanzenmaterial wurde an den darauffolgenden Tagen auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Es konnte nur in induzierten Varianten fluoreszierende Zellen beobachtet werden.
In Abhängigkeit von der Induktionsstärke konnte über einen längeren Zeitraum (> 4 Tage) Fluoreszenz beobachtet werden. Niedrige Induktionskonzentrationen (< 10 %) führten nicht zu detektierbarer GFP-Fluoreszenz. Parallel durchgeführte Transkript-Analysen wiesen jedoch eine Expression ab Konzentrationen von 1 % Ethanol nach. In diesen Untersuchungen wurde weiterhin eine Expression von 6 Tagen nachgewiesen.

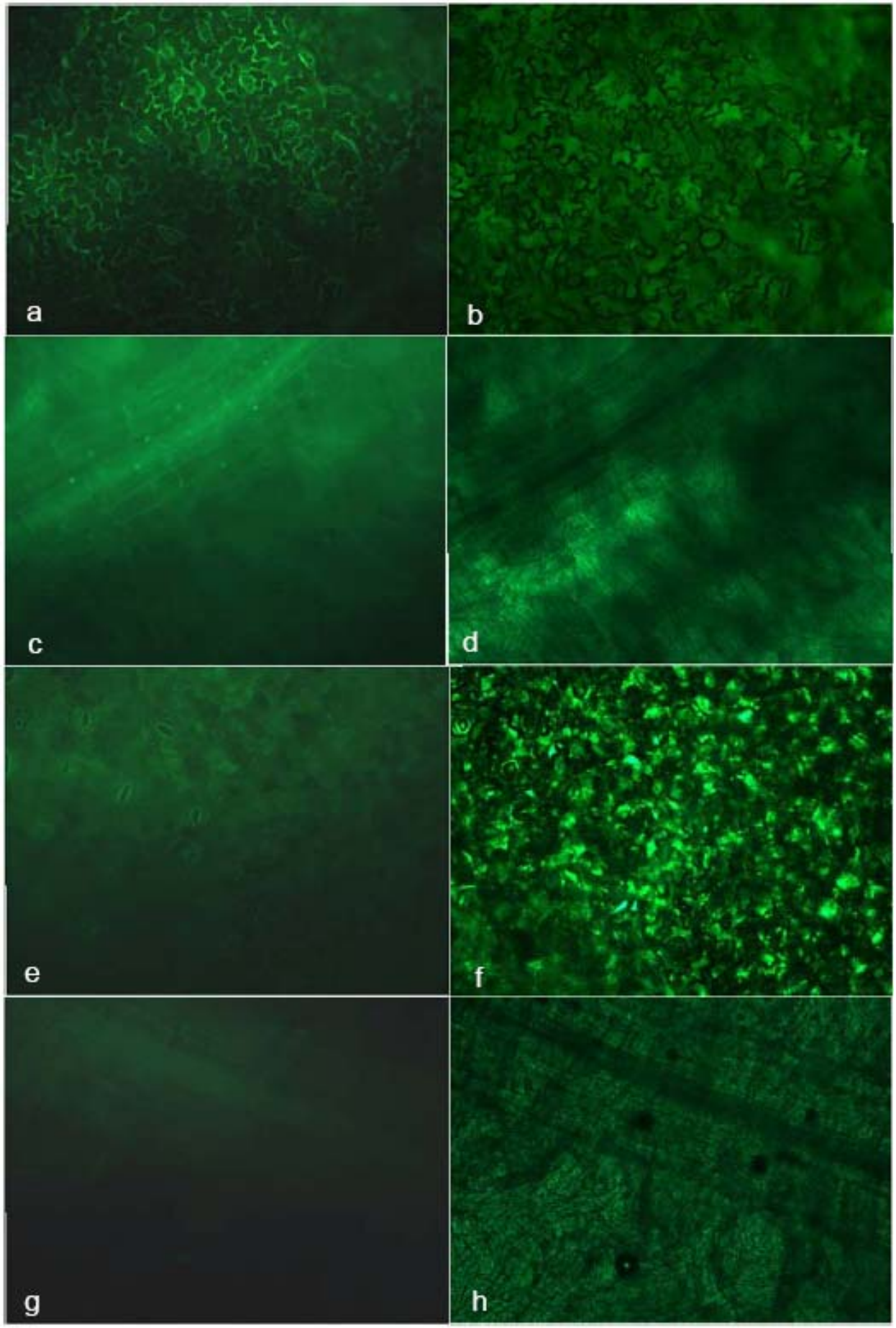

a
b
c
d
e
f
g
h

Abb. 4.2-6: alcA-gfp7 –Sämling nach Ethanolinduktion (15 %), a-d mit Ethanolapplikation; e-h ohne Ethanolapplikation
(a) Blattgewebe 1,5 sec Belichtung, 200x Vergrößerung; (b) Explantat im Durchlicht; (c) Wurzelgewebe 0,5 sec Belichtung, 200x Vergrößerung; (d) Explantat im Durchlicht; (e) Blattgewebe 1,5 sec Belichtung, 200x Vergrößerung; (f) Explantat im Durchlicht; (g) Wurzelgewebe 0,5 sec Belichtung, 200x Vergrößerung; (h) Explantat im Durchlicht

4.2.3.3. Erzeugung physiologischer Effekte nach Ethanolinduktion der bakteriellen Phytohormongene

Für erste Charakterisierungen des erzeugten transgenen Pflanzenmaterials wurde ein *in vitro*-Assay gewählt, in dem mit zwei unabhängigen selektierten Linien je Transformationskonstrukt gearbeitet wurde. Eine Induktion der Regeneration von Adventivorganen wird in der *in vitro*-Kultur über das Zusammenwirken verschiedener Faktoren wie Explantat, Kulturmedium und Konzentration der Pflanzenwachstumsregulatoren erzeugt. Den höchsten Stellenwert nimmt dabei der Einsatz von Pflanzenwachstumsregulatoren ein.

In Abhängigkeit von dem Verhältnis Cytokinin zu Auxin können Pflanzenexplantate Kallus, Wurzeln oder Sprosse bilden.

Diese Fähigkeit zur Regeneration sollte in einem ersten Test der erzeugten transgenen Tabaklinien genutzt werden. Dabei wurde ein System entwickelt, in dem durch Applikation von Ethanol die bakteriellen Phytohormongene zur Expression gebracht werden. Diese induzierte endogene Phytohormongenexpression sollte einen Zusatz von Pflanzenwachstumsregulatoren im Kulturmedium substituieren und zur Regeneration an dem Blattmaterial führen.

Entsprechend der, für die verwendeten Gene beschriebenen Wirkung wurden die in Tabelle 4.2-5 aufgeführten Adventivregenerationen in den jeweiligen Linien erwartet.

Für diese Untersuchungen wurden Blattscheiben aus *in vitro*-Material der T_0-Generation präpariert. Jeweils fünf Blattscheiben wurden je Petrischale auf hormonfreien kanamycinhaltigen Nullmedium (2.7.3.) aufgelegt. Ein Teil der Petrischalen wurde nicht mit Ethanol induziert und als Kontrolle des Regenerationsverhaltens mitgeführt. Diese Explantate sollten im Versuchsverlauf vital, ohne Seneszenzerscheinungen oder Kanamycinschäden bleiben, aber keine

Adventivregenerationen bilden. Der zweite Teil der Petrischalen wurde mit einmalig 300 µl einer 5 %igen EtOH-Lösung induziert.
Die Kulturdauer betrug vier Wochen. In regelmäßigen Abständen fand eine Sichtbonitur der Explantate statt.

Tab. 4.2-5: Hypothese der Adventivregeneratbildung in Abhängigkeit vom bakteriellen Phytohormongen

Bakterielles Phytohormongen	Funktion	Erwartetes Regenerationsereignis nach EtOH-Applikation
rolA	nicht bekannt	Kallusbildung/ Adventivwurzel
rolC	Cytokinin-Metabolismus	Adventivspross
ipt	Cytokinin-Biosynthese	Adventivspross
iaaL	Auxin-Metabolismus	Kallusbildung/ Adventivspross
iaaH	Auxin-Biosynthese	Adventivwurzel

Lediglich die alcA-ipt–Linien *ipt-1* und *ipt-3* bildeten multiple Adventivsprosse mit drei bis fünf Sprossen je induziertem Explantat. Die Blattscheiben der anderen Phytohormongen tragenden Linien zeigten keine Regeneration, sie bildeten keine Ansätze von Adventivorganen oder Kallus aus.

Um die Möglichkeit zu untersuchen, ob die induzierten Geneffekte in ihrer Intensität zu gering sind, um Adventivorganregeneration an Blattscheiben auf hormonfreien Medium zu induzieren, wurde eine Hormonmatrix (Tab. 4.2-6) erstellt. Diese sollte es ermöglichen geringe Einflüsse auf den Phytohormonhaushalt sichtbar zu machen.
Damit wurde die Hypothese untersucht, dass die aus Ethanolapplikation resultierende Beeinflussung der Phytohormonhomöostase in den kultivierten Blattscheiben zu gering ist, um die Regenerationsfähigkeit der Pflanzenzellen auszulösen. Aus dem Zusammenwirken von Pflanzenwachstumsregulatoren im Kulturmedium und Ethanol-induzierter Phytohormongenexpression sollte in Abhängigkeit der unterschiedlich zusammengesetzten Kulturmedien und den

unterschiedlich wirkenden Phytohormongenen ein differenzielles Bild der Adventivregenerationen resultieren.

Tab. 4.2-6: Übersicht der Kulturmedien mit dem Ziel durch induzierte Expression bakterieller Phytohormongene physiologische Effekte an transgenen Blattscheiben zu bewirken

	Versuchs-umfang[1]	Cytokinin (BAP)	Auxin (NAA)
Nullmedium	10	0	0
Cytokininmedium	10	1 mg	0
Cytokininbetontes Regenerationsmedium	10	1 mg	0,5 mg
Auxinmedium	10	0	1 mg
Auxinbetontes Regenerationsmedium	10	0,5 mg	1 mg
Regenerationsmedium	10	1 mg	1 mg

[1]: Angegeben ist die Zahl der verwendeten Petrischalen je Medienvariante, je Petrischale wurden 5 Explantate kultiviert

Die Blattexplantate wurden sechs Wochen auf den unterschiedlichen, in Tab. 4.2-6 aufgeführten Medien inkubiert. Die Ethanolapplikation erfolgte zu Versuchsbeginn und nach dreiwöchiger Kultur mit 300 µl einer 5 %igen EtOH-Lösung.

Die untersuchten Blattscheiben zeigten in diesem erweiterten Regenerationsversuch in Abhängigkeit vom Kulturmedium zum Teil deutliche Unterschiede im Vergleich zu den nicht-induzierten Explantaten.

Tab. 4.2-7: Blattscheibenregenerationsergebnisse nach Ethanolapplikation auf unterschiedlichen Medien in Abhängigkeit des Kulturmediums, spezifisch reagierende Versuchsglieder sind hervorgehoben; die Erhebung der Daten erfolgte nach Boniturklassen: + Regenerationsereignis ist aufgetreten; ++ Regenerationsereignis ist stark aufgetreten (> 3 Adventivereignisse/ Explantat); - Regenerationsereignis verringert aufgetreten; Datenerhebung und Zuordnung zu Boniturklassen erfolgte im Vergleich zu nicht-induzierten Kontrollen; fett gedruckte Linien sind Ethanol-induziert

Linie	Null-medium	Cytokinin-medium	Cytokinin-betontes Regenera-tions-medium	Auxin-medium	Auxin-betontes Regenera-tions-medium	Regenera-tions-medium
alcA-gfp7	Wurzel	Spross	Spross Wurzel	Wurzel	Kallus Wurzel	Spross
alcA-gfp7	Wurzel	Spross	Spross Wurzel	Wurzel	Kallus Wurzel	Spross
alcA-ipt3	Wurzel	Spross +	Spross	Kallus Wurzel	Kallus Spross Wurzel +	Spross
alcA-ipt3	Spross	Spross ++	Spross	Kallus Spross	Kallus Spross Wurzel -	Spross ++
alcA-iaaL17	Wurzel	Spross	Kallus Spross Wurzel ++	Kallus Wurzel ++	Kallus Spross Wurzel	Spross
alcA-iaaL17	Wurzel -	Spross	Kallus Spross Wurzel +	Kallus Wurzel +	Kallus Spross Wurzel	Spross
alcA-iaaH3	Wurzel	Spross	Kallus Spross	Kallus Wurzel	Kallus Spross Wurzel +	Spross Wurzel
alcA-iaaH3	/	Spross	Kallus Spross Wurzel	Kallus Wurzel	Kallus Wurzel	Spross - Wurzel
alcA-rolA3	Wurzel	Spross	Kallus Spross Wurzel +	Kallus Wurzel	Spross Kallus Wurzel	Spross Wurzel
alcA-rolA3	/	Spross	Kallus Spross Wurzel +	Kallus Wurzel	Kallus Wurzel	Kallus Spross Wurzel
alcA-rolC5	Wurzel	Spross	Kallus Spross	Kallus Wurzel	Kallus Spross Wurzel	Spross
alcA-rolC5	/	Spross	Kallus Spross	Kallus Wurzel -	Kallus Spross Wurzel -	Spross

Mithilfe der verwendeten Medienvarianten konnten für jede Linie Effekte, die dem bakteriellen Phytohormongen zuzuordnen waren, induziert werden. Einen Überblick über die Regenerationsergebnisse gibt die Tabelle 4.2-7.

Darin sind die Boniturdaten der induzierten und nicht-induzierten Explantate gegenübergestellt. Die Medienvarianten, die in einer transgenen Linie eine Differenzierung ermöglichten, sind hervorgehoben.

Die Explantate der mitgeführten Kontrolle alcA-gfp zeigten ein differenzielles Regenerationsverhalten in Abhängigkeit vom Kulturmedium. Es gab jedoch keine Variation zwischen Ethanol-induziert und Nicht-induziert, sodass diese Explantate, sowie Explantate des Tabak-WT als Referenz für den regenerativen Einfluss des Kulturmediums herangezogen werden konnten.

Die stärkste Adventivregeneratbildung trat in induzierten alcA-ipt Pflanzenmaterial auf. Die induzierte *ipt*-Expression resultierte in einer Erhöhung der endogenen Cytokiningehalte und äußerte sich in starker Adventivsprossregeneration sowohl auf den Cytokinin-betonten Medien als auch auf den stärker Auxin-haltigen Medien.

Die weiteren untersuchten transgenen Linien zeigten im Vergleich zu der *ipt*-Linie geringer ausgeprägte Differenzierungsmöglichkeiten zwischen induzierten und nicht-induzierten Explantaten. Aber auch hier war es möglich Unterschiede zu bonitieren.

Induzierte alcA-iaaH Explantate wiesen eine Auxinaktivität auf Regenerationsmedium aus.

alcA-iaaL Explantate wissen eine reduzierte Auxinaktivität auf Auxin- und Cytokininbetontes Regenerationsmedium auf.

In den Abbildungen 4.2-9 (a-i) sind beispielhaft Explantate unterschiedlicher Linien den nicht-induzierten Kontrollexplantaten gegenübergestellt.

Dabei ist der deutliche *ipt*-Effekt im Vergleich zwischen Abb. 4.2-9 (c) mit (d) zu sehen. Die *iaaH*-Expression resultierend in einer Erhöhung der Auxinsynthese führte im Gegensatz zur Steigerung der Cytokininsynthese (*ipt*) nicht zu ähnlich deutlichen Effekten. Hier konnte lediglich eine mäßige Steigerung der Wurzelbildung auf dem Cytokininbetonten Regenerationsmedium im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle beobachtet werden (Abb. 4.2-9 g,h). Deutlicher dazu war der *iaaL*-Effekt auf dem Auxinbetontem Regenerationsmedium, wo bei EtOH-

Applikation eine Wurzelbildung verhindert war (Abb. 4.2-9k,l) im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle.

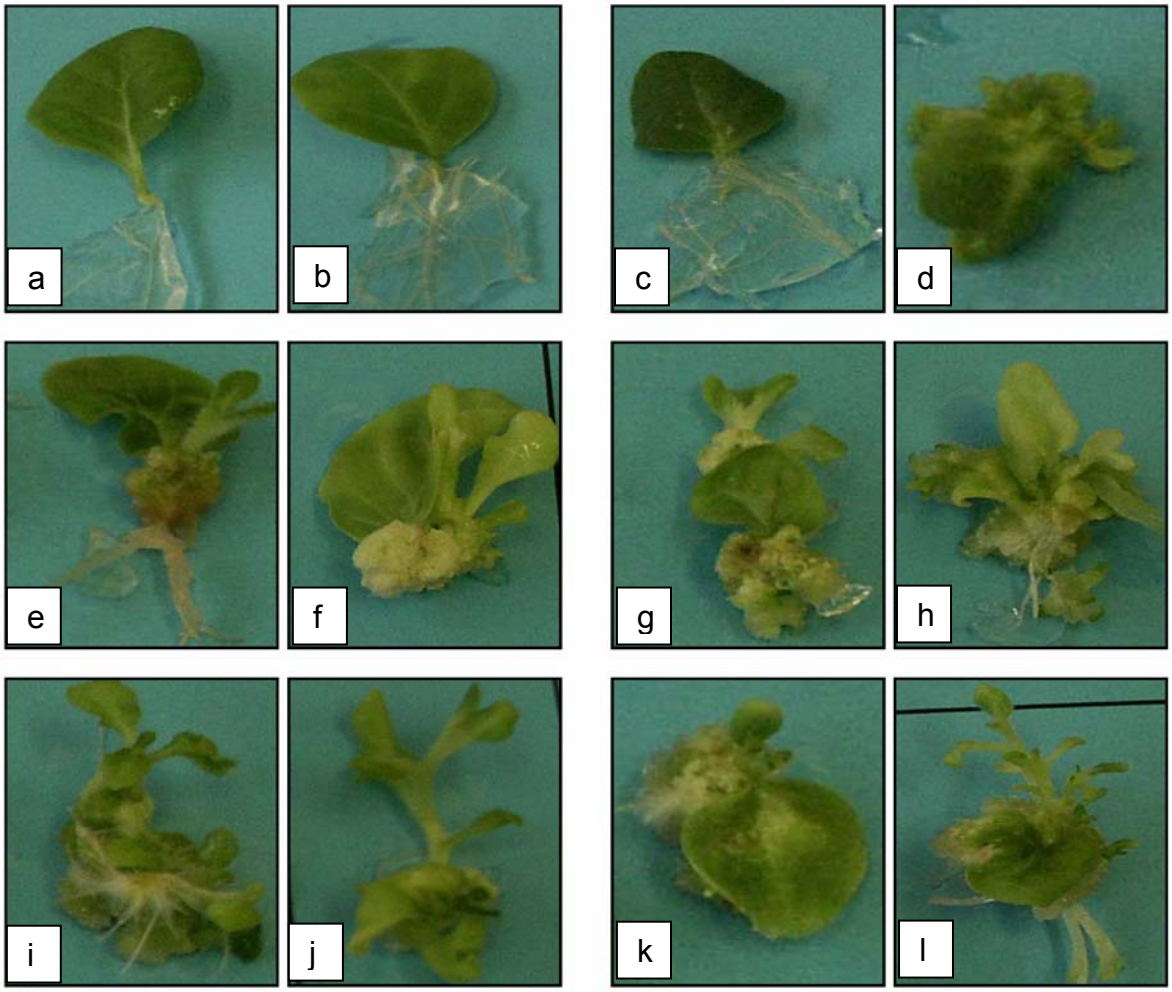


Abb. 4.2-9: (a, b) alcA-gfp7 Nullmedium; (c, d) alcA-ipt3 Nullmedium; (e,f) alcA-rolA3 Cytokininbetontes Regenerationsmedium; (g, h) alcA-iaaH3 Cytokininbetontes Regenerationsmedium; (i;j) alcA-rolC5 Auxinbetontes Regenerationsmedium; (k, l) alcA-iaaL17 Regenerationsmedium; (a,c,e,g,i,k - nicht induziert; b,d,f,h,j,l-Ethanol-induziert)

4.2.4. Ethanolinduzierbare Beeinflussung des pflanzlichen Phänotyps in transgenen Tabaklinien

Die erzeugten transgenen Tabaklinien waren auf genetischer und physiologischer Ebene primär bestimmt. Diese Untersuchungen beinhalteten die Überprüfung auf die Zahl der T-DNA-Insertionen (4.2.2.2.), sowie deren Vollständigkeit (4.2.3.1.) und die Kontrolle der Funktionsfähigkeit der Ethanol-induzierbaren Expressionskassette (4.2.3.2.)

Dabei war jedoch eine eindeutige Identifizierung lediglich in den Kontrolllinien DR5-gfp und alcA-gfp, sowie den Phytohormongen tragenden Linien alcA-ipt und alcA-iaaL möglich gewesen. Zwar konnten typische Phytohormoneffekte in einem erweiterten Blattscheibenregenerationstest (4.2.3.3.) beobachtet werden, doch ein genetischer Zusammenhang zum inserierten bakteriellen Phytohormongen konnte durch fehlende PCR-Nachweise nicht erbracht werden.

Aus diesem Grund wurden die weiteren Arbeiten zur Entwicklung eines optimalen Ethanol-Induktionssystems zur gezielten Habitusbeeinflussung auf die alcA-ipt und alcA-iaaL Linien, sowie die entsprechende Kontrolle alcA-gfp beschränkt. Mit diesen transgenen Linien standen zwei unterschiedliche Strategien der Beeinflussung des pflanzlichen Phytohormonhaushalts für die Untersuchungen zur Verfügung, zum einen Steigerung der Cytokininbiosynthese (*ipt*) und zum anderen Reduktion des freien aktiven Auxins (*iaaL*).

Diese Linien sollten auf ihre Möglichkeiten, den pflanzlichen Habitus in Form einer stärkeren Lateralverzweigung und damit resultierender Brechung der Apikaldominanz zu modulieren, untersucht werden.

Für die im Folgenden vorgestellten Versuche zur induzierbaren Beeinflussung des pflanzlichen Phänotyps wurden jeweils zwei unabhängige Linien je Transformationskonstrukt untersucht. Dabei handelte es sich um die Linien alcA-gfp7, alcA-gfp10, alcA-ipt1, alcA-ipt3, alcA-iaaL2 und alcA-iaaL17.

4.2.4.1. Untersuchungen an *in vitro* Sämlingen - Phänotypeffekte durch einmalige und wiederholte Geninduktion

Für die Untersuchungen wurde zunächst ein *in vitro*-Kultursystem verwendet. Junge etwa zehn Tage alte Sämlinge der T_1-Generation wurden auf Nullmedium (2.7.3.) aufgelegt und zunächst zur Adaption und Förderung der Pflanzenentwicklung zwei Wochen kultiviert. Für diese Analysen erfolgte die Pflanzenkultur in vertikal aufgestellten Petrischalen. Dies ermöglichte eine optimale räumliche Pflanzenentwicklung in der Petrischale. Auch die Sichtbonitur der Pflanzen konnte so vereinfacht durchgeführt werden.

Einmalige Induktion der bakteriellen Phytohormongene in transgenen *N. tabacum*-Sämlingen

In einem ersten Versuch erfolgte die Ethanolinduktion durch eine einmalige Applikation von 300 µl 5 %iger Ethanollösung in die Petrischale mit jeweils vier Sämlingen, insgesamt wurden jeweils 40 Sämlinge untersucht.

Bereits eine einmalige EtOH-Applikation führte zu einer dramatischen Beeinflussung der gesamten Sämlingsentwicklung in den *ipt*-Linien, wohingegen die parallel induzierten *iaaL*-Linien alcA-iaaL2 und alcA-iaaL7 keine visuell deutlichen Veränderungen entwickelten (Abb. 4.2-10). Die Sämlinge der Ethanol-induzierten Kontrollen von alcA-gfp zeigten keine Beeinträchtigungen in ihrem Wachstum und Entwicklung. Diese Beobachtung wies aus, dass die gewählten Induktionsbedingungen nicht pflanzenschädigend waren und phänotypische Veränderungen in alcA-ipt-Sämlingen durch induzierte Expression der Isopentenyltransferase verursacht wurden.

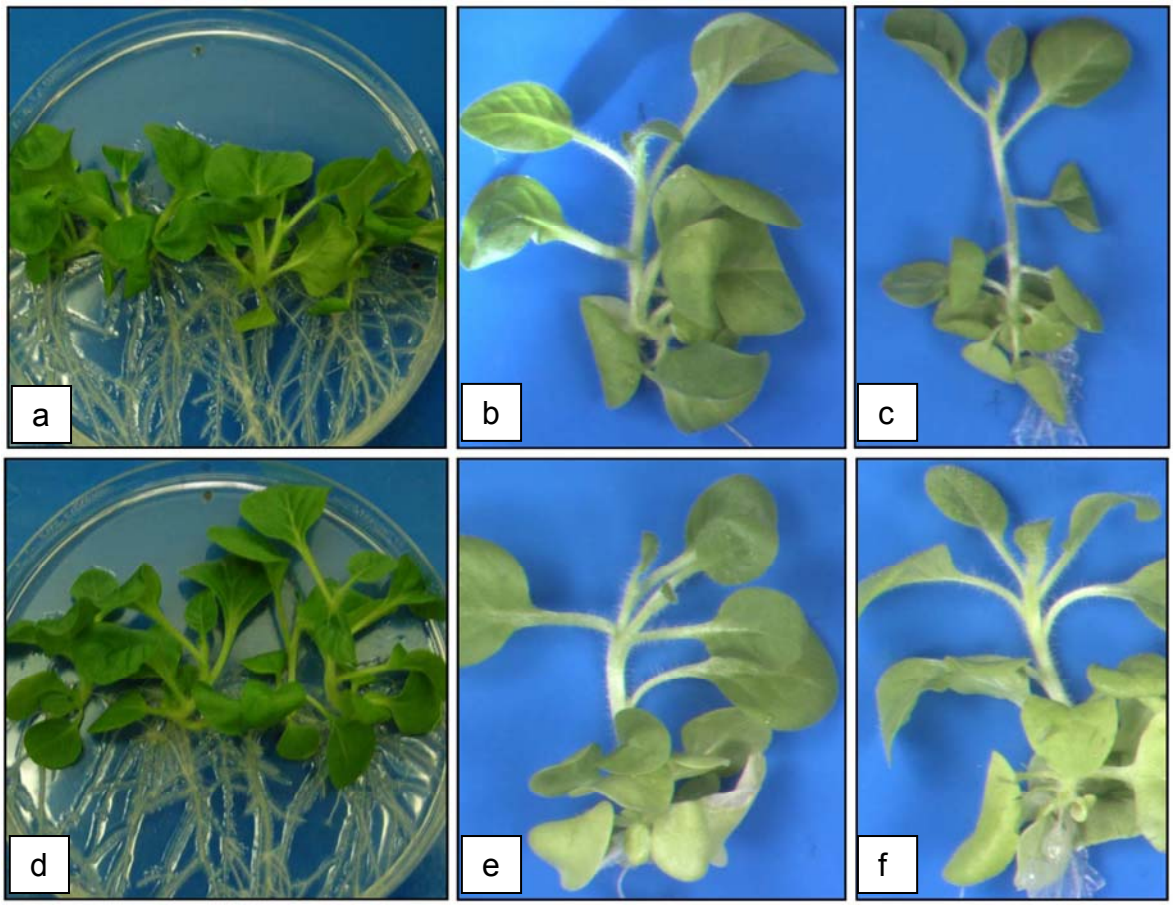


Abb. 4.2-10: Ethanolinduktion von Sämlingen, obere Reihe alcA-gfp10, untere Reihe alcA-iaaL2; (a,d) induzierte Petrischale, (b,e) Vergrößerung eines induzierten Sämlings; (c,f) nicht-induzierter Kontrollsämling

Die *ipt*-Linien alcA-ipt1 und alcA-ipt3 zeigten als Einzige eine phänotypisch veränderte Entwicklung, deren morphologische Merkmale in der induzierten Variante auf erhöhte endogene Cytokininkonzentrationen deuteten. Die einzelnen induzierten Sämlinge unterschieden sich in der Intensität der Ausprägung des beobachteten Phänotyps, aber die Merkmale stark reduzierte apikale Dominanz mit basaler Seitensprossentwicklung, reduzierte Blattflächenbildung, Stauchung und Sprossachsenverdickung sowie stark verringerte Wurzelbildung waren in nahezu allen Versuchsgliedern zu beobachten. In einigen Fällen, wie in Abbildung 4.2-11 dargestellt, konnte außerdem eine aberrante Sprossbildung beobachtet werden.

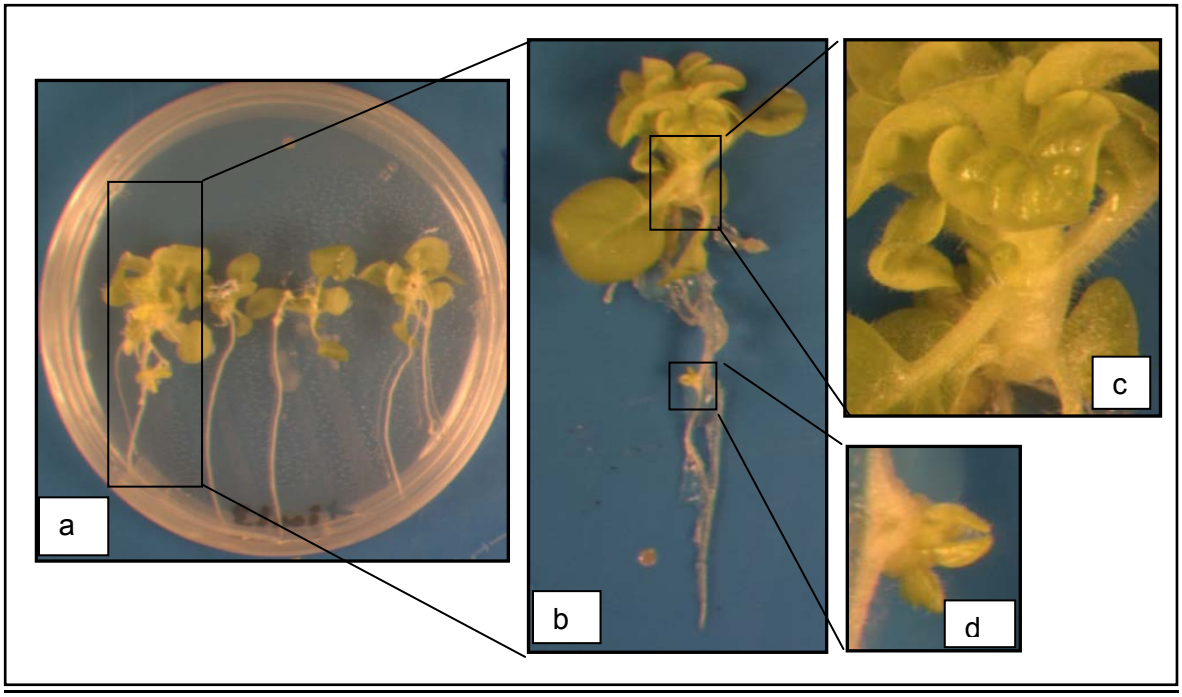


Abb. 4.2-11: Morphologische Veränderungen in alcA-ipt1 induzierten Sämlingen, (a) induzierte Petrischale; (b) Vergrößerung eines induzierten Sämlings, (c) Ausschnittvergrößerung der Sprossverdickung; (d) Ausschnittvergrößerung von aberranter Sprossbildung

Wiederholte Induktion der bakteriellen Phytohormongene in transgenen Tabaksämlingen

Da Phytohormone wichtige regulatorische Funktionen in nahezu allen Bereichen der pflanzlichen Entwicklung haben, unterliegen sie strengen Regulationsmechanismen, die eine homöostatische Balance erhalten sollen. Da die im vorangegangenen Abschnitt untersuchte einmalige Geninduktion nur in der

Variante Cytokininerhöhung (*ipt*), nicht jedoch Auxinreduktion (*iaaL*) morphologische Effekte zeigte, sollte in einem Folgeversuch die phänotypischen Auswirkungen einer, über einen längeren Zeitraum anhaltenden Genexpression durch wiederholte Induktorapplikation untersucht werden.

Dazu wurden drei Wochen alte T_1-Sämlinge über einen Kulturzeitraum von acht Wochen mit wöchentlich 150 µl $EtOH_{2,5\%}$ induziert. Der Kulturverlauf erfolgte im Vertikal-Assay. Als Kontrollen wurden neben der Induktionskontrolllinie alcA-gfp nicht-induzierte Sämlinge der Linien alcA-ipt und alcA-iaaL, sowie alcA-gfp mitgeführt.

Die Induktionsstärke war im Vergleich zur Untersuchung der einmaligen Induktion um 50 % verringert, da die Auswirkungen einer zeitlich verlängerten Expression des bakteriellen Phytohormongens im Vordergrund stehen sollten.

Mit diesem Induktionsplan war es möglich gewesen die morphologische Entwicklung der transgenen Sämlinge gezielt zu beeinflussen. Die Apikaldominanz der Tabaksämlinge wurde sowohl in den alcA-ipt-Linien als auch den alcA-iaaL-Linien gebrochen, wobei dies auf die Expression der bakteriellen Phytohormongene zurückzuführen war. Die Ethanolapplikation blieb ohne phänotypischen Einfluss in den Kontrolllinien alcA-gfp7 und alcA-gfp10.

Die Phänotypen der Sämlinge zu Versuchsende sind in Abbildung 4.2-12 dargestellt. Die Expression von *iaaL* hatte keine negativen Effekte auf die Wurzelentwicklung des Sämlings. Ebenfalls war die Blattmorphologie unbeeinflusst verglichen mit nicht-induzierten Sämlingen. Beides waren Merkmale, die bei *ipt*-Expression charakteristisch beeinflusst waren. In der Linie alcA-iaaL17 war die Lateralverzweigung im Vergleich mit der Linie alcA-iaaL2 stärker ausgeprägt, diese wies eine stärkere Reduktion der Internodien auf. Die Linie zeigte aber auch eine basal einsetzende Lateralverzweigung (Abb. 4.212 (a) - (d)). In den untersuchten *ipt*-Linien alcA-ipt1 und alcA-ipt3 kam es zu einer starken Reduktion der Apikalentwicklung zugunsten der Entwicklung von Seitensprossen. Diese wiesen, wie auch die Hauptsprossachse, eine starke Verdickung auf. In der Linie alcA-ipt3 führte die Expression zur Entwicklung von deutlich chlorotischen Seitensprossen. Die Basalentwicklung war gestört, statt einer Wurzelentwicklung, wurden multiple Sprosse gebildet (Abb. 4.2-12 (h-i)).

Aus den Abbildungen 4.2-12 (j-k) ist die Sämlingsmorphologie ohne Einflussnahme bakterieller Phytohormongene ersichtlich.

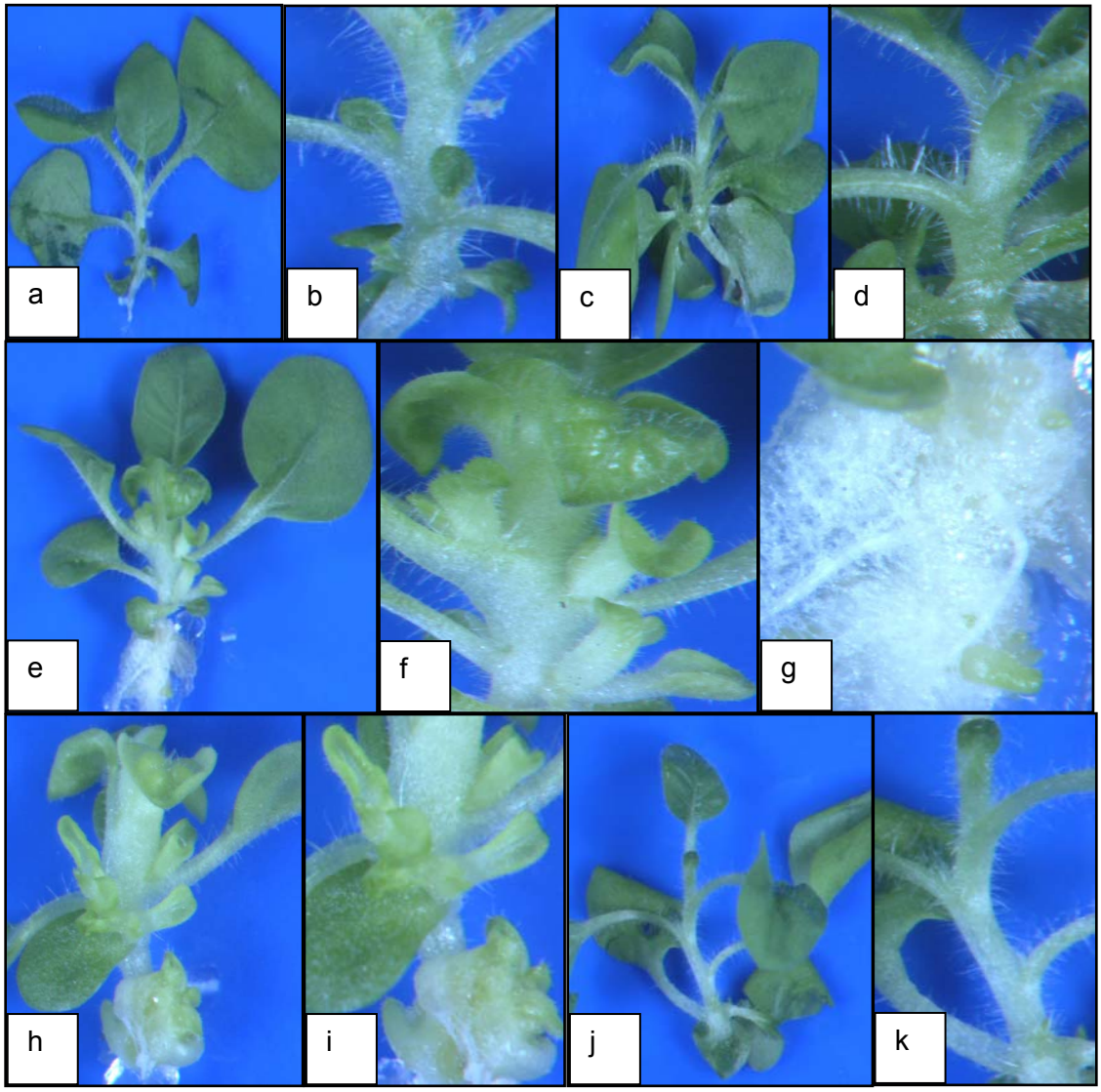


Abb. 4.2-12: Phänotypische Merkmalsausprägung in transgenen Tabaksämlingen nach acht Wochen Kulturdauer mit wöchentlicher EtOH-Applikation von 150µl $EtOH_{2,5\%}$, (a) und (b) alcA-iaaL17; (c) und (d) alcA-iaaL2; (e), (f) und (g) alcA-ipt1; (h) und (i) alcA-ipt3; (j) und (k) alcA-gfp7

4.2.4.2. Untersuchungen zur morphologischen Beeinflussung an alcA-ipt und alcA-iaaL-transgenen Gewächshauspflanzen

In den vorangegangenen Induktionsversuchen des *in vitro*-Vertikalassays konnte eine Habitusbeeinflussung bezüglich der Lateralverzweigung gezeigt werden. Dabei waren in den alcA-ipt-Linien bereits bei geringen Induktionsstärken (einmalige Induktorapplikation) starke morphologische Effekte verursacht worden,

wohingegen in den alcA-iaaL-Linien eine wiederholte Induktion für die Habitusbeeinflussung nötig war.

Dieses Entwicklungsverhalten sollte in Gewächshausversuchen eingehender untersucht werden. Für diese Analysen standen zwei Fragen im Vordergrund. Zum einen sollten Variationen in der Induktorapplikation (temporär, Konzentration) auf ihre Möglichkeiten die Apikaldominanz zu brechen, überprüft werden. Zum anderen sollten neben der Lateralverzweigung weitere pflanzencharakteristische Entwicklungsparameter, wie Wurzel und Blattmorphologie, deren Beeinflussung in den *in vitro*-Untersuchungen deutlich wurde, erfasst werden.

Für diese Versuche wurden Pflanzen der T_1-Generation verwendet. Die Aussaat erfolgte zunächst *in vitro* auf selektivem Aussaatmedium. Vitale, Kanamycin resistente Sämlinge wurden pikiert und an Gewächshausbedingungen adaptiert.

Tab. 4.2-8: Schema des Induktionsplans für die Untersuchungen im Gewächshaus

Variante	Bezeichnung	Anzahl Versuchs-glieder	Applikations-merkmal	Applikations-menge
A	A-0	8	Keine Applikation	0 ml
	A-I	8	wöchentlich	10 ml
	A-II	8	wöchentlich	25 ml
	A-III	8	wöchentlich	50 ml
B	B-0	8	Keine Applikation	0 ml
	B-I	8	wöchentlich	50 ml
	B-II	8	14-tägig	50 ml
	B-III	8	dreiwöchig	50 ml

Es wurden unterschiedliche Induktionsstärken untersucht. Zunächst waren unterschiedliche Applikationsmengen geprüft worden (Tab. 4.2-8). Im zweiten Schritt des Versuchsdesigns stand eine Variation des Zeitintervalls zwischen den Induktorapplikationen im Mittelpunkt der Beobachtung. In Tabelle 4.2-8 ist das Induktionsschema dargestellt. Der Applikationszeitraum betrug sechs Wochen.

Die Induktion erfolgte mit 5 %iger Ethanollösung. Im Anschluss wurden die Pflanzen weitere drei Wochen kultiviert bis die Erhebung der Pflanzenmerkmale erfolgte.

Beobachtungen zum Lateralaustrieb

In Abhängigkeit von der angewendeten Induktionsstärke konnten deutliche Lateralaustriebe induziert werden. Einen Vergleich der beobachteten Phänotypen nach Induktion A zeigen die Abbildungen 4.2-13 bis 4.2-15.

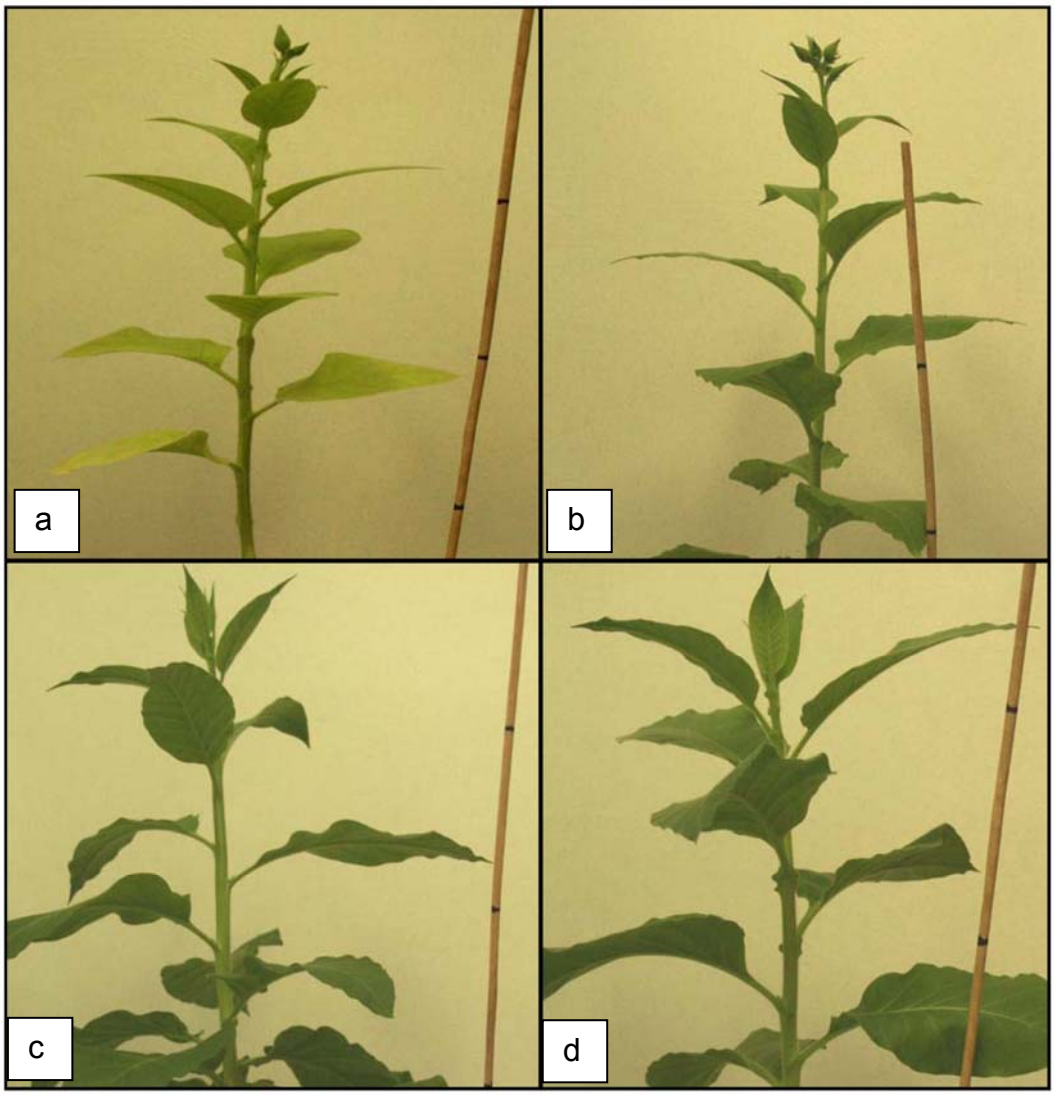


Abb. 4.2.-13: alcA-gfp10 *N. tabacum*-Pflanzen nach variierter Ethanolapplikation.
(a) nicht-induziert, (b) 10 ml, (c) 25 ml, (d) 50 ml

Die Kontrolllinie alcA-gfp zeigte keine entwicklungsphysiologischen Veränderungen durch Ethanolapplikation. Sowohl Pflanzenhöhe,

Lateralverzweigung als auch Blattmorphologie wiesen keine Veränderungen zu nicht-induzierten Pflanzen auf.

In der *ipt*-transgenen Linie alcA-ipt1 führte bereits die geringste Induktionsstärke zu einem Seitenaustrieb (Abb. 4.2-13a,b). Stärkere Induktionen führten zu einer negativen Entwicklung des apikalen Pflanzenbereiches mit stark verkürzten Internodien und verdicktem Hauptspross. Weiterhin zeigten die Blätter neben Schädigungen durch den Induktor Ethanol eine morphologische Veränderung. Es war eine Verstärkung der Vaskulargefäße, insbesondere der Blattmittelrippe zu beobachten. Eine Vergrößerung der Blätter und ein verspäteter Blühbeginn wurden ebenfalls beobachtet. Der Ansatz der generativen Organe war aber in allen Versuchsgliedern zu erkennen.

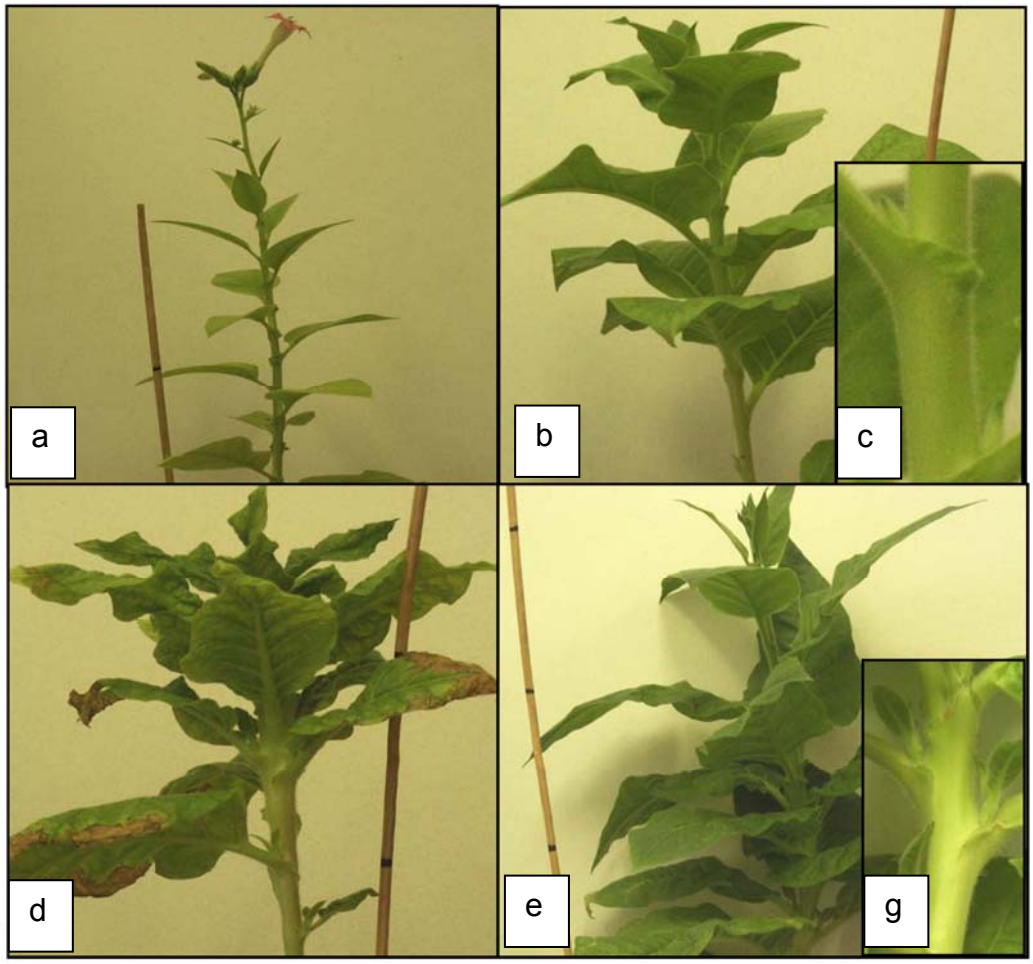


Abb. 4.2-14: Phänotypische Entwicklung von alcA-ipt1 Pflanzen, (a) nicht-induziert, (b) 10 ml, (c) Ausschnittvergrößerung, (d) 25 ml, (e) 50 ml, (f) 50 ml Ausschnittvergrößerung

In der Linie alcA-iaaL17 konnte in der stärksten Induktionsstufe die Apikaldominanz gebrochen werden und ein Lateralaustrieb induziert werden.

Diese Linie zeigte keine negativen Entwicklungen im apikalen Pflanzenbereich oder den Blättern. Die Pflanzen wiesen leicht verlängerte Internodien aus.

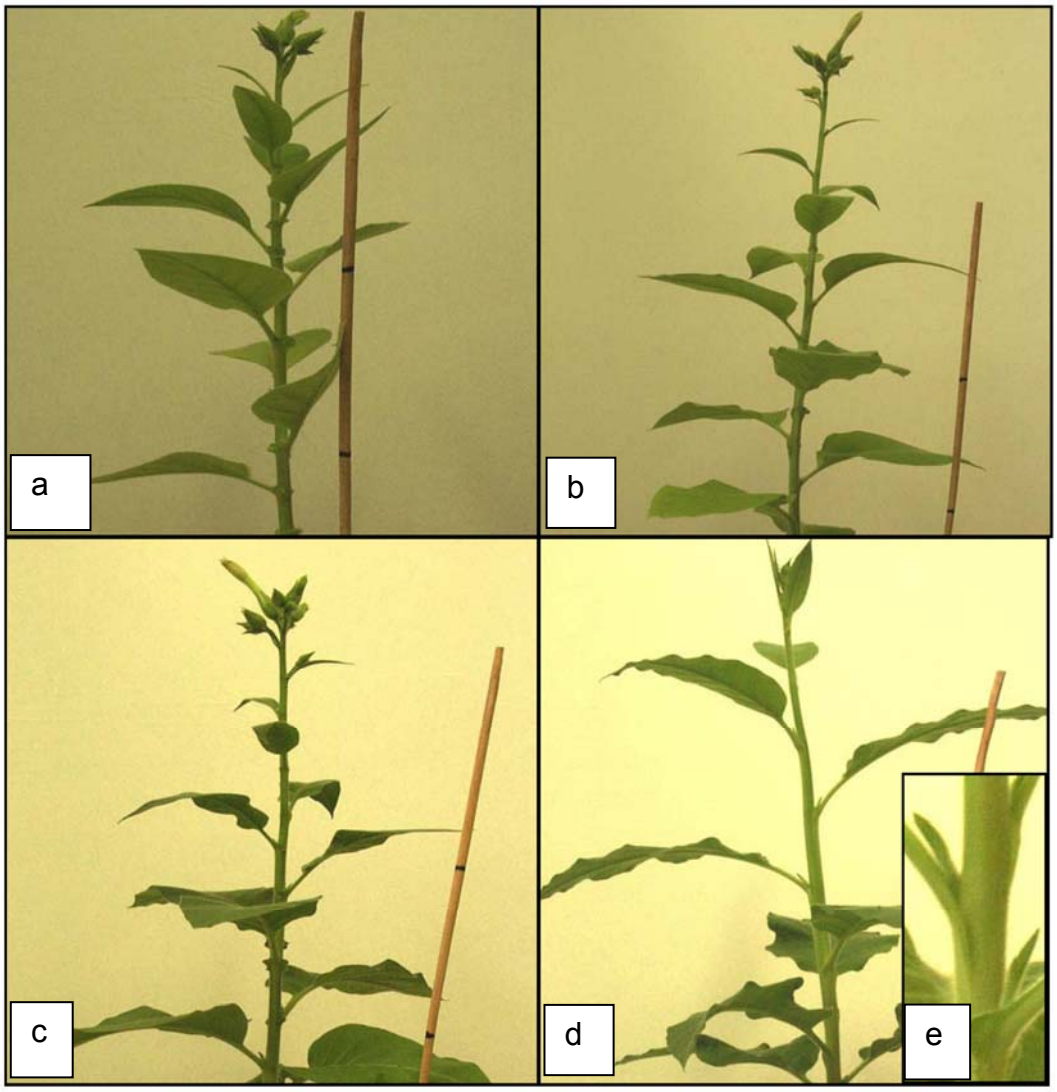


Abb. 4.2-15: Phänotypische Entwicklung von alcA-iaaL17 Pflanzen, (a) nicht-induziert, (b) 10 ml, (c) 25 ml, (d) 50 ml, (e) 50 ml Ausschnittvergrößerung

In der Untersuchung der Induktionsvariante B mit unterschiedlichen Zeitabständen zwischen den Induktorgaben, konnte gezeigt werden, dass in größeren Zeitabständen gegebene Induktionen einen ähnlichen morphologischen Effekt haben, wie schwächere Induktorgaben in kürzeren Intervallen (Abb. 4.2-16). Dies leitet sich aus einem Vergleich der induzierten Lateralverzweigung zwischen den Induktionsvarianten A und B ab. In Variante A-I konnte mit einer wöchentlichen 10 ml Induktionsgabe eine ähnliche Verzweigung wie mit einer 50 ml Applikation in dreiwöchigem Zeitintervall (B-IV) in der *ipt*-Linie alcA-ipt1 erzielt werden.

Abb. 4.2-16: Lateralverzweigung nach Ethanolinduktion, Variante B; obere Reihe alcA-ipt1; mittlere Reihe alcA-iaaL17, untere Reihe alcA-gfp10; erste Spalte nicht-induziert, zweite Spalte Induktion dreiwöchig, dritte Spalte Induktion zweiwöchig, vierte Spalte wöchentliche Induktion

Für die Linie alcA-iaaL17 konnte beobachtet werden, dass eine 14-tägige Induktorapplikation von 50 ml $EtOH_{5\%}$ für die Induktion des Achselknospenaustriebs ausreichte, während eine wöchentlich applizierte reduzierte Applikation, wie in Induktionsvariante A untersucht, nicht zu diesem Effekt führte.

Die phänotypischen Ergebnisse der Untersuchung des in Tabelle 4.2-8 aufgeführten Induktionsplans zeigten, die Eignung der verwendeten bakteriellen Phytohormongene für die Induktion der Brechung der Apikaldominanz in Tabak. In Abhängigkeit von dem verwendeten Gen führten unterschiedliche Induktionsintensitäten zum Austrieb der Seitenknospen.

Neben der Beurteilung des Sprossverzweigungsverhaltens der unterschiedlichen transgenen Tabaklinien erfolgte auch eine Bewertung der Wachstumsparameter Pflanzenhöhe, Sprossdurchmesser, Nodienzahl und Wurzeltrockenmasse.

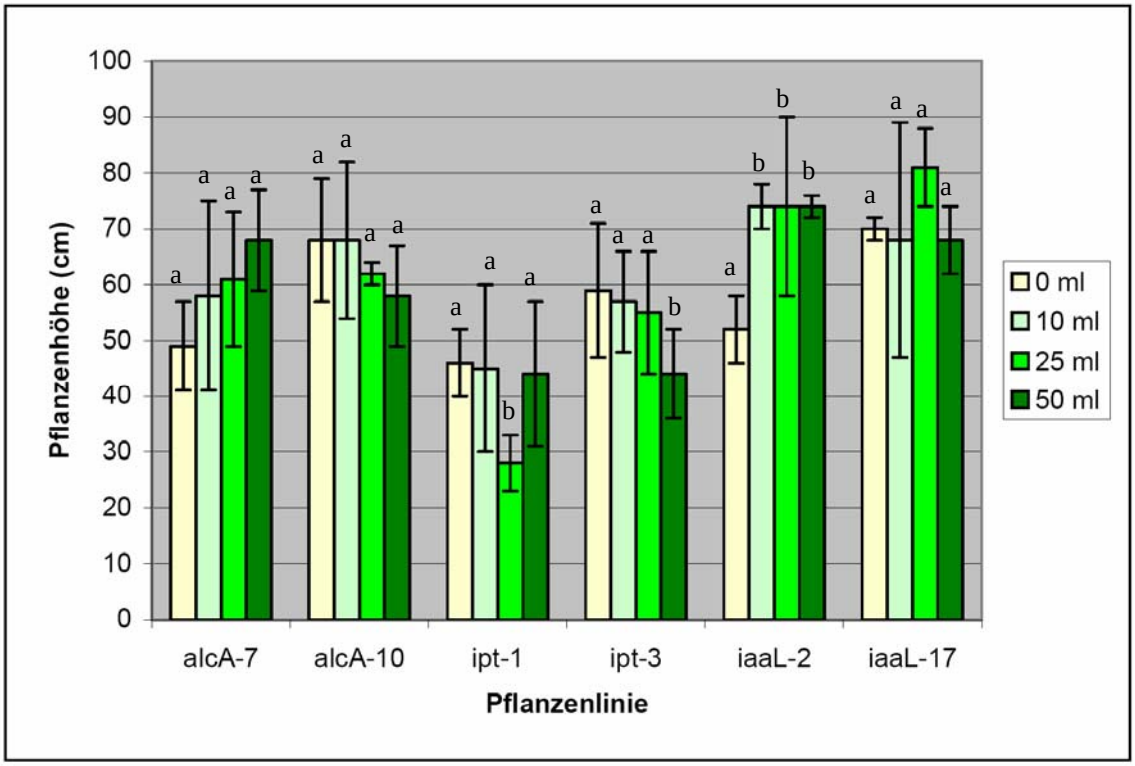


Abb. 4.2-17: Vergleich der Pflanzenhöhen in Abhängigkeit von der Ethanolinduktion; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, $p<0,05$, Tukey-Test

Eine Reduktion der Pflanzenhöhe war in den alcA-ipt Linien im Vergleich zu den anderen Linien zu sehen. Der Einfluss der Ethanolinduktion war dabei jedoch nicht signifikant für alle Induktionsstufen (Abb. 4.2-17). Bei dem verwendeten Pflanzenmaterial der T_1-Generation liegen homozygote und heterozygote Individuen vor, die möglicherweise die aufgetretene Varianzheterogenität bedingen. Diese ist aus allen quantitativen Untersuchungen (Abb. 4.2-17 bis 4.2.-20) ersichtlich.

Einen ähnlichen Einfluss der Ethanolinduktion auf die Sprosslängenentwicklung bei variiertem Induktionsintervall wurde zwischen den Linien gesehen. Eine Reduktion der Sprosshöhen fällt auf, aber die Induktionsstufen sind nicht signifikant verschieden.

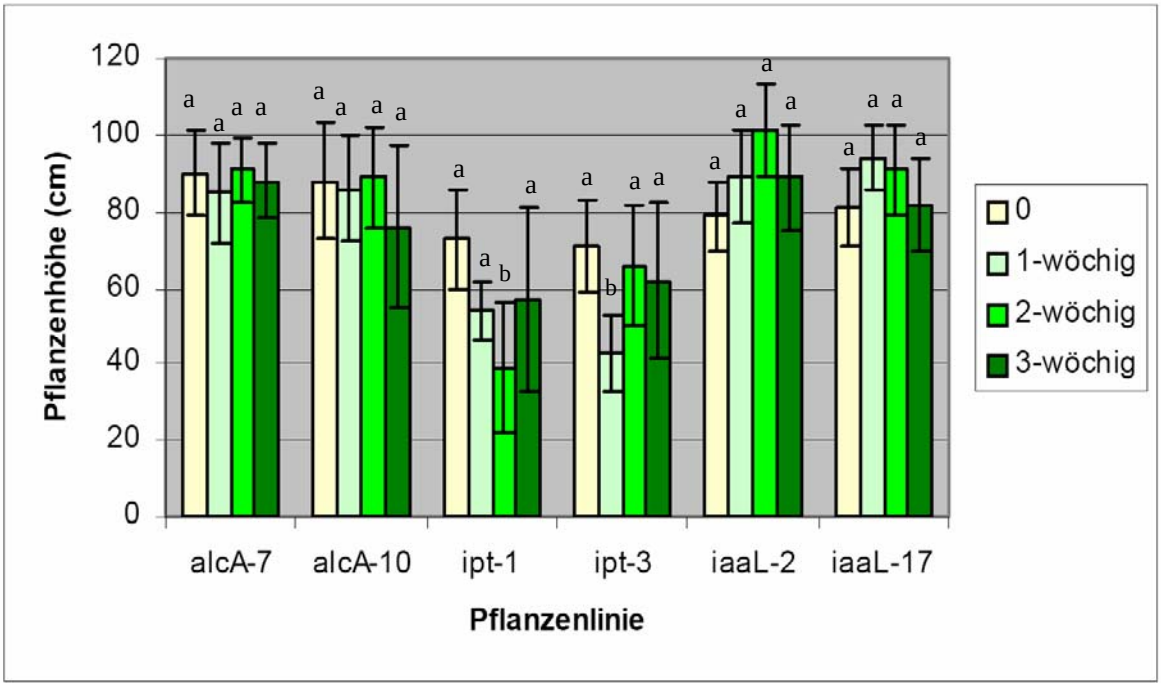


Abb. 4.2-18: Vergleich der Pflanzenhöhen in Abhängigkeit von der Ethanolinduktion; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, $p<0,05$, Tukey-Test

Weiterhin fällt auf, dass trotz eines zunehmenden Einflusses stärkerer Induktionen (Induktionsschema A), sowie kürzerer Induktionsintervalle (Schema B) der Phänotyp dramatisch beeinflusst ist in alcA-ipt-Linien, diese Beobachtung aber nicht in den Vergleichen der Sprosshöhenentwicklung wiedergespiegelt werden.

In den Abbildungen 4.2-19 und 4.2-20 ist die Reduktion der Wurzelentwicklung dargestellt.

Bei Betrachtung der Wurzelentwicklung wird der Einfluss einer stärkeren Induktion von 50 ml und 25 ml deutlich. Die Pflanzen haben deutlich reduzierte Wurzeltrockengewichte. Die auffallend geringen Wurzeltrockenmassen in den nicht-induzierten Kontrollen (Abb. 4.2-19) sind aus schlechter Nährstoffversorgung entstanden; es ist nicht von einem fördernden Effekt einer Ethanolgabe auf die Wurzelbildung auszugehen.

Dies wird auch aus Abb. 4.2-20 ersichtlich. Auffällig wird aus einem Vergleich der Daten, dass der Negativeffekt einer *ipt*-Expression auf die Wurzelentwicklung bereits ab der geringsten Induktionsstufe (AI und BIII) wirkt und dieser Effekt nicht weiter gesteigert wurde.

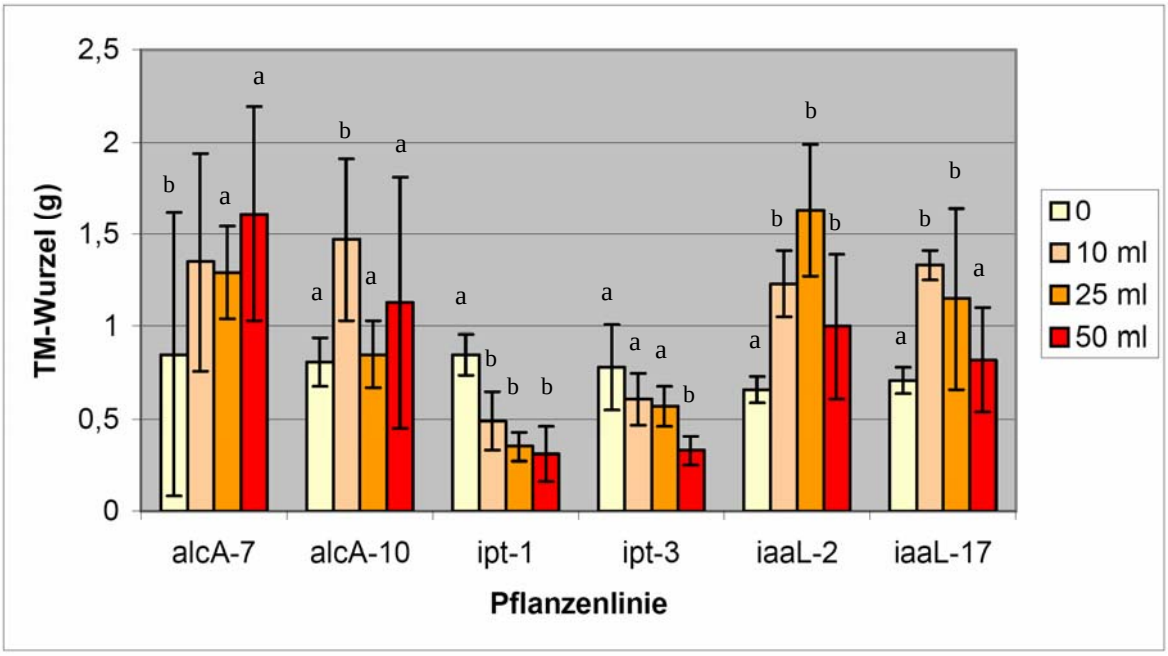


Abb. 4.2-19: Vergleich der Wurzeltrockengewichte in Abhängigkeit von der Ethanolinduktion; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, p<0,05, Tukey-Test

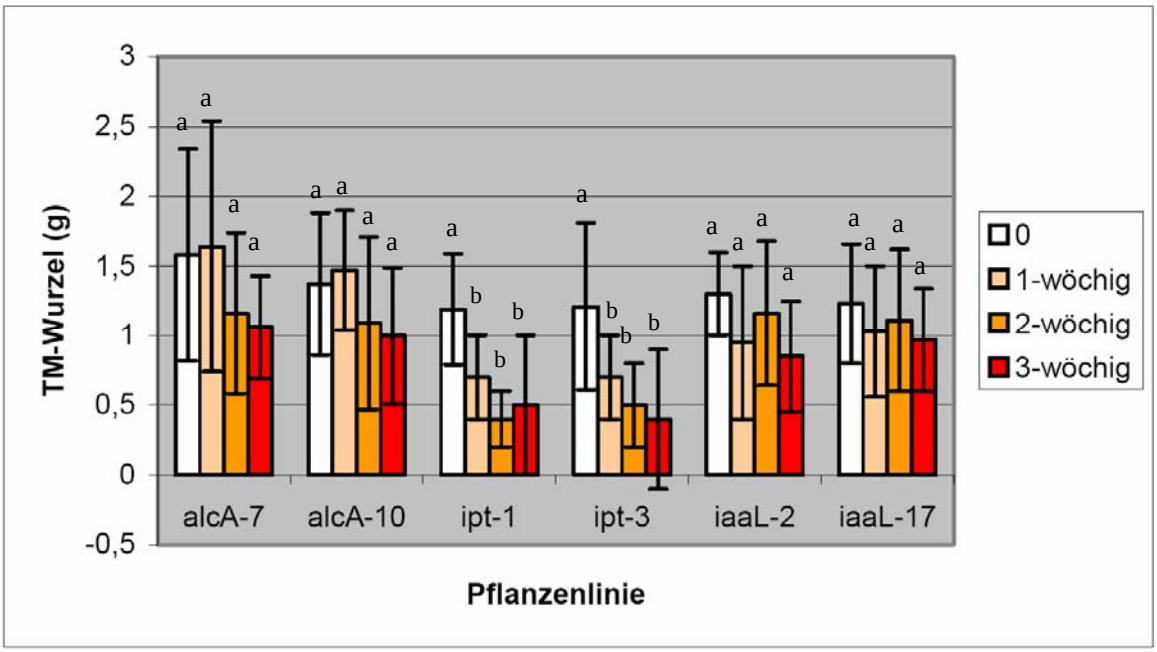


Abb. 4.2-20: Vergleich der Wurzeltrockengewichte in Abhängigkeit von der Ethanolinduktion; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, p<0,05, Tukey-Test

Als weitere morphologische Parameter wurden die Nodienzahl, der Sprossdurchmesser, sowie die Blattentwicklung bonitiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.2-9. dargestellt.

Tab. 4.2-9: Quantitative Merkmale der induzierten Tabaklinien, angegeben sind die Mittelwerte aus acht Versuchsgliedern. Die Angabe der Induktionsvariante bezieht sich auf Tabelle 4.1-8. Die Datenerhebung des Sprossdurchmessers fand zwischen 8. und 10. Nodium statt, ein Pflanzenbereich, der während des Induktionszeitraumes gebildet wurde.

Pflanzenlinie	Nodienzahl			Sprossdurchmesser (cm)		
	A-I	A-II	A-III	A-I	A-II	A-III
alcA-gfp7	21	22	22	0,7	0,7	1,1
alcA-gfp10	20	22	21	0,7	0,6	0,7
alcA-ipt1	21	22	21	1,1	1,9	1,5
alcA-ipt3	21	20	20	1,0	1,4	1,4
alcA-iaaL2	22	21	19	0,8	0,7	1,0
alcA-iaaL17	22	21	20	0,7	0,9	1,0

Es fand keine Beeinflussung der Zahl ausgebildeter Nodien statt. Die Reduktion der Pflanzenhöhen war auf eine Verkürzung der Internodien zurückzuführen.
Neben diesem Staucheeffekt wurde in alcA-ipt-Linien auch eine Verdickung der Sprossachse gemessen. Diese resultiert aus der erhöhten Gefäßbildung durch Steigerung der Cytokiningehalte. Ähnliches wurde im Vergleich der Blattmorphologie deutlich.
Wie bereits bei Abbildung 4.1-13 angesprochen, führte die induzierte Expression des bakteriellen *ipt*-Gens zu einer starken Beeinflussung der Blattader-Entwicklung. Die Blattmittelrippe, sowie die Blattadern 1. Ordnung waren stärker ausgebildet. Dies verursachte eine Starrheit der Blattstruktur. Dieser Effekt und unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten zwischen der Blattaderung und den dazwischen liegenden Blattgeweben, führte dazu, dass die ausgebildeten Blattgewebe keinen ausreichenden Platz zwischen den Blattadern fanden und eine Wölbung des Blattgewebes erfolgte (Abb. 4.2-21).

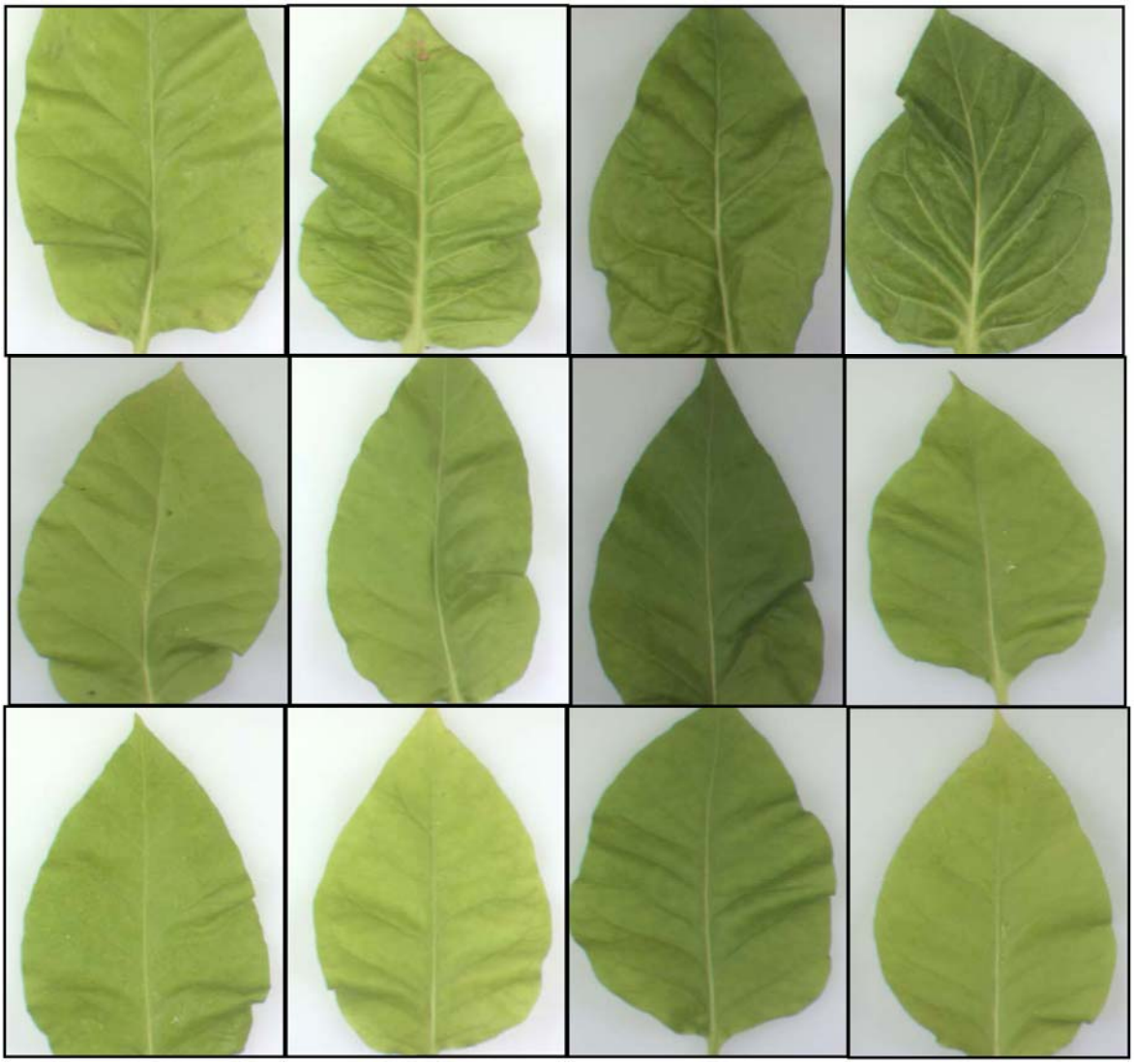


Abb. 4.2-21: Beeinflussung der Blattmorphologie nach Ethanolinduktion, Variante B; obere Reihe alcA-ipt-1; mittlere Reihe alcA-iaaL17, untere Reihe alcAgfp10; erste Spalte nicht-induziert, zweite Spalte Induktion dreiwöchig, dritte Spalte Induktion zweiwöchig, vierte Spalte wöchentliche Induktion

4.2.5. Auxin-responsive GFP-Expression

Die erzeugten transgenen Phytohormonlinien enthielten neben dem Ethanol-induzierbaren bakteriellen Genen auch ein gfp-Reportergen unter Kontrolle eines Auxin-induzierbaren Promotors. Damit wurden epifluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Basale GFP-Fluoreszenz in der transgenen Linie DR5-gfp

Die erzeugte Linie DR5-gfp diente der Erfassung von basaler GFP-Aktivität. Transgene T1-Sämlinge wurden in unterschiedlichen Altersstufen auf GFP-Fluoreszenz in Blättern, Kotyledonen, Hypokotyl, Nodien und Wurzeln untersucht. Dabei konnte in keiner der Analysen eine Fluoreszenz im Vergleich zu nicht-transgenen *N. tabacum* Pflanzen ermittelt werden.

Künstliche Induktion von DR5-gfp durch Auxinapplikation

In Anlehnung an die Arbeiten von Ulmasov *et al*. (1997), die bei der Entwicklung von DR5 zeigten, dass exogene Auxinapplikationen zu GUS-Aktivität in DR5-GUS transgenen *A. thaliana* führten, wurden unterschiedliche Auxinzusätze in einem *in vitro*-Assay untersucht.
Einen Überblick gibt Abb. 4.2-22. Vier Wochen alte Sämlinge wurden für 24 h in unterschiedlich konzentrierten NAA-Lösungen inkubiert und anschließend mikroskopiert. Dabei zeigte sich, dass nur sehr hohe, nicht natürlich vorkommende Konzentrationen in GFP-Fluoreszenz resultierten.

Untersuchungen in Phytohormongen-Linien

Eine Beeinflussung der gfp-Fluoreszenz in Ethanol-induzierbaren Phytohormongenlinien wurde ebenfalls an transgenen T_1-Sämlingen untersucht. Verschiedene Pflanzenorgane (Blatt, Hypokotyl, Wurzel) wurden auf eine differenzielle GFP-Aktivität in alcA-ipt und alcA-iaaL Linien untersucht. Es konnten jedoch keine Unterschiede in der Fluoreszenz im Vergleich zu nicht-induzierten Kontrollen beobachtet werden.
In der Erweiterung dieser Untersuchungen wurden die Sämlinge in 50 µM NAA-Lösung inkubiert, die zusätzlich 5 % Ethanol enthielt. Auch in diesen

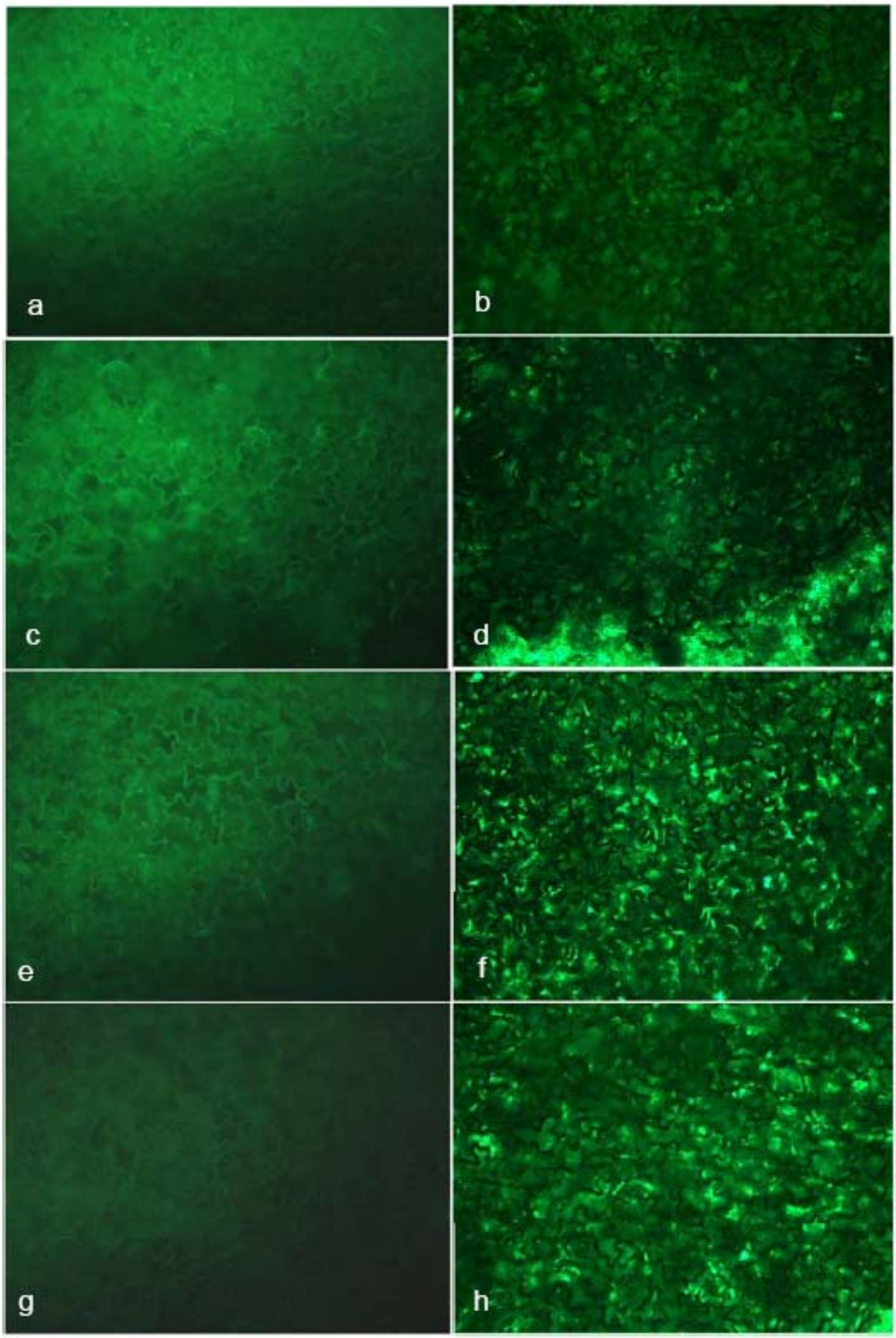

a
b
c
d
e
f
g
h

Abb. 4.2-22: Differenzielle GFP-Fluoreszenz nach Auxinapplikation, linke Spalte Fluoreszenzaufnahmen aus Blattgewebe bei 200x Vergrößerung und 1,5 sec Belichtung, rechte Spalte Durchlichtaufnahmen; (a), (b) 50 µM NAA, (c), (d) 30 µM NAA, (e), (f) 10 µM NAA, (g), (h) 0 µM NAA

Analysen konnte im Vergleich mit Sämlingen, die nur in Auxinlösung inkubiert wurden keine differenzielle GFP-Aktivität beobachtet werden.

4.3. „Virus induced gene silencing“ (VIGS) von Genen des pflanzlichen Phytohormonmetabolismus

Die Expression einer Teilsequenz oder vollständigen Sequenz in „antisense“ Orientierung mit Homologie zu einer endogenen pflanzlichen Sequenz führt zu einer Interaktion, die in „posttranskriptionellem gene silencing“ (PTGS) resultiert.
Dieses PTGS kann auch durch Pflanzenviren in Form eines „virus-induced gene silencing“ (VIGS) ausgelöst werden (siehe Einleitung).
Ziel der im Nachfolgenden beschriebenen Untersuchungen war die Bestimmung der Eignung des agroinfizierbaren cDNA Klons des TRV-Isolates PpK20 (Liu *et al*., 2002b) als Vektor zur Induktion von VIGS in *P. hybrida*. Darauffolgend schlossen sich Untersuchungen zum temporären Abschalten petunieneigener Gene des Phytohormonmetabolismus an.
Die systemische Infektion der verwendeten Petunienlinie W113 war bereits in 4.1.2.1. mit dem pflanzenviralen Reportergenkonstrukt TRV-*gfp* gezeigt worden.

4.3.1. Herstellung eines Markergenkonstruktes zur Etablierung eines VIGS-Systems in *P. hybrida*

Ein pflanzeneigenes Gen, das sich als Markergen in einem VIGS-System eignet, sollte bei temporär unterdrückter Expression zu einem optisch leicht zu erfassenden Phänotyp führen, der den zeitlichen Verlauf und die räumliche Verteilung des VIGS sichtbar macht. Als gut geeignetes Markergen hat sich das Phytoendesaturase-Gen (*PDS*) in unterschiedlichen Pflanzenspezies etabliert (siehe Einleitung).
Zunächst wurde ein Sequenzalignment mit PDS-Sequenzen verschiedener Solanaceen erstellt, anhand dessen Primer für die Amplifizierung eines PDS-Fragmentes aus *P. hybrida* abgeleitet wurden.
Aus einer Gesamt-RNA-Extraktion aus Blattmaterial der Petunienlinie W113 wurde ein 367 bp Fragment amplifiziert. Der Sequenzvergleich dieses Fragmentes zu o.e. PDS-Sequenzen wies auf Nukleotidebene eine 100 % Homologie zu *L. esculentum* und 93 % Homologie zu *N. benthamiana* aus.
Durch die, den Primern angefügten Restriktionsschnittstellen *BamH*I und *Sac*I konnte das *PhPDS*-Fragment aus Petunie in das Plasmid pBluescript kloniert

werden und im Anschluss, wie in Abb. 4.3-1 dargestellt in den TRV-basierten VIGS-Vektor subkloniert werden.

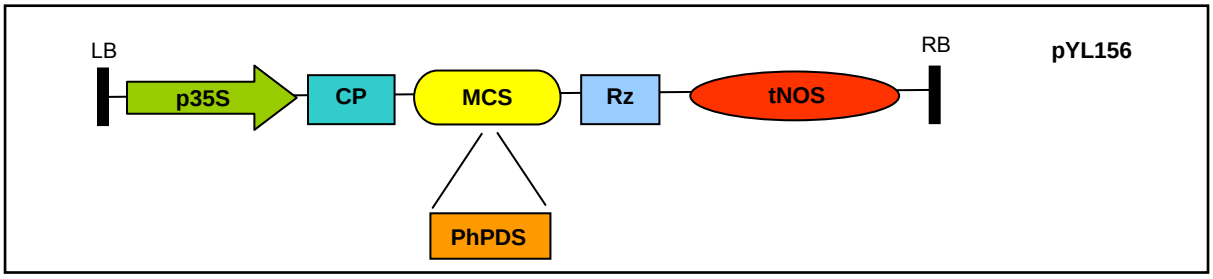


Abb. 4.3-1: Aufbau des TRV-VIGS-Vektors, schematisch dargestellt nach Liu *et al.*, 2002; TRV-cDNA-Klon der RNA2 zwischen verdoppelten CaMV 35S-Promotor und Nopalinsynthase-Terminator in binärem Vektor

Das resultierende Konstrukt pYL-*PhPDS* wurde in den Agrobakterienstamm C58C1 transformiert und zur Etablierung eines TRV-basierten VIGS-Systems in *P. hybrida* eingesetzt.

4.3.2. Überprüfung der VIGS induzierenden Funktion des auf dem TRV-Isolat PpK20 basierenden Markergenkonstruktes pYL-PhPDS

Im ersten Schritt der Etablierung eines VIGS-Systems in *P. hybrida* W113 musste überprüft werden, ob sich mit dem amplifizierten *PhPDS*-Fragment der Effekt des „photobleaching“ in Petunie induzieren lässt.

Als Positivkontrolle zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des verwendeten Vektors wurden parallel *N. benthamiana* Pflanzen mit den zu untersuchenden Vektoren inokuliert.

Es wurden jeweils 3-4 Blätter drei Wochen alter Pflanzen mit den in Tab. 4.3-1 aufgeführten Konstrukten über Agroinfiltration inokuliert, wobei je infiltriertem Blatt möglichst große Infiltrationsstellen erzeugt wurden.

Tab. 4.3-1: Ausbildung eines typischen "photobleaching" Phänoytps in Abhängigkeit von dem verwendeten VIGS-induzierenden Konstrukt und der Pflanzenart, Bonitur 30 dpi

Konstrukt	*N. benthamiana*		*P. hybrida* W113	
	Anzahl inokulierter Pflanzen	Anzahl Pflanzen mit VIGS-PDS-Phänotyp	Anzahl inokulierter Pflanzen	Anzahl Pflanzen mit VIGS-PDS-Phänotyp
TRV-RNA1	10	0	0	0
TRV-RNA1 + TRV-pYL-*NbPDS*	10	10	10	7
TRV-RNA1 + TRV-pYL-*PhPDS*	10	10	10	8

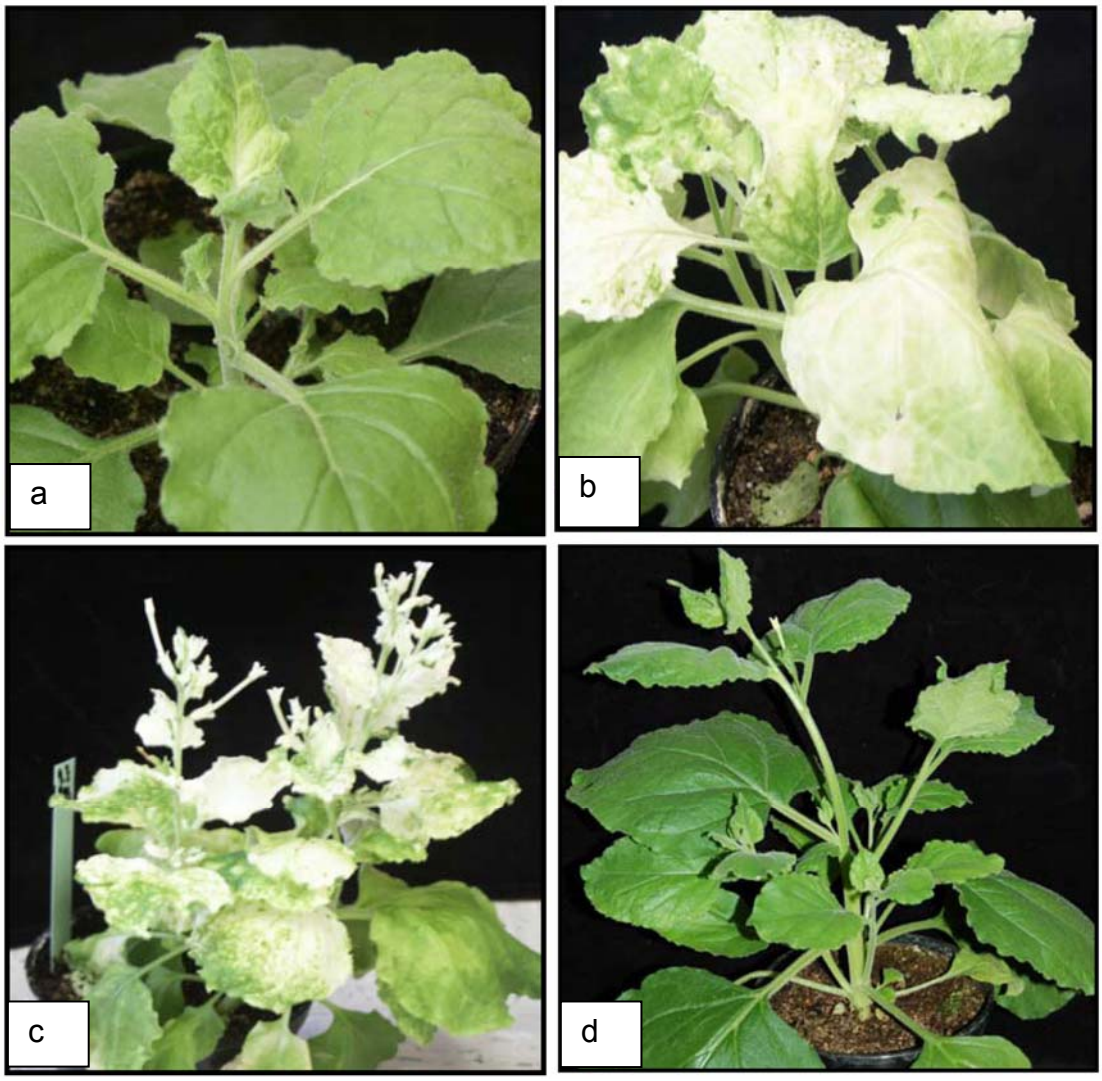
Als Kontrollen neben nicht-inokulierten Pflanzen erfolgte die Infektion mit TRV-RNA1 ohne TRV-RNA2 Konstrukt, sowie einem *gfp*-exprimierenden TRV cDNA-Klon pYL156-*gfp* zur Überprüfung der systemischen Infektion der Pflanzen mit TRV.
Der Verlauf der Entwicklung des typischen „photobleaching" Phänotyps konnte mit beiden PDS-Konstrukten in beiden Pflanzenarten erzeugt werden (Abb. 4.3-2), verlief jedoch zeitlich und räumlich verschieden.

Wie bereits unter 4.1.2.1 beschrieben, begann die systemische Ausbreitung des *gfp*-exprimierenden TRV cDNA-Klon bereits 3-4 Tage nach Infiltration und breitete sich innerhalb einer Woche in der gesamten Pflanze aus.
Sieben Tage nach Infiltration begann die Ausbildung des PDS-Phänotyps in *N. benthamiana*. Im Verlauf der weiteren Kultur breiteten sich die, in der Expression der Phytoendesaturase unterdrückten Bereiche in der Pflanze aus. Es kam zur Ausbildung vollständig weißer Blätter und Seitensprosse. Das systemische „gene silencing" hielt bis zum Kulturende 12 Wochen nach Infektion an (Abb. 4.3-3a-d).

Bei *P. hybrida* erfolgte die systemische Virusausbreitung erst 17 Tage nach Infiltration. Sie war insgesamt langsamer, weniger stark ausgeprägt und geringer in der Ausbreitung im Vergleich zu *N. benthamiana*.

Erste chlorophyllfreie Bereiche traten erst 20 Tage nach Infiltration auf. Diese Entwicklung setzte sich aber fort; es konnte ein systemisches „gene silencing“ im Neuaustrieb beobachtet werden (Abb. 4.3-3 e-g). Allerdings verblieb ein Teil der Gesamtblattfläche über den gesamten Versuchszeitraum (12 Wochen) grün, es kam nur zu fleckenartig auftretenden weißen Bereichen in den untersuchten Petunien.

Insgesamt war das Ausmaß des „silencing“-Phänotyps in *N. benthamiana* verglichen mit *P. hybrida* sowohl mit TRV-*NbPDS* als auch TRV-*PhPDS* stärker, umfassender und schneller. Jedoch konnte die prinzipielle Funktionsfähigkeit des TRV-basierten Vektors zum VIGS in Petunie anhand des Markergens *PDS* gezeigt werden.



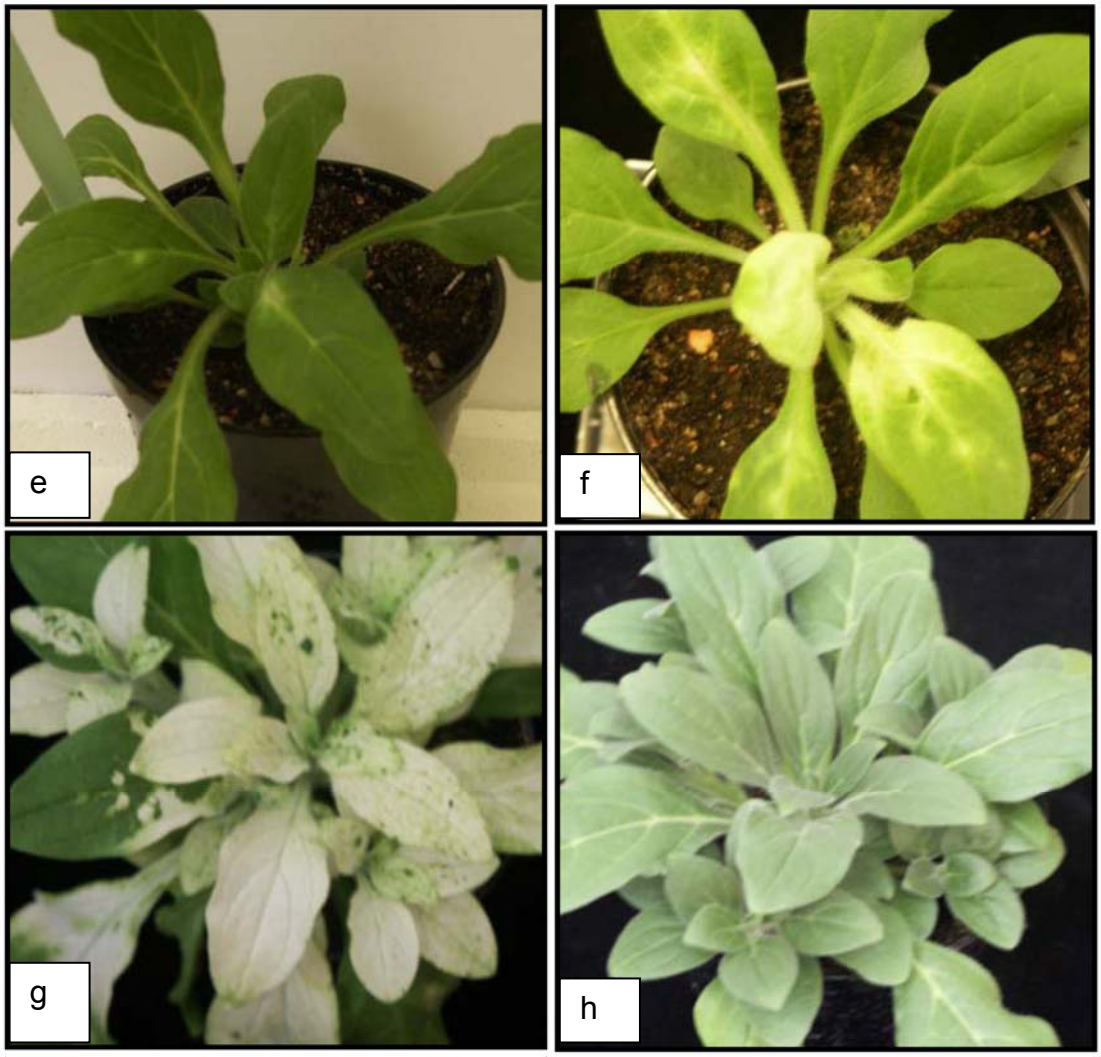


Abb.: 4.3-2: Entwicklung des viral induzierten PDS-„Silencing“ in Abhängigkeit von der Pflanze und dem PDS-Fragment im Verlauf der Kultur von 12 Wochen bei 20°C und 16 h Licht, (a-d) VIGS in *N. benthamiana* mit pYL-NbPDS, (a) 10 dpi, (b) 20 dpi, (c) 50 dpi, (d) Kontrolle TRV-RNA1 ohne RNA2-Konstrukt 50 dpi; (e-h) VIGS in P. x hybrida mit pYL-PhPDS, (e) 20 dpi, (f) 30 dpi, (g) 50 dpi, (h) Kontrolle TRV-RNA1 ohne RNA2-Konstrukt 50 dpi

4.3.3. Versuche zur Optimierung des VIGS-Systems in *P. hybrida*

Um das Ausmaß und die Intensität des VIGS in Petunie verstärken zu können, wurden unterschiedliche Parameter des Versuchsdesigns variiert. Dabei wurden Kulturbedingungen, Inokulationsmöglichkeiten sowie VIGS-Konstrukte untersucht, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt sind.

4.3.3.1. Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung des PDS-Phänotyps

Die Habitusentwicklung von Petunien kann durch die Kulturparameter Temperatur und Tageslänge beeinflusst werden. Unter Langtag-Bedingungen bilden Petunien einen unverzweigten Habitus mit längeren Internodien aus. Die Entwicklung des Hauptsprosses wird gefördert. Hingegen wird unter Kurztag-Bedingungen das Längenwachstum reduziert und die Verzweigung gefördert. Neben der Tageslänge kommt der Temperatur eine entscheidende Bedeutung in der Petunienkultur zu. Niedrige Temperaturen fördern die Anlage der Seitensprossentwicklung und reduzieren die Pflanzenhöhe, der Habitus wirkt kompakter.

Tab. 4.3-2: Einfluss der Pflanzenkultur-Temperatur auf die Ausbildung des VIGS-Phänotypes

Temperatur	Anzahl inokulierter Pflanzen	Anzahl Pflanzen mit VIGS-PDS-Phänotyp
15 °C	10	7
20°C	10	7
25°C	10	6

Da das Ziel der Etablierung des VIGS-Systems bei Petunie eine Beeinflussung des Pflanzenwuchses durch temporäre Unterdrückung von pflanzeneigenen Phytohormonmetabolismusgenen war, sollte der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Entwicklung und Ausprägung des *PDS*-Phänotypes untersucht werden. Jeweils vier Blätter von zwei Wochen alten *P. hybrida* W113 Pflanzen wurden mit TRV-PhPDS und TRV-RNA1, sowie der Kontrolle TRV-RNA1 infiltriert und unter den in Tab. 4.3-2 aufgeführten Temperaturen kultiviert.

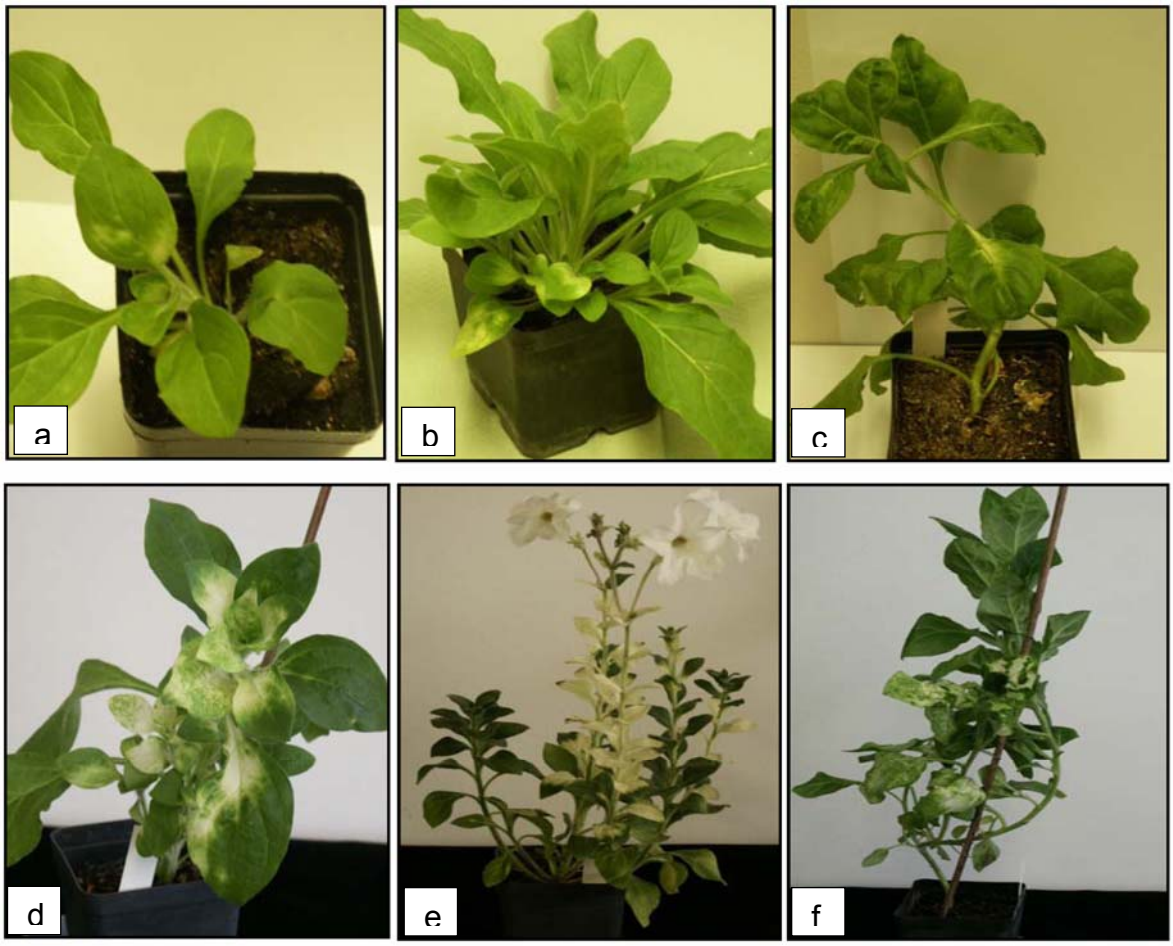


Abb. 4.3-3: Entwicklung des PDS-Phänotyps bei unterschiedlicher Kulturtemperatur, linke Spalte 40 dpi, rechte Spalte 70 dpi; (a) und (b) Kulturtemperatur 15°C; (c) und (d) Kulturtemperatur 20°C; (e) und (f) Kulturtemperatur 25°C; die Infiltration erfolgte mit dem petunieneigenen *PDS*-Fragment in dem Konstrukt pYL-*PhPDS*

Trotz deutlicher Beeinflussung des pflanzlichen Wachstums durch die verschiedenen Kulturtemperaturen (Abb. 4.3-3a-d) wurde in allen untersuchten Varianten bei 60-70 % der Versuchspflanzen ein systemisches „Silencing“ der Phytoendesaturase ausgebildet. In den Temperaturbereichen 15°C und 25°C begann die Ausbildung weißer Blattbereiche erst vier Wochen nach Infektion, in der Kontrollvariante 20°C erfolgte die Phänotypentwicklung bereits nach drei Wochen. Dieser Unterschied wurde auch für die Stärke des VIGS-Phänotyps im Versuchszeitraum (10 Wochen) bonitiert. Während bei 20°C Kulturtemperatur relativ große Sprossbereiche ein „photobleaching“ aufwiesen, war in den übrigen Varianten weniger Blattfläche beteiligt, besonders deutlich war dieser Unterschied bei der hohen Kulturtemperatur von 25°C. Und trotz geringerer

Pflanzenbiomassebildung in der 15°C-Variante war die phänotypisch auffällige weiße Fläche geringer im Vergleich zur mittleren Temperatur.

Der Versuch belegte einen Einfluss der Kulturtemperatur auf die Entwicklung des Habitus bei Petunie, die untersuchten Varianten konnten aber nicht zu einer Verstärkung und Vervollständigung des VIGS-PDS-Phänotyps führen, wie aus den Abbildungen 4.3-3a-f ersichtlich ist.

4.3.3.2. Einfluss des Pflanzenalters zum Zeitpunkt der Inokulation auf die Entwicklung des PDS-Phänotyps

Die Blattinfiltrationsmethode wurde zur Inokulation von pflanzenviralen Expressionsvektoren, vorliegend in binären Plasmiden verwendet. Dabei wird von der Unterseite des Pflanzenblattes die Bakteriensuspension in den Interzellularraum gepresst. In Abhängigkeit von Blattmorphologie (Ausprägung der Kutikula und Blattaderung), Blattvitalität und Blattalter der Pflanzen können so kleine Bereiche von 1 cm^2 bis ganze Blätter infiltriert werden.
Während sich in Blättern von *N. benthamiana* relativ leicht große Infiltrationsstellen über mehrere Interkostalfelder erzeugen ließen, mussten in Petunie mehrere Infiltrationsstellen für eine vergleichbare Inokulummenge angesetzt werden.
Ryu *et al*. (2004) stellte die Inokulationsmethode „Agrodrench“ vor, die ohne abiotische Verletzung der Pflanze durch Applikation der Bakteriensuspension auf den Pflanzenkopf und Eintrag in das Kultursubstrat erfolgt. Damit wird auch die Infektion im Sämlingsalter der Pflanze möglich. Des Weiteren kann diese Methode auch zu VIGS-Untersuchungen in der *in vitro*-Kultur eingesetzt werden.
Durch den Vergleich der Blattinfiltration drei Wochen alter Jungpflanzen und dem „Agrodrench“ von Sämlingen, sowie von *in vitro*-Kulturen sollte untersucht werden, inwiefern durch Variation in Inokulationszeit und Pflanzenalter die Entwicklung des *PDS*-Phänotyps verstärkt und gefördert werden kann.
Als Referenzpflanze wurde *N. benthamiana* neben *P. hybrida* inokuliert.
Für den „Agrodrench“ wurden jeweils zehn Sämlinge in einen 15 cm Topf pikiert und nach drei Tagen mit jeweils 5 ml Agrobakteriensuspension übergossen. Die Infektionsrate lag zwischen 60-90 %, auch bei *N. benthamiana* entwickelten nicht alle inokulierten Sämlinge ein „photobleaching“. Die Entwicklung der Pflanzen

verlief im Vergleich zu Einzelpflanzen schlechter, sie blieben sowohl im Gesamtwuchs als auch in der Gesamtblattflächenentwicklung kleiner, waren zarter und weniger robust, wie aus einem Vergleich der Pflanzen in Abbildung 4.3-4a und b mit c, sowie d und e mit f zu ersehen ist.

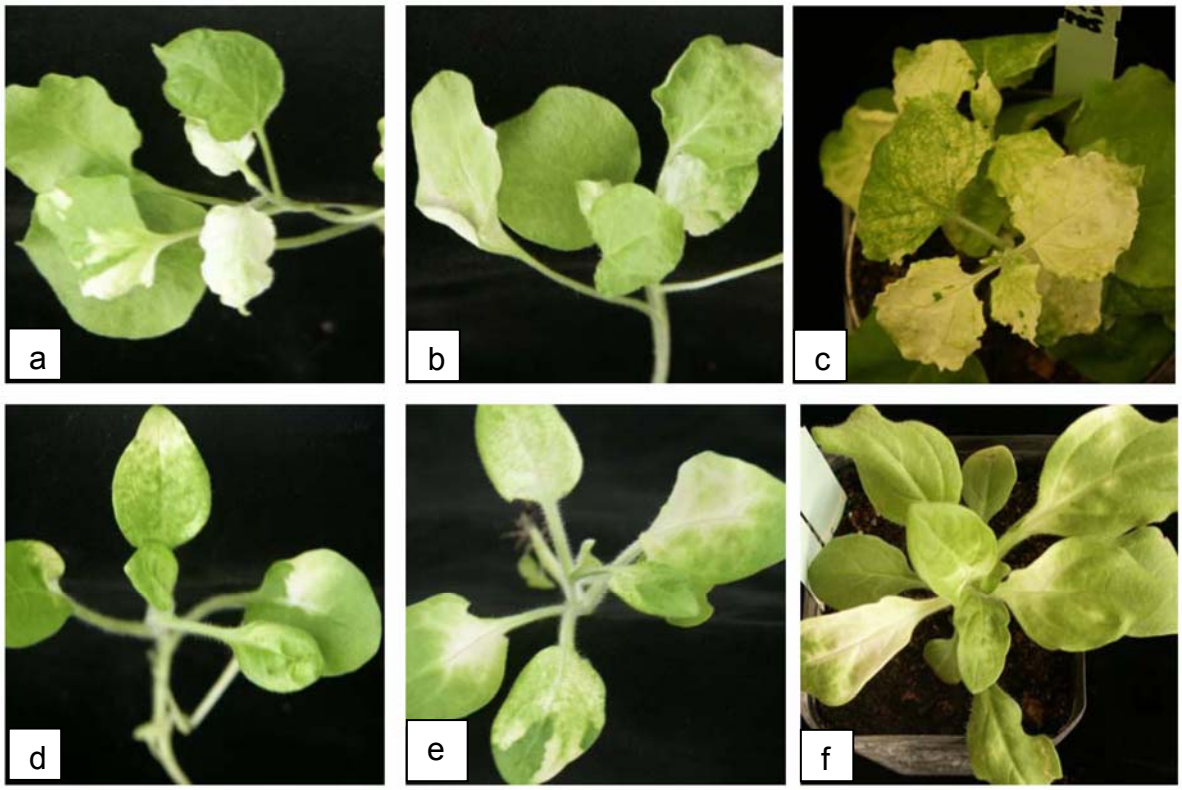


Abb. 4.3-4: Vergleich der Inokulationsmethoden "Agroinfiltration" und „Agrodrench" mit den Konstrukten pYL-*NbPDS* und pYL-*PhPDS* in *N. benthamiana* und *P. hybrida* W113, Bonitur 35 dpi,
obere Reihe: links und rechts jeweils pYL-*NbPDS*, mitte pYL-*PhPDS*; a und b-*N. benthamiana* nach „Agrodrench" c-*N. benthamiana* nach „Agroinfiltration", **untere Reihe**: links pYL-*NbPDS*, mitte und rechts pYL-*PhPDS*; d und e-*P. hybrida* W113 nach „Agrodrench", f-W113 nach „Agroinfiltration"

Die Ausbildung eines PDS-Phänotypes begann in der Variante „Agrodrench" bei *N. benthamiana* 10 Tage nach Inokulation. Bei Petunie traten erste weiße Blattstellen nach 20 Tagen auf. Wie in allen bislang untersuchten Optimierungen des VIGS-Systems traten auch bei variierter Inokulationsmethode Intensitätsunterschiede in der Phänotypausprägung zwischen den Pflanzen auf, die bei Petunie stärker waren verglichen mit Tabak. Ebenso wurde kein vollständiges „Silencing" erreicht, es verblieben bei beiden Pflanzen grüne Pflanzenteile.

Die „Agrodrench“-Inokulation wurde ebenfalls mit Sämlingen in *in vitro*-Kultur untersucht (Ergebnisse nicht dargestellt). Dabei war es ebenfalls möglich die PDS-Expression zu reprimieren, jedoch eigneten sich *N. benthamiana* und *P. hybrida* W113 Sämlinge nicht für eine längerfristige (> 6 Wochen) *in vitro*-Kultur. Während aus *N. tabacum* Sämlingen über wiederholte Subkultur von Sprossspitzen und –segmenten eine über Jahre vitale *in vitro*-Kultur etabliert werden kann, entwickelten sowohl *N. benthamiana* als auch *P. hybrida* W113 Pflanzen bei längerer *in vitro*-Kultivierung einen Phänotyp mit stark reduzierter und verkleinerter Blattbildung und einer Tendenz zu längeren „weicheren“ Sprossen. Deswegen wurde auf weiterführende Untersuchungen zu VIGS in *in vitro*-Kulturen bei Petunie verzichtet.

4.3.4. Erstellung von VIGS-Konstrukten zur Beeinflussung des pflanzlichen Habitus

Ziel der Etablierung eines VIGS-Systems in Petunie sollte das temporäre Abschalten von petunieneigenen Genen des Phytohormonmetabolismus sein. Insbesondere Gene aus Biosynthese und Katabolismus von Auxin und Cytokinin, die einen Haupteinfluss auf die Seitensprossentwicklung haben, sollten temporär in ihrer Expression unterdrückt werden und die Auswirkungen auf den pflanzlichen Phänotyp untersucht werden.
Zu diesem Zwecke wurden ausgehend von Sequenzeinträgen in der NCBI-Datenbank Genfragmente von Cytokininmetabolismus-beteiligten Genen in *P. hybrida* kloniert und auf ihre Funktionalität mittels VIGS überprüft.

4.3.4.1. Konstrukt zur Reprimierung der Cytokinin-Biosynthese

Ausgehend von der von Zubko *et al*. (2002) als *ipt*-ähnliche charakterisierte *sho*-Sequenz aus *P. hybrida* wurden spezifische Primer für ein Amplifikat von 714 bp erstellt und mit den Restriktionsschnittstellen *Sac*I und *Xba*I zur Klonierung versehen. Nach der Sequenzierung des cDNA-Fragmentes erfolgte die Subklonierung, wie in Abb. 4.3-5 a-c dargestellt, über das Plasmid pBluescript in den TRV-RNA2 cDNA-Klon pYL156.

Das resultierende Konstrukt pYL-*Phsho* konnte in den Agrobakterienstamm C58C1 transformiert und anschließend für Infektionsexperimente eingesetzt werden.

4.3.4.2. Konstrukt zur Reprimierung des Cytokininkatabolismus

Ausgehend von zwei EST-Sequenzen von Tomate (van der Hoeven *et al.*, 1999 unveröffentlicht, AW224503, AW031453) wurden Primer (LeCKX-up/LeCKX-low, 2.5.) abgeleitet, die ein CKX-Fragment von ~ 200 bp aus *P. hybrida* amplifizieren sollten.

Mit der Sequenz des erhaltenen Fragmentes wurde ein Sequenzhomologievergleich mit der NCBI-Datenbank (BlastN) durchgeführt. Dabei wurde neben zahlreichen Sequenzhomologien zu pflanzlichen Sequenzen unbekannter Funktion auch eine Homologie zu AtCKX5 mit einem „E-value“ von 0,004 ausgewiesen. Nach Altschul *et al*. (1997) können Werte $<1e^{-2}$ in den meisten Fällen Sequenzhomologien anzeigen.

Das putative PhCKX-Fragment wurde kloniert, in den TRV-RNA2 Vektor überführt und in den Agrobakterienstamm C58C1 transformiert.

4.3.4.3. Überprüfung eines Einflusses auf die Pflanzenentwicklung durch die erstellten Phytohormonmetabolismus-Konstrukte

Die erstellten Konstrukte, pYL156-*sho* zum temporären Abschalten der Cytokininbiosynthese und pYL156-*ckx* mit einer erwarteten Reprimierung des Cytokininkatabolismus und daraus resultierender Cytokininanreicherung, wurden nach der Methode von Ryu *et al*. (2004) auf zehn Tage alte *P. hybrida* W113 Sämlinge inokuliert.

Im Vergleich mit den Kontrollvarianten TRV-RNA1 und TRV-RNA1 + pYL-*PhPDS*, sowie nicht inokulierten Pflanzen konnten keine sichtbaren Veränderungen im Habitus der Pflanzen bonitiert werden, die auf einen Effekt der verwendeten Phytohormon-Metabolismus-Konstrukte schließen lassen konnten.

4.3.5. Erstellung von modifizierten VIGS-Konstrukten zur Phytohormonmetabolismus-Beeinflussung in *P. hybrida* W113

4.3.5.1. Herstellung von „Doppelkonstrukten“ zur Kontrolle der pflanzenviralen Infektion

Da zum einen in den Versuchen zum Abschalten der Phytoendesaturase die Infektionsrate zwischen 60-80 % lag und zum anderen im ersten Versuchsdurchlauf kein phänotypischer Effekt der Konstrukte festzustellen war, wurden zunächst sogenannte Doppelkonstrukte (Chen *et al*., 2004) hergestellt, die eine Kontrolle der Infektionsrate über einen PDS-Phänotyp ermöglichten.

Dafür wurden, wie unter Abbildung 4.3-5 (d) schematisch dargestellt, in die Plasmide pYL-*Phsho* und pYL-*Phckx* das *PDS*-Fragment *PhPDS* über die Restriktionsschnittstellen *Sac*I und *BamH*I eingefügt.
Bei einer Verwendung der Konstrukte in einem Infektionsexperiment sollten so durch einen entstehenden „photobleaching“ Effekt eine Differenzierung infizierter und nicht-infizierter Pflanzen möglich werden, um damit auch kleine, weniger auffällige Veränderungen zu erkennen und einem VIGS-Effekt zuordnen zu können.

4.3.5.2. Herstellung von „inverted repeat“-Konstrukten

Lacomme *et al*. (2003) führte die Möglichkeit der Verstärkung eines VIGS-Effektes durch die Expression des entsprechenden Fragmentes in „inverted repeat“ (IR) Orientierung aus. Damit soll eine Akkumulation von dsRNA-Molekülen, die für die Auslösung eines pflanzenviral induzierten PTGS von großer Bedeutung sind, erhöht werden.
Für die Erstellung dieser Konstrukte wurde die in Abbildung 4.3-5 (e) und (f) dargestellte Strategie verwendet. Dazu wurden zunächst Genfragmente, die für beteiligte Enzyme des Cytokininmetabolismus kodieren in „sense“ und „antisense“ Orientierung getrennt durch ein pflanzliches Intron subkloniert. Das so erstellte IR-Konstrukt konnte dann über die Restriktionsenzyme *Xho*I und *Xba*I in das Plasmid TRV-RNA2 pYL156 überführt werden.

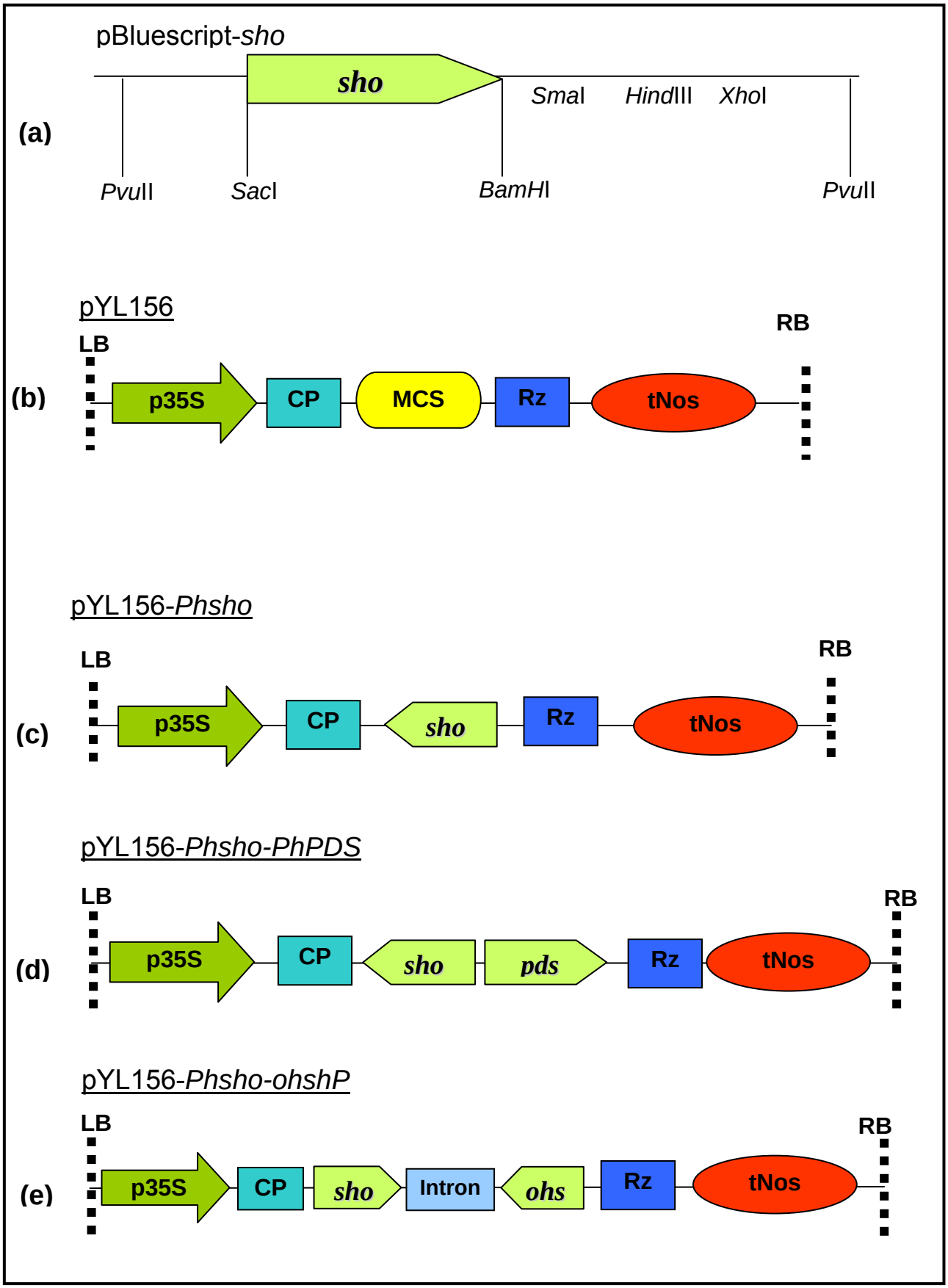

pBluescript-sho
(a)
sho
SmaI
HindIII
XhoI
PvuII
SacI
BamHI
PvuII
pYL156
(b)
LB
RB
p35S
CP
MCS
Rz
tNos
pYL156-Phsho
(c)
LB
RB
p35S
CP
sho
Rz
tNos
pYL156-Phsho-PhPDS
(d)
LB
RB
p35S
CP
sho
pds
Rz
tNos
pYL156-Phsho-ohshP
(e)
LB
RB
p35S
CP
sho
Intron
ohs
Rz
tNos

Abb. 4.3-5: Schema der Klonierungsschritte von pflanzenviralen VIGS-Konstrukten, (a)- Klonierung des Petunien *Phsho*-Fragmentes in den Vektor pBluescript über die Restriktionsschnittstellen *Sac*I und *Xba*I, die über die PCR-Amplifizierungsprimer dem Fragment angefügt wurden, sowie Aufführung verbliebene „single-sites“ für die Subklonierung des Fragmentes; (b)-cDNA-Klon der TRV-RNA2 mit vorhandener „multiple cloning site“ zum Einfügen von Fragmenten; (c)- pYL156-*Phsho*: *Phsho* über *Xba*I und *Sac*I in den cDNA-Klon der TRV-RNA2 subkloniert; (d)-pYL156-*Phsho-PhPDS*: Einklonierung des *PhPDS*-Fragmentes über *Sac*I und *BamH*I in den TRV-cDNA-Klon pYL156-*Phsho* zur Überprüfung des VIGS-Infektionserfolges in Petunie über das Markergen Phytoendesaturase; (e) -pYL156-*Phsho-ohshP*: „inverted-repeat“-VIGS-Konstrukt zum Reprimieren des Cytokininbiosyntheseweges in Petunie im TRV-cDNA-Klon der RNA2

Für das *Phsho*-Fragment erfolgte zunächst die Klonierung der „sense“ Orientierung hinter das Intron über die Restriktionsschnittstellen *Ecl*136I und *Xho*I auf *Sma*I und *Sal*I in pVIGS, resultierend in pVIGS-*Phsho.* Das „antisense“ Fragment wurde dann über *Xho*I und *Sac*I vor das Intron gesetzt.

Das putative *Phckx* wurde erst in das Plasmid pBluescript über einen *EcoR*I Verdau subkloniert. Damit standen die erforderlichen Klonierungsrestriktionsschnittstellen *Sac*I und *Xho*I zur Verfügung. Der weitere Klonierungsweg erfolgte analog zur Erstellung von pYL-*Phsho-ohshP*.

4.3.5.3. Überprüfung eines Einflusses unterschiedlich aufgebauter VIGS-Konstrukte auf den Pflanzenhabitus von *P. hybrida*

Nach dem unter 4.3.4.3. beschriebenen Erstversuch zur Habitusbeeinflussung bei *P. hybrida* W113, der keinen Effekt zeigte, wurden die zuvor erläuterten Konstrukte zur Kontrolle des Infektionserfolges (Doppelkonstrukte) und zur Verstärkung der dsRNA-Molekülbildung (IR-Konstrukte) untersucht.

Dazu wurden die in Tab. 4.3-3 dargestellten Varianten über „Agrodrench“-Inokulation auf pikierte zwei Wochen alte Einzelpflanzen von *P. hybrida* W113 und *N. benthamiana* appliziert.

Tab. 4.3-3: Übersicht der Inokulationsvarianten zur Habitusbeeinflussung; Bonitur erfolgte 30 dpi

Konstrukt	Anzahl inokulierter Pflanzen	Anzahl Pflanzen mit VIGS-PDS-Phänotyp	Anzahl Pflanzen mit VIGS-PDS-Phänotyp	Anzahl Pflanzen mit Habitus-veränderung
		N. benthamiana	*P. hybrida* W113	
Nicht-Inokuliert	10	/	/	/
TRV-RNA1	10	/	/	/
TRV-RNA1 + TRV-pYL-*Phsho*	10	/	/	0
TRV-RNA1 + TRV-pYL-*Phsho-PhPDS*	10	8	6	0
TRV-RNA1 + TRV-pYL-*Phsho-ohshP*	10	/	/	0
TRV-RNA1 + TRV-pYL-*Phckx*	10	/	/	0
TRV-RNA1 + TRV-pYL-*Phckx-PhPDS*	10	9	8	0
TRV-RNA1 + TRV-pYL-*Phckx-xkchP*	10	/	/	0

Mithilfe der “Doppelkonstukte” konnten Pflanzen, die einen “photobleaching” Phänotyp aufwiesen als infiziert selektiert werden und im Vergleich zu Pflanzen ohne dieses Merkmal sowie den übrigen untersuchten Varianten differenziert bonitiert und im Entwicklungsverlauf beobachtet werden. Diese Selektion offenbarte aber keine Auffälligkeiten, die einen, den Konstrukten zuzuschreibenden Effekt vermuten lassen konnten. Ebenso war es nicht möglich Besonderheiten oder Auffälligkeiten in IR-infizierten Pflanzen zu beobachten, wobei hier auch keine Kontrolle über eine Infektion der Pflanzen erfolgt war.

Sequenzvergleiche zwischen den Genfamilien

Sequenzvergleiche zwischen den Genfamilien für Isopentenyltransferasen aus *A. thaliana* (AB062607; AB062609; AB062610; AB062611; AB062608; AB062612; AB062613; AB062614), *B. rapa* (AB186135, AB186134; AB186133; AB186132) sowie *O. sativa* (AA754519; CA754492; CA754502) konnten keine homologen Bereiche identifiziert werden, die größer als ~10 bp waren.
Dieselbe Problematik besteht auch bei Sequenzvergleichen von CKX-Genen. Auch hier sind Daten zu *A. thaliana* in der NCBI-Datenbank verfügbar und zusätzlich einzelne Sequenzen aus *P. sativum* und *S. tuberosum*. Ein Sequenzalignment weißt jedoch eine hohe Sequenzdivergenz aus.
Weiterführende Untersuchungen sollten entsprechend dieser Sequenzunterschiede die Kombination verschiedener kurzer (~ 50 bp) Fragmentabschnitte in Form von Doppelkonstrukten prüfen.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden transgene Expressionsansätze bearbeitet, die das Verhältnis der Phytohormone Auxin und Cytokinin durch eine transiente und temporäre Expression phytobakterieller Hormonmetabolismusgene beeinflussten und in der Brechung der Apikaldominanz resultierten. Dazu wurden im ersten Teil unterschiedlich auf den pflanzlichen Phytohormonhaushalt wirkende phytobakterielle Gene auf ihre Effizienz, Pflanzenentwicklungsmuster zu modulieren in unterschiedlichen Expressionsansätzen analysiert. Neben der phänotypischen Bewertung der erzeugten transgenen Linien wurde auch die Eignung Auxin-induzierbarer Reportergenexpression zur Beobachtung der Auswirkung gerichteter Eingriffe in das Auxin-Cytokinin-Gleichgewicht auf Zellebene geprüft.
Im zweiten Teil der Arbeit wurde mittels eines RNAi-Ansatzes untersucht, die Verwendung phytobakterieller Hormonmetabolismusgene durch pflanzeneigene Gene substituieren zu können. Dafür wurden zunächst die Möglichkeiten eines VIGS-Systems bestimmt und anschließend für die Abschaltung von potenziellen Genen des Cytokininmetabolismus in *Petunia hybrida* verwendet.

5.1. Nutzung bakterieller Phytohormonmetabolismusgene zur gerichteten Beeinflussung pflanzlicher Phänotypen

5.1.1. Erzeugung starker phänotypischer Effekte durch die Nutzung pflanzenviraler Expressionssysteme

Aufgrund eines massiven Eingriffes in den Phytohormonhaushalt der Pflanze, wie er sich durch das hohe Expressionsniveau der pflanzenviralen Expression ergibt, war die Ausbildung deutlicher Phänotypen zu erwarten. Dies konnte jedoch nur bei den untersuchten Synthesegenen von Cytokinin und Auxin beobachtet werden.
Die phänotypischen Merkmale der Expression des bakteriellen Cytokininsynthesegens *ipt* gaben deutliche Hinweise auf eine Cytokininüberproduktion. Dazu gehörten ein gestauchter buschiger Habitus mit einer deutlichen multiplen Sprossbildung an Apikal-und Lateralmeristemen und eine stark ausgeprägte Seneszenzstimulierung. Weiterhin war die Pflanzenhöhe reduziert, die Blätter runder und die Sprossachse verdickt. Analysen der Wurzelentwicklung wurden in Jungpflanzen nicht unternommen, *in vitro*-Sämlinge wiesen jedoch einen nahezu vollständigen Verlust der Wurzelbildung auf. Diese Beobachtungen wiesen

auf stark erhöhte endogene Cytokiningehalte hin. Die Merkmale ähneln den Phänotypen von Cytokinin-überproduzierenden Pflanzenmutanten, wie *amp* in *A. thaliana* (Chaudhury *et al*., 1993) und *sps/bus* in *A. thaliana* (Reintanz *et al*., 2001; Tantikanjana *et al*., 2001), sowie *dad* in *P. hybrida* (Napoli, 1996), die einen buschigen Phänotyp mit verkürzten Internodien und erhöhter Seitenverzweigung aufweisen.

Die Expression des bakteriellen Auxinsynthesegens *iaaH* führte zur Ausbildung deutlicher Blattepinastie, einem Merkmal der Auxinüberversorgung. Es besteht Unklarheit über das Auftreten des zweifaktoriellen Auxinsyntheseweges über die Enzymaktivitäten von Tryptophan-Monooxygenase und Indolacetamidhydrolase in Pflanzen. Dieser wurde bislang nur in Bakterienspezies nachgewiesen (1.2.3.), dementsprechend ist wenig über das Vorkommen des iaaH-Substrates IAM in Pflanzen bekannt. Takahashi *et al*. (1975) konnten IAM in jungen Früchten von *Citrus unshiu* und Saotome *et al*. (1993) konnten IAM in Hypokotylen von *Prunus jamasakura* nachweisen. Weiterhin wurde eine IAM-Hydrolaseaktivität in *Oryza sativa* und *Poncirus trifoliata* (Kawaguchi *et al*., 1991; 1993) beschrieben. Unter Berücksichtigung dieser Informationen wurden die Arbeiten z.T. mit einer zusätzlichen Applikation des synthetischen *iaaH*-Substrates NAM durchgeführt. Inzé *et al*. (1984) und Budar *et al*. (1986) zeigten, dass durch NAM-Applikation auf *iaaH*-Funktionalität selektiert werden kann.

Die Ausprägung der Blattepinastie konnte durch die Applikation von NAM verstärkt werden. Besonders deutlich wurden die Merkmale einer Auxinüberversorgung in den Untersuchungen im *in vitro*-Kultursystem ausgeprägt. Hier konnte die Bildung von Wurzelprimordien und Wurzeln entlang der Sprossachse beobachtet werden, gleichzeitig waren die Epikotyle stark verlängert und die Blätter drastisch verkleinert. Diese Eigenschaften sprachen für eine offensichtliche *iaaH*-Wirkung im Zusammenwirken mit der NAM-Applikation. Der schwächer ausgebildete Phänotyp bei fehlender NAM-Gabe deutet die Limitierung des *iaaH*-Substrates in den untersuchten Pflanzen an, woraus sich das Ausbleiben eines drastischen Auxinüberproduktionsphänotyps erklärt, wie er bei *ipt*-Expression erzeugt werden konnte.

Die Phytohormonmetabolismusgene *iaaL* und *rolC*, sowie das *rolA*-Gen mit unbekannter Funktion resultierten nicht in der Ausbildung deutlicher, den in der Literatur beschriebenen Genfunktionen zuordnungsbaren, phänotypischen Effekten.

Die möglichen Ursachen sind unbekannt. Jedoch wurden ähnliche Beobachtungen bei der Analyse von pflanzlichen Auxinmutanten gemacht. So wurden bislang noch keine Auxin-defizienten Mutanten gefunden (Cohen *et al.*, 2003). Dessen Ursache in einem möglichen letalen Phänotyp einer Auxindefizienz vermutet wird (Estelle & Sommerville, 1987).

Eine Erklärungsmöglichkeit könnte in der fundamentalen Bedeutung von Phytohormonen für die Regulation der pflanzlichen Entwicklung liegen. Dazu unterliegt die Konzentration eines Phytohormons strengen homöostatischen Kontrollmechanismen. Über die Synthese, sowie den Antransport aus anderen Geweben kann die vorliegende Konzentration erhöht werden, wohingegen sie durch den Abtransport, den Metabolismus sowie den Katabolismus verringert werden kann. Molekulargenetische Untersuchungen unterschiedlicher phytohormoneller Regulationsebenen wiesen eine ausgeprägte Redundanz auf Seiten der Metabolismuswege, sowie der beteiligten Enzyme aus (Normanly & Bartel, 1999).

Es wäre denkbar, dass die Phytohormonsynthese den limitierenden Schritt für die Bereitstellung der phytohormonellen Substanz darstellt, wohingegen Metabolismus und Transport über ausreichend Möglichkeiten zur Regulation verfügen, sodass Störungen des Gleichgewichts auf dieser Seite weniger zum Tragen kommen.

Ein anderer wichtiger Aspekt neben der Phytohormonkonzentration ist die Kompetenz des Gewebes reagieren zu können (Trewavas, 1982; Ooms *et al.*, 1991), der in der Erklärung eines ausbleibenden Phänotyps beachtet werden muss. Zur Berücksichtigung dieses Umstandes wurden die Untersuchungen zur pflanzenviralen Expression der bakteriellen Phytohormonmetabolismusgene sowohl an sehr jungen *in vitro*-Sämlingen als auch älteren Jungpflanzen durchgeführt. Die Variation dieses Parameters zeigte jedoch keinen Einfluss auf die phänotypische Merkmalsausprägung nach pflanzenviraler Phytohormongenexpression.

Die Möglichkeit, das die exprimierten Gene aufgrund von Amplifikationsfehlern in der PCR nicht funktionell sind, konnte durch das Ergebnis der Sequenzierung (vgl. Anhang) ausgeschlossen werden. Eine andere Erklärungsmöglichkeit kann in der Genfunktion zu suchen sein.

Die Erwartungen phänotypischer Effekte resultierend aus einer *rolC*-Expression in Pflanzen müssen unter Vorbehalt bewertet werden. Die, dem *rolC*-Genprodukt zugeschriebene *ß*-Glucosidasefunktion konnte bislang nur *in vitro* nachgewiesen werden (Estruch *et al.*, 1991). Der *in planta* Nachweis steht bislang noch aus. Faiss

et al. (1996) konnten aus ihren Untersuchungen schlussfolgern, dass die *rolC*-ß-Glucosidase *in planta* keine Cytokininglukoside hydrolisiert. Diese Beobachtungen wurden gestützt durch die Beobachtung, dass das *rolC*-Genprodukt im Cytoplasma vorliegt, wohingegen Cytokininglukoside in der Vakuole eingelagert sind. Der Wirkungsmechanismus von *rolC* in transgenen Pflanzen ist unbekannt. Die in anderen Arbeiten beobachteten phänotypischen Entwicklungen einer *rolC*-Expression, wie Reduktion des pflanzlichen Längenwachstums und veränderte Ausbildung der Blattmorphologie (Michael & Spena, 1995), konnten in diesen Expressionsanalysen nicht erzielt werden.

Zusätzlich kann für das in dieser Arbeit untersuchte Expressionssystem eine Interferenz des erzielbaren Phänotyps mit den Symptomen der pflanzenviralen Infektion als Ursache vermutet werden.

Bezüglich des ausstehenden *rolA*-Phänotyps kann eine Erklärung in der Überschneidung pflanzenviraler Symptome und *rolA*-Effekte liegen. Die 35S-*rolA* Expression resultierte in der Reduktion des Pflanzenwuchses aufgrund verkürzter Internodien, sowie hochgradig faltiger und runzliger Blätter (Schmülling *et al.*, 1988; Sinkar *et al.*, 1988; Sun *et al*., 1991; Dehio *et al.*, 1993). Ähnliche Symptome wurden von der PVX-Infektion in *N. benthamiana* verursacht. Zur Überprüfung dieser Erklärung müsste die *rolA*-Expression von unterschiedlichen viralen Vektoren untersucht werden.

Die Expression eines phytobakteriellen Gens durch unterschiedliche pflanzenvirale Vektoren wurde jedoch nur für die *ipt*-Expression in dieser Arbeit durchgeführt, um die prinzipielle Eignung des Expressionsansatzes zu zeigen und den Nachweis zu erbringen, dass die erzielbaren Phänotypen unabhängig vom verwendeten viralen Vektor sind.

5.1.2. Möglichkeiten transienter pflanzenviraler Expressionssysteme

Transiente Genexpressionssysteme stellen gegenüber der Erzeugung stabiler transgener Pflanzen eine Alternative dar, die vor allem in der Schnelligkeit und methodisch-leichten Durchführung sowie der erzielbaren Resultate liegen können.

Die in dieser Arbeit für die Beeinflussung pflanzlicher Entwicklungsmuster benutzten phytobakteriellen Hormonmetabolismusgene sollten zunächst in einem transienten Expressionsassay auf ihr Potenzial phänotypische Veränderungen zu induzieren, kontrolliert werden, bevor sie für die *Agrobakterium* - vermittelte

Pflanzentransformation eingesetzt wurden. Dieses transiente Genexpressionssystem sollte sich in erster Linie über Eigenschaften wie ein zeitlich schnell durchführbares und methodisch einfach auf verschiedene Pflanzenspezies anwendbares Versuchsdesign, sowie ein hohes Expressionsniveau charakterisieren. Vor diesem Hintergrund wurden pflanzenvirale Expressionsvektoren als Möglichkeit eines starken, systemischen, aber temporären Expressionssystems untersucht. Wie Scholthof *et al*. (1996) ausführten, kann durch die Nutzung autonom replizierender pflanzenviraler Vektoren ein hohes Maß an transienter Genexpression erzielt werden, zusätzlich kann die Virusinfektion in ausgewählten pflanzlichen Entwicklungsstadien erfolgen und bietet damit für das Versuchsdesign variable Möglichkeiten. Durch die Wahl unterschiedlicher Inokulationszeitpunkte kann eine differenzielle Gewebesensitivität untersucht werden. Dies ist in besonderem Maß für die zu untersuchenden Phytohormongene von Bedeutung, da sie durch ihre grundlegende Funktion im pflanzlichen Phytohormonmetablismus zu pleiotropen, u.U. letalen Phänotypen führen können. Als wesentliche Voraussetzung die Möglichkeiten einer pflanzenviralen Expression nutzen zu können, ist das Vorliegen einer kompatiblen Wirt-Virus-Interaktion zu nennen.

Einen hinsichtlich der Beurteilung resultierender Effekte wichtigen Aspekt stellt die Symptombildung der Virusinfektion an den Wirtspflanzen dar. Diese können von leichten Mosaiksymptomen auf den Pflanzenblättern bis zu starken Scheckungen ausgeprägt sein, beinhalten aber auch Blattdeformationen, Pflanzenstauchungen und Wuchsdeformationen. Dieser Aspekt war von besonderer Bedeutung für die durchgeführten Genfunktionsanalysen, da die Bewertung der Ergebnisse der Phytohormongenexpression anhand der visuell leicht erfassbaren phänotypischen Beeinflussung der Pflanzenentwicklung erfolgte.
Deshalb wurden den phänotypischen Analysen der transienten Phytohormongenexpression Untersuchungen zur Infektion und Symptombildung von *N. benthamiana, N. tabacum* und *P. hybrida* mit *gfp*-exprimierenden PVX- und TRV-Vektoren vorangestellt. Dabei bestätigten sich zunächst die Beobachtungen von Liu *et al*. (2002b), die die Ausbildung einer hypersensitiven Reaktion in dem Pathosystem TRV-*N. tabacum* anmerkten, woraus sich eine Verwendung als pflanzenviraler Expressionsvektor für Tabak ausschließt. Weiterhin wurde in diesen Untersuchungen eine verzögerte, sehr langsam verlaufende Infektion von *P. hybrida*

sowohl mit PVX als auch TRV anhand der ermittelten *gfp*-Expression beobachtet. Während bereits sieben Tage nach Infektion der *N. benthamiana* Pflanzen eine systemische Ausbreitung der viralen Infektion festgestellt werden konnte, setzte diese in *P. hybrida* erst nach 14 Tagen ein. Dies lässt Vermutungen bezüglich einer geringeren viralen Replikationsrate oder langsameren viralen Ausbreitung in der Pflanze und sich daraus ergebenden geringeren Bildung rekombinanten Proteins in *P. hybrida* im Vergleich zu *N. benthamiana* zu, wie sie von Dawson *et al*. (1988) und Takamatsu *et al*. (1987) beschrieben wurden. Diese Hypothese wurde jedoch nicht in weiteren Analysen, wie z.B. ELISA oder Western Blot untersucht.

Für den in dieser Arbeit verwendeten PVX-basierten Expressionsvektor konnte die Eignung zur heterologen Expression resultierend in einem hohen, jedoch nicht regulierbaren Expressionsniveau gezeigt werden (Chapman *et al*., 1992; Hammond-Kosack *et al*., 1995). Dabei ergaben sich jedoch aufgrund der auf Verdoppelung des PVX-Hüllproteinpromotors basierenden Expression Instabilitäten der heterologen Konstrukte, die aus homologen Rekombinationsereignissen resultierten (Chapman *et al*., 1992; Baulcombe *et al*., 1995; Rommens *et al*., 1995; Hammond-Kosack *et al*., 1995). Der Anspruch an eine höhere Stabilität rekombinanter pflanzenviraler Expressionskonstrukte kann durch das Ersetzen der duplizierten Promotorsequenz durch eine eines verwandten Virus realisiert werden (Donson *et al*., 1991). Diese Konstruktstrategie lag in dem verwendeten TRV-basierten Expressionsvektor vor. Die Versuche zur *gfp*-Expression zeigten jedoch keine deutlichen visuell erkennbaren Unterschiede bezüglich Expressionsdauer, -stärke oder –muster zwischen TRV- und PVX-Vektor in *N. benthamiana* und *P. hybrida* und stellten damit eine Eignung beider Vektoren für die Genfunktionsanalysen heraus.

Eine andere Ursache für Konstruktinstabilitäten liegt in der zusätzlich in das Virusgenom eingefügten Gen-Insertion, deren Größen Schwierigkeiten bei der Virusverpackung und Enkapsidierung hervorrufen können. Nach Gleba *et al*. (2004) werden jedoch Geninsertionen bis zu 1,7 kb vom Virus toleriert. Damit stellten die pflanzenviral exprimierten bakteriellen Phytohormon-Metabolismusgene, deren Größe zwischen 0,3 und 1,4 kb lag, keine Schwierigkeit für die Virusstabilität dar.

Deutliche Unterschiede bezüglich der Symptomausprägung ergaben sich in den unterschiedlichen Versuchspflanzen in Abhängigkeit von dem verwendeten pflanzenviralen Vektor. PVX verursachte in *N. benthamiana* Blattchlorosen, Blattdeformationen und Wuchsstauchungen. Mildere Symptome wurden in *P. hybrida*

erzeugt, wo lediglich starke Mosaiksymptome beobachtet wurden. In *N. tabacum* konnten wiederum nur leichte Mosaiksymptome bonitiert werden. Im Gegensatz dazu verursachte die Verwendung des TRV-Vektors sowohl in *N. benthamiana* als auch *P. hybrida* keine phänotypisch deutlichen Beeinträchtigungen der Pflanzen. Diese Untersuchungen ließen den Schluss zu, dass bei der Nutzung dieser pflanzenviralen Expressionsvektoren eine Differenzierung phänotypischer Veränderungen durch eine pflanzenvirale Phytohormongenexpression von Symptomen der Virusinfektion möglich ist.

Doch trotz der im vorausgegangenen Abschnitt diskutierten erfolgreichen Erzeugung starker Phänotypen mit diesem transienten pflanzenviralen Expressionssystem eignet sich dessen Anwendung nur für den generellen Nachweis der Genfunktionalität. Eine Nutzung zur gezielten phänotypischen Beeinflussung der Pflanzenentwicklung im gärtnerischen Gebrauch stehen Einwände auf Seiten des Expressionssystems entgegen. Denn Pflanzenviren sind grundsätzlich zunächst als Pflanzenpathogene anzusehen und die Gefahr einer unerwünschten Verbreitung ist in besonderem Maß bei mechanisch-übertragbaren Pflanzenviren mit großem Wirtspflanzenkreis gegeben. Zudem stellen rekombinante Pflanzenviren S2-Konstrukte dar und unterliegen gentechnischen Sicherheitsbestimmungen. Weiterhin bleibt die Instabilität des Expressionskonstruktes ein wichtiger kritischer Punkt. Aber auch die nicht zu regulierende Expressionsstärke stellt eine Anforderung an das Virusisolat. Milde Isolate, die hohe Virustiter in Pflanzen bei gleichzeitig schwacher Symptomauslösung eignen sich besonders für die Nutzung. Auf der anderen Seite besteht ein Anspruch an das zu exprimierende habitusbeeinflussende Fremdgen. Die Erzeugung unerwünschter pleiotroper Effekte, wie sie sich aus der Nutzung phytohormoneller Gene ergeben könnten, zeigt die Notwendigkeit der Verwendung von Genen mit bekannten Funktionen und Wirkungsspektren.

5.1.3. Nutzung eines Ethanol-induzierbaren Expressionssystems zur konditionellen Beeinflussung der Phytohormonhomöostase

Die Expression von Phytohormonmetabolismusgenen bakteriellen Ursprungs zur Modulation pflanzlicher Entwicklungsprozesse wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Hamill, 1993; Napoli & Klee, 1993; Klee & Romano, 1994; Gaudin *et al.*, 1994; Hedden & Phillips, 2000). Dabei wurde deutlich, dass

aufgrund der großen regulatorischen Funktion von Phytohormonen in der Steuerung der pflanzlichen Entwicklungsprozesse eine kontrollierte Expression von Genen des Phytohormonmetabolismus nötig ist, um eine ungewollte negative Beeinflussung von nicht Ziel-Entwicklungsmustern zu vermeiden. Vorangegangene Untersuchungen zeigten wiederholt, das die Expression von bakteriellen Phytohormonmetabolismusgenen unter Kontrolle der nativen Promotoren oder des konstitutiven 35S-Promotors in einer heterologen Expression resultiert, die neben den erwarteten Genwirkungen zu pleiotropen Effekten führte. So konnten in Untersuchungen von Smigocki & Owens (1988, 1989) durch 35S- *ipt*-Expression deutlich erhöhte Cytokiningehalte mit korrespondierenden verringerten Konzentrationen von Auxin beobachtet werden, die in dramatischen phänotypischen Entwicklungsveränderungen resultierten. Dazu gehörten die Brechung der Apikaldominanz, der Verlust der Wurzelbildung mit einhergehender Kallusbildung an der Sprossbasis, eine Verzwergung der Pflanzen, sowie einer Blattbildung, die kein Expansionswachstum aufwies. Eine Transformation mit 35S-*ipt* und anschließender *in vitro*-Selektion von Regeneraten erwies sich als schwierig aufgrund der starken endogenen Cytokininsynthese, die eine Wurzelbildung der transgenen hochverzweigten nicht-elongierenden Sprossregenerate verhinderte (Klee *et al*., 1987). Weniger dramatische, aber ebenfalls nicht-kontrollierbare phänotypische Beeinflussungen wurden durch die konstitutive *iaaL*-Expression erzeugt (Spena *et al*., 1991; Romano *et al*., 1995). Die darin, durch eine signifikante Reduktion der Auxingehalte, erzeugten Habitusmerkmale (Klee & Lanahan, 1995), wie reduziertes Wurzelwachstum, erhöhte Seitentriebbildung und verringerte Apikaldominanz, traten über den gesamten pflanzlichen Entwicklungszeitraum auf und erwiesen sich damit für eine gezielte Wachstumsbeeinflussung als ungeeignet. Eine ähnliche, mit deutlich negativen Eigenschaften verbundene konstitutive Expression bakterieller Phytohormongene wurde auch bei der Expression der Auxinsynthesegene *iaaM/iaaH* (Klee *et al*., 1987; Sitbon *et al*., 1991, 1992 und Romano *et al*., 1993), sowie der aus *A. rhizogenes* stammenden *rolA*- (Guivarc'h *et al*., 1996; Nilsson & Olsson, 1997) und *rolC*-Gene (Michael & Spena, 1995) beobachtet.

Diese mit der starken Expression durch konstitutive Promotoren verbundene, deutliche Beeinflussung der pflanzlichen Hormonbalance einhergehende negative Interferenz der Pflanzenentwicklung könnte jedoch durch eine geeignete Promotorwahl umgangen werden (Rotino *et al*., 1997). Dazu eignen sich

grundsätzlich induzierbare Expressionssysteme, die jedoch verschiedenen Anforderungen genügen müssen. Dazu zählen u.a. eine nicht nachweisbare Basalexpression, eine hohe Spezifität und leichte Applizierbarkeit des Induktors, sowie eine dynamische und schnelle Expression (Gatz, 1997; Zuo & Chua, 2000; Padidam, 2003). Die Verwendung unterschiedlicher Systeme zur induzierbaren oder lokalen Expression von bakteriellen Phytohormongenen zeigte die Möglichkeiten auf, die daraus für eine gezielte Beeinflussung von pflanzlichen Entwicklungsmustern resultieren können. Eine Vielzahl der bislang untersuchten Systeme zur regulierten Fremdgenexpression konnte die Gesamtheit der gestellten Anforderungen jedoch nur zum Teil erfüllen, wobei immer wieder einzelne Schwierigkeiten der verwendeten Expressionssysteme offensichtlich wurden. In einigen Beispielen verhindert der verwendete Induktor die Eignung des Regulationssystems über die grundlagenwissenschaftliche Anwendung hinaus z.B. für einen Einsatz im großflächigen landwirtschaftlichen oder gartenbaulichen Anbau. In diese Gruppe fallen verschiedene Tetrazyklin-aktivierende und -reprimierende Systeme (Gatz *et al*., 1992; Weinmann *et al*., 1994; Love *et al*., 2000), der Kupfer-induzierbare Promotor (McKenzie *et al*., 1998), sowie das Dexamethason-induzierbare Glucocorticoid-basierende Expressionssystem (Aoyama & Chua, 1997). Ein anderes Problem stellte die auftretende Basalaktivität des Promotorsystems in Abwesenheit des Induktors dar, welches van Loven *et al*. (1993) bei der Nutzung des Hitzeschock-induzierbaren Promotors HSP70 beschrieben oder Martinez *et al*. (1999) bei der Charakterisierung des Ecdysone-induzierbaren Expressionssystems anmerkten.

Dem in dieser Arbeit benutzten Ethanol-induzierbaren System wurden nach den von Caddick *et al*. (1998) und Salter *et al*. (1998) gezeigten charakterisierenden Analysen die Eigenschaften einer minimalen Basalaktivität, einer schnellen reversiblen Induktionskinetik, sowie die Möglichkeit der Regulation von Expressiondauer und -niveau über die Induktorapplikation nachgewiesen. Diese Merkmale konnten durch Anwendung dieses Expressionssystems zur transkriptionellen Kontrolle phytohormoneller Gene in dieser Arbeit bestätigt werden. Craft *et al.* (2005) und Samalova *et al.* (2005) weisen in ihren Untersuchungen zur Charakterisierung des Glucocorticoid- und Dexamethason-abhängigen Expressionssystems die hohe Sensitivität einer *ipt*-Expression für die Pflanzenentwicklung aus.

Die Untersuchungen der Expressionseigenschaften, in den in dieser Arbeit erzeugten induzierbaren transgenen Linien anhand der erstellten Reportergenlinien alcA-gfp7

und alcA-gfp10, bestätigten durch epifluoreszenzmikroskopische und transkriptionelle Untersuchungen die nicht - nachweisbare Basalaktivität und schnelle Induktionskinetik. Weiterhin erfüllt das System die von Schaarschmidt *et al*. (2004) geforderte Variabilität in der Art der Induktorapplikation, wie die Untersuchungen von Caddick *et al*. (1998), Salter *et al*. (1998), Sweetmann *et al*. (2002), sowie die in den hier vorliegenden Untersuchungen angewendeten *in vitro*- und Gießwasserinduktionen zeigten. Dass dieses Expressionssystem sich zur gezielten phytohormonellen Modulation, resultierend in phänotypischen Effekten eignet, konnte durch die Versuche von Ait-ali *et al.* (2003) gezeigt werden. Die Autoren konnten durch Ethanol-induzierbare Expression des *gai*-Gens aus *A. thaliana* den pflanzlichen Gibberellinhaushalt modifizieren und Pflanzenstauchungen induzieren. Die Eignung des alcA-Systems zur gerichteten Modulation des Auxin-Cytokinin-Verhältnisses in der Pflanze konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit nachgewiesen werden. In den durchgeführten Analysen zeigte sich bereits bei der *Agrobakterium*-vermittelten Transformation von Tabak (4.2.) eine minimale Basalexpression, die nicht zu einer negativen Interferenz der *in vitro*-Regeneration mit den Anforderungen an das sterile Arbeiten (Oberflächensterilisation von Arbeitsmaterial und -platz mit Ethanol) führte. Inwiefern eine minimale Basalexpression einen Einfluss auf die Regenerationsrate hatte, bleibt spekulativ. Auffällig ist bei Betrachtung der aus den drei unabhängigen Transformationen hervorgegangenen Transformanden, die leicht erhöhte Transformationsrate bei den *ipt*- und *iaaL*-Konstrukten im Vergleich zur DR5-gfp und alcA-gfp-Kontrolle, sowie die deutlich niedrigere Transformationsrate bei den verwendeten *rol*-Konstrukten.

Jedoch konnten auch in den späteren Untersuchungen der erzeugten transgenen Linien keine negativen Einflüsse auf die pflanzliche Entwicklung bemerkt werden. Nicht-induzierte Kontrollen wiesen immer einen nicht unterscheidbaren Habitus von nicht-transgenen Kontrollen auf.

Einzig die später im Detail diskutierte Beobachtung der Blattschäden an *ipt*-induzierten Pflanzen wies auf Grenzen in der Anwendung von Ethanol als Induktor des alcA-Systems hin, die jedoch durch das zur Verfügung stehende breite Spektrum von Induktoren, wie die Arbeiten von Junker *et al.* (2003) zeigten, umgangen werden können.

5.1.4. Genetische und physiologische Charakterisierung der erzeugten Linien

Mit *Agrobakterium*-vermitteltem Gentransfer steht eine Methode zur genetischen Transformation von Pflanzen zur Verfügung, die bei Vorliegen eines etablierten Transformations- und Regenerationsprotokolles für eine verhältnismäßig routinierte Erzeugung von Transgenen benutzt werden kann. In dieser Arbeit wurde diese Technik verwendet um sieben unterschiedliche transgene Linien zu erzeugen (4.2). Ein Merkmal des *Agrobakterium*-vermittelten Gentransfers ist die Übertragung der T-DNA von der rechten zur linken Integrationsgrenze. Weil die Integration der T-DNA in das Pflanzengenom auf der Seite der rechten Integrationsgrenze präziser erfolgt als auf der linken Seite (Holsters *et al*., 1983; Zambryski *et al*., 1982, Deroles & Gardner, 1988) sollte der Selektionsmarker an der linken Integrationsgrenze lokalisiert sein. Diese Strategie verhindert das Auftreten marker-resistenter Regenerate, die aufgrund eines Abbruchs bei der T-DNA-Übertragung nur den Selektionsmarker enthalten und dient damit als Kontrolle über die vollständige Integration der gesamten T-DNA. Dies war jedoch im Rahmen der Klonierungsstrategie zur Erstellung der binären Transformationsvektoren nicht zu realisieren, sodass aufgrund der zur Verfügung stehenden Restriktionsschnittstellen der Kanamycin-Selektionsmarker an der rechten Integrationsgrenze angeordnet war. Das Ethanol-induzierbare Phytohormongenelement musste an der linken Integrationsgrenze positioniert werden. Damit war es nicht möglich im *in vitro*-Regenerationsprozess auf Vollständigkeit der T-DNA Integration zu selektieren, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass insbesondere aufgrund der mittleren Größe der zu übertragenden T-DNA von 11 kb ein Teil der erzeugten Linien eine unvollständige Insertion aufweist.

Die einzelnen selektierten transgenen Linien wurden unter Verwendung der PCR auf die Integration aller Segmente des Transformationskonstruktes sowohl in der T_0 als auch der T_1-Generation analysiert. In diesen Untersuchungen war es trotz unterschiedlicher unternommener Versuche zur Optimierung der Parameter wie Primer, Annealingtemperatur und eingesetzte Nukleinsäureprobe nicht möglich, den transgenen Status in allen erzeugten Linien zu bestimmen. In drei Phytohormongenlinien, den *rolA*-, *rolC*- und *iaaH*-Linien konnte das Ethanol-induzierbare Element sowohl mit dem universellen Primerpaar alcA/T-NOS, welches ein Fragment mit Teilen des alcA-Promotors als auch der NOS-Termination

amplifizieren sollte, wie auch mit Phytohormongen-spezifischen Primern kein Amplifikat erzielt werden (4.2.3.). Zu diesen genomischen Analysen muss angemerkt werden, dass diese nur an 2-3 Linien je Konstrukt durchgeführt wurden, die über eine Insertion des Transformationskonstruktes verfügten. Aufgrund der möglichen Instabilitäten, die sich aus Mehrfachinsertionen der T-DNA ergeben können, wurde auf eine weitergehende Analyse dieser Linien von Beginn an verzichtet. Dadurch ist keine Aussage darüber möglich, inwieweit PCR-Analysen in Linien mit Mehrfachinsertionen zu einem möglichen Nachweis für die Eignung der einzelnen methodischen Parameter (Primer, Programm, Nukleinsäureextrakt) der durchgeführten PCR zu empfehlen waren. Jedoch kann aus den Analysen, die das universelle Primerpaar alcA/T-Nos verwendeten und in den alcA-ipt- und alcA-iaaL-Linien sowie alcA-gfp-Linien zu einem spezifischen PCR-Produkt führten ein methodischer Fehler ausgeschlossen werden. Vielmehr muss aufgrund dieses Ergebnisses die Ursache für den ausstehenden Nachweis der transgenen Konstitution einiger erzeugter Linien an anderer Stelle vermutet werden.

Die Bestimmung der Anzahl von T-DNA-Insertionen erfolgte anhand des Aufspaltungsverhältnisses von Kanamycin-sensitiven und –resistenten Sämlingen der T_1-Generation. Dabei konnten für nahezu alle erzeugten transgenen Linien eine Vererbung der transgenen Eigenschaften nach den Mendelschen Regeln nachgewiesen werden (Feldmann *et al*., 1997). Unabhängig von dem für die Transformation eingesetzten Konstrukt wurden in der Mehrzahl Einzelinsertionen bestimmt. Dies stellt einen Vorteil der genutzten *Agrobakterium*-vermittelten Transformation gegenüber biolistischen Transformationstechniken dar (Crouzet & Hohn, 2002; Herrera-Estrella *et al*., 2005).

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit des erzeugten transgenen Materials wurden mit der T_1-Generation durchgeführt, die die Möglichkeit aufweist, stabil transformierte Pflanzen anhand oben diskutierter Selektionsmarkeraufspaltung und genomischer PCR-Analyse nachzuweisen. Ein Nachteil der Arbeiten mit der T_1-Generation liegt darin, dass diese sich aus homozygoten und heterozygoten Pflanzen zusammensetzt. Dies kann u.U. Ursache einer erhöhten Streuung/Varianzheterogenität sein und ein Erklärungsansatz für die geringen statistisch-signifikanten Differenzen der Datenerhebung unter 4.2.4.2. trotz visueller morphologischer Unterschiede darstellen.

Analysen zur phänotypischen Beeinflussung von pflanzlichen Entwicklungsmustern durch Expression der übertragenen Gene wurde zunächst in einem *in vitro*-Kultursystem durchgeführt, welches definierten gleichmäßigen Kulturbedingungen unterliegt und im Gewächshaus auftretende schwankende Umweltbedingungen ausschließt.

Trotz des ausstehenden Nachweises der Transgenität auf genomischer Ebene in den *rolA*-, *rolC*- und *iaaH*-Linien wurden Untersuchungen zur physiologischen Leistungsfähigkeit der unterschiedlichen Phytohormon-Metabolismusgen tragenden Tabaklinien mit allen erzeugten Linien durchgeführt.

Diese Versuche sollten in einem *in vitro*-Kultursystem die Eigenschaft der unterschiedlichen Linien aufzeigen, durch endogene Beeinflussung des Auxin-Cytokinin-Verhältnisses eine exogene Applikation von synthetischen Pflanzenwachstumsregulatoren im Kulturmedium substituieren zu können. Dieser Versuch basierte auf den Beobachtungen von Skoog & Miller (1957), die zeigen konnten, dass die Bildung von Adventivorganen am Pflanzengewebe durch das Verhältnis der Phytohormone Cytokinin und Auxin bestimmt wird. Die Autoren beobachteten, dass ein Cytokinin-betontes Phytohormonverhältnis im Kulturmedium die Sprossbildung fördert, wohingegen Auxin-betonte Bedingungen die Wurzelbildung fördern. Die Annahme, dass sich diese Regenerationsereignisse auch aus endogenen Verschiebungen der Auxin-Cytokinin-Balance ergeben können, kann aus den Beobachtungen an Pflanzentumoren, die nach einer Infektion mit unterschiedlichen *Agrobacterium*-Spezies gebildet wurden, geschlossen werden. Diese Tumorzellen wiesen eine Phytohormonautonomie auf. Messungen der Phytohormonkonzentrationen im Tumorgewebe und die Tumormorphologie zeigten eine Korrelation mit den Beobachtungen von Skoog & Miller (1957) bezüglich des morphogenen Potenzials in Abhängigkeit vom Phytohormonverhältnis (Amasino, 1982; Akiyoshi, 1983).

Es konnte jedoch nur bei Induktion der Cytokininsynthese durch *ipt*-Expression die Bildung von Adventivsprossen auf hormonfreiem MS-Kulturmedium erzielt werden. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen Smigocki & Owens (1988, 1989), die zeigen konnten, dass die Expression der bakteriellen Isopentenyltransferase bei der Transformation von Pflanzenzellen die Morphogenese jener Pflanzenzellen durch eine endogene Erhöhung des Cytokinin-Auxin-Verhältnisses induzieren kann. Zuvor zeigten jedoch bereits Spena *et al*. (1987) morphologische Veränderungen an

Blattscheiben bei der Expression von unterschiedlich kombinierten *rol*-Genen. In diesen Versuchen ergab sich jedoch eine Abhängigkeit des Regenerationsergebnisses von der Expressionsstärke und der Pflanzenspezies, so resultierte die *rolC*-Transformation an Kalanchöe-Explantaten in einer Adventivwurzelregeneration, wohingegen Tabakexplantate reaktionslos blieben.
Aufgrund dieser Beispiele aus der Literatur für das regenerative Potenzial, welches sich aus der Expression phytobakterieller Gene ergab, musste davon ausgegangen werden, dass die regenerative Inkompetenz des transgenen Materials unter den in 4.2.3.3. beschriebenen Bedingungen entweder mit dem zuvor bereits angesprochenen ausstehenden Nachweis der transgenen Konstitution einzelner Linien zusammenhing oder aber die Gründe im Versuchsdesign zu suchen waren. Bei letzterem kamen zunächst Überlegungen bezüglich des Expressionssystems in Betracht, doch wie unter 4.2.3.2. gezeigt, waren die gewählten Induktionsbedingungen ausreichend, eine *gfp*-Expression für mehrere Tage zu induzieren. Bei der Übertragung dieses Ergebnisses auf die transiente Expression von Genen des Phytohormonmetabolismus muss jedoch berücksichtigt werden, dass dies einen Eingriff in die phytohormonelle Balance des Pflanzengewebes darstellt und von Seiten der Pflanze regulatorische Mechanismen greifen, um diese Balance wiederherzustellen und aufrecht zu erhalten. Dementsprechend ist u.U. ein anderes Ethanol-Induktionsschema nötig, um regenerative Ereignisse zu erzielen. Die prinzipielle Möglichkeit eine *ipt*-Expression als Selektionsmarker nutzen zu können, wurde jedoch von Kunkel (1999) unter Verwendung des Dexamethason-induzierbaren Expressionssystems gezeigt. Die Eignung weiterer Phytohormonmetabolismusgene aus unterschiedlichen Agrobakterienspezies als Selektionsmarker zeigten Ebinuma *et al*. (2005). Sie wiesen damit nach, dass die Substituierung von Pflanzenwachstumsregulatoren im Kulturmedium durch eine *in planta* Modulation der Phytohormonhomöostase in transformierten Pflanzenzellen möglich ist. Dies konnte mit der Ethanol-induzierbaren Expression dieser phytobakteriellen Hormonmetabolismusgene erst unter Verwendung von Kulturmedien unterschiedlicher phytohormoneller Konzentration gezeigt werden, die die regenerative Fähigkeit des untersuchten Gewebes unterstützen sollte und möglicherweise dem Erreichen eines „Schwellenwertes“ zur Induktion von Adventivorganen förderlich war. Diese Erklärungsmöglichkeiten stellen jedoch nur Hypothesen für den beobachteten additiven Effekt aus

Pflanzenwachstumsregulatoren im Kulturmedium und *in planta* Modulation der Auxin-Cytokinin-Balance dar, für die sich bislang keine unterstützenden Untersuchungen in der Literatur finden lassen.
Schlussfolgernd lässt sich zusammenfassen, das aus dem zur physiologischen Charakterisierung der erzeugten transgenen Linien unternommenem Regenerationsversuch an *in vitro*-Blattscheiben erste Anhaltspunkte für deren Leistungsfähigkeit lieferte. Diese sind jedoch aufgrund der ausstehenden Ergebnisse auf Seiten der Bestimmung der genomischen Konstitution des transgenen Materials nur als Hinweis für eine erste Einschätzung der Befähigung des erzeugten transgenen Materials Einfluss auf pflanzliche Entwicklungsprozesse nehmen zu können, anzusehen. Weitere Analysen, wie z.B. Southern Blot-Untersuchungen der Tabaklinien sowie Northern Blot-Analysen des Expressionsverhaltens der induzierten Transgenexpression, müssen den genauen Status des erzeugten Tabakmaterials verifizieren und bestätigen. Diese Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität könnten weiterhin Informationen liefern, inwiefern Positionseffekte des transgenen Insertionsortes einen Einfluss auf die Expressionsrate nehmen.

5.1.5. Untersuchungen zur Beeinflussung der Pflanzenentwicklung in ausgewählten transgenen Linien

Aus den Ergebnissen der genomischen PCR-Analysen und den Untersuchungen zu phänotypischen Effekten an transgenen Blattscheiben nach Ethanolinduktion wurde eine Auswahl aus den vorhandenen sieben unterschiedlichen transgenen Linien für die weitere Charakterisierung in vertiefenden Untersuchungen getroffen.
Darin sollte das Potenzial der ausgewählten Habituslinien die Apikaldominanz und den Habitus durch kontrollierte Expression in ausgewählten Entwicklungsstadien gezielt zu beeinflussen, bestimmt werden. Für diese Untersuchungen wurden die alcA-ipt- und alcA-iaaL-Linien, sowie als Kontrolle für die Induktionsbedingungen die alcA-gfp-Linien ausgewählt. Durch diese Auswahl sollte ein Vergleich von zwei unterschiedlichen Wirkungsmechanismen, Reduktion freier Auxingehalte durch *iaaL*-Expression und Steigerung der Cytokininsynthese durch *ipt*-Expression, bezüglich der Möglichkeiten pflanzliche Entwicklungsmuster zu beeinflussen, ermöglicht werden. Der Mechanismus der Regulation der Apikaldominanz ist nicht bekannt. Untersuchungen zu den beteiligten Faktoren haben aber die Bedeutung von Auxin

und Cytokinin, sowie ihres relativen Verhältnisses zueinander als einen Bestimmungsfaktor für die Ausprägung der Apikaldominanz herausgestellt. Dabei reprimiert Auxin das Wachstum von Seitenknospen, wohingegen eine Steigerung der Cytokiningehalte in einer erhöhten Seitenverzweigung resultiert (siehe Einleitung).

Die Untersuchungen wurden in zwei unterschiedlichen Kultursystemen (*in vitro, ex vitro*) durchgeführt, die bezüglich der Induktoraufnahme sowie der beeinflussten pflanzlichen Entwicklungsstadien variierten. Beobachtungen zur Phytohormonsensitivität des Gewebes, die einen Parameter der Phytohormonwirkung darstellt, zeigten, dass diese vom Entwicklungsstadium, Pflanzengewebe, Gewebealter und Umwelteinflüssen abhängig sein kann (Davies, 1995). In dem genutzten *in vitro*-Kultursystem wurde die Einflussnahme auf die junge Sämlingsentwicklung analysiert. Die Kulturgefäße stellen ein geschlossenes System dar, in dem aufgrund der hohen Luftfeuchtigkeit keine Abschlussgewebe ausgebildet werden, wodurch der Induktor über die gesamte Pflanzenoberfläche aufgenommen werden kann. Es ist davon auszugehen, dass dadurch die Expression des Phytohormonmetabolismusgens zum Zeitpunkt der Induktion in der gesamten Pflanze einsetzte. Demgegenüber erfolgte die Induktion der Jungpflanzen im Gewächshaus über das Gießwasser. Der Induktor musste erst durch die Pflanzen transloziert werden, welches möglicherweise in einem Expressionsgradienten resultiert. Den Einfluss des Pflanzenentwicklungsstadium verdeutlichten die Untersuchungen von Ooms & Lenton (1985) und Schmülling *et al*. (1989), die zeigten, dass *ipt*-transgene Sprosse aufgrund ihrer Unfähigkeit zur Wurzelbildung nicht lebensfähig waren, aber durch Pfropfung auf nicht-transgene Wurzelstöcke „gerettet“ werden konnten. Diese Beispiele könnten einen Erklärungsansatz liefern für die in den *ipt*-Linien beobachteten dramatischen Phänotypentwicklungen in den Sämlingsanalysen. Wobei als zusätzlicher Punkt berücksichtigt werden muss, dass in allen in dieser Arbeit untersuchten Expressionssystemen *ipt*-Effekte im Vergleich zu den übrigen verwendeten phytobakteriellen Hormonmetabolismusgenen deutlich stärker hervortraten.

Im Hinblick auf die untersuchten Genwirkungen von *ipt* und *iaaL* wurde bereits in diesen *in vitro*-Versuchen deutlich, dass die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen eine differenzielle Induktionsstrategie benötigen, um die „Zieleffekte“ zu erreichen. Diese Beobachtung wurde in den anschließenden

Gewächshausversuchen bestätigt. Dies kann mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen des verwendeten Genmaterials zusammenhängen.

Die Ethanolinduktion führte in den *ipt*-Linien zu einem reduzierten Wachstum der Hauptsprossachse zugunsten einer gesteigerten Bildung von Seitentrieben resultierend in einer Reduktion der Pflanzengröße. Die Wurzelbildung war reduziert im Vergleich mit nicht-induzierten Kontrollpflanzen. Die wiederholte *ipt*-Induktion bewirkte weiterhin eine massive Verstärkung der Blattaderentwicklung, sowie die Ausbildung von Symptomen starker Seneszenz. Diese Beobachtung phänotypischer Merkmale zeigte die Steigerung der endogenen Cytokiningehalte auf und wies darauf hin, dass homöostatische Regulationsmechanismen, wie die Cytokinin-induzierte Cytokininoxidase (Motyka *et al*., 1996) die massive Störung des Gleichgewichtes nicht regulieren konnte.

Damit zeigte sich die Möglichkeit durch Erhöhung der Cytokininsynthese die Apikaldominanz in Tabak zu brechen und die Lateralverzweigung zu erhöhen. Jedoch werden bei Betrachtung der Ergebnisse auch ungewollte Nebeneffekte deutlich, die sich aus dieser Habitus-beeinflussenden Strategie ergaben. Diese Effekte wiesen zum einen auf die Funktionen von Cytokinin hin und zum anderen auf in Wechselwirkung mit Cytokinin stehende andere Phytohormone (Auxin, Ethylen).

Dies wurde auch an der massiven Reduktion der Wurzelbildung sichtbar. Gerade aus diesem Merkmal ergeben sich Beeinträchtigungen für die gesamte Pflanzenentwicklung. Denn zum einen ergaben sich durch den deutlichen Wurzelverlust Probleme mit dem Halt der Pflanzen, da sie die Verankerung im Boden verloren. Und zum anderen wurden Behinderungen in der Nährstoff- und Wasserversorgung der Pflanzen deutlich. Während dabei die Nährstoffversorgung einen über Kulturmaßnahmen korrigierbaren Parameter darstellt, zeigte sich an den Schädigungen des Blattapparates in *ipt*-exprimierenden Pflanzen die Folgen einer Wasserunterversorgung. Diese Schädigung der Pflanzen konnte möglicherweise durch den wiederholt applizierten Induktor Ethanol verstärkt zum Tragen kommen. Ähnliche Blattschädigungen könnten jedoch auch aus zu starker Cytokininsynthese in den Pflanzen resultieren. Ähnliche Beobachtungen von massiven Blattdeformationen und Sprossverdickungen wurden nach Hitze-induzierbarer *ipt*-Expression von Ainley *et al*. (1993) berichtet.

Ungeklärt muss aus diesen Ergebnissen bleiben, inwieweit, auch aufgrund der fundamentalen Bedeutung von Cytokinin für die Pflanze, eine zur Brechung der

Apikaldominanz nötige Steigerung der Cytokiningehalte ohne diese negativen Begleiterscheinungen möglich ist, oder aber die Strategie „Steigerung endogener Cytokininkonzentrationen zur Förderung der Lateralverzweigung“ einen suboptimalen Ansatzpunkt darstellt. Denkbar sind, aufgrund der verschiedentlich erbrachten Nachweise erhöhter endogener Cytokiningehalte in Seitenknospen als treibenden Parameter eines Lateralaustriebes, die Ansätze von Junker *et al*. (2003) und Maizel *et al*. (2004). Diese substituierten die in dieser Arbeit verwendete konstitutive 35S-Expression des Transkriptionsfaktors *alcR* durch gewebespezifische Promotoren und konnten so die Restriktion der Ethanol-induzierbaren Expression auf definierte Pflanzengewebe zeigen. Eine auf diese Weise lokal eingeschränkte *ipt*-Expression könnte eine Optimierung des Versuchsansatzes darstellen. Ähnliches wurde bereits von Rupp *et al.* (1999) durch lokale Induktion der *ipt*-Expression in Nodien gezeigt.

Die Ethanolinduktion der *iaaL*-Linien führte zu einer reduzierten Ausprägung der Apikaldominanz ohne die Beeinträchtigung von Pflanzenparametern wie Wurzelbildung oder Wuchshöhe. Damit konnte die Eignung reduzierter Auxingehalte als Möglichkeit die Lateralverzweigung zu fördern nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich aber auch, dass für die „zielorientierte“ Nutzung dieser Strategie stärkere Induktorapplikationen nötig sind. Eine Ursache für diese Beobachtung mag darin zu suchen sein, dass aufgrund der ausgeprägten Redundanz des Auxinmetabolismus (Normanly & Bartel, 1999) Eingriffe in die Auxinhomöostase, wie sie eine *iaaL*-Expression darstellt, von der Pflanze innerhalb gewisser Grenzen reguliert werden konnte. So wurde zum Erreichen der Ausprägung phänotypischer Merkmale durch Auxininaktivierung eine anhaltende kontinuierliche Genexpression resultierend in einer längerfristigen Störung des phytohormonellen Gleichgewichts benötigt. Zur Untermauerung dieser Erklärung für den erzielten Effekt fehlen jedoch in der Literatur Anhaltspunkte bezüglich der Bedeutung einzelner metabolischer Prozesse zur Regulation der Phytohormonbalance.

Ein Vergleich der Ergebnisse der untersuchten Strategien „Cytokininüberproduktion“ und „Auxininaktivierung“ verdeutlichte jeweils Vor- und Nachteile der Systeme. Anhand dieser Beobachtungen zeigte sich die Möglichkeit, die in dieser Arbeit untersuchte Ethanol-induzierbare *iaaL*-Expression bei einem Bedarf der Optimierung der Induktionsstrategie für die Habitusbeeinflussung nutzen zu können, wohingegen eine Verwendung induzierbarer *ipt*-Expression einer weitergehenden Anpassung einzelner Komponenten bedarf.

5.1.6. Untersuchungen zur Beeinflussung der Auxinkinetik mittels Auxin-induzierbarer Reportergenaktivität

Genetische Charakterisierungen von Phytohormonmetabolismus- und -signaltransduktionswegen haben eine alternative Möglichkeit der Phytohormonmessung gegenüber den technisch aufwendigen physikalisch-chemikalischen Methoden (GC-MS, HPLC) sowie immunologischen Methoden eröffnet.

Durch die Identifizierung von Phytohormon-induzierten Genen wurde eine Visualisierung phytohormoneller Aktivität auf Zellebene über Phytohormon-responsive Promotor-Reportergenkonstrukte möglich.

DR5 stellt einen synthetischen Auxin-sensitiven Promotor dar, dessen Aktivität in konzentrationsabhängiger Weise durch Auxin reguliert wird (Ulmasov *et al*., 1997) und sich dadurch als Marker in Untersuchungen der endogenen Auxinverteilung eignet.

Eine künstliche Applikation unterschiedlicher NAA-Konzentrationen (siehe 4.2.5.) wies die DR5-induzierbare Reportergenaktivität in Wurzel-, Hypokotyl- und Blattgewebe transgener *N. tabacum*-Sämlinge nach.

Eine basale Aktivität des Promotors konnte in keinen der durchgeführten Untersuchungen beobachtet werden. Als Gründe für diese Beobachtung kommen unterschiedliche Erklärungsansätze in Betracht, die sich aus dem Zusammenwirken von Versuchssystem, Promotor, Induktor, Reportergen und Pflanze ergeben.

In der Literatur finden sich verschiedene Beispiele, die die Eignung von DR5-Reportergenkonstrukten bzw. alternativen Auxin-induzierbaren Promotoren als Möglichkeit der Verdeutlichung von Auxingradienten im Pflanzengewebe zeigen. Dazu gehören u.a. Untersuchungen an pflanzlichen Auxinmutanten (Oono *et al*., 1998; Oono *et al*., 2002; Li *et al*., 2004). Weitere Arbeiten zeigten die Nutzung DR5-responsiver Reportergenaktivität für die Analyse der Beteiligung von Auxin in pflanzlichen Entwicklungsmustern (Wurzelgravität, Ottenschläger *et al*., 2003; Seitenwurzelbildung, Bao *et al*., 2004; Nematodenbefall, Karczmarek *et al.,* 2004; „apical hook“, De Grauwe *et al.*, 2005).

In allen diesen Arbeiten wurden Wurzel- und Hypokotylgewebe bezüglich einer differenziellen Reportergenaktivität untersucht.

In der vorliegenden Arbeit erfolgten Untersuchungen an apikalen Pflanzengeweben wie Kotyledonen, Laubblätter und Nodiensegmenten. Dabei war es nicht möglich

gewesen eine basale DR5-Aktivität in diesen Geweben zu detektieren. Die Arbeiten von Sabatini *et al*. (1999) und Aloni *et al.* (2003) führen eine DR5-Promotoraktivität in apikalen Pflanzenorganen vornehmlich entlang der Vaskularentwicklung von Laubblättern aus. Ebenso zogen Nakamura *et al.* (2003) aus ihren Untersuchungen zur Induktion von DR5 die Schlussfolgerung, dass die Promotoraktivität in Wurzelgeweben im Vergleich mit Blattgewebe sensitiver ist.
Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass die in Laubblättern vorliegenden Auxinkonzentrationen nicht ausreichend sind eine detektierbare Reportergenaktivität zu induzieren oder aber die Aktivität des Promotors selbst in oberirdischen Pflanzengeweben nicht ausreichend sensitiv ist.
Andere Erklärungsmöglichkeiten können auf Seiten des Reportergens gesucht werden. Damit eine GFP-Fluoreszenz detektierbar ist, müssen ausreichend GFP-Moleküle akkumulieren, die Berücksichtigung einer erforderlichen Zeitspanne zwischen Genexpression und Proteinbildung, sowie Stabilität des Genproduktes gegeben sein. GFP hat sich jedoch in zahlreichen Untersuchungen der letzten Jahre als funktionelles und geeignetes Reportergen bewiesen (Leffel *et al.*, 1997), sodass davon auszugehen ist, dass GFP und auch die in dieser Arbeit verwendete Variante *mgfp4* (Haseloff *et al*., 1997) die nötigen Eigenschaften bezüglich oben erwähnter Parameter aufweist. Eine Unzulänglichkeit des Reportergens wäre demnach als Erklärung für die Ergebnisse in 4.2.5 auszuschließen.

Durch fehlende Basalaktivität des DR5-gfp Konstruktes in den untersuchten Pflanzenlinien wurde versucht eine Beeinflussung der Auxinkinetik durch Ethanol-induzierbare Phytohormongenexpression auf indirektem Weg nachzuweisen. Dazu erfolgte die kombinierte Applikation von Auxin und Ethanol, um über eine Reduktion der GFP-Aktivität Rückschlüsse auf die phytohormonelle Einflussnahme abzuleiten. Auch in diesen Untersuchungen konnte keine differenzielle GFP-Expression beobachtet werden.
Die Gründe für dieses Ergebnis müssen in dem verwendeten Versuchsdesign gesucht werden. Eine Ursache auf Seiten des verwendeten bakteriellen Phytohormongens kann ausgeschlossen werden, denn die Genwirkungen sind sowohl für *ipt* als auch *iaaL* bekannt und die erzeugten pflanzlichen Phänotypen (4.1. und 4.2.) wiesen die Funktionalität der Gene nach. Die Untersuchungen wurden mit Sämlingen der T_1-Generation durchgeführt, die sich aus homo- und heterozygoten

Individuen zusammensetzt. Daraus resultiert ein gewisses Maß an Varianzheterogenität, die eine visuelle Differenzierung einer reduzierten GFP-Fluoreszenz erschwert. Über ausreichend hohe Stichproben und nachfolgender Quantifizierung der Unterschiede in der GFP-Fluoreszenz sollte es möglich sein, den differenziellen Einfluss der verwendeten bakteriellen Phytohormongene nachzuweisen.

5.2. Untersuchungen zur Nutzung eines transienten RNAi-Ansatzes zur Beeinflussung der pflanzlichen Cytokininhomöostase

VIGS stellt einen durch Pflanzenviren ausgelösten PTGS-Mechanismus dar (Dougherty *et al*., 1994; Kumagai *et al*., 1995; Angell & Baulcombe 1997) und hat sich als Methode zur „functional genomics“ in der Form des temporären Abschaltens pflanzlicher Gene in einer Vielzahl von unterschiedlichen Pflanzen erwiesen. Dazu gehören neben den Modellpflanzen *Nicotiana benthamiana* (Ratcliff *et al*., 2001) und *Arabidopsis thaliana* (Turnage *et al.,* 2002) auch eine Reihe weiterer Solanaceen, wie *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum* (Liu *et al.,* 2002b), *Capsicum annuum*, (Brignetti *et al*., 2004, Ryu *et al.,* 2004), *Petunia hybrida* (Chen *et al.,* 2004) und ebenso die monokotyle Gerste (Holzberg *et al.,* 2002; Lacomme *et al.,* 2003). Durch Nutzung von VIGS wird im Gegensatz zu konventioneller Mutagenese das Gen nicht funktionslos sondern nur transient über einen bestimmten, vom genutzten pflanzenviralen Vektor abhängigen Zeitraum in seiner Expression unterdrückt (siehe Einleitung).

Zunächst wurden grundlegende Untersuchungen durchgeführt, die die Effizienz des TRV-vermittelten VIGS bestimmten.
In nachfolgenden Untersuchungen wurden einzelne Enzyme ausgewählter Metabolismuswege temporär ausgeschaltet und auf ihr Potenzial in Pflanzenhabitusveränderungen zu resultieren, untersucht. In diesen Versuchen wurde mit dem TRV-Vektor gearbeitet, sodass die Untersuchungen nur in *N. benthamiana* und *P. hybrida* stattfinden konnten.

5.2.1. Untersuchungen zum Abschalten eines Markergens

Im Rahmen dieses RNAi-Versuchsansatzes wurde zunächst untersucht, ob sich der zur Verfügung stehende infektiöse agroinfizierbare cDNA Klon des TRV-Isolates

PpK20 (Liu *et al.*, 2002) als Vektor zur Induktion von VIGS in *N. benthamiana* und *P. hybrida* eignet. Für diese Untersuchungen wurde ein Fragment der Phytoendesaturase aus *P. hybrida* amplifiziert und in den TRV-Vektor kloniert (4.3.). Durch das Abschalten der PDS, einem Enzym der Carotinoidbiosynthese resultiert eine Reduktion des Chlorophyllgehaltes, die zu einem „photobleaching“ des pflanzlichen Blattapparates führt (Kumagai *et al*., 1995). Über diesen visuell leicht bonitierbaren Phänotyp lässt sich der Verlauf des VIGS verfolgen.

Die Ergebnisse unter 4.3.2. zeigten den erwarteten Phänotyp einer Reduktion der PDS-Expression sowohl in *N. benthamiana* als auch *P. hybrida.* Im Vergleich der Ausprägung und Entwicklung der markanten weißen Blattflächen fiel eine schnellere und vollständigere Ausbildung in *N. benthamiana* auf. Dessen Ursache kann durch den unter 4.1.2.1. gezeigten schwächeren und langsameren Infektionsverlauf einer TRV-Infektion in *P. hybrida* vermutet werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der aus beiden Pflanzenarten verwendeten PDS-Fragmente zeigte sich eine ähnliche Phänotypentwicklung in den Pflanzen unabhängig von der Herkunft des PDS-Fragmentes.

Um die VIGS-Entwicklung in *P. hybrida* zu optimieren, wurden verschiedene einflussnehmende Parameter auf ihre Bedeutung untersucht. Dazu gehörten Kulturtemperatur, pflanzliches Entwicklungsstadium und Inokulationsmethode.

Bezüglich des Einflussfaktors Temperatur gibt es in der Literatur gegensätzliche Aussagen. Szittya *et al.* (2003) beobachteten unter höheren Temperaturen (24°C) eine Förderung der Akkumulation der, für die Ausbildung des „Silencing“ essenziellen siRNAs, wohingegen unter niedrigen Temperaturen eine Inhibierung der siRNA-Bildung festzustellen war, die in einer Reduktion des RNA-Silencing resultierte. Hingegen konnte in den Untersuchungen von Brignetti *et al.* (2004) in *S. tuberosum* und Fu *et al.* (2005) in *L. esculentum* keine negative Beeinflussung der Entwicklung des PDS-Phänotyps unter niedrigen Temperaturen beobachtet werden. Dieses Ergebnis wurde auch in dieser Arbeit (4.3.3.1.) bei *P. hybrida* beobachtet. Jedoch konnte nicht die Beobachtung von Ekengren *et al.* (2003) gemacht werden, die eine Steigerung von VIGS bei niedrigen Temperaturen (16-20°C) beschrieben. Eine deutliche Beeinflussung der Habitusausprägung von *P. hybrida* konnte in den unterschiedlichen Temperaturvarianten beobachtet werden. Die Ausprägung des „Silencing“-Phänotyps wurde in der wärmeren Variante (25°C) jedoch nicht verstärkt. In der Kaltvariante (15°C) war das Pflanzenwachstum deutlich reduziert, aber das

Verhältnis des Anteils weißer Blattfläche an der Gesamtblattfläche war den anderen Temperaturvarianten vergleichbar. Lediglich eine verzögerte Entwicklung der Phänotypausbildung konnte zu Beginn der Untersuchungen beobachtet werden, wie es ebenso von Fu *et al.* (2005) beschrieben wurde.

Die in dieser Arbeit häufig verwendete Agroinfektion von pflanzenviralen Vektoren erfolgte als Blattinfiltration der Bakteriensuspension. Die Effizienz dieser Inokulationsmethode ist von pflanzenblattmorphologischen Eigenschaften abhängig. Die Untersuchungen von Liu *et al.* (2002a) und Lu *et al.* (2003b) zeigten, dass die Applikationsmethode einen Einfluss auf das VIGS-Ergebnis haben kann. Dazu zeigte Liu *et al*. (2002a) eine Steigerung des Phänotyps, indem sie die Pflanzen mit der Agrobakteriensuspension besprühten. Die Autoren vermuten, dass die höhere Gewebeverletzung einen positiven Einfluss auf den T-DNA Transfer hat. Weiterhin räumen sie aber auch ein, dass die Infiltration von Tomatenblättern schwierig ist und dies ebenfalls eine Ursache der Ergebnissteigerung durch die alternative Applikationsmethode sein konnte. Lu *et al.* (2003) konnten die Ausprägung des PDS-Phänotyps in *A. thaliana* erhöhen, indem sie zunächst eine TRV-Infektion in *N. benthamiana* durchführten und diese Pflanzen als Inokulum für die Infektion von *A. thaliana* verwendet wurden. Dieser Ansatz könnte eine Möglichkeit darstellen die Infektion in *P. hybrida* zu steigern. Der Vergleich der TRV-gfp Infektion in *N. benthamiana* und *P. hybrida* zeigte eine deutlich schwächere Ausbreitung das TRV-Virus in Petunie. Es wäre somit denkbar das Primärinokulum durch Verwendung von RNA-Präparationen aus systemisch infizierten *N. benthamiana* steigern zu können. Diese Möglichkeit wurde jedoch nicht geprüft. Untersuchungen zur Verwendung unterschiedlicher Bakteriensuspensionskonzentrationen zeigten, dass ab Konzentrationen $> OD_{600}=1,5$ Pflanzenschäden in den infiltrierten Blattbereichen resultierten (Ergebnisse nicht dargestellt) und damit nicht geeignet waren, eine stärkere Infektion zu setzen. Dementgegen infiltrierten Chen *et al.* (2004) eine Agrobakteriensuspension, die auf eine $OD_{600}=2$ eingestellt war, ohne Pflanzenschäden zu beobachten. Unter Umständen wirken Sorten- bzw. Speziesspezifische Faktoren auf der Pflanzenseite als auch der verwendete Agrobakterienstamm bei der Ausbildung des Wirt-Pathogensystems.

Ryu *et al*. (2004) stellten eine Inokulationsmethode vor, die eine Infektion der Pflanzen über die Wurzeln setzt. Dabei ist es zusätzlich möglich, zum einen *in vitro*-Inokulationen durchzuführen, sowie zum anderen bereits in sehr jungen

Sämlingsstadien zu inokulieren. Bei Blattinfiltrationen sind die Pflanzen bereits vier Wochen alt. Dieser methodische Ansatz war insbesondere im Rahmen der Zielstellung für diese Versuche besonders interessant, da für die funktionelle Bestimmung von Gensequenzen des pflanzlichen Phytohormonmetabolismus junge Pflanzenentwicklungsstadien sensitiver reagieren könnten. Die Ergebnisse zeigten unter 4.3.3.2., das ein Abschalten der PDS durch diese Inokulationsmethode sowohl in *N. benthamiana* als auch *P. hybrida* möglich ist, aber die Infektionsraten im Vergleich zur Blattinfiltrationsmethode deutlich niedriger liegen.
Diese einleitenden Untersuchungen zur Nutzung und Effizienz von VIGS wiesen die Möglichkeit aus ein pflanzeneigenes Gen in Petunie ausschalten zu können. Weiterhin konnten verschiedene Inokulationsmethoden angewendet werden durch die Untersuchungen in unterschiedlichen pflanzlichen Entwicklungsstadien möglich sind.

5.2.2. Funktionelle Charakterisierung potentieller Gensequenzen des Cytokininmetabolismus aus *P. hybrida*

Durch Nutzung eines transienten RNAi-Ansatzes sollten die phänotypischen Auswirkungen des Abschaltens einzelner Phytohormonmetabolismuswege bestimmt werden. Dieser Expressionsansatz eignet sich dafür in besonderem Maß, wenn die Reprimierung der Genexpression in visuell leicht erfassbaren Merkmalen resultiert.
Für diese Untersuchungen wurde der Cytokininmetabolismus ausgewählt. Die Gründe dafür liegen zum einen bei der Bedeutung von Cytokinin für die Ausprägung der Apikaldominanz und zum anderen in der Organisation des Cytokininmetabolismus. Der Auxinmetabolismus weist eine hohe Redundanz auf enzymatischer Ebene auf, bislang wird von mindestens drei unterschiedlichen Synthesewegen ausgegangen (Normanly & Bartel, 1999). Hingegen wurde für den Cytokininmetabolismus ein Hauptsyntheseweg über die Isopentenyltransferase und ein Hauptkatabolismusweg über die Cytokininoxidase/-dehydrogenase beschrieben (Mok & Mok, 2001).
Zum Zweck der phänotypischen Beeinflussung der Pflanzenentwicklung wurden zwei Strategien zur Modulation des pflanzlichen Cytokininmetabolismus untersucht. Dazu gehörten zum einen die Reprimierung der Cytokininsynthese, die in einer Cytokinindefizienz resultieren sollte und zum anderen die Abschaltung der Cytokinindegradation, die eine Cytokininanreicherung bewirken sollte. Für beide

Strategien der Beeinflussung der Cytokininhomöostase sind aus unterschiedlichen Untersuchungen die phänotypischen Effekte beschrieben wurden. Durch Überexpression pflanzlicher Cytokininoxidasen konnte Werner *et al.* (2003) eine Senkung der Cytokiningehalte in Pflanzen zeigen. Diese resultierten in verstärkter Wurzelbildung, Pflanzenstauchung und schwächerer Vaskularentwicklung.
Pflanzliche Cytokininüberproduktionsmutanten, wie *max, rms* und *dad* (siehe Einleitung), sowie bakterielle Isopentenyltransferase exprimierende Transgene und die exogene Applikation von Cytokininen weisen die zu erwartenden phänotypischen Merkmale einer Cytokininüberversorgung aus.
Unter der Annahme, das die physiologischen Regulationsmöglichkeiten der Pflanze nicht ausreichend sind die Reprimierung der Genexpression o.a. Cytokininmetabolismuswege zu kompensieren, wurde die Ausbildung ähnlicher phänotypischer Merkmale erwartet.

Für die Erstellung des VIGS-Konstruktes zum Abschalten der Cytokininsynthese in *P. hybrida* konnte auf die Publikation von Zubko *et al.* (2002), die die Charakterisierung eines *ipt*-ähnlichen Gens in *P. hybrida* beschreibt, zurückgegriffen werden.
Für das VIGS-Konstrukt zum Abschalten des Cytokininkatabolismus waren keine Sequenzen aus Petunie in der Datenbank verfügbar. Aus dem Datenbankeintrag für eine Cytokininoxidase in *L. esculentum* wurden Primer abgeleitet, mit denen ein Fragment der erwarteten Größe resultierte (4.3.4.2.). Über BlastN wurden Seuqenzhomologe gesucht, anhand derer davon auszugehen waren, dass ein potentielles Cytokininoxidasefragment aus Petunie für die weitere Konstrukterstellung zur Verfügung stand.
Für beide Enzyme ist bekannt, dass sie als Genfamilien in der Pflanze vorliegen (Werner *at al.*, 2001; Schmülling, 2003, Takei *et al*., 2001; Kakimoto 2001). Die *ipt*-Genfamilie in *A. thaliana* weist ein temporär differenzielles und gewebespezifisches Expressionsmuster auf (Miyawaki *et al*., 2004). Auch die Cytokininoxidasen weisen ein differenzielles Expressionsmuster und unterschiedliche subzelluläre Lokalisation auf (Schmülling, 2003).
Durch die Nutzung von VIGS können sowohl spezifische Mitglieder einer Genfamilie als auch gesamte Genfamilien ausgeschaltet werden. Eine vollständige

Sequenzhomologie für mindestens 23 bp muss vorliegen (Thomas *et al.,* 2001), wenn die gesamte Genfamilie in ihrer Expression unterdrückt werden soll.
Aus den erstellten Sequenzalignments konnte kein Bereich ausgewählt werden, der über alle Genfamilienmitglieder einer Pflanzenspezies eine Homologie über diesen Bereich ausweist. Entsprechend muss davon ausgegangen werden, das mit dem verwendeten Fragment nicht alle Mitglieder der Genfamilie in ihrer Expression reprimiert worden sind. Wodurch eine Kompensierung der Expressionsrepression eines Isogens durch andere Mitglieder der Genfamilie resultieren könnte und eine phänotypische Veränderung der Pflanzen verhindert wurde.

Für die Untersuchungen zum Abschalten von Cytokininmetabolismuswegen wurden drei unterschiedliche Konstrukte erstellt (4.3.1. und 4.3.5.). Das Doppelkonstrukt sollte durch Vernetzung eines Gens, dessen Abschalten in einem visuell leicht erfassbaren Phänotyp resultiert, mit einem Gen, dessen Funktion bestimmt werden sollte, die Möglichkeit bieten, infizierte Pflanzen von nicht-infizierten unterscheiden zu können. Die Möglichkeit des simultanen Abschaltens von zwei Genen wurde von Chen *et al*. (2004) in Petunie mit PDS und CHS (Chalconsynthase) gezeigt, deren Expressionsreprimierung in beiden Fällen zu einem visuell leicht erfassbaren Phänotyp führte. Die Konstrukte zur Expression von „inverted repeats“ (4.3.5.) sollten in einer Verstärkung des VIGS-Phänotyps resultieren, wie es von Lacomme *et al.* (2003) gezeigt worden war.
In keiner der untersuchten Pflanzen konnte eine phänotypische Veränderung gegenüber den Kontrollpflanzen beobachtet werden. Die Ergebnisse der Reprimierung der PDS in Petunie zeigten, das Replikation und Ausbreitung von TRV in Petunie ausreichend sind, um VIGS auszulösen.
Die Gründe für die fehlende Phänotypausbildung sollten daher auf der Seite der verwendeten Genfragmente liegen. Zunächst müsste davon ausgegangen werden, dass diese nicht die erwartete Funktion besitzen.
Die Verifizierung der verwendeten Gensequenzen wäre über die Anwendung einer RACE-PCR, in der die gesamte Gensequenz amplifiziert und nachfolgend bestimmt wird, möglich. Weiterhin sollten Analysen zum Expressionsverhalten der verwendeten Sequenzen in Petunie Aufschluss über die Bedeutung des untersuchten Isogens für die pflanzliche Cytokininhomöostase geben.

Zusätzlich müssten weiterführende Untersuchungen zeigen, inwieweit in den Experimenten eine Reduktion der Expression der endogenen Zielsequenz erfolgte und inwiefern morphologisch nicht-erfassbare Beeinflussungen der Pflanzen (Veränderungen der Cytokininkonzentration, Veränderungen in der Konzentration von Phytohormonen, die mit Cytokinin in Wechselwirkung stehen) auftraten.
Aus diesen Ergebnissen könnte ein Rückschluss darauf möglich sein, dass die benutzte Gensequenz für diesen Versuchsansatz geeignet ist.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene transgene Expressionsansätze zur Beeinflussung des Auxin-Cytokinin-Gleichgewichtes benutzt, um die pflanzliche Apikaldominanz in *Nicotiana* spec. und *Petunia hybrida* zu brechen und den Lateralaustrieb zu fördern.

Im ersten Teil der Arbeit wurden für die Modulation der pflanzlichen Entwicklungsmuster phytobakterielle Gene (*rolA, rolC, iaaH, iaaL* und *ipt*) aus *A. rhizogenes*, *A. tumefaciens* und *P. syringae*, die den Phytohormonhaushalt in Pflanzen beeinflussen, eingesetzt.

Im zweiten Teil wurde die Möglichkeit untersucht, pflanzeneigene Gene des Cytokininmetabolismus durch Nutzung eines RNA Interferenz (RNAi) -Ansatzes in ihrer Expression zu reprimieren und darüber phänotypische Veränderungen der Pflanzen zu erzeugen.

Erste Untersuchungen, die das Potenzial zur Induktion phänotypischer Entwicklungsveränderungen durch die bakteriellen Phytohormon-Metabolismusgene in Pflanzen (*N. tabacum, N. benthamiana, P. hybrida*) bestimmten, wurden in einem transienten Expressionsansatz untersucht. Dafür wurden pflanzenvirale Expressionsvektoren des *Potato virus X* (PVX) und des *Tobacco rattle virus* (TRV) verwendet. Dieses Expressionssystem ist durch ein hohes transientes Expressionsniveau des zu exprimierenden Gens charakterisiert. Damit erfolgten Untersuchungen an sehr jungen Sämlingen und Jungpflanzen, die bei pflanzenviraler *ipt*-Expression zu typischen Symptomen einer Cytokininüberversorgung, wie Lateralaustrieb, Verzwergung und Wurzelbildungsinhibierung führten. Eine Expression des bakteriellen *iaaH*-Gens induzierte Symptome einer Auxinüberversorgung, wie Blatt-Epinastie und Wurzelprimordienbildung am Stängel. Durch eine starke Symptomausbildung der PVX-Infektionen wurden für einige der verwendeten Gene die zu erwartenden Kennzeichen der Phytohormongenexpression möglicherweise überlagert, wodurch keine phänotypischen markanten Merkmale bei der pflanzenviralen *rolA*- und *rolC*-Expression erfasst wurden.

Für den stabilen transgenen Expressionsansatz wurden die phytobakteriellen Gene unter Kontrolle eines Ethanol-induzierbaren Expressionssystems (alcA/alcR-System), sowie ein *gfp*-Reportergen (*mgfp*4) unter Kontrolle eines Auxin-induzierbaren Promotors (DR5) für die Erzeugung von transgenen *N. tabacum* Pflanzen eingesetzt.

Mit den erzeugten Pflanzenlinien (T0 und T1) wurden die Möglichkeiten einer gezielten, zeitlich begrenzten Expression von Phytohormon-beeinflussenden Genen auf die Modulation der Ausprägung der pflanzlichen Apikaldominanz bestimmt. Die Auxin-induzierbare GFP-Expression sollte darin als weiteres charakterisierendes Merkmal für die Beeinflussung des pflanzlichen Hormonhaushaltes neben den Habitusveränderungen erfasst werden.

Die Erzeugung transgener *N. tabacum* Linien erfolgte mit sieben verschiedenen Konstrukten. Die Untersuchungen dieser transgenen Linien zeigten die Eignung des Ethanol-induzierbaren Expressionssystems, die Transkription habitusbeeinflussender Gene zu regulieren und konnte für eine kontrollierte Phytohormonbeeinflussung nutzbar gemacht werden. In verschiedenen Untersuchungen resultierten sowohl *in vitro* als auch *ex vitro*, sowie in unterschiedlichen pflanzlichen Entwicklungsstadien typische Habitusveränderungen aus der Ethanolinduktion der phytobakteriellen Gene. Die Bestimmung der Transgenität war jedoch nicht für alle erzeugten transgenen Linien möglich, sodass sich ein Teil der Untersuchungen auf die alcA-*ipt* und alcA-*iaaL* Pflanzen beschränkte. Mit selektierten Linien dieser Konstrukte konnte eine Brechung der Apikaldominanz, resultierend in einem erhöhten Lateralaustrieb, erzielt werden. Jedoch wiesen Ethanol-induzierte alcA-*ipt* Linien neben diesem Merkmal auch unerwünschte Nebenwirkungen der Pflanzenentwicklung auf. Dazu zählte einerseits die massive Reduktion der Wurzelentwicklung und andererseits die Ausbildung von Blattnekrosen, die auf Trockenstress deuteten. Diese Phänotypen könnten sowohl sekundäre Effekte der Wasserunterversorgung, wie auch synergistische Effekte der Ethanolapplikation darstellen. Weiterhin wurde durch die erhöhte Cytokininversorgung der transgenen alcA-*ipt* Linien die kambiale Aktivität gefördert, die in einer massiven Bildung der Pflanzengefäße Xylem und Phloem, aber auch Verstärkung der Blattaderbildung resultierte.

Die Ethanolinduktion der alcA-*iaaL* Linien führte nicht zu negativen Mustern in der Pflanzenentwicklung. In diesen transgenen Linien musste eine stärkere Induktion unter Verwendung höherer Ethanolkonzentrationen oder häufigerer Induktorapplikation zur Erhöhung der *iaaL* Expression erfolgen, um die Apikaldominanz zu brechen. Die dazu eingesetzten Applikationsvarianten führten jedoch nicht zu Pflanzenschäden.

Weiterhin erfolgten anhand des mitgeführten Auxin-induzierbaren *gfp*-Markergens Untersuchungen zu Veränderungen in der Auxinkinetik. Hierbei konnte zunächst

mittels Epifuoreszenzmikroskopie keine Basalexpression in nicht Auxin-induzierten Pflanzen beobachtet werden. Die exogene Auxinapplikation konnte jedoch die Funktionalität des DR5-*gfp* Konstruktes nachweisen.

Untersuchungen der Cytokinin-synthetisierenden alcA-*ipt* Linien und Auxin-inaktivierenden alcA-*iaaL* Linien nach Ethanolapplikation führten nicht zu einem differenziellen *gfp*-Expressionsmuster.

In einem weiteren Expressionsansatz wurde die Möglichkeit untersucht, durch Nutzung von VIGS zur Induktion von transientem RNAi von Petunien-eigenen Genen des Cytokininmetabolismus, pflanzliche Entwicklungsmuster zu beeinflussen. Zunächst wurde die Eignung des zur Verfügung stehenden TRV-basierten VIGS-Vektors, effizientes RNAi zu induzieren, anhand des Abschaltens der Phytoendesaturase (PDS), die in einem visuell leicht erfassbaren Phänotyp resultiert, bestimmt. In diesen Untersuchungen konnte das Transkriptionsniveau des pflanzeneigenen PDS-Gens reprimiert werden und resultierte in einer großflächigen, aber unvollständigen Ausbildung chlorophyllfreier Blattbereiche in *P. hybrida*. Unter Verwendung verschiedener Infektionsmethoden war die Analyse in unterschiedlichen Pflanzenentwicklungsstadien möglich und die generelle Funktionalität von VIGS in Petunie konnte gezeigt werden. Anschließend wurden Genfragmente aus *P. hybrida*, die eine hohe Sequenzhomologie zu pflanzlichen Isopentenyltransferasen und Cytokininoxidasen/dehydrogenasen aufwiesen, in „sense“-, „antisense“- und „inverted repeat“-Orientierung in den pflanzenviralen VIGS-Vektor kloniert. Die Untersuchungen in *P. hybrida* und *N. benthamiana* mit diesen Konstrukten verliefen jedoch ohne erkennbare phänotypische Veränderungen der Pflanzen.

Zusammengefasst konnte die Brechung der Apikaldominanz in Tabakspezies sowohl durch endogene Steigerung der Cytokininsynthese (*ipt*) als auch Reduktion der Auxingehalte (*iaaL*) gezeigt werden. Dafür wurde erstmals eine pflanzenvirale Expression benutzt. Auch das Ethanol-induzierbare System konnte für die gezielte Modulation der Auxin-Cytokinin Balance in transgenen Pflanzen erfolgreich genutzt werden.

7. Literaturverzeichnis

Abel, S. & Theologis, A. (1996): Early genes and auxin action. Plant Physiology 111: 9-17

Ainley, W.M., McNeil, K.J., Hill, J.W., Lingle, W.L., Simpson, R.B., Brenner, M.L., Nagao, R.T. & Key, J.L. (1993): Regulatable endogenous production of cytokinins up to „toxic“ levels in transgenic plants and plants tissues. Plant Molecular Biology 22: 13-23

Ait-ali, T., Rands, C. & Harberd, N.P. (2003): Flexible control of plant architecture and yield via switchable expression of *Arabidopsis gai*. Plant Biotechnology Journal 1: 337-343

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acid Research 25: 3389-3402

Akiyoshi, D.E., Morris, R.O., Hinz, R., Mischke, B.S., Kosgue, T., Garfinkel, D.J., Gardon, M.P. & Nester, E.W. (1983): Cytokinin/auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 407-411

Aloni, R., Schwalm, K., Langhaus, M. & Ullrich, C.I. (2003): Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. Planta 216: 841-853

Amasino, R.M. & Miller, C.O. (1982): Hormonal control of Tobacco Crown Gall Tumor Morphology. Plant Physiology 69: 389-392

Angell, S. & Baulcombe, D.C. (1999): Potato virus X amplicon-mediated silencing of nuclear genes. The Plant Jounal 20: 367-362

Astot, C., Dolezal, K., Nordstrom, A., Wang, Q., Kunkel, T., Chua, N.H. & Sandberg, G. (2000): An alternative cytokinin biosynthesis pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 14778-83

Ayoama, T. & Chua, N.H. (1997): A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. The Plant Journal 11: 605-612

Bainbridge, K., Sorefan, K., Ward, S. & Leyser, O. (2005): Hormonally controlled expression of the *Arabidopsis MAX4* shoot branching regulatory gene. The Plant Journal 44: 569-580

Bandurski, R.S., Cohen, J.D., Slovin, J.P. & Reinecke, D.M. (1995): Auxin biosynthesis and metabolism in Davies, P.J. ed (1995): Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London., 39-65

Bangerth, F. (1994): Response of cytokinin concentration in the xylem exudates of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment, and relationship to apical dominance. Planta 194: 439-442

Bao, F., Shen, J., Brady, S., Muday, G.K., Asami, T. & Yang Z. (2004): Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. Plant Physiology 134: 1624-1631

Bar, T. & Okon, Y. (1993): Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillium brasilense* Sp 7. Canadian Journal of Microbiology 39: 81-86

Bartel, B. (1997): Auxin biosynthesis. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 51-66

Bartel, B. & Fink, G.R. (1994): Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene familiy in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91: 6649-6653

Bartling, D., Seedorf, M., Mithöfer, A. & Weiler, E.W. (1992): Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. European Journal of Biochemistry 205: 417-424

Bartling, D., Seedorf, M., Schmidt, R.C. & Weiler, E.W. (1994): Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: Key enzymes in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91: 6021-6025

Baulcombe, D.C., Chapman, S. & Santa-Cruz, S. (1995): Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. The Plant Journal 7: 1045-1053

Baulcombe, D.C. (1999): Viruses and gene silencing in plants. Archives of Virology Supplementum15: 189-201

Ben-Hayyim, G., Martin-Tanguy, J. & Tepfer, D. (1996): Changing root and shoot architecture with the *rolA* gene from *Agrobacterium rhizogenes*: Interactions with gibberellic acid and polyamine metabolism. Physiologia Plantarum 96: 237-243

Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G. & Friml, J. (2003): Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. Cell 115: 591-602

Bennett, T., Sieberer, T., Willett, B., Booker, J., Luschnig, C. & Leyser, O. (2006): The *Arabidopsis MAX* pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. Current Biology 16: 553-563

Beveridge, C.A., Ross, J.J. & Murfet, I.C. (1994): Branching mutant *rms*-2 in *Pisum sativum*. Plant Physiology 104: 953-959

Beveridge, C.A., Ross, J.J. & Murfet, I.C. (1996): Branching in pea. Plant Physiology 110: 859-865

Beveridge, C.A., Murfet, I.C., Kerhoas, L., Sotta, B., Miginiac, E. & Rameau, C. (1997a): The shoot controls zeatin riboside export from pea roots: evidence from the branching mutant *rms1*. The Plant Journal 11: 339-345

Beveridge, C.A., Symons, G.M., Murfet, I.C., Ross, J.J. & Rameau, C. (1997b): The *rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signal(s). Plant Physiology 115: 1251-1258

Beveridge, C.A. (2000): Long-distance signalling and a mutational analysis of branching in pea. Plant Growth Regulation 32: 193-203

Beveridge, C.A. (2006): Axillary bud outgrowth: sending a message. Current Opinion in Plant Biology 9: 35-40

Birnboim, H.C. & Doly, J., (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research 7: 1513-1523

Binns, A.N. (1994): Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic, and molecular approaches. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 94: 173-196

Boerjan, W., Cervera, M.T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., van Onckelen, H., van Montagu M. & Inzé, D. (1995): *Superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. The Plant Cell 7: 1405-1419

Booker, J., Chatfield, S. & Leyser O. (2003): Auxin acts in Xylem-associated or medullary cells to mediate apical dominance. The Plant Cell 15: 495-507

Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., McCarthy, D., Klee, H. & Leyser, O. (2004): *MAX3/CCD7* is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signalling molecule. Current Biology 14: 1232-1238

Booker, J., Sieberer, T., Wright, W., Williamson, L., Willett, B., Stirnberg, S., Turnbull, C., Srinivasan, P., Goddard, P. & Leyser, O. (2005): The *MAX1* gene of *Arabidopsis* encodes a putative cytochrome P450 that acts downstream of *MAX3* and *MAX4* in the synthesis of a novel branch-inhibiting hormone. Developmental Cell 8: 443-449

Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A. & Lamb, C (2000): Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid synthesis. The Plant Cell 12: 2383-2394

Brignetti, G., Martin-Hernandez, A.M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D.C., Baker, B., Jones, J.D. (2004): Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. The Plant Journal 39: 264-272

Brown, B.T., Foster, C., Phillips, J.N. & Rattigann, B.M. (1979): The indirect role of 2,4-D in the maintenance of apical dominance in decapitated sunflower seedlings (*Helianthus annus* L .). Planta 146: 475-480

Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L. & Muday, G.K. (2001): Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in *Arabidopsis.* Plant Physiology 126: 525-535

Budar, F., Deboeck, F., Van Montagu, M. & Hernalsteens, J.-P. (1986): Intruduction and expression of the octopine T-DNA in Tobacco plants and their Progeny. Plant Science 46: 195-206

Caddick, M.X., Greenland, A.J., Jepson, I., Krause, K.P., Qu, N., Riddell, K.V., Salter, M.G., Schuch, W., Sonnewald, U. and Tomsett, A.B. (1998): An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. Nature Biotechnology 16: 177-180

Carneiro, M. & Vilaine, F. (1993): Differential expression of the *rolA* plant oncogene and its effect on tobacco development. The Plant Journal 3: 785-792

Casanova, E., Zuker, A., Trillas, M.I., Moysset, L. & Vainstain, A. (2003): The *rolC* gene in carnation exhibits cytokinin-and auxin-like activities. Scienta Horticultturae 97: 321-331

Casanova, E., Valdés, A.E:, Zuker, A., Fernández, B., Vainstein, A., Trillas, M.I., & Moysset, L. (2004): *rolC*-transgenic carnation plants: adventitious organogenesis and levels of endogenous auxin and cytokinins. Plant Science 167: 551-560

Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G., Casero, P.J. & Bennett, M. (2001): Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. Cell 13: 843-852

Chapman,S.N., Kavanagh,T.A. and Baulcombe,D.C. (1992): *Potato virus X* as a vector for gene expression in plants. The Plant Journal 2: 549–557

Chatfield, S.P., Stirnberg P., Forde B.G. & Leyser O. (2000): The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. The Plant Journal 24: 159-169

Chaudhury AM, Letham S, Craig S (1993) *amp1*—a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. The Plant Journal 4:907–914

Chen, C. & Melitz, D.K. (1979): Cytokinin biosynthesis in a cell-free system from cytokinin-autotrophic tobacco tissue culture. FEBS Letters 107: 15-20

Chen, J.-C., Jiang, C.-Z., Gookin, T.E., Hunter, D.A., Clark, D.G. & Reid, M.S. (2004): Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. Plant Moleculat Biology 00: 1-10

Cline, M. (1991): Apical dominance. Botanical Reviews 57: 318-358

Cohen, J.D. & Bandurski, R.S. (1982): Chemistry and physiology of the bound auxins. Annual Reviews in Plant Physiology 33: 403-430

Cohen, J.D., Slovin J.P. & Hendrickson, A.M. (2003): Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: More redundancy in auxin biosynthesis. Trends in Plant Science 8: 197-199

Craft, J., Samalova, M., Baroux, C., Townley, H., Martinez, A. & Jepson, I. (2005): New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in Arabidopsis. The Plant Journal 41: 899-918

Creelman, R.A. & Mullett, J.E. (1997): Oligosaccharins, Brassinolides, and Jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. The Plant Cell 9: 1211-1223

Crouzet, P. & Hohn, B. (2002): Transgenic plants. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group

Dalmay, T., Hamilton, A., Müller, E. & Baulcombe D.C. (2000a): *Potato virus X* amplicons in *Arabidopsis* mediate genetic and epigenetic gene silencing. The Plant Cell 12: 369-379

Dalmay T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. & Baulcombe D.C. (2000b): An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. Cell 101: 543-553

Dawson, W.O., Bubrick, P. & Grantham, G.L. (1988): Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement, and symptomatology. Phytopathology 78: 783-789.

Davies, P.J. ed (1995): Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. & Leemans, J. (1985): Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium-mediated* gene transfer to plants. Nucleic acids research 13: 4777-4788

DeGrauwe, L., Vandenbussche, F., Tietz, O., Palme, K. & van der Straeten, D. (2005): Auxin, Ethylene and Brassinosteroids: tripartite control of growth in the *Arabidopsis* hypokotyl. Plant Cell Physiology 46: 827-836

Dehio, C., Grossmann, K., Schell, J. & Schmülling, T. (1993): Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. Plant Molecular Biology 23: 1199-1210

Dehio, C. & Schell, J. (1993): Stable expression of a single-copy *rolA* in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants allows an exhaustive mutagenic analysis of the transgene-associated phenotype. Molecular and General Genetics 241: 359-366

Deroles, S.C. & Gerdner, R.C. (1988): Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by *Argobacterium*- mediated transformation. Plant Molecular Biology 11: 365-377

Dolja, V.V., Peremyslov, V.V., Keller, K.E., Martin, R.R. & Hong, J. (1998): Isolation and stability of histidine-tagged proteins produced in plants via potyvirus gene vectors. Virology 252: 269-74

Donson, J., Kearney, C.M., Hilf, M.E. & Dawson, W.O. (1991): Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 7204-7208

Dougherty, W.G., Lindbo, J.A., Smith, H.A., Prks, T.D., Swaney, S. & Proebsting W.M. (1994): RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. Molecular Plant-Microbe Interactions 7: 544-552

Ebinuma, H., sugita, K., Endo, S., Matsunaga, E. & Yamada, K. (2005): Elimination of marker genes from transgenic plants using *MAT* vector systems. Methods in Molecular Biology 286: 237-253

Ekengren, S.K., Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kmar, S.P. & Martin, G.B. (2003): Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. The Plant Journal 36: 905-917

Eklöf, S. , Åstot, C , Blackwell. J. , Moritz, T. , Olsson, O. , Sandberg, G. (1996): Cytokinin metabolites and gradients in wild type and transgenic tobacco with moderate cytokinin over-production. Physiologia Plantarum 98: 333-44

Estelle, M.A. & Sommerville, C. (1987): Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. Molecular General Genetics 206: 200–206

Estelle, M. (2001): Plant hormones: Transporters on the move. Nature 413: 374-375

Estruch, J.J., Chriqui, D., Grossmann, K., Schell, J. & Spena, A. (1991): The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. EMBO Journal 10: 2889-2895

Everat-Bourbouloux, A., & Bonnemain J.L. (1980): Distribution of labeled auxin and derivates in stem tissues of intact and decapitated broad-bean plants in relation to apial dominance. Physiologia Plantarum 50: 145-152

Fagard, M. & Vaucheret, H. (2000): (Trans)Gene silencing in Plants: How many Mechanisms?. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51: 167-94

Faiss, M., Strnad, M., Redig, P., Dolezal, K., Hanus, J., Onckelen, H.V. & Schmülling, T. (1996): Chemically induced expression of the *rolC*-encoded ß-glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: *rolC* does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides in planta. The Plant Journal 10: 33–46

Faiss, M., Zalubilova, J., Strnad, M. & Schmülling, T. (1997): Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. The Plant Journal 12: 401-415

Feldmann, K.A., Coury D.A. and Christianson M.L. (1997): Exceptional segregation of a selectable marker (*Kan*^{R}) in *Arabidopsis* identifies genes important for gametophytic growth and development. Genetics 1447: 1411-1422

Felenbok, B., Sequeval, D., Mathieu, M., Sibley, S., Gwynne D.I. & Davies, R.W. (1988): The ethanol regulon in Aspergillus nidulans: characterization and sequence of the positive regulatory gene alcR. Gene 73: 385-96

Follin, A., Inzè, D., Budar, F., Genetello, C., van Montagu, M. & Schell, J. (1985): Genetic evidence that the tryptophan 2-monooxygenase gene of *Pseudomaonas savastanoi* is functionally equivalent to one of the T-DNA genes involved in plant tumour formation by *Agrobacterium*. Molecular and General Genetics 207: 178-185

Foo, E., Turnbull, C. & Beveridge, C.A. (2001): Long distance signalling and the control of branching in the *rms1* mutant of pea. Plant Physiology 126: 203-209

Foo, E., Bullier, E., Goussot, M., Foucher, F., Rameau, C. & Beveridge, C.A. (2005): The branching gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. The Plant Cell 17: 464-474

Fu, D.-Q., Zhu, B.-Z., Zhu, H.-L., Zhang, H.-X., Xie, Y.-H., Jiang, W.-B., Zhao, X.-D. & Luo, Y.-B. (2005): Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. Molecular Cells 21: 153-160

Galuszka, P., Frebort, I., Sebela, M., Sauer, P., Jacobsen, S. & Pec. P. (2001): Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. European Journal of Biochemistry 268: 450-461

Gatz, C., Frohberg, C., Wendenburg, R. (1992): Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. The Plant Journal 2: 397-404

Gatz, C. (1997): Chemical control of gene expression. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 89-108

Gatz, C. & Lenk, I. (1998): Promotors that respond to chemical inducers. Trends in Plant Science 3: 352-358

Gaudin, V., Vrain, T. & Jouanin, L. (1994): Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. Plant Physiology and Biochemistry 32: 11-29

Giovannini, A., Zottini, M., Morreale, G., Spena, A. & Allavena, A (1999): Ornamental traits modification by *rol* genes in *Osteospermum ecklonis* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. In Vitro Cell and Developmental Biology 35: 70-75

Glass N.L. & T. Kosuge (1986): Cloning of the gene for indoleacetic acid-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi.* Journal of Bacteriology 166: 598-603

Gleba, Y., Marillonnet, S. & Klimyuk, V. (2004): Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. Current Opinion in Plant Biology 7: 182-188

Gocal, G.F.W., Pharis, R.P., Yeung E.C. & Pearce D. (1991): Changes after Decapitation in Concentrations of Indole-3-Acetic Acid and Abscisic Acid in the Larger Axillary Bud of *Phaseolus vulgaris* L. cv Tender Green. Plant Physiology 95: 344-350

Guivarc´h, A., Carneiro, M., Vilaine, F., Pautot, V. & Chriqui, D. (1996): Tissue-specific expression of the *rolA* gene mediates morphological changes in transgenic tobacco. Plant Molecular Biology 30: 125-134

Hagen, G. & Guilfoyle, T. (2002) : Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. Plant Molecular Biology 49: 373-85

Hall, S.M. & Hillman, J.R. (1975): Correlative inhibition of lateral bud growth in *Phaseolus vulgaris* L.: timing of bud growth following decapitation. Planta 123: 137-143

Hamann, T., Mayer, U. & Jurgens, G. (1999): The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis embryo*. Development 126: 1387-1395

Hamill, J.D. (1993): Alterations in Auxin and Cytokinin Metabolism of Higher Plants due to Expression of Specific Genes from Pathogenic Bacteria: a Review. Australian Journal of Plant Physiology 20: 405-23

Hammond-Kosack, K.E., Staskawicz, B.J., Jones, J.D.G. & Baulcombe, D.C. (1995): Functional expression of a fungal avirulence gene from a modified potato virus X. Molecular Plant Microbe Interactions 8: 181-185

Hansen, C.E., Meins, F.Jr. & Aebi R. (1987): Hormonal regulation of zeatin riboside accumulation by cultured tobacco cells. Planta 172: 520-525

Harrison, B.D. (1970). Tobacco Rattle Virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No.12 Commonwealth Agricultural Bureaux and Association of Applied Biologists, Perthshire, Scotland.

Haseloff, J. (1997): Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 2122-2127

Hedden, P. & Phillips, A.L. (2000): Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. Current Opinion in Biotechnology 11: 130-137

Herrera-Estrella L., Simpson, J. & Martinez-Trujillo (2005): Transgenic plants. An historical perspective. Methods in Molecular Biology 286: 3-32

Hewelt, A., Prinsen, E., Schell, J., van Onckelen, H. & Schmülling, T. (1994): Promotor tagging with a promotorless *ipt* gene leads to cytokinin-induced phenotypic variability in transgenic tobacco plants: implications of gene dosage effects. The Plant Journal 6: 879-891

Huisman, M.J., Linthorst, H.J., Bol, J.F. & Cornelissen, J.C. (1988): The complete nucleotide sequence of *potato virus X* and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. Journal of General Virology 69: 1789-1798

Hillmann, J.R., Math V.B. & Medlow G.C. (1977): Apical dominance and the levels of indole acetic acid in *Phaseolus* lateral buds. Planta 134: 191-193

Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. & Schilperoort, R.A., (1983): A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *A. tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303: 179-180

Holsters, M., Villarroel. R., Gielen, J., Seurinck, J., De Greve, H., Van Montagu, M. & Schell, J. (1983): An analysis of the boundaries of the octopine TL-DNA in tumors induced by *Agrobacterium tumefaciens*. Molecular General Genetics 190: 35–41

Holtz, J. & Klämbt, D. (1978): *tRNA* i*sopentenyltransferase* from *Zea mays* L. Characterisation of the isopentenylation reaction of tRNA, oligo(A) and other nucleic acids. Journal of Physiology and Chemistry 359: 89-101

Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C., Pogue, G.P. (2002). *Barley stripe mosaic virus* induced gene silencing in a monocot plant. The Plant Journal 30: 315–327.

Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. & Fraley, R.T., (1985): A simpleand general method for transferring genes into plants. Science 227: 1229-1231

Horvath, P.D., Anderson, J.V., Chao, W.S. & Foley, M.E. (2003): Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. Trends in Plant Science 8: 543-540

Houba-Herin, N., Pethe, C., d'Alayer, J. & Laloue, M. (1999): *Cytokinin oxidase* from *Zea mays*: Purification, *cDNA* cloning and expression in moss protoplasts. The Plant Journal 17: 615-26

Huisman, M.J., Linthorst, H.J., Bol, J.F. & Cornelissen, J.C. (1988): The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. Journal of General Virology 69: 1789-1798

Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96: 23-28

Inzé, D., Follin, A., Van Lijsebettens, M., Simonens, C., Genetello, M., Van Montagu, M. & Schell, J. (1984): Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. Molecular and General Genetics 194: 265-274

Ishikawa, S., Maekawa, M., Arite, T., Onishi, K., Takamure, I. & Kyozuka, J. (2005): Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. Plant Cell Physiology 46: 79-86

Jackson, M.B. (1993) Are plant hormones involved in root to shoot communication? Advances in Botanical Research 19: 103-187

Jepson, I., Martinez, A. & Sweetman, J.P. (1998): Chemical-inducible gene expression systems for plants – a review. Pesticide Sciences 54: 360-367

Junker, B.H., Ch, C., Sonnewald, U., Willmitzer, L. & Fernie, A.R. (2003): In plants the *alc* gene expression system responds more rapidly following induction with acetaldahyde than with ethanol. FEBS Letters 53: 136-140

Kakimoto, T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: *ATP/ADP isopentenyltransferases.* Plant Cell Physiology 42: 677-685

Kaminek, M. (1974): Evolution of tRNA and origin of the two positional isomers of zeatin. Journal of Theoretical Biology 48: 489

Kaminek, M. (1992): Progress in cytokinin research. Trends in Biotechnology 10: 159-164

Kaminek, M., Motyka, V. & Vankova, R. (1997): Regulation of cytokinin content in plant cells. Physiologia Plantarum 101: 689-700

Karczmarek, A., Overmars, H., Helder, J. & Goverse, A. (2004): Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and transient activation of a specific auxin-inducible promotor element. Molecular Plant Pathology 5: 343-346

Kawaguchi, M., Fujioka, S., Sakurai, A., Yamaki, Y.T., & Syono, K. (1993): Presence of a Pathway for the Biosynthesis of Auxin via Indole-3-Acetaminde in *Trifoliata Orange*. Plant Cell Physiology 34: 121-128

Kawaguchi, M., Kobayashi, M., Sakurai, A. & Syono, K. (1991): The Presence of an Enzyme that Converts Indole-3-acteamide into *IAA* in Wild and Cultivated Rice. Plant Cell Physiology 32: 143- 149

Kende, H. & Zeevart, J.A.D. (1997): The five classical plant hormones. The Plant Cell 9: 1197-1210

Klee, H.J., Horsch, R.B., Hichee, M.A., Hein, M.B. & Hoffmann, N.L. (1987): The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* auxin biosynthetic genes in transgenic petunia plants. Genes & Development 1: 86-96

Klee, H.J., Horsch, R.B. & Rogers, S.G. (1987). *Agrobacterium-mediated* plant transformation and its further applications to plant biology. Annual Reviews of Plant Physiology 38: 467-486

Klee, H.J. & Romano, C.P. (1994): The Roles of Phytohormones in Development as Studied in Transgenic Plants. Critical Reviews in Plants Sciences 13: 311-324

Klee, H.J. & Lanahan, M.B. (1995): Transgenic plants in hormone biology. In Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development, P.J. Davies (ed.) (Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff)

Kooter, J.M., Matzke, M.A., Meyer, P. (1999): Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. Trends in Plant Science 4: 340-347

Kosuge, T., Comai, L. & Glass, N.L. (1983): Virulence determinants in plant-pathogen interactions. In Plant Molecular Biology, R.P. Goldberg (ed.), (Alan R. Liss, Inc.)

Kumagai, M.H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. and Grill, L.K. (1995): Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived *RNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 1679-1683.

Kunkel, T., Niu, Q., Chan, Y., Chua, N., Niu, Q.W., Chan, Y.S. & Chua, N.H. (1999): Inducible *isopentenyl transferase* as a high efficiency marker for plant transformation. Nature Biotechnology 17: 916-919

Lacomme, C., Smolenska, L., Michael, T. & Wilson A. (1998): Genetic Engineering and the expression of foreign peptides or proteins with plant virus-based vectors. Genetic engineering 20: 225-237

Lacomme, C., Hrubikova, K., Hein, I. (2003): Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats. The Plant Journal 34: 543-553

Lazar, G. & Goodman, H.M. (2006): *MAX1*, a regulator of the flavonoid pathway, controls vegetative axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 472-476

Leffel, S.M., Mabon, S.A. & Stewart, C.N. Jr. (1997): Applications of green fluorescent protein in plants. Biotechniques 23: 912-918

Letham, D.S. (1978) : Cytokinins. In Letham, D.S., Goodwin, P.B., Higgins, T.J.V. (Hrsg.) : Phytohormones and related compounds : A comprehensive treatise. Vol.1, Elsevier

Letham, D.S. (1994): Cytokinins as phytohormones − sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinins. - In: Mok, D.W.S., Mok, M.C. (ed.): Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. CRC Press

Leyser, H.M., Lincoln, C.A., Timpte, C., Lammer, D., Turner, J. & Estelle M. (1993): *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. Nature 364: 161-164

Leyser, H.M., Pickett, F.B., Dharmasiri, S. & Estelle, M (1996): Mutations in the AXR3 gene of Arabidopsis result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promotor. The Plant Journal 10: 403-413

Li, H., Johnson, P., Stepanova, A., Alonso, J.M. & Ecker J.R. (2004): Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. Developmental Cell 7: 193-204

Li, C.J. & Bangerth, F. (2003): Stimulatory effect of cytokinins and interaction with *IAA* on the release of lateral buds of pea plants from apical dominance. Journal of Plant Physiology 160: 1059-1063

Li, C.J., Guevara, E., Herrera, J. & Bangerth, F. (1995): Effect of apex excision and replacement by 1-naphthylacetic acid on cytokinin concentration and apical dominance in pea plants. Physiologia Plantarum 94: 465-469

Lincoln, C., Britton, J.H. & Estelle, M. (1990): Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. The Plant Cell 2: 1071-1080

Liu, H., Reavy, B., Swanson, M., MacFarlane, S. (2002a): Functional replacement of the t*obacco rattle virus* cysteine-rich protein by pathogenicity proteins from unrelated viruses. Virology 298: 232–239

Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P. (2002b): Virus-induced gene silencing in tomato. The Plant Journal 31: 777–786

Ljung, K., Bhalerao, R.P. & Sandberg, G. (2001a): Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. The Plant Journal 28: 465-474

Ljung, K., Ostin, A., Lioussanne, L. & Sandberg, G. (2001b): Developmental regualtion of indole-3-acetic acid turnover in Scots pine seedlings. Plant Physiology 125: 464-475

Love, J., Scott, A.C., Thompson, W.F. (2000): Technical advance: stringent control of transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using the Top10 promotor system. The Plant Journal 21: 579-588

Lu, R., Martin-Hernandez, A.M., Peart, J.R., Malcuit, I. and Baulcombe, D.C. (2003a): Virus-induced gene silencing in plants. Methods 30: 296–303

Lu, R., Malcuit, I., Moffett, P., Ruiz, M.T., Peart, J., Wu, A.J., Rathjen, J.P., Bendahmane, A., Day, L., Baulcombe, D.C. (2003b): High throughput virus-induced gene silencing implicates *heat shock protein 90* in plant disease resistance. EMBO Journal 22: 5690–5699.

Ludwig-Müller, J. & Hilgenberg, W. (1995): Characterization and partial purification of indole-3-butyric acid synthase from maize (*Zea mays*). Physiologia Plantarum 94: 651-660

MacFarlane, S.A. (1999): Molecular biology of the *Tobraviruses* (1999). Journal of General Virology 80: 2799–2807

MacFarlane, S.A., Popovich, A.H. (2000): Efficient expression of foreign proteins in roots from tobravirus vectors. Virology 267: 29–35

Magie, A.R., Wilson, E.E. & Kosuge, T. (1963): Indoleacetamide as an intermediate in the synthesis of indole acetic acid in *Pseudomonas savastanoi*. Science 141: 1281-1282

Maizel, A. & Weigel, D. (2004): Temporally and spatially controlled induction of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 38: 164-171

Manulis, S., Shafir, H., Epstein, E, Lichter, A. & Barash, I. (1994): Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. Microbiology 140: 1045-1050

Martin-Tanguy, J., Tepfer, D., Paynot, M., Burtin, D., Heisler, L. & Martin, C. (1990): Inverse relationship between polyamine levels and the degree of phenotypic alteration induced by the *Ri TL-DNA* from *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Physiology 92: 912-918

Martinez, A., Sparks, C., Hart, C.A., Thompson, J. and Jepson, I. (1999): Ecdysone agonist inducible transcription in transgenic tobacco plants. The Plant Journal 19: 97–106

Mattanovich, D., Ruker, F., Machado, A.C., Laimer, M., Regner, F., Steinkellner, H., Himmler, G. & Katinger, H., (1989): Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. Nucleic Acids Research 17: 6747

Maurel, C., Barbier-Brygoo, H., Spena, A., Tempe, J. & Guern, J. (1991): Single *rol* genes from *Argrobacterium rhizogenes TL-DNA* alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotina tabacum*. Plant Physiology 97: 212-216

McGaw, B.A. (1987). Cytokinin biosynthesis and metabolism. In Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development, P.J. Davies, ed (Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff)

McKenzie, M.J., Mett, V., Reynolds, P.H.S. & Jameson, P.E. (1998): Controlled cytokinin production in transgenic tobacco using a copper-inducible promoter. Plant Physiology 116: 969-977

McSteen, P. & Leyser, O. (2005): Shoot Branching. Annual Reviews of Plant Biology 56: 353-374

Medford, J.I., Horgan, R., El-Sawi, Z. & Klee, H.J. (1989): Alterations of endogeneous cytokinins in transgenic plants using a chimeric i*sopentenyl transferase* gene. The Plant Cell 1: 403-413

Michael, T. & Spena, A. (1995): The plant oncogenes *rolA, B,* and *C* from *Agrobacterium rhizogenes*. Effects on morphology, development, and hormone metabolism. Methods in Molecular Biology 44: 207-222

Michalczuk, L., Ribnicky, D.M., Cooke, T.J. & Cohen, J.D. (1992): Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathway in carrot cell cultures. Plant Physiology 100: 1346-1353

Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. & Kakimoto, T. (2004): Expression of cytokinin biosynthetic *isopentenyltransferase genes* in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin and nitrate. The Plant Journal 37: 128-38

Mok, D.W.S., Mok, M.C. (2001): Cytokinin Metabolism and Action. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 89-118

Moniz de Sa, M. & Drouin, G. (1996): Phylogeny and substitution rates of angiosperm actin genes. Molecular Biology and Evolution 13: 1198-1212

Moore, C.T. (1989) Auxins. *In* Moore, C.T., ed, Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer Verlag, New York

Moritz, T. & Schmülling, T. (1998): The gibberellin content of *rolA* transgenic tobacco plants is specifically altered. Journal of Plant Physiology 153: 774-776

Morris, D.A. (1977): Transport of exogenous auxin in two-branched dwarf pea seedlings (*Pisum sativum* L.). Planta 136: 91-96

Morris, R.O., Bilyeu, K.D., Laskey, J.G. & Cheikh, N.N. (1999): Isolation of a gene encoding a glycosylated *cytokinin oxidase* from maize. Biochem. Biophys. Res. Commun. 16: 328-333

Morris, S.E., Turnbull, C.G., Murfet, I.C. & Beveridge C.A. (2001): Mutational analysis of branching in pea. Evidence that *Rms1* and *Rms5* regulate the same novel signal. Plant Physiology 126: 1205-1213

Motyka, V., Faiss, M., Strand, M., Kaminek, M. & Schmulling, T. (1996): Changes in Cytokinin Content and Cytokinin Oxidase Activity in Response to Derepression of *ipt* Gene Transcription in Transgeic Tobacco Calli and Plants. Plant Physiology 112: 1035-1043

Müller, A. & Weiler, E.W. (2000): Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of *Arabidopsis thaliana*. Planta 211: 855-863

Murashige, T. & Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 473-497

Nagel, R., Elliot, A., Masel, A., Birch, R.G. & Manners, J.M., (1990): Elektroporation of binary Ti plasmids vektors into *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes*. FEMS Microbiology Letters 67: 325-328

Nakamura, A., Higuchi, K., Goda, H., Fujiwara, M., Sawa, S., Koshiba, T., Shimada, Y. & Yoshida, S. (2003): Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in Arabidopsis implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signalling. Plant Physiology 133: 1843-1853

Napoli, C. & Klee, H. (1993): Phentype modification in horticultural crops through hormonal control. Scientia Hoticultura 55: 161-175

Napoli, C.A. (1996). Highly branched phenotype of the petunia *dad1–1* mutant is reversed by grafting. Plant Physiology 111: 27–37

Nilsson, O., Moritz, T., Imbault, N., Sandberg, G. & Olsson, O. (1993): Hormonal characterization of transgenic tobacco plants expressing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA. Plant Physiology 102: 363-371

Nilsson, O., Moritz, T., Sundberg, B., Sandberg, G. & Olsson, O. (1996): Expression of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene in a deciduous forest tree alters growth and development and leads to stem fasciation. Plant Physiology 112: 493-502

Nilsson, O. & Olsson, O. (1997): Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots, Physiologia Plantarum 100: 463-473

Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Astot, C., Dolezal, K. & Sandberg, G. (2004): Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of Potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 8039-44

Normanly, J. (1997): Auxin metabolism. Physiologia Plantarum 100: 431-442

Normanly, J., Cohen, J.D. & Fink, G.R. (1993): *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 10355-10359

Normanly, J. & Bartel, B. (1999): Redundancy as a way of life-*IAA* metabolism. Current Opinion in Plant Biology 2: 207-213

Normanly, J., Slovin, J.P. & Cohen, J.D. (1995): Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. Plant Physiology 107: 323-329

Ooms, G. & Lenton, J.R. (1985): T-DNA genes to study plant development: precocious tuberisation and enhanced cytokinins in *A. tumefaciens* transformed potato. Plant Molecular Biology 5: 205-212

Ooms, G., Risiott, R., Kendall, A., Keys, A., Lawlor, D., Smith, S., Turner, J. & Young, A. (1991): Phenotypic changes in T-cyt-transformed potato plants are consistent with enhanced sensitivity of specific cell types to normal regulation by root-derived cytokinin. Plant Molecular Biology 17: 727-743

Oono, Y., Kanaya, K. & Uchimiya, H. (1990): Early flowering in transgenic tobacco plants possessing the rolC gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid. Japanese Journal of Genetic 65: 7-16

Oono, Y., Chen, Q.G., Overvoorde, P.J., Köhler, C. & Theologis, A. (1998): *age* mutants of *Arabidopsis* exhibit altered auxin-regulated gene expression. The Plant Cell 10: 1649-1662

Oono, Y., Ooura, C. & Uchimiya, H. (2002): Expression pattern of Aux/IAA genes in the *iaa3/shy2-ID* mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Annals of Botany 89: 77-89

Ottenschläger, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M. & Palme, K. (2003): Gravitiy-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 2987-2991

Paces, V., Werstiuk, E., & Hall, R.H. (1971): Conversion of N-(Delta-Isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. Plant Physiology 48: 775-778

Padidam, M. (2003): Chemically regulated gene expression in plants. Current Opinion in Plant Biology 6: 169-177

Palni L.M.S., Burch L. & Horgan R. (1988): The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. Planta 174: 231-234

Panigrahi, B.M. & Audus, L. (1966): Apical dominance in *Vicia faba*. Annals of Botany 30: 457-473

Park, W.J., Schäfer, A., Prinsen, E., van Onckelen, H., Kang, B.G. & Hertel, R. (2001): Auxin-induced elongation of short maize coleoptile segments is supported by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. Planta 213: 92-100

Phillips I.D.J. (1975): Apical dominance. Annual Reviews of Plant Physiology 26: 341-367

Pilate, G., Sossountzov, L. & Miginiac, E. (1989): Hormone levels and apical dominance in the aquatic fern Marsilea drummondii A. Plant Physiology 90: 907-912

Prasad, T.K., Hosokawa, Z. & Cline, M.G. (1989): Effects of auxin, auxin-transport inhibition and mineral nutrients on apical dominance in *Pharbitis nil*. Journal of Plant Physiology 135: 472-477

Prasad, T.K., Li, X., Abdel-Rahman, A.M., Hosokawa, Z., Cloud, N.P., LaMotte, C.E. & Cline M.G. (1993): Does auxin play a role in the release of apical dominance by shoot inversion in *Ipomoea nil*? Annals of Botany 71: 223-29

Prinsen, E., Chriqui, .D, Vilaine, F., Tepfer, M. & van Onckelen, H. (1994): *Pisum sativum* epicotyls inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* agropine strains harbouring various transfer DNA fragments-morphology, histology and endogenous

indole-3-acetic acid and indole-3-acetamide content. Journal of Plant Physiology 140: 80-85

Prior, A.M. (2000): Struktur und Funktion einer pflanzlichen Adenosin-5`-phosphosulfat-Reduktase aus *Catharanthus roseus* (L.). Dissertation. Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, Ruhr-Universität Bochum

Ratcliff, F., Harrison, B.D. & Baulcombe, D.C. (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. Science 276: 1558-1560

Ratcliff, F., MacFarlane, S. & Baulcombe, D.C. (1999) Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross protection between viruses. The Plant Cell 11: 1207-1215

Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M. & Baulcombe, D.C. (2001): *Tobacco rattle virus* as a vector for analysis of gene function by silencing. The Plant Journal 25: 237-245

Redig, P., Schmülling, T. & van Onckelen, H. (1996): Analysis of cytokinin metabolism in ipt transgenic tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Plant Physiology 112: 141-148

Reintanz, B., Lehnen, M., Reichelt, M., Gerhenzon, J., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Godde, M., Uhl, R. & Palme K. (2001): *bus*, a Bushy Arabidopsis *CYP79F1* Knockout Mutant with Abolished Synthesis of Short-Chain Aliphatic Glucosinolates. The Plant Cell 13: 351-367

Roberto, F.F., Klee, H., White, F., Nordeen, R. & Kosuge, T. (1990): Expression and fine structure of the gene encoding N-(indole-3-acetyl)-L-lysine synthetase from *Pseudomonas savastanoi.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87: 5797-5801

Robertson, D. (2004). VIGS vector for gene silencing: many targets, many tools. Annual Reviews Plant Biology 55: 495–519

Rodrigues-Pousada, R., Van Caeneghem, W., Chauvaux, N., Van Onckelen, H.,Van Montagu, M. & Van Der Straeten, D. (1999): Hormonal cross-talk regulates the *Arabidopsis thaliana* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene *1* in a developmental and tissue-dependent manner. Physiologia Plantarum 105: 312–320

Romano, C.P., Cooper, M.L. & Klee, H.J. (1993): Uncoupling Auxin and Ethylene Effects in Transgenic Tobacco and *Arabidopsis* Plants. The Plant Cell 5: 181-189

Romano, C.P., Hein, M.B. & Klee, H.J. (1991): Inactivation of auxin in tobacco transformend with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. Genes Development 5: 438-46

Romano, C.P., Robson, P.R.H., Smith, H., Estelle, M. & Klee, H. (1995): Transgene-mediated auxin overproduction in *Arabidopsis*: hypocotyls elongation phenotype and interactions with the hy6-1 hypocotyl elongation and axr1 auxin-resistant mutants. Plant Molecular Biology 27: 1071-1083

Rommens, C.M., Salmeron, J.M., Baulcombe, D.C. & Staskawicz, B.J. (1995): Use of a gene expression system based on potato virus X to rapidly identify and characterize a tomato Pto homolog that controls fenthion sensitivity. The Plant Cell 7: 249-257

Roslan, H.A., Salter, M.G., Wood, C.D., White, M.R., Croft, K.P., Robson, F., Coupland, G., Doonan, J., Laufs, P., Tomsett, A.B. & Caddick, M.X. (2001): Characterization of the ethanol-inducible *alc* gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 28: 225-235

Rotino, G.L., Perri, E., Zottini, M., Sommer, H. & Spena, A. (1997): Genetic engineering of parthenocarpic plants. Nature Biotechnology 15: 1398-1401

Ruegger, M., Dewey, E., Hobbie, L., Brown, D., Bernasconi, P., Turner, J., Muday, G. & Estelle M. (1997): Reduced naphthylphtalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. The Plant Cell 9: 745-757

Ruiz, M.T., Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. The Plant Cell 10: 937-946

Rupp, H.M., Frank, M., Werner, T., Strnad, M., Schmülling, T. (1999) Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. The Plant Journal 18: 357-363

Ryu, C.M., Anand, A., Kang, L. and Mysore, K.S. (2004): Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse Solanaceous species. The Plant Journal 40: 322-31

Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechthold, N., Weisbeek, P. & Scheres B. (1999): An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis root.* Cell 99: 463-472

Sachs, T. & Thimann, K.V. (1964): Release of lateral buds from apical dominance. Nature 201: 939-940

Salter, M.G., Paine, J.A., Riddell, K.V., Jepson, I., Greenland, A.J., Caddick, M.X. and Tomsett, A.B. (1998)**:** Characterisation of the ethanol-inducible *alc* gene expression system for transgenic plants. The Plant Journal 16, 127-132.

Samalova, M., Brzobohaty, B. & Moore, I. (2005): pOp/LhGR: a stringently regulated and highly responsive dexamethasone-inducible gene expression system for tobacco. The Plant Journal 41: 9191-935

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Saotome, M., Shirahata, K., Nishimura, R., Yahaba, M., Kawaguschi, M., Syono, K., Kitsuwa, T., Ishii, Y. & Nakamura, T. (1993): The Identification of Indole-3-Acetic Acid

and Inole-3-Acetamide in the Hypocotyls of Japanese Cherry. Plant Cell Physiology 34: 157-159

Schneider, E.A. & Wightman, F. (1974): Amino acid metabolism in plants. V. changes in basic indole compounds and the development of tryptophan decarboxylase activity in barley (*Hordeum vulgare*) during germination and seedling growth. Canadian Journal of Biochemistry 52: 698-705

Scholthof, H.B., Scholthof, K.B. & Kackson, A.O. (1996): Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. Annual Reviews of Phytopathology 34: 299-323

Scorza, R., Zimmermann, T.W., Cordts, J.M., Footen, K.J. & Ravelonandro, M. (1994): Horticultural characteristics of transgenic tobacco expressing the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. Journal Am Soc Hortic Sci 119: 1091-1098

Schaarschmidt, S., Qu, N., Strack, D., Sonnewald, U. & Hause, B. (2004): Local induction of the alc gene switch in transgenic tobacco plants by acetaldehyde. Plant Cell Physiology 45: 1566-1577

Schmülling, T., Schell, J. & Spena, A. (1988): Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. EMBO Journal 7: 2621-2629

Schmülling, T., Beinsberger, S., De Greef, J., Schell, J., van Onckelen, H. & Spena, A. (1989): Construction of a heat-inducible chimeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue. FEBS Letters 289: 401-406

Schmülling, T., Schell, J. (1993) Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. Plant Molecular Biology 21: 705-708

Schmülling T. (2003): Structure and function of cytokinin oxidase-dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. Journal of Plant Research 116, 241-252

Schmülling, T. (2004) Cytokinin. *In* Encyclopedia of Biological Chemistry (Eds. Lennarz, W., Lane, M.D.) Academic Press/Elsevier Science

Schröder, G., Waffenschmidt, S., Weiler, E.W.& Schröder, J. (1984): The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. European Journal of Biochemistry 138: 387-391

Schwartz, S.H., Qin, X. & Loewen, M.C. (2004): The biochemical characterization of two carotinoid cleavage enzymes fom *Arabidopsis* indicates that a carotinoid-derived compound inhibits lateral branching. Journal of Biological Chemistry 279: 46940-46945

Sekimoto, H., Seo, M., Dohmae, N., Takio, K., Kamiya, Y. & Koshiba, T. (1997): Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase. Journal of Biological Chemistry 272: 15280-15285

Sekimoto, H., Seo, M., Kawakami, N., Komano, T., Desloire, S., Liotenberg, S., Marion-Poll, A., Caboche M., Kamiya, Y. & Koshiba, T. (1998): Molecular cloning and charakterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology 39: 433-442

Sharma, P.C., Ito, A., Shimizu, T., Terauchi, R., Kamoun, S. & Saitoh, H. (2003): Virus-induced silencing of WIPK and SIPK genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. Molecular Genetics Genomics 269: 583–591.

Singh, S., Letham, D.S. & Palni, L.M.S. (1992): Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. Physiologia Plantarum 86: 398-406

Sinkar, V.P., Pythoud, F., White, F.F., Nester, E.W. & Gordon, M.P. (1988): *rolA* locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic tobacco plants**.** Genes & Development 2: 688-697

Sitbon, F., Hennion, S., Sundberg, B., Little, C.H., Olsson, O.& Sandberg,G. (1992): Transgenic Tobacco plants Coexpressing the *Agrobacterium tumefaciens iaaM* and *iaaH* Genes Display Sltered Growth and Indoleacetic Acid Metabolism. Plant Physiology 99: 1062-1069

Sitbon, F., Sundberg, B., Olsson, O.&Sandberg, G. (1991): Free and Conjugated Indoleacetic Acid (*IAA*) Contens in Trangenic Tobacco Plants Expressing the *iaaM* and *iaaH* Biosynthesis Genes from *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology 95: 480-485

Skoog, F. & Miller, C.O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-131

Smigocki, A.C. & Owens, L.D. (1988): Cytokinin gene fused with a strong promotor enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85: 5131-5135

Smigocki, A.C. & Owens, L.D. (1989): Cytokinin-to-Auxin ratios and morphology of shoots and tissues transformed by a chimeric isopentenyl transferase gene. Plant Physiology 91: 808-811

Smigocki, A.C. (1991): Cytokinin content and tissue distribution in plants transformed by a reconstructed isopentenyl transferase gene. Plant Molecular Biology 16: 105-115

Snow, R. (1937): On the nature of correlative inhibition. New Phytologist 36: 283-300

Snowden, K.C., Simkin, A.J., Janssen, B.J., Templeton, K.R., Loucas, H.M., Simons, J.L., Karunairetnem, S., Gleave, A.P., Clark, D.G. & Klee, H.J. (2005): The *Dad1/PhCCD8* gene affects brunch production and has a role in leaf senescence, root growth and flower development. The Plant Cell 17: 746-759

Snyder, W.E. (1949): Some responses of plants to 2,3,5-triiodo-benzoic acid. Plant Physiology 24: 195-206

Sorefan, K., Booker, J., Haurogne, K., Goussot, M., Bainbridge, K., Foo, E., Chatfield, S., Ward, S., Beveridge, C., Rameau, C. (2003): *MAX4* and *RMS1* are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. Genes & Development 17: 1469-1474

Spena A., Prinsen E., Fladung M., Schulze S.C. & H. van Onckelen (1991): The indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas syringa*e ssp. *savastanoi* induces developmental alterations in transgenic tobacco and potato plants. Molecular and General Genetics 227: 205-212

Spena, A., Schmülling, T., Koncz, C. & Schell, J.S. (1987): Independent and synergistic activity of *rol A, B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. The EMBO Journal 6: 3891-3999

Stafstrom, J. (1993): Axillary bud development in pea: apical dominance, growth cycles, hormonal regulation and plant architecture. In Cell Communication in Plants. Edited by Amasino, R, Plenum Publishing

Stirnberg, P., Chatfield, S.P. & Leyser, H.M. (1999): *AXR1* acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in *Arabidopsis*. Plant Physiology 121: 839-847

Stirnberg, P., Van de Sande, K. & Leyser, H.M. (2002): *MAX1* and *MAX2* control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. Development 129: 1131-1141

Sun, L.Y., Monneusse, M.O., Martin-Tanguy, J. & Tepfer, D. (1991): Changes in flowering and the accumulation of polyamines and hydroxycinnamic acid-polyamine conjugates in tobacco plants transformed by the *rolA* locus from the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Science 80: 145-156

Sweetmann, J.P., Chu, C., Qu, N., Greenland, A.J., Sonnewald, U. & Jepson, I. (2002): Ethanol vapour is an efficient inducer of the alc gene expression system in model and cop plant species. Plant Physiology 129: 943-948

Szittya, G., Silhavy, D., Molnar, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Banfalvi, Z. & Burgyan, J. (2003): Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. EMBO Journal 22: 633-640

Takahashi, N., Yamaguchi, I., Kono, T., Igoshi, M., Hirose, K., Suzuki, K. (1975) Characterization of plant growth substances in *Citrus unshiu* and their change in fruit development. Plant Cell Physiology 16: 1101–1111

Takai, K., Sakakibara, H. & Sugiyama, T. (2001): Identification of genes encoding *adenylate isopentenyltransferase*, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. Journal Bio.Chemistry 276: 26405-26410

Takamatsu, N., Ishikawa, M., Meshi, T. & Okada, Y. (1987): Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. EMBO Journal 6: 307-311

Tamas, I.A. (1987): Hormonal regulation of apical dominance. In Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development (P.J. Davies, ed.), 393-410

Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H. & Mori, H. (2006): Auxin controls local biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. The Plant Journal 45: 1028-1036

Tantikanjana, T., Yong, J.W.H., Letham, D.S., Griffith, M., Hussain, M., Ljung, K., Sandberg, G. & Sundaresan, V. (2001): Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the *SUPERSHOOT* gene. Genes Development 15: 1577-1588

Thimann, K.V. & Skoog, F. (1933): Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 19: 714-716

Thimann, K.V. & Skoog, F. (1934): On the Inhibition of Bud Development and other Functions of Growth Substance in *Vicia faba.* Proceedings of the Royal Society of London. Series B 114: 317-339

Thomas, C.L., Jones, L.D. & Maule, A.J. (2001): Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for using RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a *potato virus X* vector. The Plant Journal 25: 417-425

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680

Trewavas AJ (1982): Growth substance sensitivity: The limiting factor in plant development. Physiologia Plantarum 55: 60–72

Trewavas, A.J. & Cleland, R.E. (1983): Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances. Trends in Biochemical Sciences 8: 349-357

Turnage, M.A., Muangsan, N., Peele, C.G. & Robertson, D. (2002): Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. The Plant Journal 30: 107-114

Turnbull C.G.N., Raymond M.A.A., Dodd I.C. & Morris S.E. (1997): Rapid increases in cytokinin concentration in lateral buds of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during release of apical dominance. Planta 202: 271-276

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. & Guilfoyle, T.J. (1997): *AUX/IAA* proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. The Plant Cell 9: 1963-1971

Van Altvorst, A.C.; Bino, R.J., van Dijk, A.J., Lamers, A.M.J., Lindhout, W.H., van der Mark, F. & Dons, J.J.M. (1992): Effects of the introduction of *Agrobacterium rhizogenes rol* genes on tomato plant and flower development. Plant Science 83: 77-85

Van der Hoeven, R.S., Garvin, D., Matern, A.L., Holt, I.E., Liang, F., Upton, J., Hansen, T., Craven, M.B., Bowman, C.L., Ahn, S., Ronning, C.M., Fraser, C.M., Martin, G.B., Giovannoni, J.J. & Tanksley, S.D. (1999): Generation of ESTs from tomato root tissue. Clemson University Genomics Institute, USA, unveröffentlicht

Van Loven, K., Beinsberger, S.E.I., Valcke, R.L.M., Van Onckelen, H.A. & Clijsters H.M.M. (1993): Morphometric analysis of the growth of P*hsp70-ipt* transgenic tobacco plants. Journal of Expreimental Botany 44: 1671-1678

Vansuyt, G., Vilaine, F., Tepfer, M. & Rossignol, M. (1992): *rolA* modulates the sensitivity to auxin of the proton translocation catalysed by the plasma membrane H^+-ATPase I transformed tobacco. FEBS Letters 289: 89-92

Vorwerk, S., Biernacki, S., Hillebrand, H., Janzik, I., Müller, A., Weiler, E.W., Piotrowski, M. (2001): Enzymatic characterization of the recombinant *Arabidopsis thaliana* nitrilase subfamily encoded by the *NIT*2/*NIT*1/*NIT*3-gene cluster. Planta 212: 508-516

Waterhouse, P.M., Wang, M.-B.& Lough T. (2001): Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature 411:834-842

Waterhouse, P.M. & Helliwell, C.A. (2003): Exploring Plant Genomes by RNA-induced gene silencing. Nature Reviews 4: 29-38

Ward, S.P. & Leyser, O. (2004): Shoot branching. Current Opinion in Plant Biology 7: 73-78

Weinmann, P., M. Gossen, W. Hillen, H. Bujard and C. Gatz (1994): A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. The Plant Journal 5: 559-569

Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H. & Schmülling, T. (2003): Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants show Muliple developmental Alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activty. The Plant Cell 15: 2532-2550

Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. & Schmulling, T. (2001): Regulation of plant growth by cytokinin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 10487-92

Wickson M. & Thimann K.V. (1958): The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance. Physiologia Plantarum 11: 62-74

Winefield, C., Lewis, D., Arathoon, S. & Deroles, S. (1999): Alterations of Petunia plant form through the introduction of the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. Molecular Breeding 5: 543-551

Whitty, C.D. & Hall, R.H. (1974): A cytokinin oxidase in Zea mays. Canadian Journal of Biochemistry 52: 787-799

Woo, H.R., Chung, K.M., Park, J.H., Oh, S.A., Ahn, T., Hong, S.H., Jang, S.K. & Nam, H.G. (2001): ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. The Plant Cell 13: 1779-1790

Wright, A.D., Moehlenkamp, C.A., Perrot, G.H., Neuffer, M.G. & Cone K.C. (1992): The maize auxotrophic mutant *orange pericarp* is defective in duplicate genes for *tryptophan synthase ß*. The Plant Cell 4: 711-719

Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D. and Doke, N. (2003): *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H2O2 accumulation and resistance to Phytophthora infestans. The Plant Cell 15: 706–718

Zambryski P, Depicker A, Kruger K, Goodman HM (1982): Tumor induction by A*grobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. Journal of Molecular and Applied Genetics 1:361–370

Zubko, E. (2002)**:** Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. The Plant Journal 29: 797-808

Zuo, J. & Chua, N.H. (2000): Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. Current Opinion in Biotechnology 11: 146-151

Zou, J., Zhang, S., Zhang, W., Li, G., Chen, Z., Zhai, W., Zhao, X., Pan, X., Xie, Q. & Zhu, L. (2006): The rice HIGH-TILLERING *DWARF1* encoding an otholog of *Arabidopsis MAX3* is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. The Plant Journal 48: 687-698

8. Anhang

8.1. Sequenzen der verwendeten bakteriellen Gene

iaaH

```
   1 atggtggccattacctcgttagcacaaaccctagaacgcatcagactga
  50 aggaatactcctgcctagaactagtggaaactctgatagcgcgttgtga
 100 agctgcaaaatcactaaacgcccttctggctacagactgggatggcttg
 150 cggcgaagcgcaaaacaaattgatcgccatggaaacgccggagtaggtc
 200 tttgcggcattccactctgttttaaggcgaacatcgcgaccggcatatt
 250 tcctgcaagcgctgctacgccggcgctgataaaccacttgccaaagata
 300 ccatcccgcgtcgcagaaagactttttcagctggagcactgccgggtg
 350 cctcgggaaacatgcatgagttatcgtttggaattacgagtaacaacta
 400 tgccaccggggcggttcggaacccgtggaatccaagtctgataccagga
 450 gggtcaagcggtggtgtggcggctgcggtggcaagccgattaatgttgg
 500 gcggcataggcaccgataccggggcatctgttcgccttccctcagccct
 550 atgtggggtagtaggatttcgaccgacgcttggtcgatatccaggagat
 600 cggataataccggttagccctacccgagacactcccggaatcatagcgc
 650 agtgcgtagccgatgttgtaatcctcgaccagataatttccggcacacc
 700 ggcgagaatgccacccataccgctgagggggctaaggatcggcctccct
 750 ataacctacttttatgatgaccttgatgctgatgtggccctagcagctga
 800 aacaacgattcgcctgctagcaaacaaaggcgtaacttttgttgaagcc
 850 aacattcctcacctagacgaactgaacagtggggccagtttaccaattg
 900 cactctatgaatttccacacgctctaaaacagtatctcgatgactttgta
 950 aaaactatttctttttctgacgtgattaaaggaattcgtagccctgatgt
1000 agccaacattgtcaatgcgcaaattgatggacatcaaatttccaaagctg
1050 catatgaactggcccgtcattccttcagaccaaggcttcaagccacatat
1100 cgcaactacttcagacttaataaattagatgcaattctcttcccaactg
1150 cacccttggtggccagacccataggtcaggattcctcagttatacacaat
1200 ggctcgatgatggacacattcaagatctacgtgcgaaatgtggacccaa
1250 gcagcaacgcaggcctacctggcctgagcattcctgtttgccttacacc
1300 tgatcgcttgcctgttggaatggagatcgatggattagcgggttcagac
1350 caacgtctgttagcaatagggggggcattggaagaagccattggattcc
1400 gatatcgtgccggtttacccaattaa
```

iaaL

```
   1 atgactgcctacgatatggaaaaggaatggagcagaatttccagcactg
  50 ccgctaaaatccaccagaacaacgattttgaaggattcacttatcagga
 100 cttcagaacccacgtaccgatcatggacaaagacggcttcgcggcacag
 150 actgaacgctgtctagagcgcaatgagcgaaactgcctgatcggcttta
 200 ccagtggcaccagcggcaacatcaaacgctgttattactactacgactg
 250 cgaagtcgatgaagacagctccctctccaacgtcttccgcagcaacggc
 300 tttattctgcccggtgatcgctgcgccaacctgttcacgatcaacctgt
 350 tttctgctctgaacaacacgattaccatgatggccggtaactgcggtgc
 400 tcacgtcgtgtccgtaggtgacatcaccctggtgaccaagagccatttc
 450 gaagcgcttaacccgatcaagctcaacgtactgctcggcgtgccatcca
 500 ctatcttgcagttcatcaatgccatgcaacataacggtgtgcacatcaa
```

550 tatcgagaaggttgtcttcaccggcgagagcctgaaaactttccagaag
600 aaaatcatcaggcaagcctttggcgaacaagtctccatcgtcggtgtgt
650 atggcagttccgagggcggcattctcggtttcaccaacagcccttgcca
700 cactgaatacgagtttctgtccgacaagtatttcatcgaaaaagaaggc
750 gacagcatcctcatcacctcgctgacccgagaaaactttacgccgctgc
800 tgaggtatcgcctaggagacaccgcaaccctttcgatgaaaggcgacaa
850 gctctacctgacagacatccagcgggaggacatgagcttcaacttcatg
900 ggcaacctcatcgggctgggcatcattcagcaaacgattaaacagacac
950 tgggccgatcgctggaaatccaggttcacctgtcagtgaccgaagagcg
1000 caaggaactggtgaccgttttcgttcaggcctctgaagtcgatgaagac
1050 gaacgcgtcagaatcgaaacagccatcgccgatatccccgacatcaaag
1100 aggcgtatcagaaaaaccaaggcagcgtgtcggtcctgcgcaaggatgc
1150 cagagactacgcggtctcggag cgaggcaaaatgctctacatcatcgac
1200 cgccgaaactga

ipt

1 atggacctgcatctaattttcggtccaacttgcacaggaaagacgacga
50 ccgcgatagctcttgcccagcagacagggcttccagtcctttcgcttga
100 tcgggtccaatgctgtcctcaactatcaaccggaagcggacgaccaaca
150 gtggaagaactgaaaggaacgacgcgtctctaccttgatgatcggcctc
200 tggtggagggtatcatcgcagccaagcaagctcatcataggctgatcga
250 ggaggtgtataatcatgaggccaacggcgggcttattcttgagggagga
300 tccacctcgttgctcaactgcatggcgcgaaacagctattggagtgcag
350 attttcgttggcatattattcgccacaagttacccgaccaagagacctt
400 catgaaagcggccaaggccagagttaagcagatgttgcaccccgctgca
450 ggccattctattattcaagagttggtttatctttggaatgaacctcggc
500 tgaggcccattctgaaagagatcgatggatatcgatatgccatgttgtt
550 tgctagccagaaccagatcacggcagatatgctattgcagcttgacgca
600 aatatggaaggtaagttgattaatgggatcgctcaggagtatttcatcc
650 atgcgcgccaacaggaacagaaattcccccaagttaacgcagccgcttt
700 cgacggattcgaaggtcatccgttcggaatgtatt

rolA

1 atggaattagccggactaaacgtcgccggcatggcccagaccttcggag
50 tattatcgctcgtctgttctaagcttgttaggcgtgcaaaggccaagag
100 gaaggccaaacgggtatccccgggcgaacgcgaccatcttgctgagcca
150 gccaatctgagcaccactcctttggccatgacttcccaagcccgaccgg
200 gacgttcaacgacccgcgagttgctgcgaagggaccctttgtcgccgga
250 cgtgaaaattcagacctacgggattaatacgcatttcgaaacaaaccta
300 cgggattaa

rolC

1 gaattcctgcagaatggctgaagacgacctgtgttctctctttttcaag
50 ctcaaagtggaggatgtgacaagcagcgatgagctagctagacacatga
100 agaacgcctcaaatgagcgtaaacccttgatcgagccgggtgagaatca
150 atcgatggatattgacgaagaaggagggtcggtgggccacgggctgctg
200 tacctctacgtcgactgcccgacgatgatgctctgcttctatggagggt
250 ccttgccttacaattggatgcaaggcgcactcctcaccaaccttccccc

300 gtaccagcatgatgtgactctcgatgaggtcaatagagggctcaggcaa
350 gcatcaggtttttcggttacgcggatcctatgcggagcgcctacttcg
400 ctgcattttctttccctgggcgtgtcatcaagctgaatgagcagatgga
450 gctaacttcgacaaagggaaagtgtctgacattcgacctctatgccagc
500 acccagcttaggttcgaacctggtgagttggtgaggcatggcgagtgca
550 agtttgcaatcggctaa

8.2. Insertionsbestimmung in den erzeugten transgenen *N. tabacum*-Linien

(nach Feldmann *et al*., 1997)

Plasmid	Transformand	Aufspaltung KnR:KnS	Anzahl chromosomaler T-DNA-Insertionen	χ^2 Wert für Insertionsanzahl
pBIN19-DR5-mgfp4	DR5-1	59/19 278/83	1 Locus 1 Locus	0,002 0,399
	DR5-2	Alle grün Alle grün	Mind. 2 Loci Mind. 2 Loci	
	DR5-c	227/10	Mind. 2 Loci	1,056
	DR5-5	270/122 288/97	1 Locus 1 Locus	3,696 0,007
	DR5-13	648/219 451/164	1 Locus 1 Locus	0,016 0,424
	DR5-14	Alle grün Alle grün	Mind. 2 Loci Mind. 2 Loci	

Plasmid	Transformand	Aufspaltung KnR:KnS	Anzahl chromosomaler T-DNA-Insertionen	χ^2 Wert für Insertionsanzahl
pBIN19 alcA-mgfp4	alcA-7	61/26 91/41 99/38	1 Locus 1 Locus 1 Locus	0,46 1,202 0,301
	alcA-10	144/38 206/77 138/55	1 Locus 1 Locus 1 Locus	0,816 0,481 0,649
	alcA-12	426/155 250/73	1 Locus 1 Locus	0,449 0,449
	alcA-13	210/23 134/19 250/8	2 Loci 2 Loci 2 Loci	1,834 3,861 2,288
	AlcA-14	152/43 147/58 179/68	1 Locus 1 Locus 1 Locus	0,512 0,612 0,376

Plasmid	Transformand	Aufspaltung KnR:KnS	Anzahl chromosomaler T-DNA-Insertionen	χ^2 Wert für Insertionsanzahl
pBIN19 DR5-mgfp4 alcA-iaaH	iaaH4	184/88 254/87 133/39	1 Locus 1 Locus 1 Locus	3,595 0,024 0,256
	iaaH6	180/62	1 Locus	0,033
	iaaH12	157/65 287/100 103/31	1 Locus 1 Locus 1 Locus	1,082 0,061 0,103
	iaaH15	204/6 180/7	2 Loci 2 Loci	2,737 0,957

Plasmid	Transformand	Aufspaltung KnR:KnS	Anzahl chromosomaler T-DNA-Insertionen	χ^2 Wert für Insertionsanzahl
pBIN19 DR5-mgfp4 alcA-iaaL	iaaL-1	121/38 61/77	1 Locus 1 Locus	0,068 0,427
	iaaL-2	75/29 218/57	1 Locus 1 Locus	0,222 1,482
	iaaL-3	140/43	1 Locus	0,134
	iaaL-4	307/99	1 Locus	0,041
	iaaL-6	317/25	2 Loci	0,36
	iaaL-11	alle grün	Mind. 2 Loci	
	iaaL-14	alle grün alle grün	Mind. 2 Loci Mind. 2 Loci	
	iaaL-17	233/76	1 Locus	0,014
	iaaL-18	alle grün alle grün	Mind. 2 Loci Mind. 2 Loci	
	iaaL-20	alle grün	Mind. 2 Loci	
	iaaL-21	439/137	1 Locus	0,231
	iaaL-22	190/52 168/80	1 Locus 1 Locus	0,788 3,197
	iaaL-23	alle gelb	Keine Insertion	
	iaaL-24	221/64	1 Locus	0,509
	iaaL-25	alle grün	Mind. 2 Loci	
	iaaL-26	250/92	1 Locus	0,347

Plasmid	Transformand	Aufspaltung KnR:KnS	Anzahl chromosomaler T-DNA-Insertionen	χ^2 Wert für Insertionsanzahl
pBIN19 DR5-mgfp4 alcA-ipt	ipt1	97/25 128/45 248/88	1 Locus 1 Locus 1 Locus	0,642 0,061 0,125
	ipt3	252/81 58/14 120/26	1 Locus 1 Locus 1 Locus	0,041 0,643 2,138
	ipt4-8	449/166	1 Locus	0,687
	ipt6-12	alle grün	Mind. 2 Loci	
	ipt6-14/2	101/23 265/91 191/57	1 Locus 1 Locus 1 Locus	1,515 0,03 0,276
	ipt9+	398/5 126/7	Mind. 2 Loci Mind. 2 Loci	
	ipt14	252/81 209/72	1 Locus 1 Locus	0,032 0,083
	ipt19	130/38 63/24 104/44	1 Locus 1 Locus 1 Locus	0,263 0,118 0,833
	ipt21+	146/49 177/51 243/78	1 Locus 1 Locus 1 Locus	0,00 0,437 0,034

Plasmid	Transformand	Aufspaltung KnR:KnS	Anzahl chromosomaler T-DNA-Insertionen	χ^2 Wert für Insertionsanzahl
pBIN19 DR5-mgfp4 alcA-rolA	rolA1	274//77 314/100 119/53	1 Locus 1 Locus 1 Locus	0,384 0,069 1,445
	rolA2	298/99 131/44 216/56	1 Locus 1 Locus 1 Locus	0,00 0,00 1,504
	rolA3	141/29 189/64 308/86	1 Locus 1 Locus 1 Locus	3,109 0,006 1,062
	rolA5	222/84 217/77 298/83	1 Locus 1 Locus 1 Locus	1,062 0,126 1,098

Plasmid	Transformand	Aufspaltung KnR:KnS	Anzahl chromosomaler T-DNA-Insertionen	χ^2 Wert für Insertionsanzahl
pBIN19 DR5-mgfp4 alcA-rolC	rolC2	315/90 238/82	1 Locus 1 Locus	0,865 0,033
	rolC3	126/41 185/50 88/26	1 Locus 1 Locus 1 Locus	0,001 0,967 0,122
	rolC4	Alle grün Alle grün	Mind. 2 Loci Mind. 2 Loci	
	rolC4+	128/32 175/52 232/106	1 Locus 1 Locus 1 Locus	1,147 0,659 3,455
	rolC5	269/117 196/66 255/70	1 Locus 1 Locus 1 Locus	2,786 0,006 1,044
	rolC6	Alle grün Alle grün	Mind. 2 Loci Mind. 2 Loci	
	rolC7	329/113 263/81 130/64	1 Locus 1 Locus 1 Locus	0,045 0,198 3,101

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Mark Varrelmann für die Überlassung des Themas, die stete Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft, die hilfreichen Ratschläge und Anregungen, sowie für die gewährte freie und persönliche Gestaltung meiner Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Winkelmann für die spontane Übernahme des Korreferats.

Den Mitarbeitern der Abteilung Pflanzenvirologie möchte ich aufrichtig für ihre Geduld, die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre stete Hilfsbereitschaft danken, sowie allen weiteren Mitarbeitern des Instituts.

Mein besonderer Dank gilt Heike Thiel für das genaue Lesen der Arbeit und ihre stete Diskussionsbereitschaft.

Der deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit.

Bei Dr. Mark Zahn möchte ich für die für die Überlassung des Petuniensaatguts bedanken. Prof. Schmülling und Dr. Fladung danke ich für die zur Verfügung gestellten Plasmide.

Abschließend möchte ich meinen ganz besonderen Dank meinen Eltern aussprechen, die immer auf mich vertraut und mich immer unterstützt haben.

E r k l ä r u n g e n

1. Hiermit erkläre ich, daß diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits anderen Prüfungsbehörden vorgelegen hat.

Weiter erkläre ich, daß ich mich an keiner anderen Hochschule um einen Doktorgrad beworben habe.

Göttingen, den .....

2. Hiermit erkläre ich eidesstattlich, daß diese Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

Göttingen, den .....

Lebenslauf

Name:	Elke Nitschke
Geburtsdatum:	11.03.1978 in Saalfeld/Saale
Schulausbildung:	1984 – 1986 Max Kabisch-Schule, Saalfeld 1986 – 1991 Wladimir Komarov-Oberschule, Saalfeld 1991 – 1996 Heinrich Böll-Gymnasium Saalfeld Abschluss: Abitur
Hochschulausbildung:	1997 – 2002 Studium Gartenbauwisenschaften an der Universität Hannover 2001 – 2002 Diplomarbeit am Institut für Angewandte Genetik und Pflanzenzüchtung der Universität Hannover Thema: „Untersuchungen zur *in vitro*-Regeneration und *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von *Impatiens walleriana*“ 31.07.2002 Abschluss Dipl.-Ing.agr. 2002 – 2005 Anfertigung einer Dissertation am Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Georg-August Universität Göttingen
Praktika:	07-08/1998 Zierpflanzengärtnerei Gerboth, Saalfeld-Crösten 02-04/1999 Zierpflanzengärtnerei Hartse, Seelze 07-10/2000 Staudengärtnerei Zinser, Hannover-Isernhagen
Berufliche Tätigkeit:	08/2002-08/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, Universität Göttingen seit 08/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Zuckerrübenforschung (IfZ), Göttingen